

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 923**

51 Int. Cl.:

C07C 243/26	(2006.01) C07K 5/10	(2006.01)
C07C 271/22	(2006.01) A61K 47/60	(2007.01)
A61K 9/14	(2006.01) A61K 47/69	(2007.01)
A61K 31/351	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
A61K 31/437	(2006.01)	
A61K 33/24	(2009.01)	
C07D 339/04	(2006.01)	
C07C 323/52	(2006.01)	
C07C 323/60	(2006.01)	
C07K 5/06	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2016 PCT/CN2016/090893**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2017 WO17012568**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2016 E 16827259 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3325440**

54 Título: **Enlazadores sensibles al pH para suministrar un agente terapéutico**

30 Prioridad:

22.07.2015 US 201562195654 P

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

04.12.2020

73 Titular/es:

**GNT BIOTECH & MEDICALS CORPORATION
(100.0%)
1F, No.52, Lane 258 Ruiguang Rd., Neihu District
Taipei City 114, TW**

72 Inventor/es:

**LIAO, YU-JUNG;
HUANG, WEI-JAN;
CHEN, CHIA-NAN;
LIN, HUAN-YU;
LIN, CHING-YI;
 TSAI, MENG-JU;
HSU, WAN-YI;
CHI, LI-LING;
CHAO, YE-SU y
WU, YI-HONG**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 797 923 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

Enlazadores sensibles al pH para suministrar un agente terapéutico

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un enlazador que puede unirse con un agente y una nanopartícula. En particular, el enlazador de la invención es sensible al pH y puede unirse simultáneamente a nanopartículas y a agentes de especies iguales o diferentes.

10

Antecedentes de la invención

El suministro específico y eficiente de compuestos terapéuticos y diagnósticos a células, especialmente al citosol, es un objetivo principal de muchas compañías farmacéuticas. Se ha usado una serie de diferentes enfoques para aumentar la especificidad y la captación. Por ejemplo, se ha usado ampliamente la nanotecnología en el desarrollo de nuevas estrategias para el suministro de fármacos y terapias contra el cáncer. Se han desarrollado nanosistemas sensibles al pH en los que la liberación del fármaco se provoca específicamente por el ambiente ácido del tumor y dichos sistemas pueden mejorar la eficacia del tratamiento contra el cáncer. Feng Wnang et al. han desarrollado un sistema de suministro de fármaco mediante el anclaje de doxorubicina a la superficie de AuNP con un espacio de poli(etilenglicol) por medio de un enlace lábil a ácidos (American Chemical Society, 2011, Vol. 5, n.º 5, págs. 3679-3692). Tian-Meng Sun et al., divulgan una terapia contra células madre de cáncer que usa doxorubicina conjugada a nanopartículas de oro por medio de enlaces hidrazona (Biomaterials 35, 2014, págs. 836-845). El documento US 2013/0331764 se refiere a un método para suministrar un fármaco anticáncer a células cancerosas mediante la unión del fármaco anticáncer a nanopartículas de metal sensibles al pH para que se separen en las células cancerosas. El documento WO 2013/139942 proporciona una nanopartícula que comprende una nanopartícula de metal y al menos un enlazador.

15

20

25

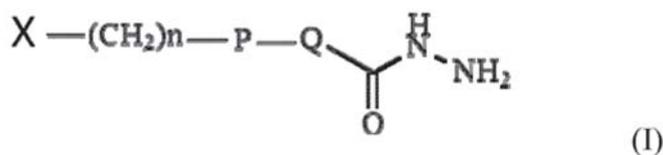
30

Hyejin Park et al, Biomaterials, 35, 10, 2014, 3480-3487 describe la formación de un sistema de suministro de fármaco usando nanoesferas de oro junto con cuatro péptidos penetrantes en células α -helicoidales y evalúa sus actividades de penetración en células y de muerte celular.

Sin embargo, sigue habiendo necesidad de desarrollar un sistema de suministro sensible al pH que tenga una mejor eficacia.

35 **Sumario de la invención**

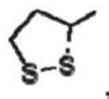
Se proporciona un enlazador sensible al pH que tiene la siguiente fórmula (I),



40

en donde

X es



45

-SH, -NH₂, Boc-NH-, Fmoc-NH-, -COOH;

n es de 1 a 6;

P es -C(O)NH- o -C(O)O-;

50

Q es -R(CH₂CH₂O)_m-, R(-C(O)NH-)_z o -R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]Y;

R es un enlace, -alquilo C₁₋₁₂ o alcoxi C₁₋₁₀;

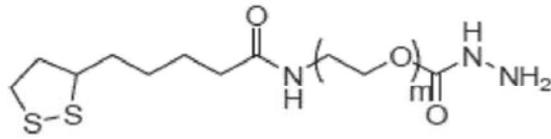
m es de 1 a 12;

z es de 1 a 4; y

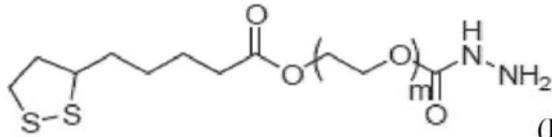
Y es de 1 a 12.

55

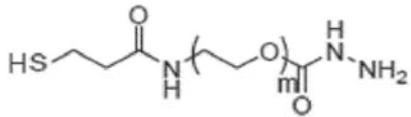
En algunas realizaciones, el enlazador tiene la siguiente fórmula:



(Enlazador I-amida);

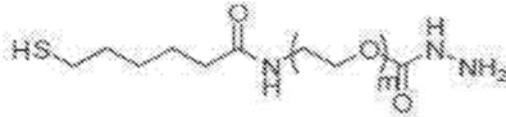


(Enlazador I-C(O)O; Enlazador III);

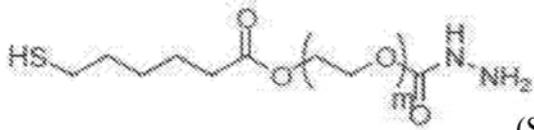


(SH-C₂-enlazador I);

5

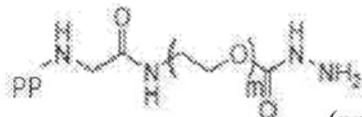


(SH-C₅-enlazador-I-amida);



(SH-C₅-enlazador-I-C(O)O-; HS-C₅-enlazador-III);

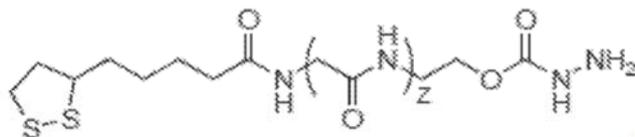
10



(ppNH-C₁-enlazador-I-amida);

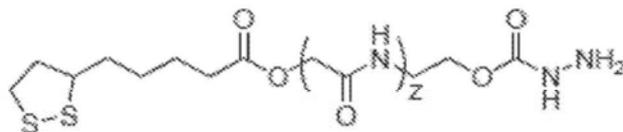


(ppNH-C₁-enlazador-I-C(O)O-; NH₂-C₁-enlazador-III-C(O)O-);

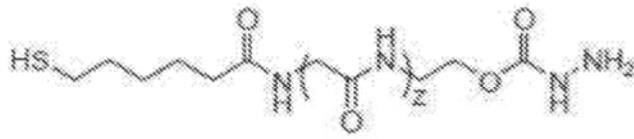


(Enlazador II-amida);

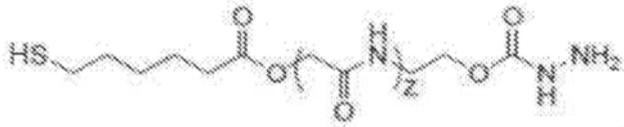
15



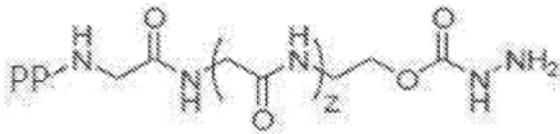
(Enlazador II-C(O)O-);



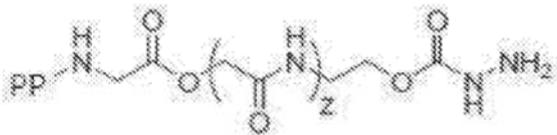
(SH-C₅-enlazador-II-amida);



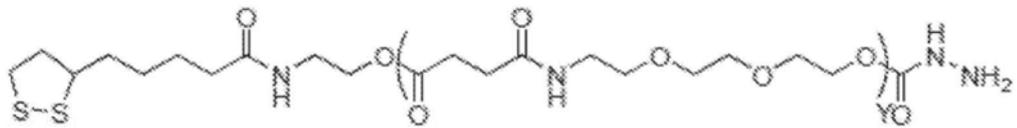
(SH-C₅-enlazador-II-C(O)O-);



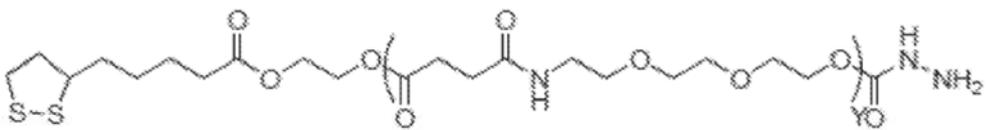
(ppNH-C₁-enlazador-II-amida);



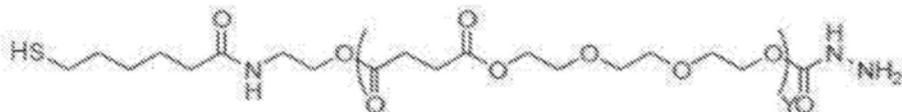
(ppNH-C₁-enlazador-II-C(O)O-);



(Enlazador IV-amida);

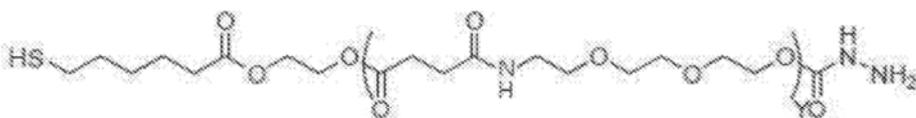


(Enlazador IV-C(O)O-);



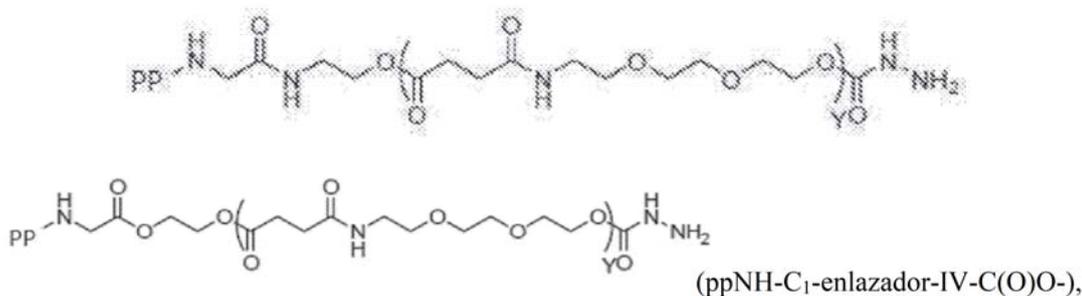
(SH-C₅-
enlazador IV-amida);

(SH-C₅-



(SH-C₅-
enlazador IV-C(O)O-);

(SH-C₅-



5 en donde pp es Boc o Fmoc.

La invención también proporciona un complejo de nanopartícula metálica, que comprende una nanopartícula metálica complejada con uno o más enlazadores de la invención, opcionalmente complejada con uno o más PEG. En una realización, la nanopartícula metálica es una nanopartícula de Au, Pd, Pt o Ag. En una realización, el enlazador es igual o diferente. Más preferentemente, el complejo de nanopartícula metálica comprende varios enlazadores con diferentes longitudes moleculares.

La invención también proporciona una composición que comprende uno o más complejos de nanopartículas metálicas que unen uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico iguales o diferentes y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un sistema de suministro de fármaco, que comprende uno o más complejos de nanopartícula metálica que enlazan uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico iguales o diferentes.

20 Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1 (A) a (C) muestran que el anticuerpo p24 anti-VIH-1 (mAb3) conjugado sobre nanopartículas de oro (Au/IKI-1/mAb-p24) siguió mostrando afinidad de unión. (A) El espectro de absorción del complejo Au/IKI-1/mAb-p24 y de Au. El complejo Au/IKI-1/mAb-p24 muestra un desplazamiento al rojo de 2 nm en el pico de plasmón. (B) Los complejos Au/IKI-1/mAb-p24 mostraron fluorescencia detectada con anticuerpos secundarios con Alexa Fluor 568. (C) Se usó el ensayo ELISA para demostrar la formación del complejo Au/IKI-1/mAb-p24 y la actividad de unión del antígeno p24 para compararla con la de mAb-p24.

Las figuras 2 (A) a (B) muestran el espectro de absorción de anticuerpos dirigidos contra EGFR (receptor de factor de crecimiento epidérmico) conjugados con nanopartículas de oro (Au/IKI-1/Ab-EGFR y Au/IKI-5/Ab-EGFR) y Au. (A) El complejo Au/IKI-1/Ab-EGFR muestra un desplazamiento al rojo de 1 nm en el pico de plasmón. (B) El complejo Au/IKI-5/Ab-EGFR muestra un desplazamiento al rojo de 1 nm en el pico de plasmón.

La figura 3 muestra el espectro de absorción de anticuerpos Trastuzumab (Tras) conjugados sobre nanopartículas de oro (Au/IKI-1/Tras) y Au. El complejo Au/IKI-1/Tras muestra un desplazamiento al rojo de 8 nm en el pico de plasmón.

La figura 4 (A) a (C) muestran que Etanecept (ETA) conjugado sobre nanopartículas de oro (Au/IKI-1/ETA) siguen mostrando la afinidad de unión. (A) El espectro de absorción del complejo Au/IKI-1/ETA y de Au. El complejo Au/IKI-1/ETA muestra un desplazamiento al rojo de 2 nm en el pico de plasmón. (B) El complejo Au/IKI-1/ETA mostró fluorescencia detectada con anticuerpos secundarios con Alexa Fluor 568. (C) Imágenes de TEM del complejo Au/IKI-1/ETA, se observó unión de anticuerpos anti-IgG humana secundarios marcados con oro de 1-5 nm a EDTA ubicado sobre la superficie de Au.

La figura 5 muestra el espectro de absorción del complejo de Au/IKI-1/Dox y Au. Los datos de UV/vis, la longitud de onda, muestra un desplazamiento al rojo de 3 nm en el complejo Au/IKI-1/Dox.

La figura 6 (A) a (D) muestra el tratamiento de tumores de mama MDA-MB-231. (A) Cambio de peso neto del animal (g) durante el tratamiento. A partir de los datos, la doxorubicina y Au/IKI-1/Dox causaron una pérdida de peso de más del 20 % y del 3 % en ratones desnudos (N=3), respectivamente. Esto significa que el complejo Au/IKI-1/Dox en comparación con doxorubicina tuvo mucha menos toxicidad en ratones desnudos. (B) La inhibición del crecimiento de tumores de mama de MDA-MD-231 (N=3): Dox > Au/IKI-1/Dox > Au/PEG=PBS. (C) Imágenes de TEM de células de tumor mamario MDA-MB-231 tratadas con complejo de Au/IKI-1/Dox; se determinó fácilmente el complejo de Au/IKI-1/Dox en el tumor en el modelo de xenoinjerto. (D) Inmunohistoquímica de especímenes de tumor. Se tomaron especímenes de tumor mamario de los ratones, se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se observa más necrosis en los tumores de ratones tratados con doxorubicina que en tumores de ratones tratados con complejo Au/IKI-1/Dox.

55 Descripción detallada de la invención

La invención se basa al menos en el descubrimiento de un enlazador sensible al pH que puede unirse simultáneamente a nanopartículas metálicas y a uno o más agentes con diversos tamaños moleculares. El enlazador de la invención puede suministrar los agentes a células implicadas en procesos patológicos o cerca de las

células, de tal forma que los agentes pueden dirigirse y afectar selectivamente a las células. El suministro dirigido proporcionado por el enlazador de la invención puede usarse, por ejemplo, para detección de enfermedades, formación de imágenes, suministro de fármacos y terapia.

5 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido por un experto en la materia. Todas las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones citadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad a menos que se indique otra cosa. En caso de que haya varias definiciones para un término del presente documento, a menos que se indique lo contrario, prevalecen las indicadas en esta sección.

10 El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos en tanto que muestren la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpo (como se describe en más detalle en el presente documento). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

15 El término "tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a un crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes, como se cita en el presente documento.

20 El término "cáncer", como se usa en el presente documento, se refiere a la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por el crecimiento/proliferación celular no regulada. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin), blastoma, sarcoma y leucemia, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o
30 uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

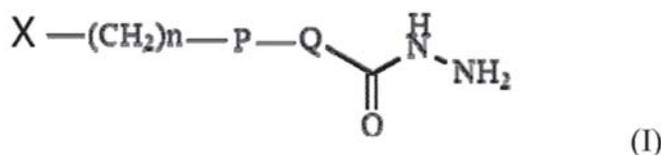
35 Como se usan en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento", "terapéutico" o "terapia" no significan necesariamente la curación total o la supresión de la enfermedad o afección. Cualquier alivio de cualquier señal o síntoma no deseado de una enfermedad o afección, en cualquier medida, se puede considerar tratamiento y/o terapia. Además, el tratamiento puede incluir acciones que pueden empeorar la sensación general de bienestar o la apariencia del paciente.

40 Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

45 Una cantidad terapéuticamente eficaz de una sustancia/molécula de la invención puede variar dependiendo de factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo y de la capacidad de la sustancia/molécula, para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que los efectos tóxicos o perjudiciales de la sustancia/molécula se ven superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Generalmente, pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa más temprana de la
50 enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz puede ser menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

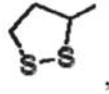
La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto que no provoca irritación significativa a un organismo al que se administra y no suprime la actividad biológica y propiedades del compuesto.

55 En un aspecto, La invención proporciona un enlazador sensible al pH que tiene la siguiente fórmula (I),



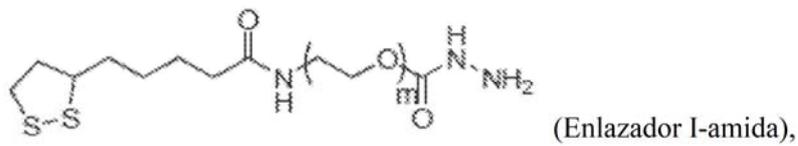
en donde

60 X es



- 5 -SH, -NH₂, Boc-NH-, Fmoc-NH-, -COOH;
 n es de 1 a 6;
 P es -C(O)NH- o -C(O)O-;
 Q es -R(CH₂CH₂O)_m-, R(-C(O)NH-)z o -R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]Y;
 R es un enlace, -alquilo C₁₋₁₂ o alcoxi C₁₋₁₀;
 m es de 1 a 12;
 10 z es de 1 a 4; y
 Y es de 1 a 12.

En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



15

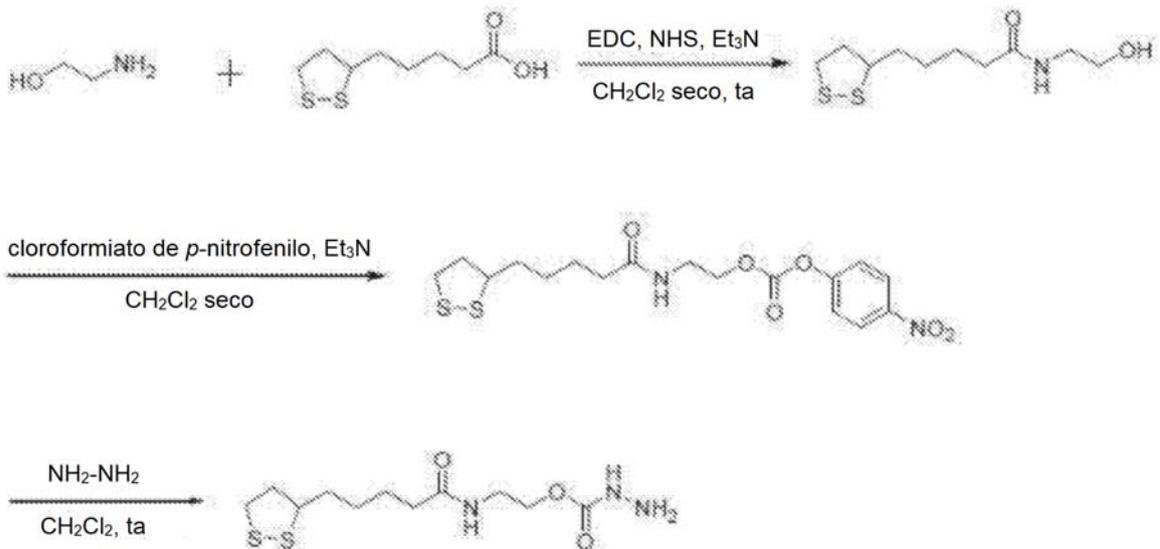
en donde m es de 1 a 12.
 El enlazador I-amida tiene la fórmula (I) en donde X es



20

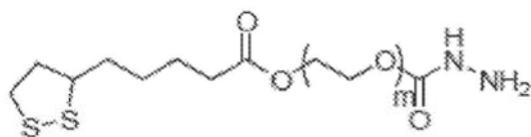
n es 4, P es C(O)NH, R es un enlace y Q es -R(CH₂CH₂O)_m-. Preferentemente, m es un número entero de 1 a 6.
 Más preferentemente, m es un número entero de 2.

- 25 Los enlazadores del enlazador I-amida de la presente invención puede prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.



30

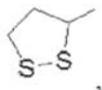
En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



(Enlazador I-C(O)O; Enlazador III)

en donde m es de 1 a 12.

5 El enlazador I-C(O)O (enlazador III) tiene la fórmula (I) en donde X es

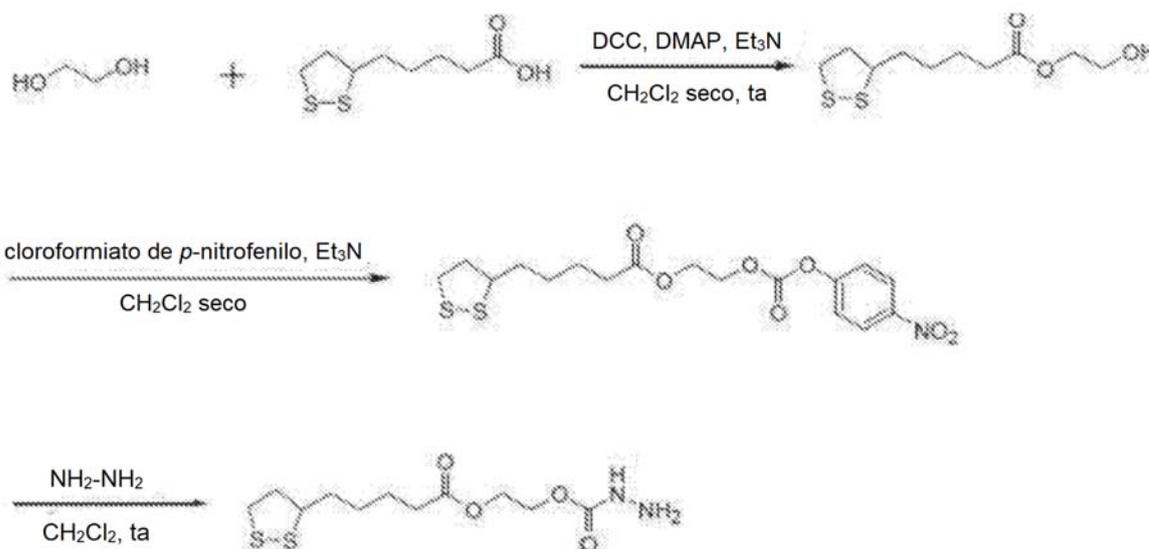


10

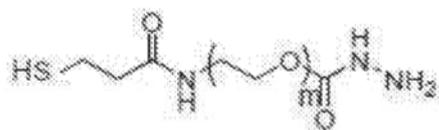
n es 4, P es -C(O)O-, R es un enlace, Q es -R(CH₂CH₂O)_m- y m es de 1 a 12. Más preferentemente, m es un número entero de 2.

Los enlazadores del enlazador I-C(O)O (enlazador III) de la presente invención puede prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.

15



En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



(SH-C₂-enlazador I);

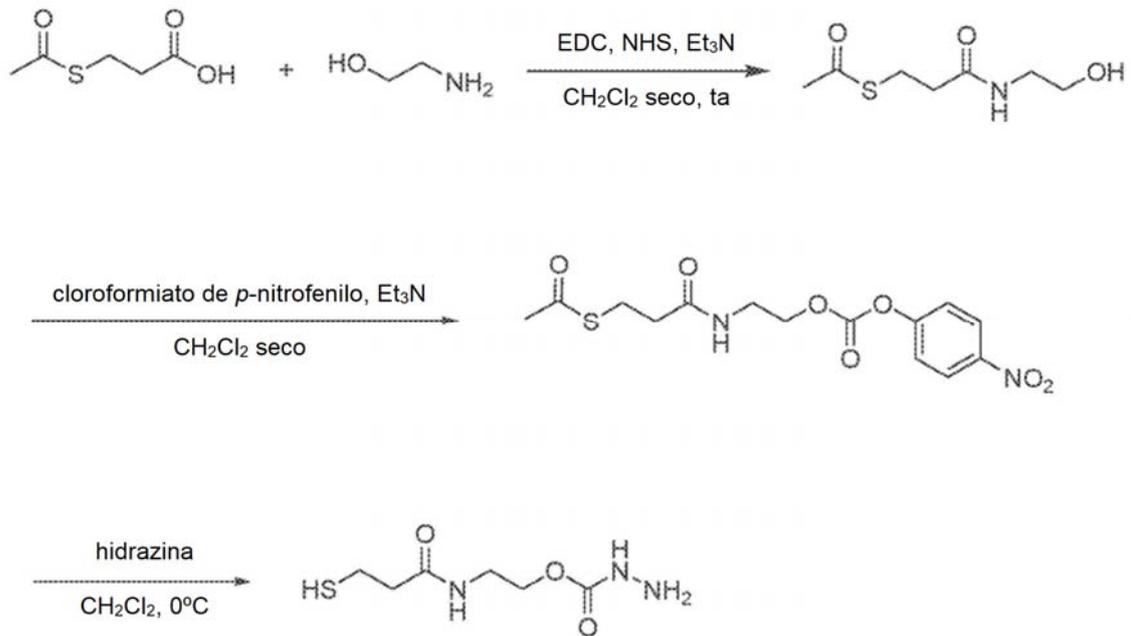
20

en donde m es de 1 a 12.

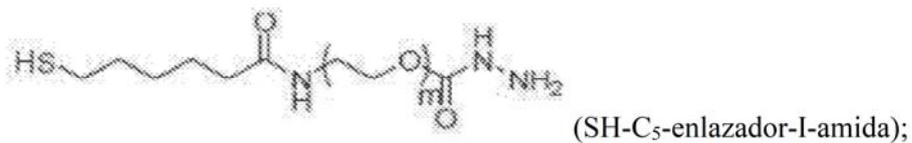
El enlazador SH-C₂-enlazador-I tiene la fórmula (I) en donde X es -SH, n es 2, P es -C(O)NH-, R es un enlace, Q es -R(CH₂CH₂O)_m- y m es de 1 a 12. Más preferentemente, m es un número entero de 2.

25

Los enlazadores de SH-C₂-enlazador-I de la presente invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.



En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



5

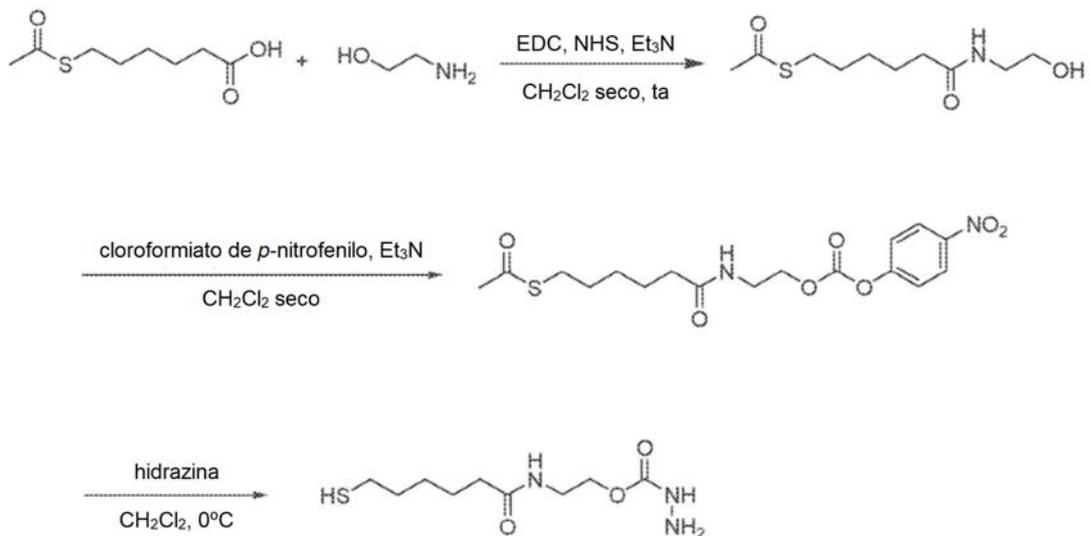
en donde m es de 1 a 12.

El enlazador SH-C₅-enlazador-I-amida tiene la fórmula (I) en donde X es -SH, n es 5, P es -C(O)NH-, R es un enlace, Q es -R(CH₂CH₂O)_m- y m es de 1 a 12. Más preferentemente, m es un número entero de 2.

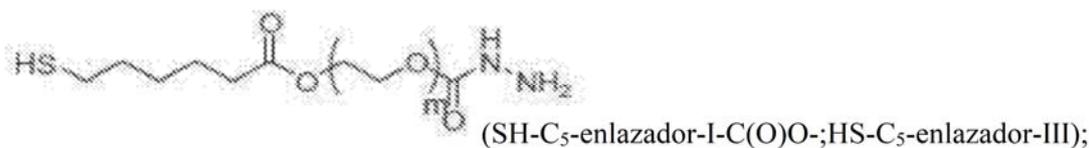
10

Los enlazadores de SH-C₅-enlazador-I-amida de la presente invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.

15



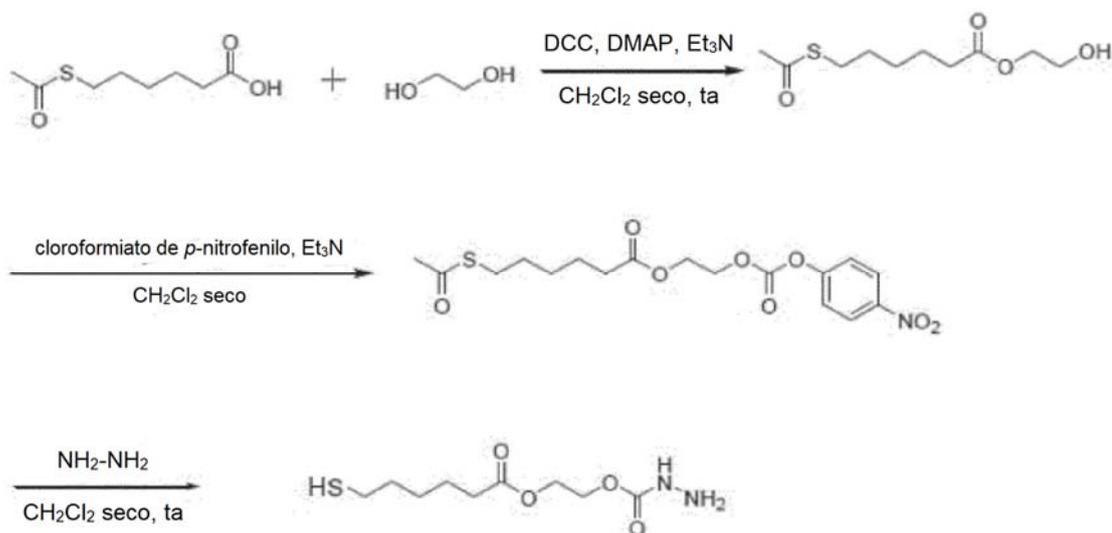
En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



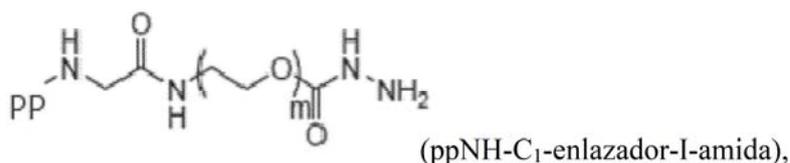
en donde m es de 1 a 12.

- 5 SH-C₅-enlazador-I-C(O)O-(SH-C₅-enlazador-III) tiene la fórmula (I) en donde X es -SH, n es 5, P es -C(O)O-, R es un enlace, Q es -R(CH₂CH₂O)_m- y m es de 1 a 12. Preferentemente, m es un número entero de 1 a 6. Más preferentemente, m es un número entero de 2.

- 10 Los enlazadores de SH-C₅-enlazador-I-C(O)O-(SH-C₅-enlazador-III) de la presente invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.



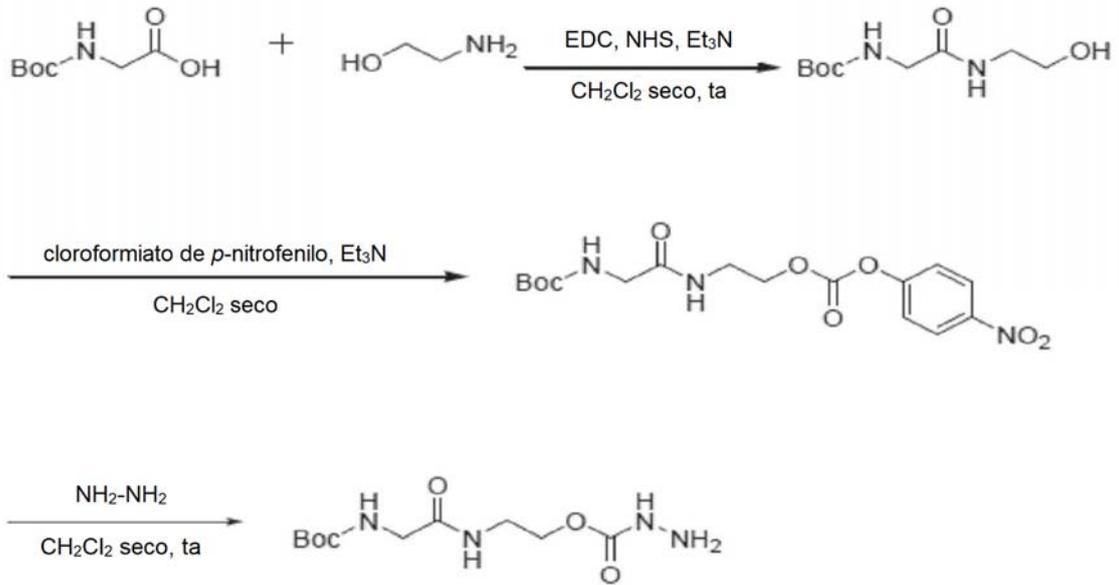
- 15 En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



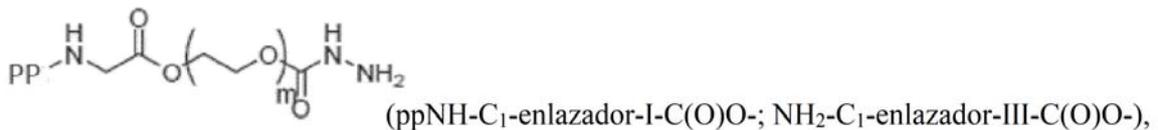
en donde pp es un grupo protector que es Boc o Fmoc; y m es de 1 a 12.

- 20 NH₂-C₁-enlazador-I-amida tiene la fórmula (I) en donde X es pp-NH-; pp es un grupo protector que es Boc o Fmoc, n es 1, P es -C(O)NH-, R es un enlace, Q es -R(CH₂CH₂O)_m- y m es de 1 a 12. Preferentemente, m es un número entero de 1 a 6. Más preferentemente, m es un número entero de 2.

- 25 Los enlazadores de NH₂-C₁-enlazador-I-amida de la presente invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.



En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



5

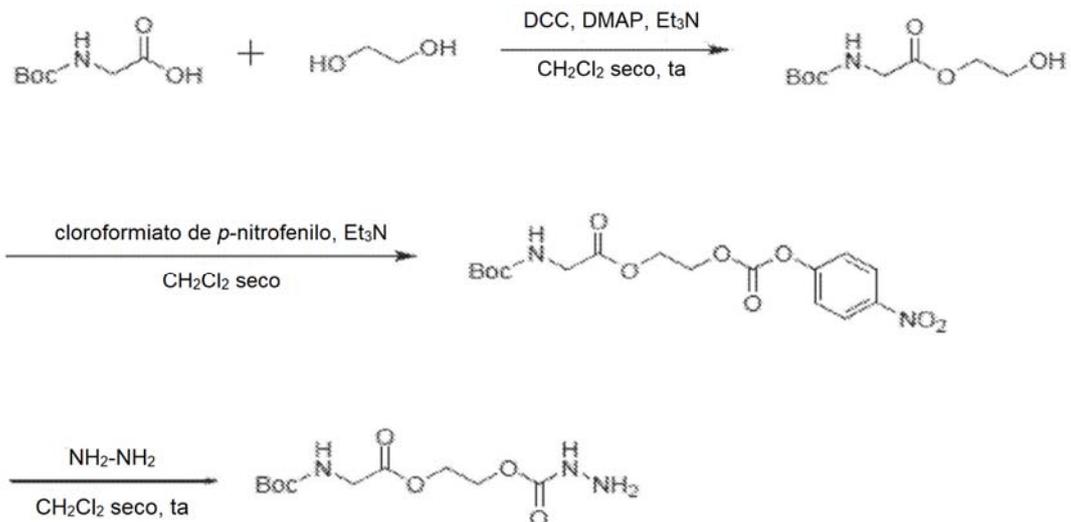
en donde

10 pp es un grupo protector que es Boc o Fmoc; y
m es de 1 a 12.

ppNH-C₁-enlazador-I-C(O)O-(ppNH-C₁-enlazador-III-C(O)O-) tiene la fórmula (I) en donde X es pp-NH- (pp es un grupo protector que es Boc o Fmoc), n es 1, P es -C(O)O-, R es un enlace, Q es -R(CH₂CH₂O)_m- y m es de 1 a 12. Preferentemente, m es un número entero de 1 a 6. Más preferentemente, m es un número entero de 2.

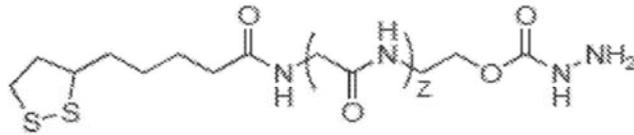
15

Los enlazadores de ppNH-C₁-enlazador-I-C(O)O-(ppNH-C₁-enlazador-III-C(O)O-) de la presente invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.



20

En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



(Enlazador II-amida),

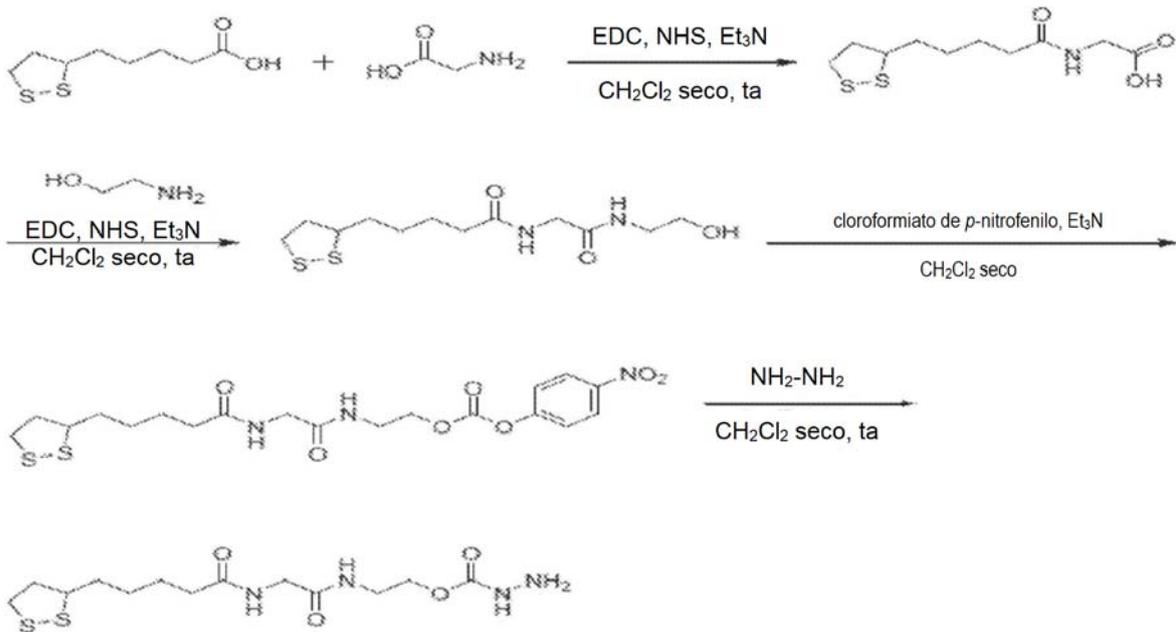
5 en donde z es de 1 a 4.

El enlazador II-amida tiene la fórmula (I) en donde X es

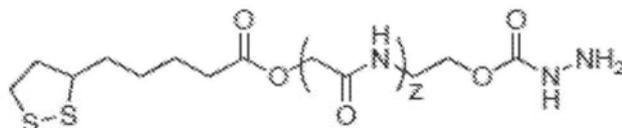


10 n es 4, P es -C(O)NH-, R es un enlace, Q es R-(CH₂C(O)NH)-z y z es de 1 a 4. Más preferentemente, z es un número entero de 3.

15 Los enlazadores de enlazador II-amida de la presente invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.



20 En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



(Enlazador II-C(O)O-),

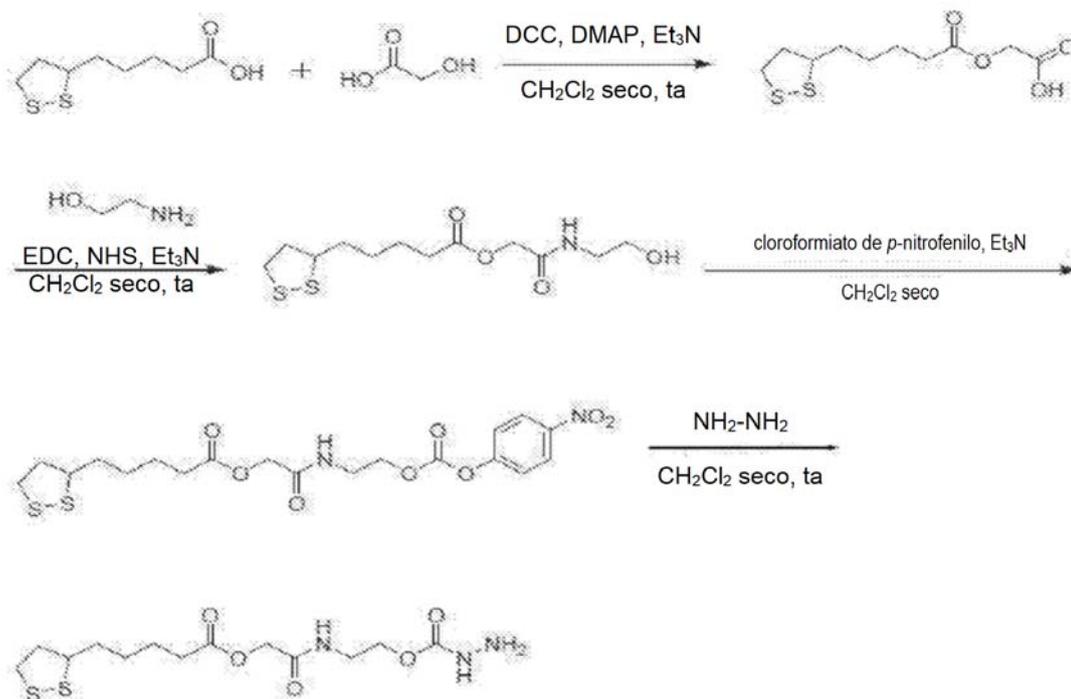
en donde z es de 1 a 4.

25 El enlazador II-C(O)O- tiene la fórmula (I) en donde X es

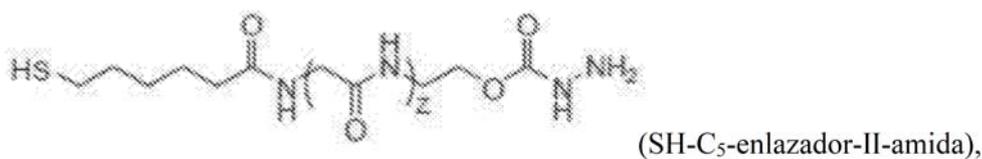


n es 4, P es -C(O)O-, R es un enlace, Q es R(-CH₂C(O)NH-)z y z es de 1 a 4. Más preferentemente, z es un número entero de 3.

5 Los enlazadores de enlazador II-C(O)O- de la presente invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.



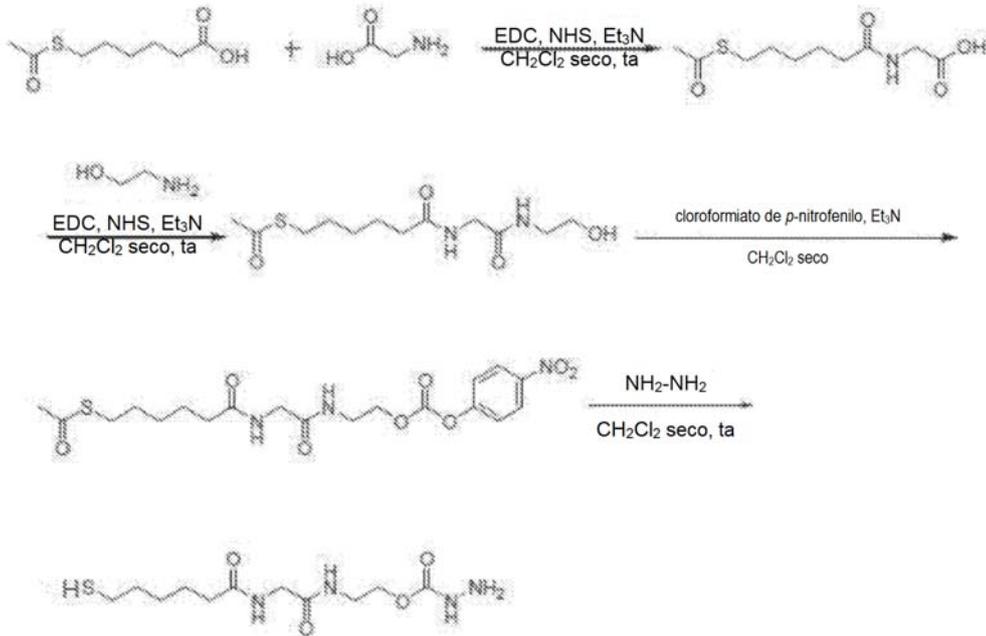
10 En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



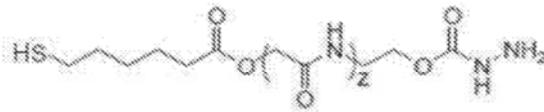
15 en donde z es de 1 a 4.

20 SH-C₅-enlazador-II-amida tiene la fórmula (I) en donde X es -SH, n es 5, P es -C(O)NH-, R es un enlace, Q es R(-CH₂C(O)NH-)z y z es de 1 a 4. Más preferentemente, z es un número entero de 3.

En otra realización, n es 2. Los enlazadores de SH-C_{2.5}-enlazador-II-amida de la presente invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.



En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



(SH-C₅-enlazador-II-C(O)O-),

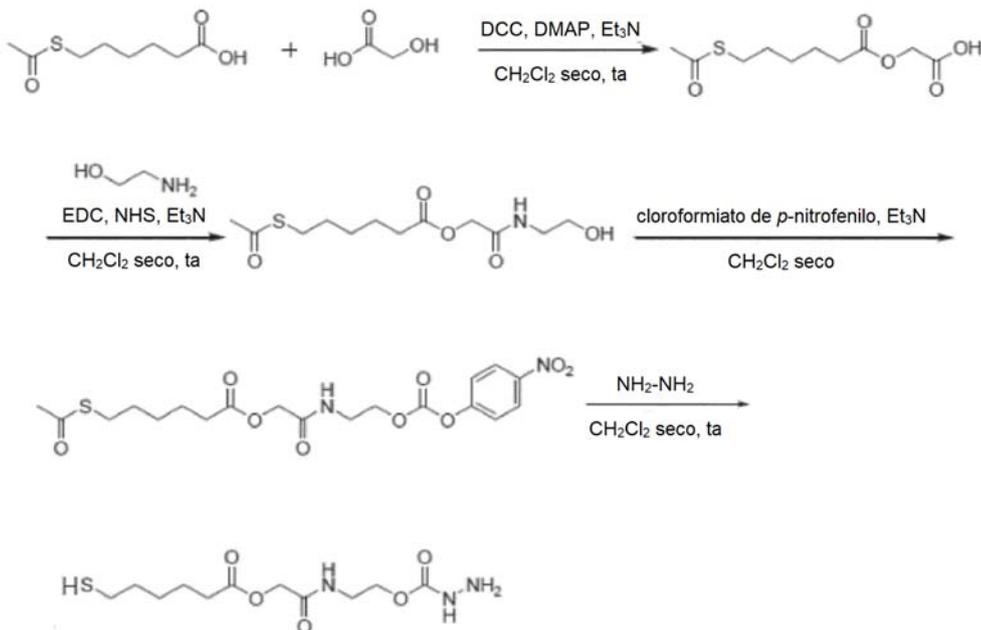
5

en donde z es de 1 a 4.

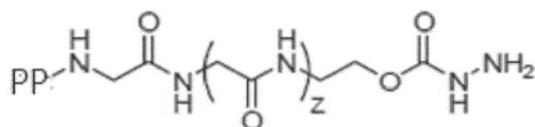
10 SH-C₅-enlazador-II-C(O)O- tiene la fórmula (I) en donde X es CH₃C(O)S-, n es 5, P es -C(O)O-, R es un enlace, Q es R(-CH₂C(O)NH-)z y z es de 1 a 4. Más preferentemente, z es un número entero de 3.

15

En otra realización, n es 2. Los enlazadores de SH-C₂₋₅-enlazador-II-C(O)O- de la presente invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.



En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



(ppNH-C₁-enlazador-II-amida),

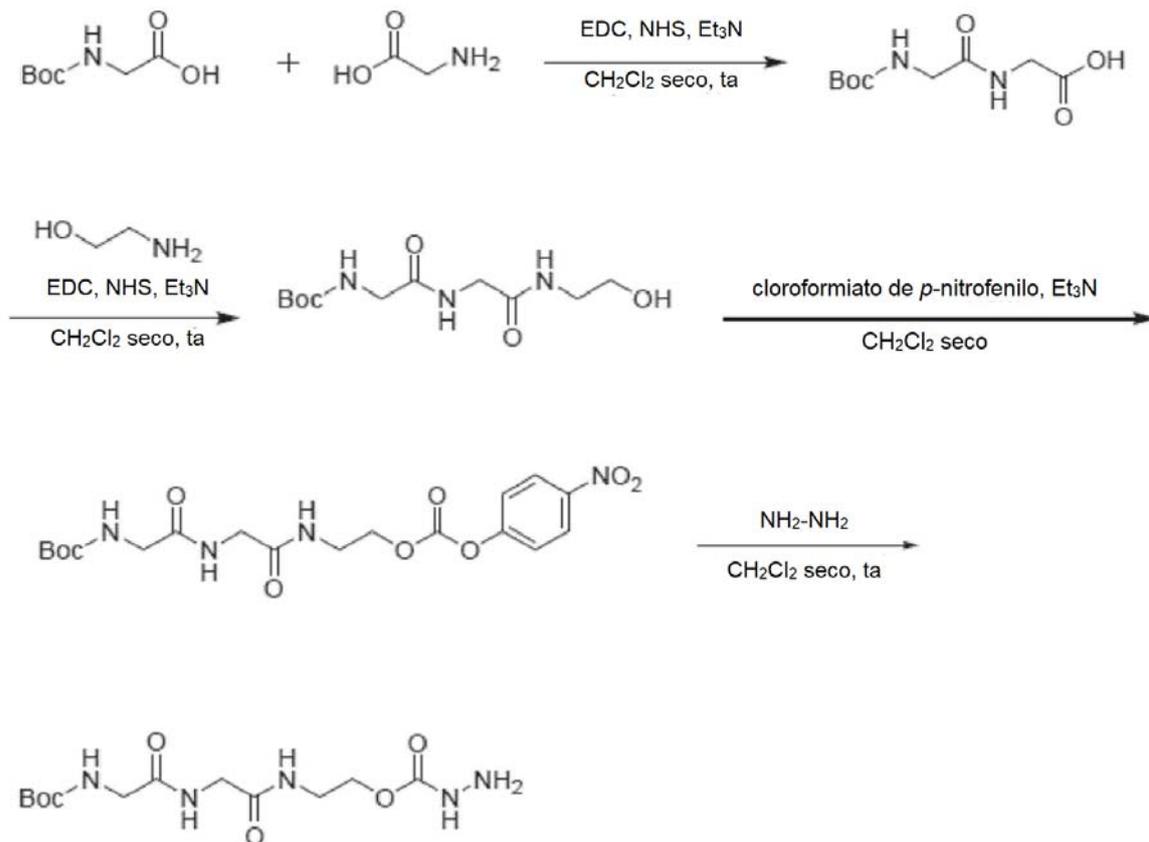
5

en donde pp es un grupo protector que es Boc o Fmoc; y
z es de 1 a 4.

ppNH-C₁-enlazador-II-amida tiene la fórmula (I) en donde X es pp-NH-; pp es un grupo protector (tal como Boc o Fmoc), n es 1, P es -C(O)NH-, R es un enlace, Q es R-C(O)NH-z y z es de 1 a 4. Más preferentemente, z es un número entero de 3.

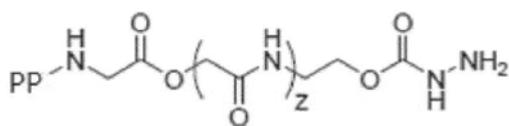
Los enlazadores de ppNH-C₁-enlazador-II-amida de la presente invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.

15



20

En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



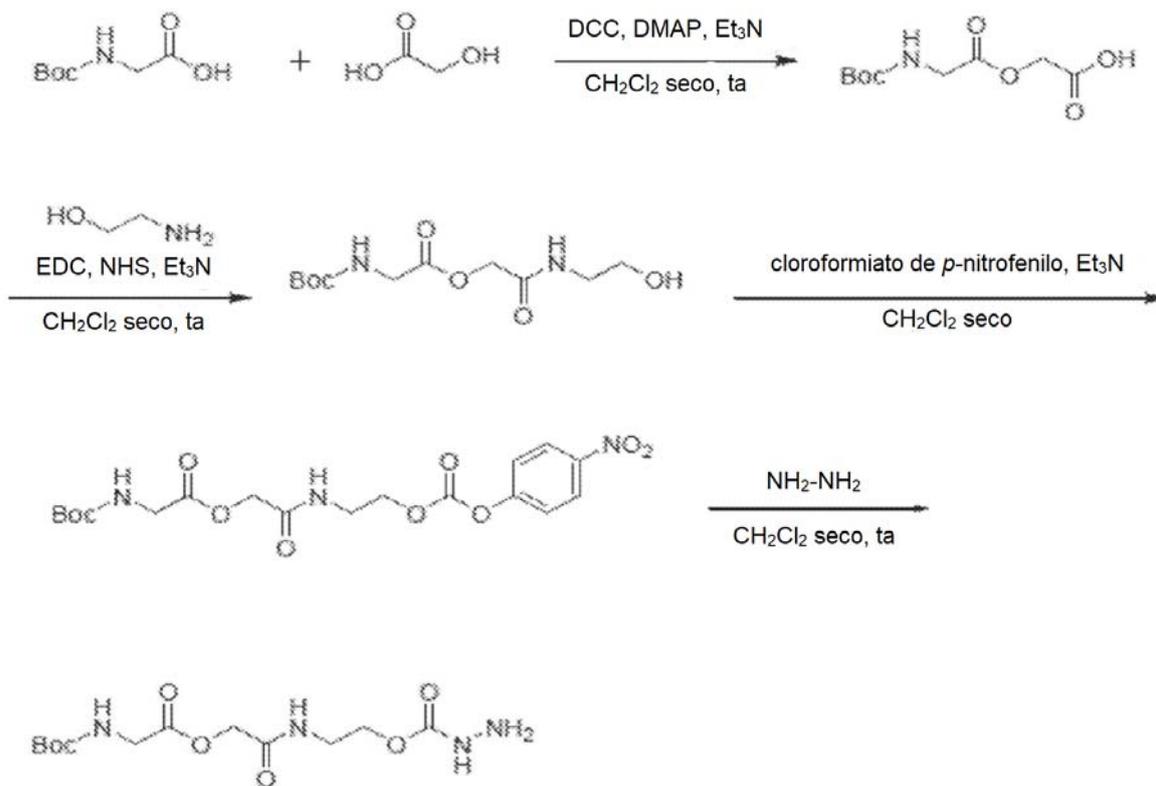
(ppNH-C₁-enlazador-II-C(O)O),

en donde pp es un grupo protector que es Boc o Fmoc; y

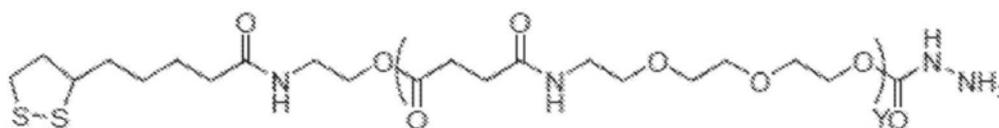
z es de 1 a 4.

ppNH-C₁-enlazador-II-C(O)O- tiene la fórmula (I) en donde X es pp-NH-; pp es un grupo protector que es Boc o Fmoc, n es 1, P es -C(O)O-, R es un enlace, Q es R(-C(O)NH-)z y z es de 1 a 4. Más preferentemente, z es un número entero de 3.

Los enlazadores de ppNH-C₁-enlazador-II-C(O)O- de la presente invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.



En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



(Enlazador IV-amida),

en donde Y es de 1 a 12.

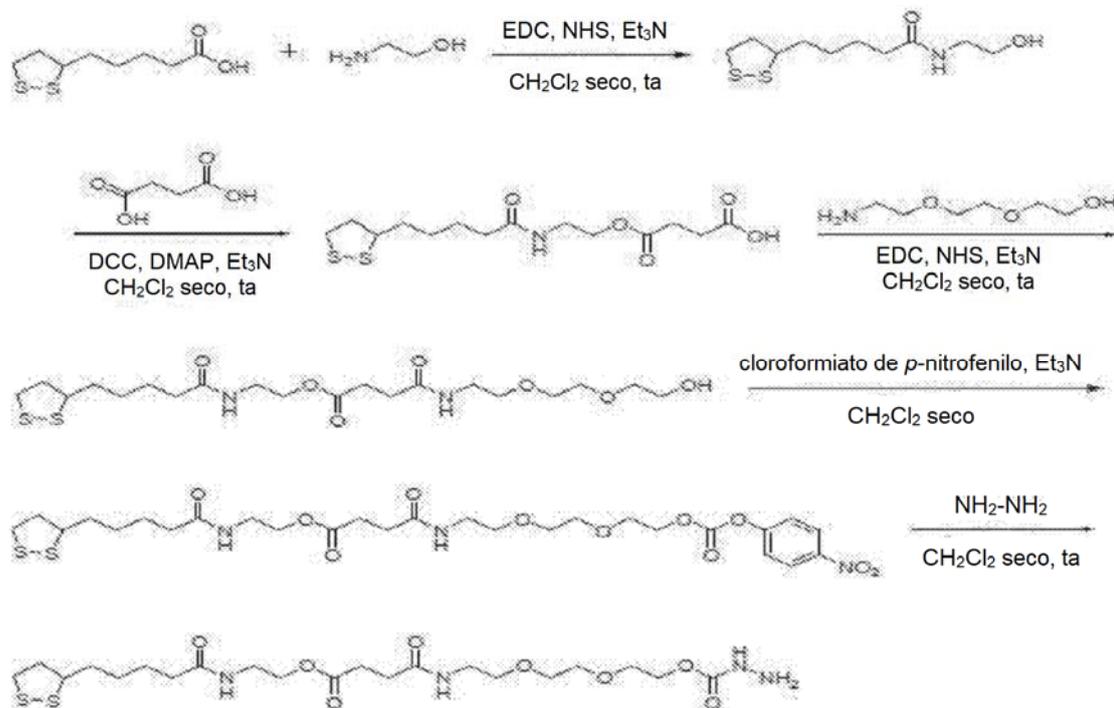
El enlazador IV-amida tiene la fórmula (I) en donde X es



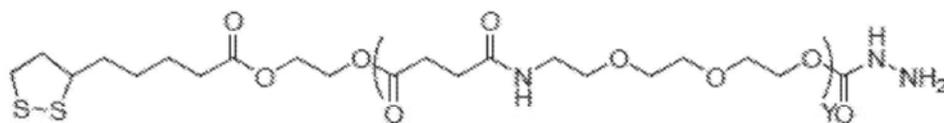
n es 4, P es -C(O)NH-, R es -CH₂CH₂O-, Q es -R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]_Y, m es 3 e Y es de 1 a 12. Preferentemente, m es 2 e Y es 2.

En otra realización, m es 1-12. Los enlazadores de enlazador IV-amida de la presente invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los

enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.



5 En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



(Enlazador IV-C(O)O-),

en donde Y es de 1 a 12.

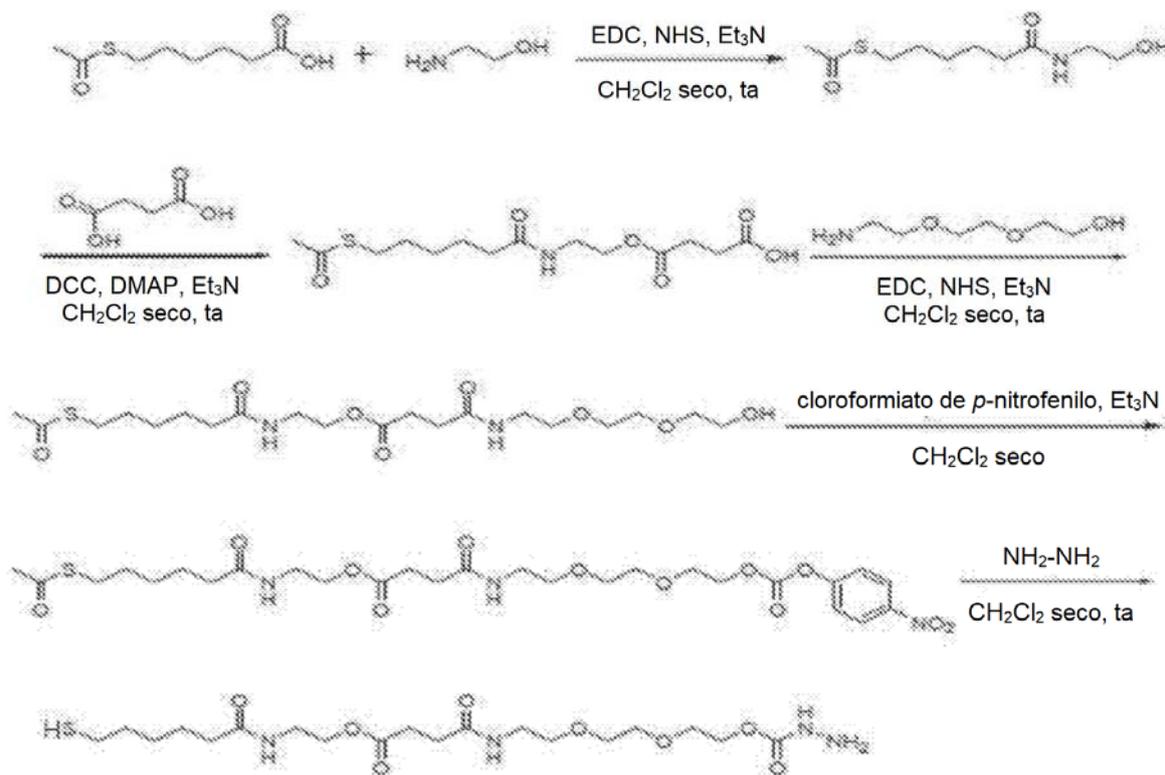
10

El enlazador IV-C(O)O- tiene la fórmula (I) en donde X es

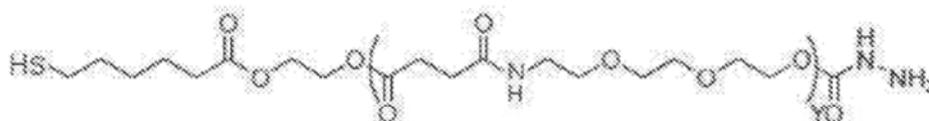


15 n es 4, P es -C(O)O-, R es -CH₂CH₂O-, Q es -R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]_Y, m es 3 e Y es de 1 a 12. Más preferentemente, Y es un número entero de 2.

20 En otra realización, m es 1-12. Los enlazadores de enlazador IV-C(O)O- de la presente invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.



En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:



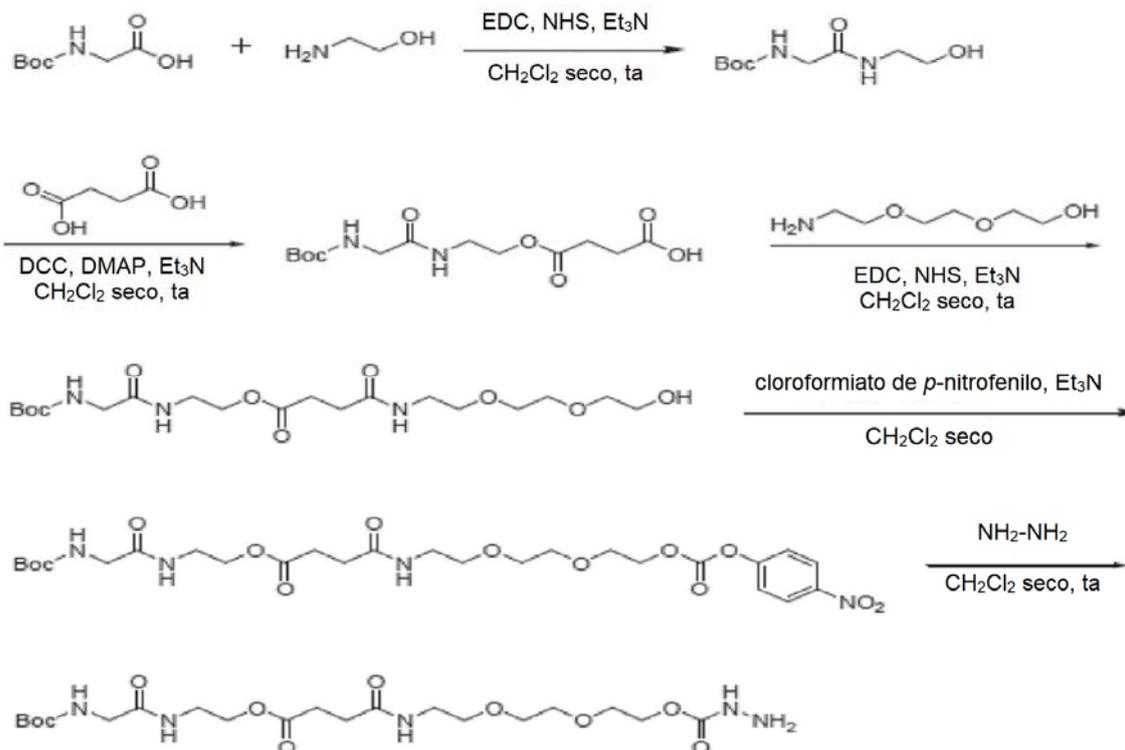
(SH-C₅-enlazador-IV-C(O)O),

5

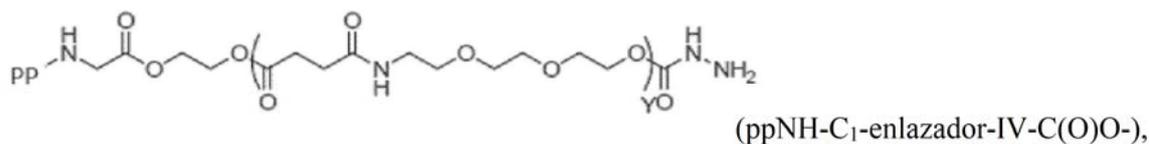
en donde Y es de 1 a 12.

10 SH-C₅-enlazador-IV-C(O)O- tiene la fórmula (I) en donde X es CH₃C(O)S-, n es 5, P es -C(O)O-, R es -CH₂CH₂O-, Q es -R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]_Y, m es 3 e Y es de 1 a 12. Preferentemente, Y es un número entero de 1 a 6. Más preferentemente, Y es un número entero de 2.

15 En otras realizaciones, n es 2 o 5 y m es 1-12. Los enlazadores de HS-C₂₋₅-enlazador-IV-C(O)O- de la presente invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.



En algunas realizaciones, el enlazador de la invención tiene la siguiente fórmula:

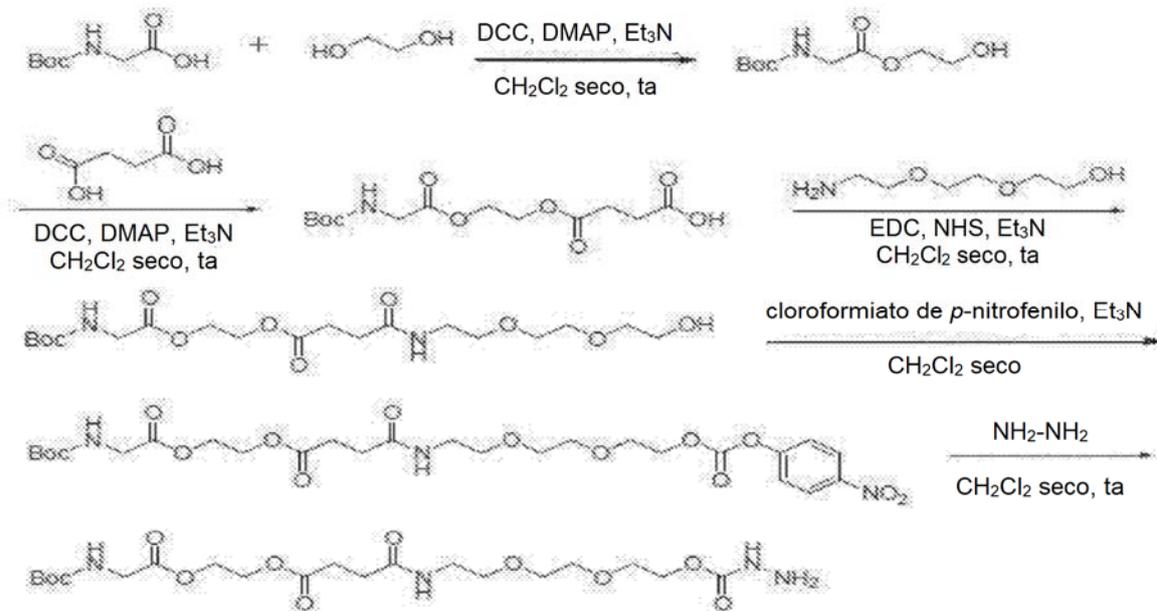


5

en donde pp es un grupo protector que es Boc o Fmoc; e Y es de 1 a 12.

10 ppNH-C₁-enlazador-IV-C(O)O- tiene la fórmula (I) en donde X es pp-NH-; pp es un grupo protector (tal como Boc o Fmoc), n es 1, P es -C(O)O-, R es -CH₂CH₂O-, Q es -R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]_Y, m es 3 e Y es de 1 a 12. Más preferentemente, Y es un número entero de 2.

15 En otras realizaciones, m es 1-12. Los enlazadores de ppNH-C₁-enlazador-IV-C(O)O- de la presente invención pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, los enlazadores preferidos de la invención pueden prepararse como se muestra en el siguiente esquema.



En otro aspecto, la invención proporciona un complejo de nanopartícula metálica, que comprende una nanopartícula metálica complejada con uno o más enlazadores de la invención, opcionalmente complejada con uno o más PEG.

5

En una realización, la nanopartícula metálica es una nanopartícula de Au, Pd, Pt o Ag.

En una realización, el enlazador es igual o diferente. Más preferentemente, el complejo de nanopartícula metálica comprende varios enlazadores con diferentes longitudes moleculares. Los enlazadores con diferente longitud molecular pueden unirse a un agente terapéutico o de diagnóstico diferente dependiendo de la necesidad de una célula o enfermedad que se vaya a tratar o diagnosticar. El enlazador se une a la nanopartícula metálica a través de los átomos de azufre del grupo 1,2-ditiolano o del grupo -SH en el enlazador.

10

En una realización, el peso molecular del PEG usado en la invención varía de 2000 a 20.000 Da; preferentemente, de 2000 a 5000. También puede usarse PEGilación, en algunos casos, para reducir la interacción de carga entre un enlazador o una nanopartícula y un resto biológico, por ejemplo, creando una capa hidrófila en la superficie del enlazador o la nanopartícula, que puede proteger al polímero frente a la interacción con el resto biológico. En algunos casos, la adición de unidades repetidas de poli(etilenglicol) puede aumentar la semivida en plasma del conjugado polimérico, por ejemplo, reduciendo la captación del conjugado polimérico por el sistema fagocítico a la vez que reduce la eficiencia de transfección/captación por las células. Los expertos habituales en la materia conocerán métodos y técnicas para la PEGilación de un polímero, por ejemplo, usando EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y NHS (N-hidroxisuccinimida) para hacer reaccionar un polímero con un grupo PEG que termina en una amina, como se analiza en los ejemplos más adelante, mediante técnicas de polimerización de apertura de anillo (ROMP) o similares.

15

20

25

En otra realización, la nanopartícula metálica tiene un tamaño menor de 100 nm, preferentemente, menor de 80 nm.

En alguna realización, el complejo de nanopartícula metálica enlaza además uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico iguales o diferentes. Preferentemente, el agente terapéutico es un fármaco antitumoral o un anticuerpo. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo dirigido a un antígeno con expresión específica en la superficie de células, tales como células tumorales; más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo que se dirige, reconoce y actúa contra células tumorales.

30

En algunas realizaciones, el fármaco antitumoral es un fármaco contra el cáncer o un anticuerpo contra el cáncer útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de fármaco contra el cáncer incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético de topotecán, CPT-11 (irinotecán), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos, adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucilo,

35

40

clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma II y calicheamicina omega II (véase, por ejemplo, Agnew, Chem. Int. Ed. Engl., 33:183-186(1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina relacionados con cromoproteína), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolinodoxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifludina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitiostano, testolactona; agentes antisuiprarrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor del ácido fólico, tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo polisacarídico (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulación de paclitaxel en nanopartículas diseñada en albúmina libre de Cremophor (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.) y docetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; oxaliplatino; leucovorina; vinorelbina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina; sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino combinado con 5-FU y leucovorina.

La cantidad de un fármaco anticáncer presente en la nanopartícula puede variar dentro de un amplio intervalo. En algunas realizaciones, la nanopartícula puede incluir una cantidad del fármaco anticáncer en el intervalo del 1 % al 50 % (peso/peso) basándose en la relación en masa del fármaco anticáncer a la nanopartícula. En otras realizaciones, la nanopartícula puede incluir una cantidad del fármaco anticáncer en el intervalo del 5 % al 40 % (peso/peso) basándose en la relación en masa del fármaco anticáncer a la nanopartícula. En otras realizaciones más, la nanopartícula puede incluir una cantidad del fármaco anticáncer en el intervalo del 10 % al 30 % (peso/peso). En otras realizaciones más, la nanopartícula puede incluir una cantidad del fármaco anticáncer en el intervalo del 1 % al 10 % (peso/peso), del 1 % al 5 % (peso/peso), del 5 % al 10 % (peso/peso), del 10 % al 20 % (peso/peso), del 15 % al 35 % (peso/peso), del 30 % al 40 % (peso/peso) y similares, basándose en la relación en masa del fármaco anticáncer a la nanopartícula. En algunas realizaciones, la nanopartícula puede incluir una cantidad del fármaco anticáncer del 20 % (peso/peso) basándose en la relación en masa del fármaco anticáncer a la nanopartícula. En otras realizaciones, la nanopartícula puede incluir una cantidad del fármaco anticáncer del 5 % (peso/peso), 10 % (peso/peso), 15 % (peso/peso), 25 % (peso/peso), 30 % (peso/peso) y similares basándose en la relación en masa del fármaco anticáncer a la nanopartícula.

Algunas realizaciones descritas en el presente documento se refieren a una composición que puede comprender uno o más complejos de nanopartícula metálica que enlazan uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico iguales o diferentes y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica facilita la administración de un complejo de nanopartícula metálica que enlaza uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico iguales o diferentes a un organismo. En la técnica existen múltiples técnicas de administración de un compuesto que incluyen, pero sin limitación, administración oral, por inyección, en aerosol, parenteral y tópica.

Algunas realizaciones descritas en el presente documento se refieren a un sistema de suministro de fármaco, que comprende uno o más complejos de nanopartícula metálica que enlazan uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico iguales o diferentes.

Existen en la técnica múltiples técnicas de administración de un complejo de nanopartículas metálicas que enlaza uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico iguales o diferentes que incluyen, pero sin limitación, administración oral, rectal, tópica, en aerosol, en inyección y parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intravenosas, intramedulares, e inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intraperitoneales,

intranasales e intraoculares.

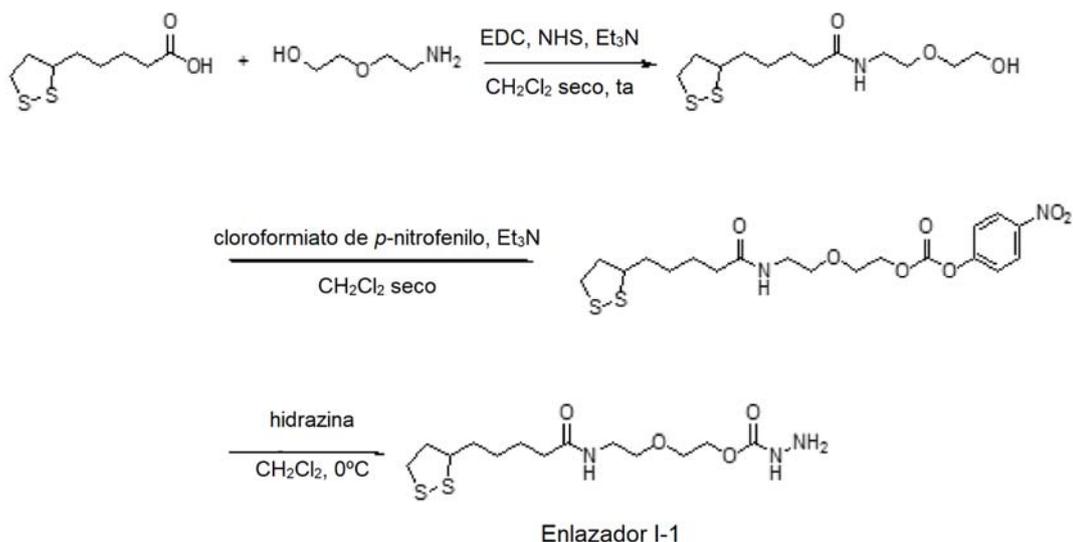
Ejemplo

5 Ejemplo 1 Preparación de enlazador I-amida

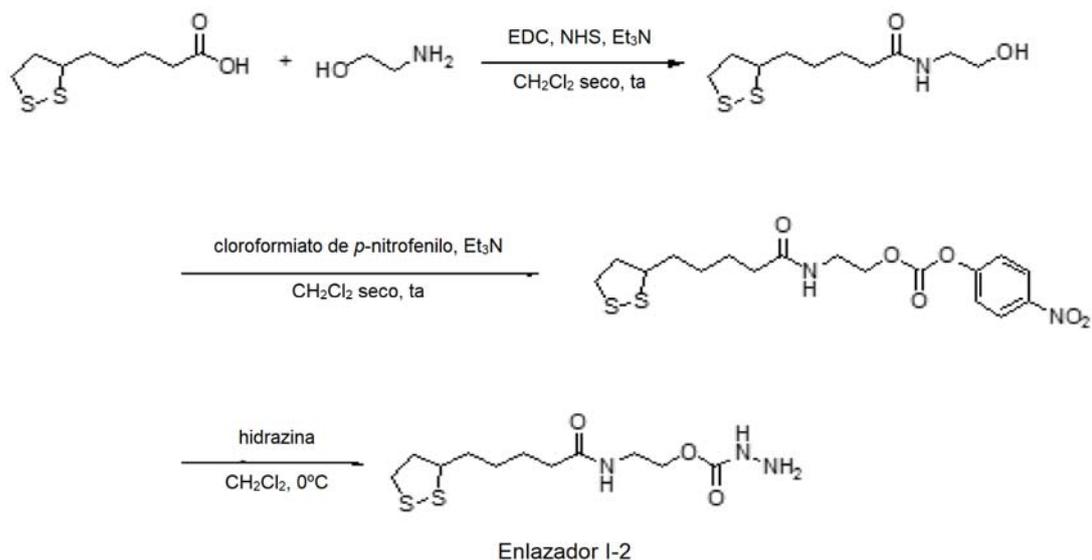
Etapa 1. Se disolvieron la etanolamina (1,28 g, 1,05 eq) y el ácido lipoico (4,13 g, 1,0 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (4,98 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (2,30 g, 1,0 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 4,04 g; 81,0 %.

Etapa 2. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto 1 de la etapa 1** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:1:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 51,6 %.

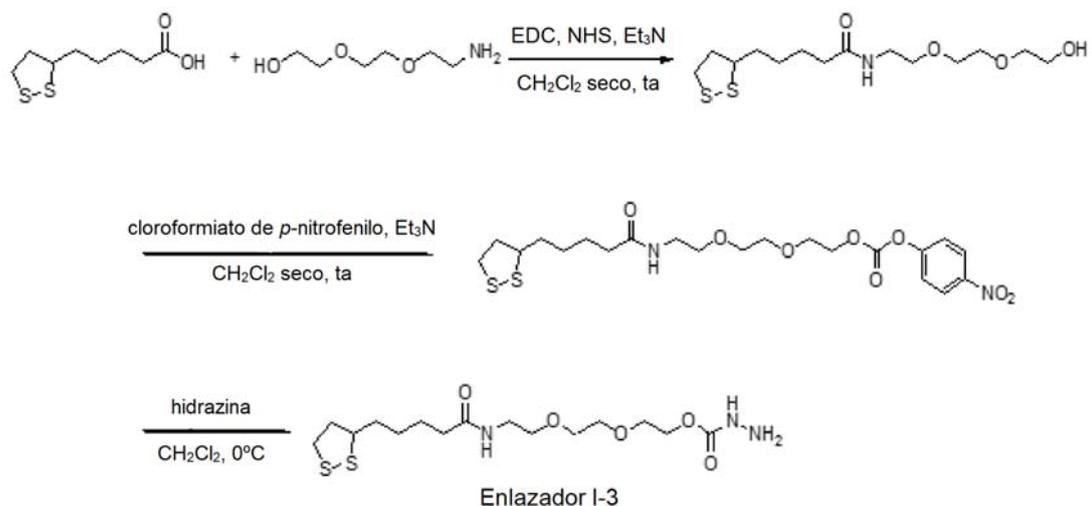
Etapa 3. El **producto 2 de la etapa 2** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 19,5 %.



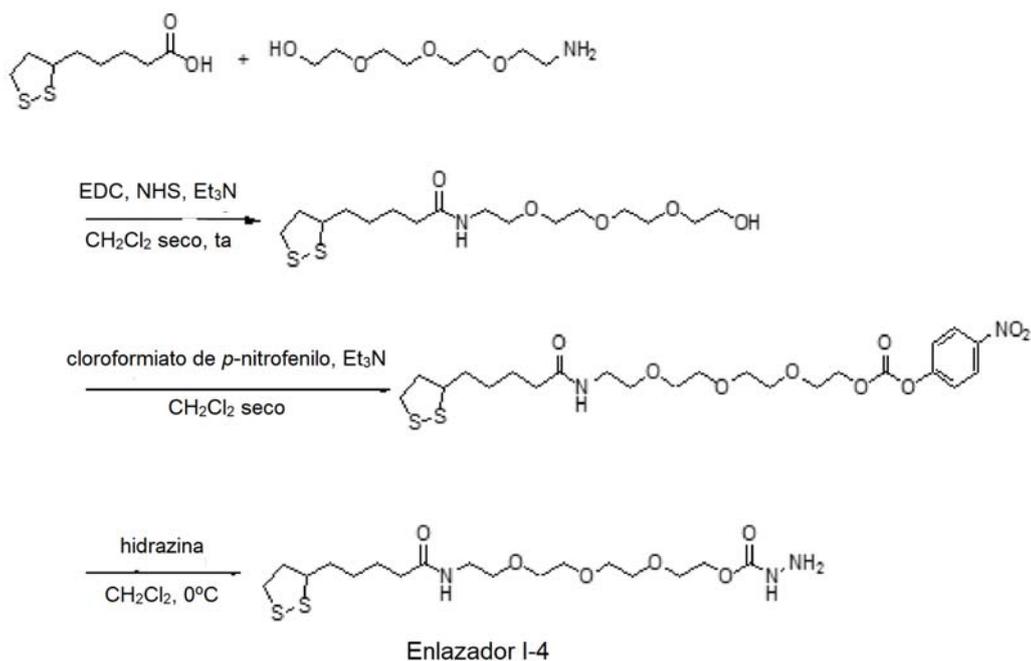
Enlazador 1-1 (Enlazador I-amida, m=2). ¹H (400 MHz) δ 1,23-1,31 (2H, m), 1,40-1,51 (3H, m), 1,57-1,64 (1H, m), 1,78-1,86 (1H, m), 2,05 (2H, t), 2,32-2,39 (1H, m), 3,01-3,18 (4H, m), 3,39 (2H, t), 3,52-3,57 (3H, m), 4,03-4,19 (4H, m), 7,94 (1H, s), 8,14 (1H, s). ¹³C (100 MHz) δ 25,9, 29,0, 34,8, 36,1, 38,9, 39,5, 40,9, 57,2, 64,7, 69,3, 69,6, 159,5, 174,9 ppm. Masa de H (m/z): (M+Na) = 374,1171



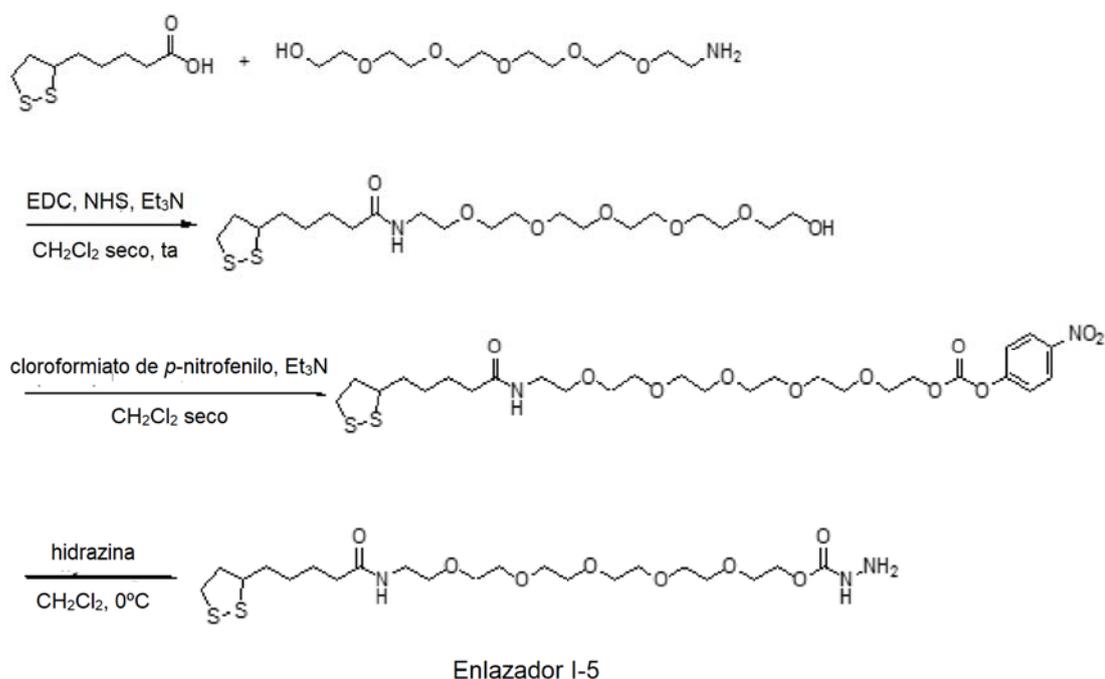
5 Enlazador 1-2 (Enlazador I-amida, m=1). ^1H (300 MHz) δ 1,30-1,38 (2H, m), 1,45-1,57 (3H, m), 1,60-1,72 (1 H, m), 1,80-1,92 (1 H, m), 2,06 (2H, s), 2,36-2,46 (1H, m), 3,07-3,24 (4H, m), 3,56-3,65 (1H, m), 3,95 (2H, t), 4,02 (2H, s), 7,88 (1H, t), 8,11 (1H, s). ^{13}C (100 MHz) δ 25,6, 28,8, 34,6, 35,9, 38,8, 39,4, 40,7, 56,9, 63,7, 163,8, 174,3 ppm. Masa de H (m/z): (M+Na) = 330,0894.



10 Enlazador I-3 (Enlazador I-amida, m=3). ^1H (300 MHz) δ 1,30-1,37 (2H, m), 1,45-1,57 (3H, m), 1,60-1,72 (1H, m), 1,80-1,91 (1H, m), 2,06 (2H, t), 2,35-2,46 (1H, m), 3,07-3,23 (4H, m), 3,39 (2H, t), 3,47-3,65 (7H, m), 4,02 (2H, s), 4,05-4,08 (2H, m), 7,84 (1H, t), 8,18 (1H, s). ^{13}C (100 MHz) δ 25,7, 28,9, 34,7, 35,9, 38,8, 39,4, 40,7, 60,0, 64,4, 69,4, 69,6, 70,1, 70,3, 159,2, 174,2 ppm. Masa de H (m/z): (M+Na) = 418,1466.



5 Enlazador 1-4 (Enlazador I-amida, m=4). ¹H (300 MHz) δ 1,30-1,38 (2H, m), 1,45-1,57 (3H, m), 1,60-1,72 (1H, m), 1,80-1,91 (1H, m), 2,06 (2H, t), 2,36-2,46 (1H, m), 3,07-3,23 (4H, m), 3,39 (2H, t), 3,49-3,65 (11H, m), 4,02 (2H, s), 4,05-4,08 (2H, m), 7,83 (1H, t), 8,18 (1H, s). ¹³C (100 MHz) δ 25,7, 28,9, 34,7, 35,9, 38,8, 39,4, 40,7, 56,9, 64,4, 69,4, 69,6, 70,2, 70,3, 70,4, 159,2, 174,1 ppm. Masa de H (m/z): (M+Na) = **440,1875**.



10 Enlazador 1-5 (Enlazador I-amida, m=5). ¹H (300 MHz) δ 1,30-1,38 (2H, m), 1,45-1,57 (3H, m), 1,60-1,69 (1H, m), 1,80-1,91 (1H, m), 2,06 (2H, t), 2,36-2,46 (1H, m), 3,07-3,23 (4H, m), 3,39 (2H, t), 3,51-3,62 (19H, m), 4,02 (2H, s), 4,05-4,08 (2H, m), 4,83 (1H, t), 8,18 (1H, s). ¹³C (100 MHz) δ 25,9, 29,0, 34,8, 36,1, 39,0, 39,4, 40,9, 57,2, 64,8, 69,5, 69,7, 70,3, 70,4, 70,5, 159,5, 174,8 ppm. Masa de H (m/z): (M+Na) = **550,2234**

15 Ejemplo 2 Preparación de enlazador I-C(O)O

Etapa 1. Se disolvieron etilenglicol (1,30 g, 1,05 eq) y ácido lipoico (4,13 g, 1,0 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (5,36 g, 1,3 eq), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP)

(0,24 g, 0,1 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 4,00 g; 80,5 %.

Etapa 2. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto 1 de la etapa 1** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:1:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 50,6 %.

Etapa 3. El **producto 2 de la etapa 2** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 18,5 %.

Ejemplo 3 Preparación de HS-C₂-enlazador-I-amida

Etapa 1. Se disolvieron la etanolamina (1,28 g, 1,05 eq) y el ácido 3-(acetiltio)propiónico (2,96 g, 1,0 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (4,98 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (2,30 g, 1,0 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 4,10 g; 70,0 %.

Etapa 2. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto 1 de la etapa 1** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:1:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 48,6 %.

Etapa 3. El **producto 2 de la etapa 2** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 19,0 %.

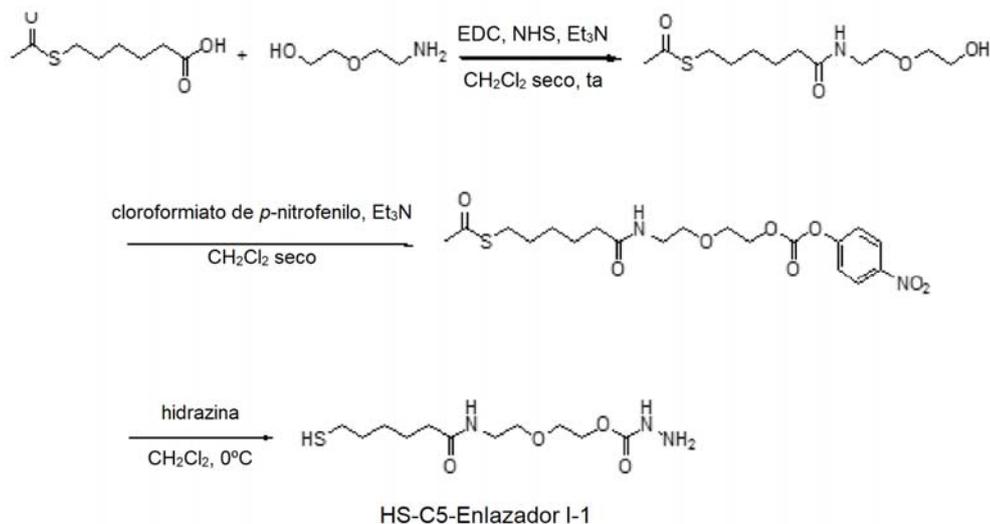
Ejemplo 4 Preparación de HS-C₅-enlazador-I-amida

Etapa 1. Se disolvieron la etanolamina (1,28 g, 1,05 eq) y el ácido 6-acetiltiohexanoico (3,81 g, 1,0 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (4,98 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (2,30 g, 1,0 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 3,85 g; 78,0 %.

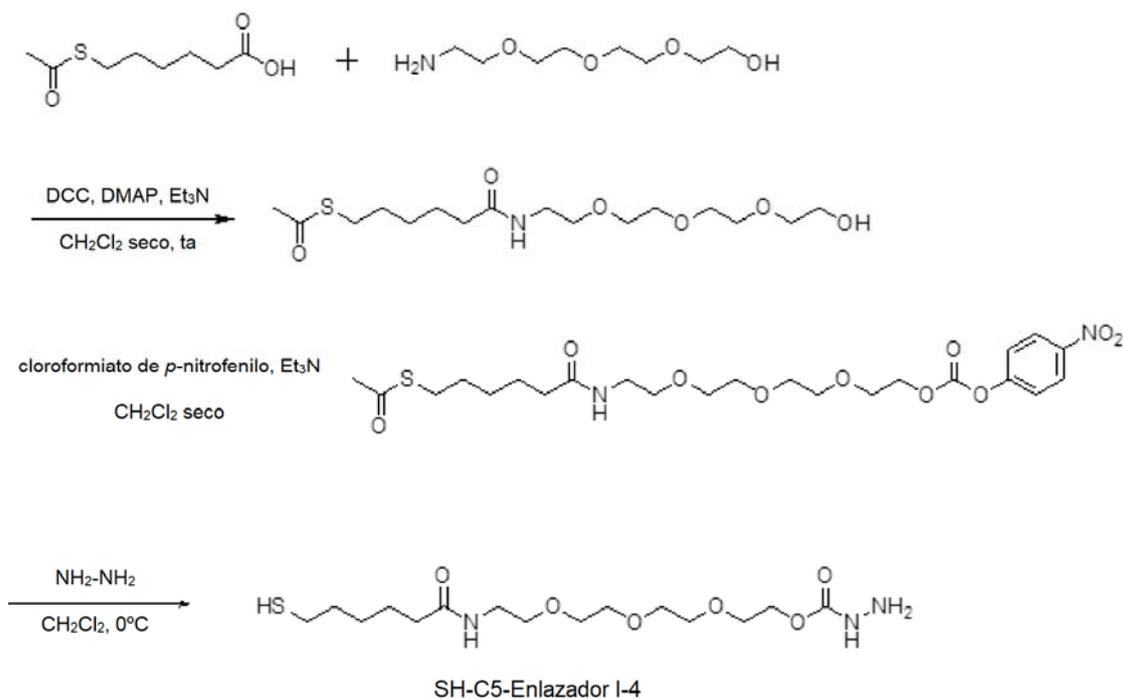
Etapa 2. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto 1 de la etapa 1** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto

se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:1:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 48,6 %.

Etapa 3. El **producto 2 de la etapa 2** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 17,0 %.



SH-C5-enlazador 1-1 (SH-C5-enlazador-1-amida, m es 2): **¹H (400 MHz)** δ 1,26-1,33 (2H, m), 1,43-1,55 (4H, m), 2,05 (2H, t), 2,22 (1H, s), 2,45 (2H, t), 3,15-3,19 (2H, m), 3,37 (2H, t), 3,54 (2H, t), 4,03-4,08 (4H, m), 7,85 (1H, t), 8,19 (1H, s); **¹³C (100 MHz)** δ 23,7, 24,7, 27,4, 33,1, 35,2, 38,4, 63,3, 68,6, 69,1, 158,3, 172,2. **Masa de H (m/z): (M+Na) = 316,1336**



SH-C5-enlazador 1-4 (SH-C5-enlazador-1-amida, m es 4): **¹H (400 MHz)** δ 1,26-1,34 (2H, m), 1,43-1,56 (4H, m),

2,05 (2H, t), 2,22 (1H, t), 2,43-2,48 (2H, m), 3,16-3,20 (3H, m), 3,39 (2H, t), 3,48-3,50 (7H, m), 3,56 (2H, m), 4,03-4,08 (4H, m), 7,84 (1H, m), 8,20 (1H, s); ^{13}C (100 MHz) δ 23,7, 24,8, 27,4, 33,1, 35,2, 38,5, 63,4, 68,9, 69,2, 69,6, 69,8, 158,3, 172,2. **Masa de H (m/z): (M+Na) = 404,1843**

5 Ejemplo 5 Preparación de SH-C_s-enlazador-I-C(O)O-

Etapa 1. Se disolvieron etilenglicol (1,30 g, 1,05 eq) y ácido 6-acetiltohexanoico (3,81 g, 1,0 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (5,36 g, 1,3 eq), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0,24 g, 0,1 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 3,88 g; 79,8 %.

Etapa 2. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto 1 de la etapa 1** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EA:Hex:MeOH = 1:1:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 51,6 %.

Etapa 3. El **producto 2 de la etapa 2** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 19,4 %.

Ejemplo 6 Preparación de NH₂-C₁-enlazador-I-amida

Etapa 1. Se disolvieron la etanolamina (1,28 g, 1,05 eq) y Boc-glicina (3,50 g, 1,0 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (4,98 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (2,30 g, 1,0 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 4,10 g; 81,5 %.

Etapa 2. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto 1 de la etapa 1** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:1:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 51,6 %.

Etapa 3. El **producto 2 de la etapa 2** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 17,9 %.

Ejemplo 7 Preparación de NH₂-C₁-enlazador-I-C(O)O-

Etapa 1. Se disolvieron el etilenglicol (1,30 g, 1,05 eq) y Boc-glicina (3,50 g, 1,0 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (5,36 g, 1,3 eq), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0,24 g, 0,1 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue

un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 3,60 g; 78,0 %.

Etapa 2. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto 1 de la etapa 1** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EA: Hex:MeOH = 1:1:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 49,7 %.

Etapa 3. El **producto 2 de la etapa 2** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 20,0 %.

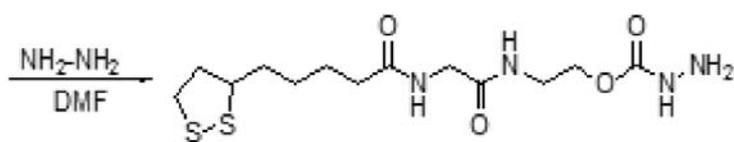
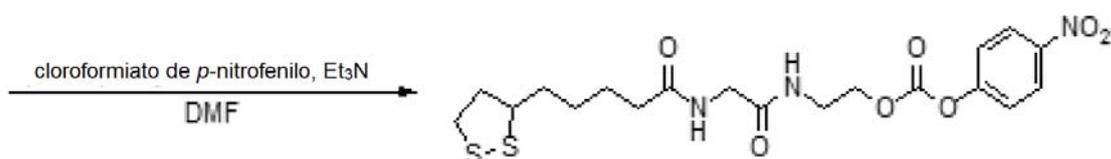
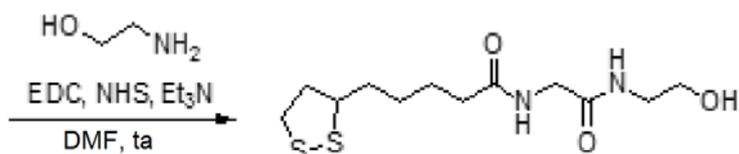
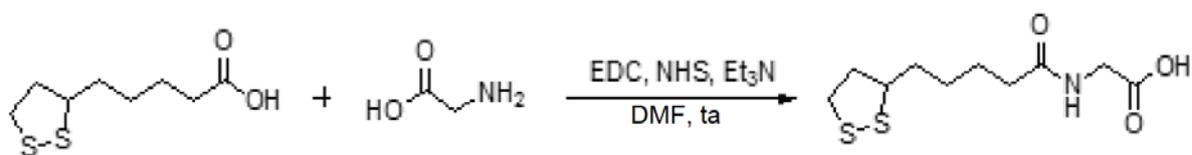
20 Ejemplo 8 Preparación de enlazador II-amida

Etapa 1. Se disolvieron la glicina (2,36 g, 1,05 eq) y el ácido lipoico (6,19 g, 1,0 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDCHCl (7,47 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (3,45 g, 1,0 eq) y trietilamina (9,6 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 70,0 %.

Etapa 2. Se disolvieron el **producto de la etapa 1** (5,26 g, 1,0 eq) y etanolamina (1,28 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (4,98 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (2,30 g, 1,0 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 81,0 %.

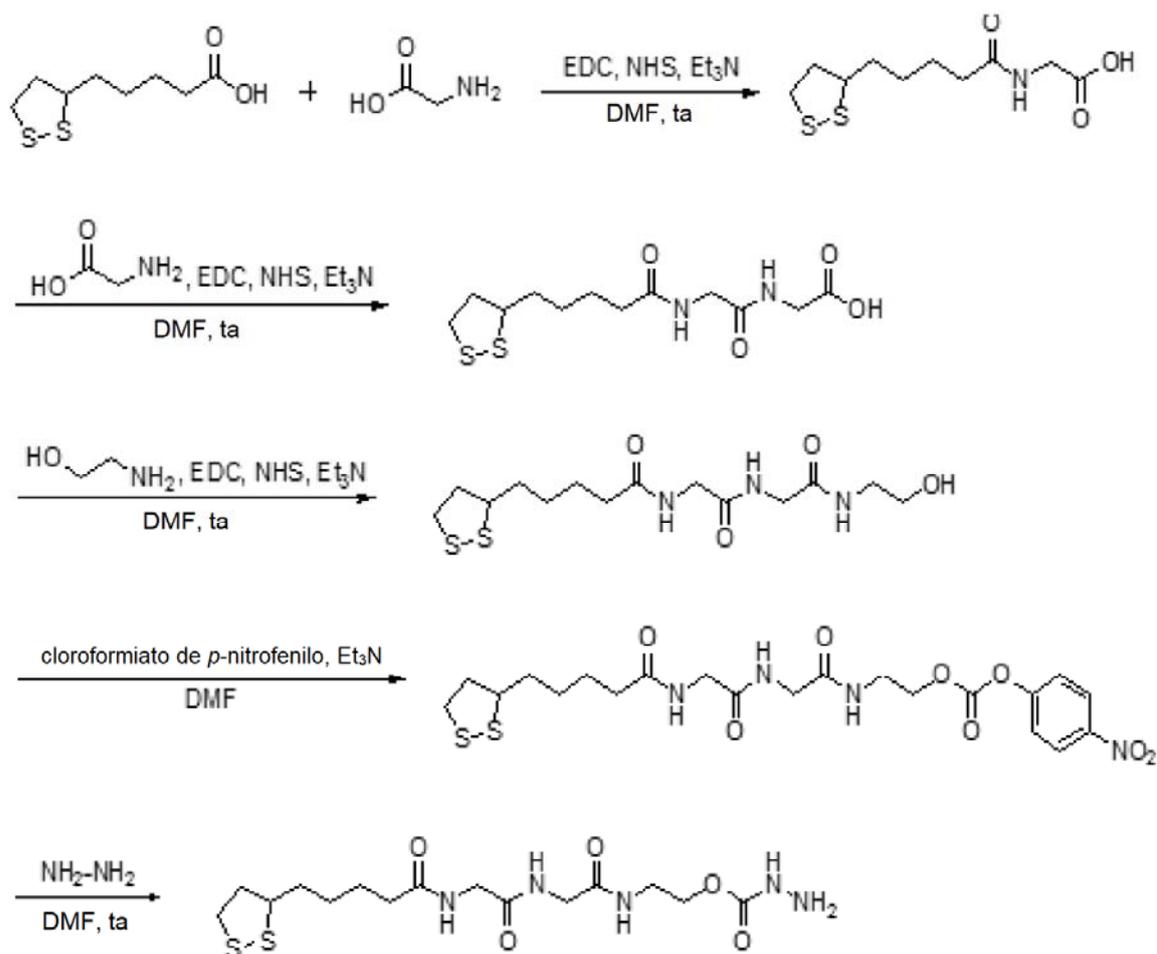
Etapa 3. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto 1 de la etapa 1** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 51,6 %.

Etapa 4. El **producto 2 de la etapa 2** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 30,0 %.



Enlazador II-1

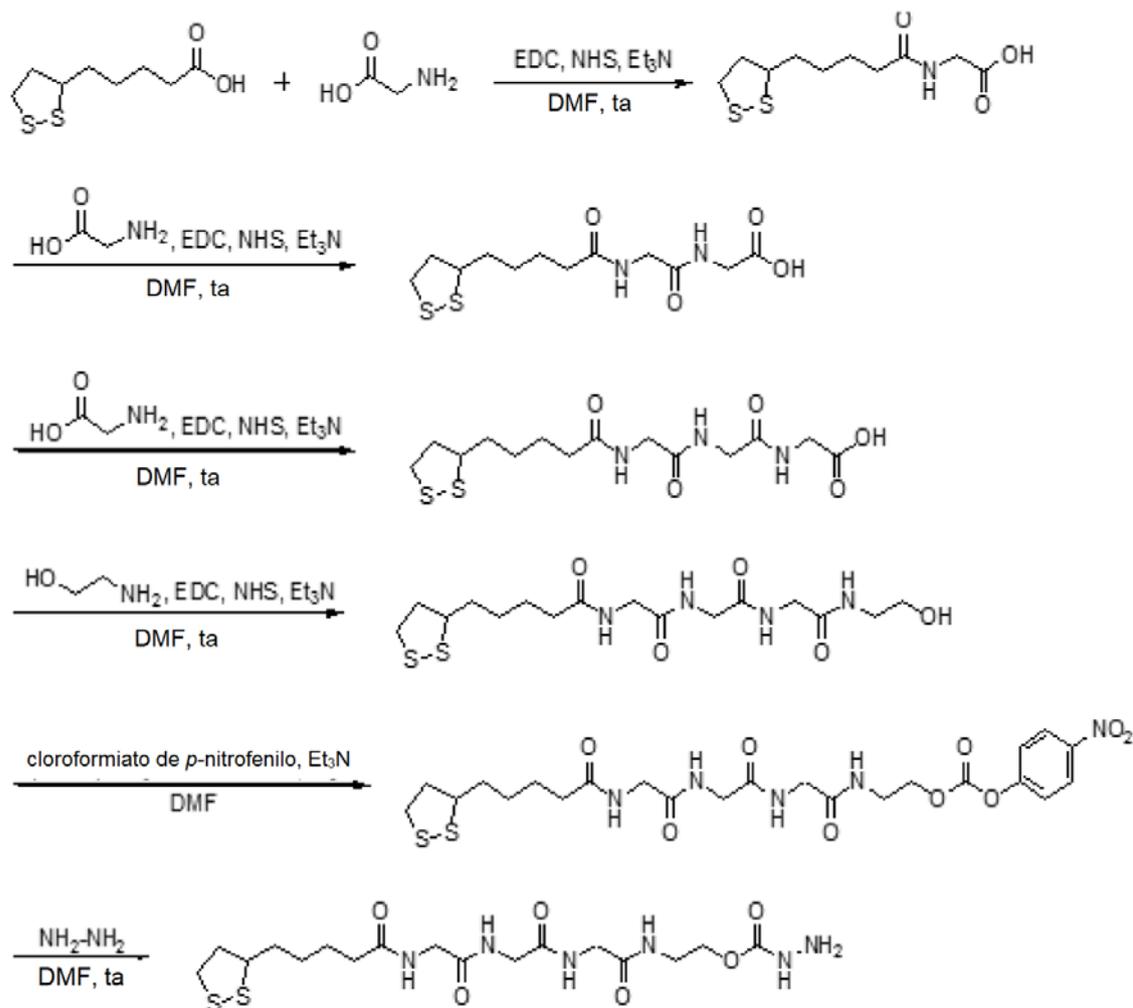
Enlazador 11-1 (Enlazador II-amida, z=1). ¹H (400 MHz) δ 1,32-1,39 (2H, m), 1,46-1,57 (2H, m), 1,63-1,69 (1H, m), 1,83-1,91 (1H, m), 2,08 (1H, s), 2,13 (2H, t), 2,36-2,46 (1H, m), 3,07-3,19 (2H, m), 3,22-3,28 (2H, m), 3,62-3,65 (3H, m), 3,95 (3H, t), 7,01 (1H, s), 7,91 (1H, t), 8,01 (1H, t), 8,14 (1H, s). ¹³C (100 MHz) δ 25,2, 28,8, 34,6, 35,4, 38,6, 38,7, 39,5, 42,4, 56,60, 62,85, 135,63, 169,72, 172,83 ppm. Masa de H (m/z): (M+Na) = 387,1102



Enlazador II-2

Enlazador II-2 (Enlazador II-amida, z=2). ^1H (300 MHz) δ 1,32-1,39 (2H, m), 1,47-1,57 (3H, m), 1,61-1,73 (1H, m), 1,81-1,92 (1H, m), 2,14 (2H, t), 2,35-2,46 (2H, m), 3,09-3,21 (3H, m), 3,23-3,31 (3H, m), 3,65-3,71 (4H, m), 3,97 (2H, t), 7,78 (1H, t), 7,89 (1H, t), 8,12 (2H, t). ^{13}C (100 MHz) δ 25,3, 28,8, 34,6, 35,4, 38,6, 38,7, 39,5, 42,4, 42,6, 56,6, 60,2, 62,8, 169,4, 169,9, 173,1 ppm. Masa de H (m/z): (M+Na) = 444,1345

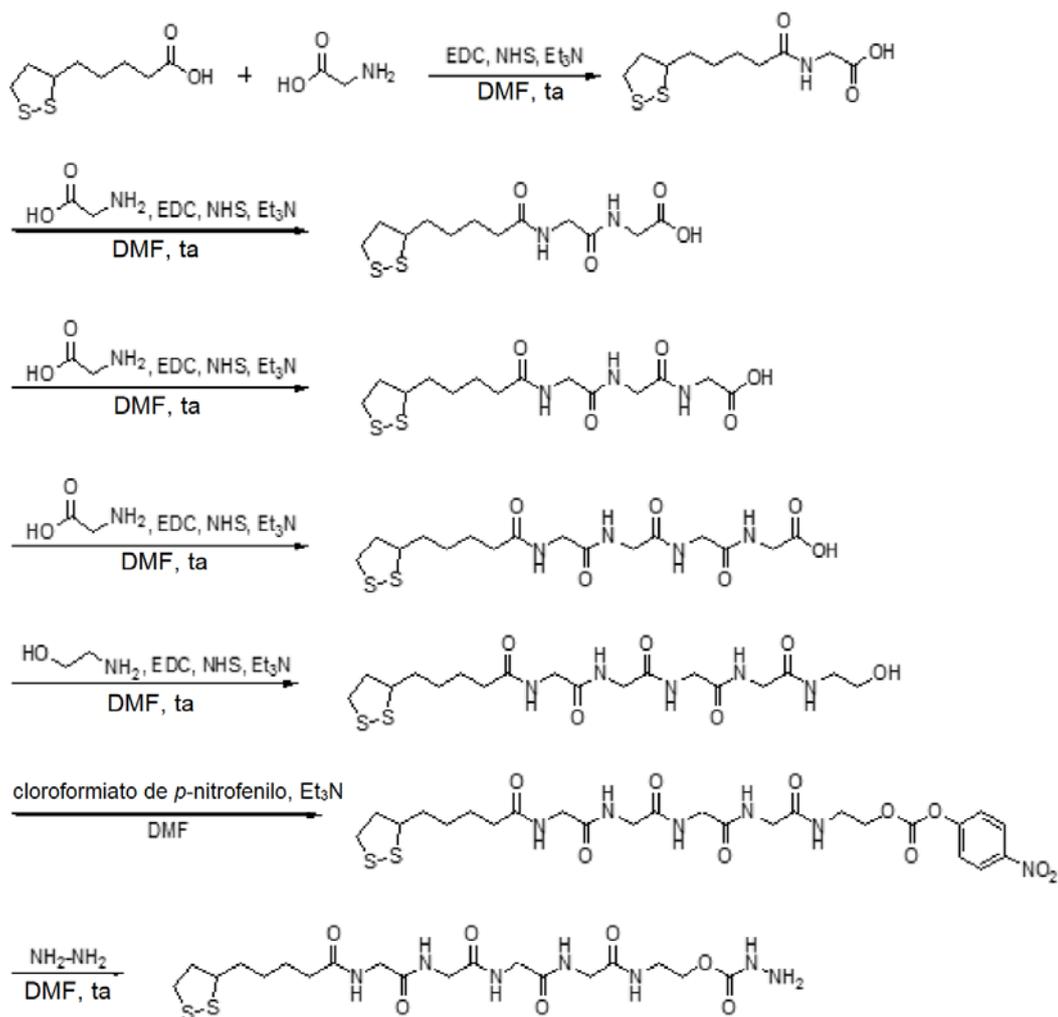
5



Enlazador II-3

Enlazador II-3 (Enlazador II-amida, z=3). **¹H (300 MHz)** δ 1,23 (1H, s), 1,32-1,40 (2H, m), 1,46-1,57 (4H, m), 1,63-1,70 (1H, m), 1,80-1,92 (2H, t), 1,96 (1H, s), 2,04 (1H, s), 2,14 (3H, t), 3,07-3,19 (3H, m), 3,58-3,66 (3H, m), 3,72 (3H, t), 3,96 (1H, t), 4,05 (1H, s), 7,86 (1H, s), 8,10 (3H, s). **¹³C (100 MHz)** δ 25,3, 28,8, 34,6, 35,4, 38,6, 39,5, 39,7, 40,5, 42,4, 42,6, 56,6, 60,2, 62,8, 169,4, 169,6, 170,1, 173,1 ppm. **Masa de H (m/z): (M+Na) = 501,1606**

5



Enlazador II-4

Enlazador II-4 (Enlazador II-amida, z=4). **¹H (300 MHz)** δ 1,26 (3H, s), 1,35-1,42 (2H, m), 1,47-1,70 (4H, m), 1,82-1,94 (2H, m), 2,03-2,20 (8H, m), 2,26-2,33 (2H, m), 3,66-3,81 (7H, m), 3,95-4,01 (1H, m), 7,86-7,94 (1H, m), 8,80-8,22 (3H, m). **¹³C (100 MHz)** δ 25,3, 28,8, 29,4, 31,2, 34,6, 35,4, 38,5, 38,6, 42,4, 42,6, 56,6, 66,0, 125,8, 128,7, 129,4, 169,4, 169,8, 170,0, 173,1 ppm. **Masa de H (m/z): (M+Na) = 558,1768**

Ejemplo 9 Preparación de Enlazador II-C(O)O-

10 Etapa 1. Se disolvieron ácido glicólico (2,40 g, 1,05 eq) y ácido lipoico (6,19 g, 1,0 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (8,05 g, 1,3 eq), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0,37 g, 0,1 eq) y trietilamina (9,6 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 85 %.

15 Etapa 2. Se disolvieron **el producto de la etapa 1** (5,26 g, 1,0 eq) y etanolamina (1,28 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (4,98 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (2,30 g, 1,0 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 80,5 %.

25 Etapa 3. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto 1 de la etapa 1** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de

hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 47,8 %.

Etapa 4. El **producto 2 de la etapa 2** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 19,3 %.

15 Ejemplo 10 Preparación de Enlazador SH-C₅-enlazador-II-amida

Etapa 1. Se disolvieron el ácido 6-acetiltiohexanoico (5,71 g, 1,0 eq) y glicina (2,36 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDCHCl (7,47 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (3,45 g, 1,0 eq) y trietilamina (9,6 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 68,8 %.

Etapa 2. Se disolvieron **el producto de la etapa 1** (5,26 g, 1,0 eq) y etanolamina (1,28 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (4,98 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (2,30 g, 1,0 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 80,5 %.

Etapa 3. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto 1 de la etapa 1** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 50,6 %.

Etapa 4. El **producto 2 de la etapa 2** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 18,3 %.

50 Ejemplo 11 Preparación de Enlazador SH-C₅-enlazador-H-C(O)O-

Etapa 1. Se disolvieron ácido 6-acetiltiohexanoico (5,71 g, 1,0 eq) y ácido glicólico (2,40 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (8,05 g, 1,3 eq), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0,37 g, 0,1 eq) y trietilamina (9,6 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 78 %.

Etapa 2. Se disolvieron **el producto de la etapa 1** (5,26 g, 1,0 eq) y etanolamina (1,28 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDCHCl (4,98 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (2,30 g, 1,0 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 80,5 %.

Etapa 3. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El

producto 1 de la etapa 1 pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 51,6 %.

Etapa 4. El **producto 2 de la etapa 2** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 19,0 %.

Ejemplo 12 Preparación de enlazador NH₂-C₁-enlazador-II-amida

Etapa 1. Se disolvieron Boc-glicina (5,26 g, 1,0 eq) y glicina (2,36 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (7,47 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (3,45 g, 1,0 eq) y trietilamina (9,6 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 70 %.

Etapa 2. Se disolvieron **el producto de la etapa 1** (5,26 g, 1,0 eq) y etanolamina (1,28 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (4,98 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (2,30 g, 1,0 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 77,8 %.

Etapa 3. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto 1 de la etapa 1** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 51,6 %.

Etapa 4. El **producto 2 de la etapa 2** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 18,8 %.

Ejemplo 13 Preparación de NH₂-C₁-enlazador-II-C(O)O-

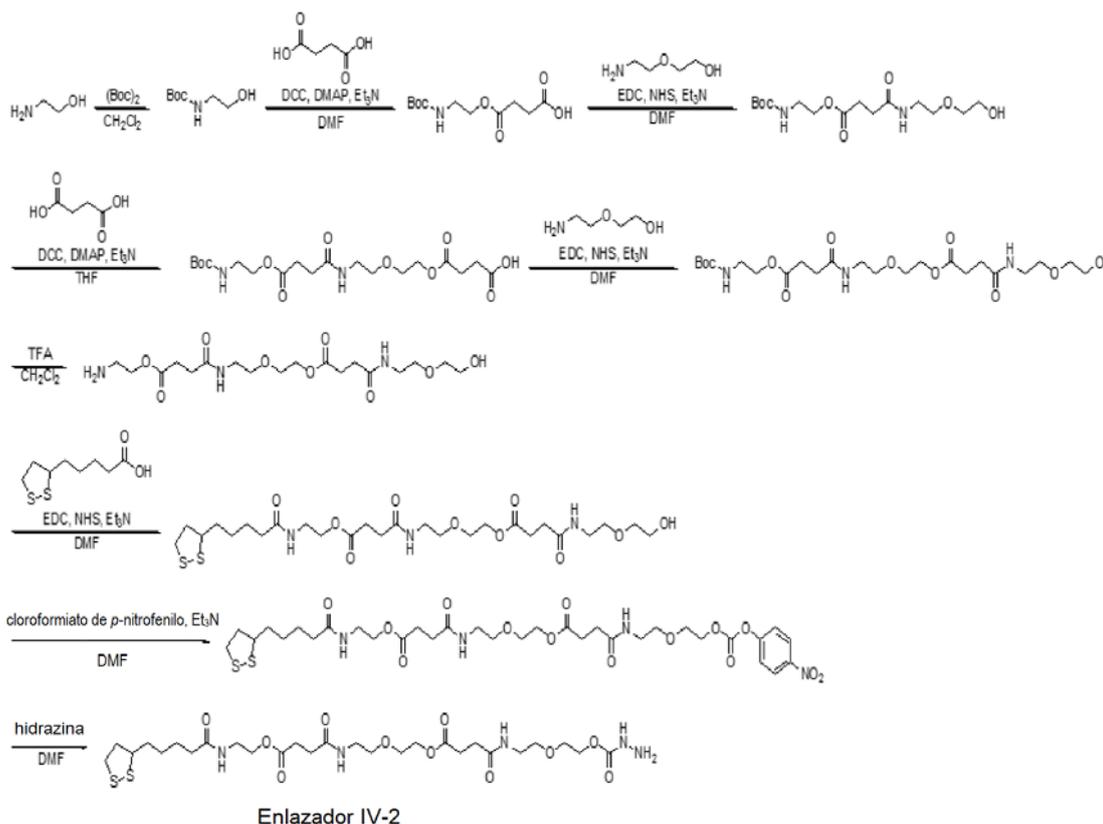
Etapa 1. Se disolvieron Boc-glicina (5,26 g, 1,0 eq) y ácido glicólico (2,40 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (8,05 g, 1,3 eq), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0,37 g, 0,1 eq) y trietilamina (9,6 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MOH = 9,5:0,5. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 82,0 %.

Etapa 2. Se disolvieron **el producto de la etapa 1** (5,26 g, 1,0 eq) y etanolamina (1,28 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (4,98 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (2,30 g, 1,0 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 78,5 %.

Etapa 3. Se puso el cloroforniato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto 1 de la etapa 1** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 51,0 %.

Etapa 4. El **producto de la etapa 2** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 19,5 %.

Ejemplo 14 Preparación de enlazador IV-amida



Etapa 1. Se disolvieron la etanolamina (1,92 g, 1,05 eq) y el ácido lipoico (6,19 g, 1,0 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDCHCl (7,47 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (3,45 g, 1,0 eq) y trietilamina (9,6 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 66,0 %.

Etapa 2. Se disolvieron el **producto de la etapa 1** (4,98 g, 1,0 eq) y ácido succínico (2,48 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (5,36 g, 1,3 eq), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0,24 g, 0,1 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 80,7 %.

Etapa 3. Se disolvieron **el producto de la etapa 2** (3,49 g, 1,0 eq) y 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etanol (1,57 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (2,49 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (1,15 g, 1,0 eq) y trietilamina (3,2 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 81,2 %.

Etapa 4. Se puso el clorofornio de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto de la etapa 3** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 48,6 %.

Etapa 5. El **producto de la etapa 4** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto (Enlazador IV-2) fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 30,0 %. **¹H (300 MHz)** δ 1,30-1,34 (2H, m), 1,47-1,56 (3H, m), 1,60-1,67 (1H, m), 1,82-1,87 (1 H, m), 2,23 (2H, t), 2,54-2,56 (4H, m), 2,63-2,66 (4H, m), 3,07-3,25 (2H, m), 3,33-3,39 (3H, m), 3,40-3,43 (2H, m), 3,46-3,50 (5H, m), 3,54-3,58 (5H, m), 4,03-4,05 (2H, m), 4,07-4,10 (2H, m), 4,13-4,15 (2H, m) **¹³C (100 MHz)** δ 24,5, 24,6, 27,5, 33,7, 34,7, 38,1, 41,0, 55,7, 55,8, 59,6, 59,7, 59,8, 65,7, 65,8, 65,9, 71,5, 71,7, 171,7, 171,9, 172,0, 177,1, 177,2, 177,3

30 Ejemplo 15 Preparación de Enlazador IV-C(O)O-

Etapa 1. Se disolvieron etilenglicol (1,96 g, 1,05 eq) y ácido lipoico (6,19 g, 1,0 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (8,04 g, 1,3 eq), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0,37 g, 0,1 eq) y trietilamina (9,6 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 66,0 %.

Etapa 2. Se disolvieron **el producto de la etapa 1** (4,98 g, 1,0 eq) y ácido succínico (2,48 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (5,36 g, 1,3 eq), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0,24 g, 0,1 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 81,2 %.

Etapa 3. Se disolvieron **el producto de la etapa 2** (3,49 g, 1,0 eq) y 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etanol (1,57 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (2,49 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (1,15 g, 1,0 eq) y trietilamina (3,2 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 80,5 %.

Etapa 4. Se puso el clorofornio de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto de la etapa 3** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Tras completarse la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 50,3 %.

Etapa 5. El **producto de la etapa 4** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la

columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 31,0 %.

5 Ejemplo 16 Preparación de SH-C_s-enlazador-IV-amida

10 Etapa 1. Se disolvieron la etanolamina (1,92 g, 1,05 eq) y el ácido 6-acetilthiohexanoico (5,71 g, 1,0 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDCHCl (7,47 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (3,45 g, 1,0 eq) y trietilamina (9,6 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 74,0 %.

15 Etapa 2. Se disolvieron el **producto de la etapa 1** (4,98 g, 1,0 eq) y ácido succínico (2,48 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (5,36 g, 1,3 eq), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0,24 g, 0,1 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 80,2 %.

20 Etapa 3. Se disolvieron el **producto de la etapa 2** (3,49 g, 1,0 eq) y 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etanol (1,57 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (2,49 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (1,15 g, 1,0 eq) y trietilamina (3,2 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 80,0 %.

25 Etapa 4. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto de la etapa 3** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 51,1 %.

30 Etapa 5. El **producto de la etapa 4** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 28,0 %.

45 Ejemplo 17 Preparación de SH-C₅-enlazador-IV-C(O)O-

50 Etapa 1. Se disolvieron etilenglicol (1,96 g, 1,05 eq) y ácido 6-acetilthiohexanoico (5,71 g, 1,0 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (8,04 g, 1,3 eq), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0,37 g, 0,1 eq) y trietilamina (9,6 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 71,5 %.

55 Etapa 2. Se disolvieron el **producto de la etapa 1** (4,98 g, 1,0 eq) y ácido succínico (2,48 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (5,36 g, 1,3 eq), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0,24 g, 0,1 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 81,4 %.

60 Etapa 3. Se disolvieron el **producto de la etapa 2** (3,49 g, 1,0 eq) y 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etanol (1,57 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (2,49 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (1,15 g, 1,0 eq) y trietilamina (3,2 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se

65

retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 78,8 %.

Etapa 4. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto de la etapa 3** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 51,1 %.

Etapa 5. El **producto de la etapa 4** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 27,8 %.

Ejemplo 18 Preparación de NH₂-C₁-enlazador-IV-amida

Etapa 1. Se disolvieron la etanolamina (1,92 g, 1,05 eq) y Boc-glicina (5,26 g, 1,0 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDCHCl (7,47 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (3,45 g, 1,0 eq) y trietilamina (9,6 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 62,0 %.

Etapa 2. Se disolvieron el **producto de la etapa 1** (4,98 g, 1,0 eq) y ácido succínico (2,48 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (5,36 g, 1,3 eq), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0,24 g, 0,1 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 80,4 %.

Etapa 3. Se disolvieron el **producto de la etapa 2** (3,49 g, 1,0 eq) y 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etanol (1,57 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (2,49 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (1,15 g, 1,0 eq) y trietilamina (3,2 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 71,0 %.

Etapa 4. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto de la etapa 3** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 51,9 %.

Etapa 5. El **producto de la etapa 4** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 29,0 %.

Ejemplo 19 Preparación de NH₂-C₁-enlazador-IV-C(O)O-

Etapa 1. Se disolvieron el etilenglicol (1,96 g, 1,05 eq) y Boc-glicina (5,26 g, 1,0 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (8,04 g, 1,3 eq), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0,37 g, 0,1 eq) y trietilamina (9,6 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al

menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 75,0 %.

5 Etapa 2. Se disolvieron el **producto de la etapa 1** (4,98 g, 1,0 eq) y ácido succínico (2,48 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (5,36 g, 1,3 eq), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0,24 g, 0,1 eq) y trietilamina (6,4 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 80,5 %.

10 Etapa 3. Se disolvieron el **producto de la etapa 2** (3,49 g, 1,0 eq) y 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etanol (1,57 g, 1,05 eq) en 80 ml de DCM y se añadieron lentamente EDC HCl (2,49 g, 1,3 eq), hidroxisuccinimida (NHS) (1,15 g, 1,0 eq) y trietilamina (3,2 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante al menos 5 h y la reacción fue seguida de TLC. Posteriormente, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,8:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento: 81,0 %.

15 Etapa 4. Se puso el cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,35 g, 1,15 eq) en un matraz de dos bocas. Al vacío durante 1 h, se derivó la válvula de tres vías al dispositivo de nitrógeno y se añadieron 60 ml de DCM con una jeringa. El **producto de la etapa 3** pesado se disolvió con 10-15 ml de DCM, se inyectó en el matraz de reacción con una jeringa y después se añadió lentamente trietilamina (4,5 ml, 2,3 eq). La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo durante aproximadamente 1 h y después de nuevo a temperatura ambiente durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando EtOAc:Hex:MeOH = 1:2:0,2. El producto fue un líquido de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 50,6 %.

20 Etapa 5. El **producto de la etapa 4** pesado (3,5 g, 1,0 eq) se disolvió en 120 ml de DCM y después se añadió lentamente hidrato de hidrazina (6,5 ml, 10,0 eq). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. El color de la solución viró de amarillo pálido a naranja. Después de finalizar la reacción, la mezcla se inactivó añadiendo ddH₂O y se extrajo 2-3 veces con DCM. La capa orgánica se recogió, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró con MgSO₄ y después se retiró el DCM. El extracto se purificó con la columna usando DCM:MeOH = 9,5:0,5. En esta etapa, el producto quedó retenido en la columna y el MeOH puede aumentarse al 5 % para eluir el producto final. El producto fue un sólido pegajoso de color amarillo pálido. Rendimiento después de la purificación: 31,2 %.

Ejemplo 20 Ensayo de citotoxicidad de enlazadores de la invención

40 Se examinó la citotoxicidad de 9 enlazadores y se calculó el valor de CI₅₀ para cada enlazador. Para la prueba de citotoxicidad se seleccionaron de adenocarcinoma de mama, MCF7, MDA-MB-453 y MDA-MB-231 y las células epiteliales mamarias humanas H184B5F5/M10. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se trataron con Enlazador I-1 (Enlazador I-amida, m=2), Enlazador I-2 (Enlazador I-amida, m=1), Enlazador I-3 (Enlazador I-amida, m=3), Enlazador I-4 (Enlazador I-amida, m=4), Enlazador I-5 (Enlazador I-amida, m=5), Enlazador II-1 (Enlazador I-amida, z=1), Enlazador II-2 (Enlazador I-amida, z=2), Enlazador II-3 (Enlazador I-amida, z=3) y Enlazador II-4 (Enlazador II-amida, z=4) y se incubaron adicionalmente durante 72 horas a 37 °C. Después de tomar fotos, se contaron las células usando un hemocitómetro. Se comparó la inhibición del crecimiento con los controles no tratados para hallar la concentración del enlazador que inhibió el crecimiento en un 50 % (CI₅₀). Se muestra el resumen de la CI₅₀ en la tabla. 1. Los valores de la CI₅₀ fueron de 300 a 700 μM en el enlazador I-1 al enlazador I-5 y el enlazador II-1. El valor de CI₅₀ del enlazador II-2 al II-4 es mayor de 800 μM. Estos datos sugieren que la toxicidad celular es baja para un enlazador para conjugar un fármaco y nanopartículas de oro para el suministro de fármacos.

Tabla. 1 Resumen de valores de CI₅₀ de citotoxicidad de enlazadores en MCF7, MDA-MB-453 y MDA-MB-231 de carcinoma de mama y en células epiteliales mamarias humanas H184B5F5/M10 durante 72 horas.

Valor de CI ₅₀ para la citotoxicidad del enlazador (μM)	MCF7	MDA-MB-231	M10	MDA-MB-453
Enlazador I-1	692,0 ± 51,9	528,9 ± 52,1	584,4 ± 62,7	298,6 ± 23
Enlazador I-2	730 ± 36,7	535,6 ± 21,6	685,7 ± 105,5	432,5 ± 96,6
Enlazador I-3	538,2 ± 39,6	453,7 ± 141,7	555 ± 33,5	332,9 ± 9,8
Enlazador I-4	569,2 ± 14,1	575,6 ± 81,9	560 ± 45,1	342,3 ± 11
Enlazador I-5	418,9 ± 23,8	484,3 ± 64,6	569,3 ± 54,7	460 ± 87,9
Enlazador II-1	500,8	474,3	500,4	> 800
Enlazador II-2	> 800	> 800	> 800	> 800
Enlazador II-3	> 800	428,3 ± 116,2	585,3 ± 132,2	> 800

55

(continuación)

Valor de CI ₅₀ para la citotoxicidad del enlazador (µM)	MCF7	MDA-MB-231	M10	MDA-MB-453
Enlazador II-4	> 800	> 800	> 800	> 800
Enlazador IV-2	> 800	655,5	> 800	708,4 ± 35,3
Enlazador SHI-1	> 800	558,9 ± 23,3	> 800	128,3 ± 15,1
Enlazador SHI-4	> 800	532,7 ± 63,9	> 800	129,7 ± 13,4

Ejemplo 21 Preparación de complejos de nanopartículas de oro, enlazador y fármaco anticáncer y/o anticuerpo

1. Complejo de Au/IKI-1/mAb-p24

Preparación del complejo Au/IKI-1/mAb-p24

Para conjugar el anticuerpo sobre nanopartículas de oro, se concentró el anticuerpo anti-VIH-1 p24 (VIH-1 p24) (GeneTex, GTX41595) usando un filtro de centrifugadora de 10 kDa MWCO (Millipore, UFC501024) y se disolvió en tampón de Na₂HP0₄ 100 mM, pH 7,4 a 1 mg/ml. A continuación, se añadieron 5 µl de NaIO₄ 100 mM en agua a 50 µl de solución de anticuerpo y la mezcla se incubó en la oscuridad durante 30 minutos. La reacción se inactivó añadiendo 250 µl de PBS 1 x. En este punto, se oxidaron los restos de carbohidrato de la porción Fc del anticuerpo a grupos aldehído. A continuación, se añadió enlazador 1-1 (**Enlazador I-amida, m=2**) a la solución de anticuerpo. El enlazador tiene grupos hidrazida y ditiol en sitios opuestos de la molécula. El resto de hidrazida interactúa con grupos aldehído de la porción Fc de las moléculas de anticuerpo modificadas. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se recogieron los anticuerpos tiolados usando filtros de centrifugación y se resuspendieron en tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4. Se mezclaron cien microlitros de los anticuerpos tiolados a una concentración de 0,1 mg/ml con 0,5 ml de nanopartículas de oro y la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Los complejos de anticuerpo-nanopartículas de oro se almacenaron a 4 °C para su uso posterior.

2. Caracterización del complejo Au/IKI-1/mAb-p24

Se analizó la formulación del complejo Au/IKI-1/mAb-p24 con un espectrofotómetro de UV-Vis (Beckman, DU 800). Los espectros de resonancia de plasmón superficial registrados mostraron un desplazamiento al rojo de 2 nm en el pico de plasmón ($\lambda_{m\acute{a}x}$) de las partículas de oro conjugadas con anticuerpo (figura 1A). Se midió la fluorescencia roja de imágenes de anticuerpos secundarios marcados con Alexa Fluor 568 de complejo Au/IKI-1/mAb-p24 usando un microscopio invertido (Nikon, TE2000-U). Cada nanopartícula de oro mostró fluorescencia roja, lo que sugiere que cada partícula de oro se conjugó con anticuerpos P24 anti-VIH-1 en la superficie (figura 1B). Además, se investigó la afinidad de unión de los anticuerpos P24 anti-VIH-1 a las nanopartículas de oro. Mediante ELISA, se pudo confirmar la afinidad de unión de los complejos Au/IKI-1/mAb-p24 a proteínas P24 anti-VIH-1 (figura 1C).

2. Complejo Au/IKI-1 o LK I-5/Ab-EGFR Preparación del complejo Au/IKI-1 o LKI-5/ Ab-EGFR

Para conjugar el anticuerpo sobre nanopartículas de oro, se concentró el clon H11 de anti-EGFR humano (Thermo, MA1-12693) usando un filtro de centrifugación de 10 kDa de MWCO (Millipore, UFC501024) y se disolvió en tampón de Na₂HP0₄ 100 mM, pH 7,4 a 1 mg/ml. A continuación, se añadieron 5 µl de NaIO₄ 100 mM en agua a 50 µl de solución de anticuerpo y la mezcla se incubó en la oscuridad durante 30 minutos. La reacción se inactivó añadiendo 250 µl de PBS 1 x. En este punto, se oxidaron los restos de carbohidrato de la porción Fc del anticuerpo a grupos aldehído. A continuación, se añadió enlazador 1-1 (**Enlazador I-amida, m=2**) o enlazador 1-5 (**Enlazador I-amida, m=5**) a la solución de anticuerpo. El enlazador tiene grupos hidrazida y ditiol en sitios opuestos de la molécula. El resto de hidrazida interactúa con grupos aldehído de la porción Fc de las moléculas de anticuerpo modificadas. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se recogieron los anticuerpos tiolados usando filtros de centrifugación y se resuspendieron en tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4. Se mezclaron cien microlitros de los anticuerpos tiolados a una concentración de 0,1 mg/ml con 0,5 ml de nanopartículas de oro y la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Los complejos de anticuerpo-nanopartículas de oro se almacenaron a 4 °C para su uso posterior.

Caracterización del complejo Au/IKI-1 o LK I-5/Ab-EGFR

Se analizó la formulación del complejo de Au/IKI-1/Ab-EGFR o del complejo Au/LK I-5/Ab-EGFR con un espectrofotómetro de UV-Vis (Beckman, DU 800). Los espectros de resonancia de plasmón superficial registrados mostraron un desplazamiento al rojo de 2 nm en el pico de plasmón ($\lambda_{m\acute{a}x}$) de las partículas de oro conjugadas con anticuerpo (figura 2). Se examinaron dos enlazadores, el enlazador 1-1 (**Enlazador I-amida (m=2)**) y el enlazador 1-5 (**Enlazador I-amida (m=5)**), para la conjugación de anticuerpo para EGFR y nanopartículas de oro. El análisis por citometría de flujo del complejo Au/IKI-1/Ab-EGFR y el complejo Au/IKI-5/Ab-EGFR demostró afinidad por las células

de adenocarcinoma de mama humano MCF-7. Tanto el complejo Au/IKI-1/Ab-EGFR como el complejo Au/IKI-5/Ab-EGFR mostraron una capacidad de direccionamiento similar a la del anticuerpo para EGFR (tabla 2). Estos datos sugieren que el enlazador es adecuado para la conjugación con anticuerpo y nanopartículas de oro y mantienen la afinidad de unión del anticuerpo.

5 Tabla. 2 Análisis por citometría de flujo del efecto de direccionamiento de Ab-EGFR, el complejo Au/IKI-1/Ab-EGFR y el complejo Au/IKI-5/Ab-EGFR a EGFR de la superficie de células de tumor mamario MCF-7.

	Ab-EGFR	Complejo Au/IKI-1/Ab-EGFR	Complejo Au/IKI-5/Ab-EGFR
% de EGFR diana en la superficie celular (línea celular: MCF-7)	71,5	68	67

10 3. Complejo Au/IKI-1/trastuzumab (Tras) Preparación del complejo Au/IKI-1/Tras

15 Para conjugar el anticuerpo sobre nanopartículas de oro, se concentró Tras (JHL Biotech, JHL1188) usando un filtro de centrifugación de 10 kDa de MWCO (Millipore, UFC501024) y se disolvió en tampón de Na₂HP0₄ 100 mM, pH 7,4 a 1 mg/ml. A continuación, se añadieron 5 µl de NaIO₄ 100 mM en agua a 50 µl de solución de anticuerpo y la mezcla se incubó en la oscuridad durante 30 minutos. La reacción se inactivó añadiendo 250 µl de PBS 1 x. En este punto, se oxidaron los restos de carbohidrato de la porción Fc del anticuerpo a grupos aldehído. A continuación, se añadió Enlazador 1-1 (**Enlazador I-amida (m=2)**) a la solución de anticuerpo. El enlazador tiene grupos hidrazida y ditiol en sitios opuestos de la molécula. El resto de hidrazida interactúa con grupos aldehído de la porción Fc de las moléculas de anticuerpo modificadas. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se recogieron los anticuerpos tiolados usando filtros de centrifugación y se resuspendieron en tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4. Se mezclaron cien microlitros de los anticuerpos tiolados a una concentración de 0,1 mg/ml con 0,5 ml de nanopartículas de oro y la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Se almacenó el complejo Au/IKI-1/Tras a 4 °C para su uso posterior.

25 Caracterización del complejo Au/IKI-1/Tras

30 Se analizó la formulación del complejo Au/IKI-1/Tras con un espectrofotómetro de UV-Vis (Beckman, DU 800). Los espectros de resonancia de plasmón superficial registrados mostraron un desplazamiento al rojo de 8 nm en el pico de plasmón ($\lambda_{m\acute{a}x}$) de las partículas de oro conjugadas con anticuerpo (figura 3). Se examinó el complejo Au/IKI-1/Tras. El análisis por citometría de flujo de Au/IKI-1/Tras demostró afinidad de direccionamiento a células de adenocarcinoma de mama humano. El complejo Au/IKI-1/Tras mostró una capacidad de direccionamiento similar a trastuzumab (tabla 3).

Tabla 3. Análisis por citometría de flujo del efecto de direccionamiento de Tras y Au/IKI-1/Tras a Her2/neu en la superficie de células de tumor mamario MDA-MB-453.

	Ab-EGFR	Complejo Au/IKI-1/Ab-EGFR
% de Trastuzumab a Her2/neu en la superficie celular (línea celular: MDA-MB-453)	99,89	99,98

35 4. Complejo de Au/IKI-1/Etanercept (ETA) Preparación del complejo Au/IKI-1/ETA

40 Para conjugar el anticuerpo sobre nanopartículas de oro, se concentró Etanercept (ETA) (Mycenax biotech, TuNEX) usando un filtro de centrifugación de 10 kDa de MWCO (Millipore, UFC501024) y se disolvió en tampón de Na₂HP0₄ 100 mM, pH 7,4 a 1 mg/ml. A continuación, se añadieron 5 µl de NaIO₄ 100 mM en agua a 50 µl de solución de anticuerpo y la mezcla se incubó en la oscuridad durante 30 minutos. La reacción se inactivó añadiendo 250 µl de PBS 1x. En este punto, se oxidaron los restos de carbohidrato de la porción Fc del anticuerpo a grupos aldehído. A continuación, se añadió enlazador 1-1 a la solución de anticuerpo. El enlazador tiene grupos hidrazida y ditiol en sitios opuestos de la molécula. El resto de hidrazida interactúa con grupos aldehído de la porción Fc de las moléculas de anticuerpo modificadas. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se recogieron los anticuerpos tiolados usando filtros de centrifugación y se resuspendieron en tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4. Se mezclaron cien microlitros de los anticuerpos tiolados a una concentración de 0,1 mg/ml con 0,5 ml de nanopartículas de oro y la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Se almacenó el complejo Au/IKI-1/ETA a 4 °C para su uso posterior.

50 Caracterización del complejo Au/IKI-1/ETA

55 Se analizó la formulación del complejo Au/IKI-1/ETA con un espectrofotómetro de UV-Vis (Beckman, DU 800). Los espectros de resonancia de plasmón superficial registrados mostraron un desplazamiento al rojo de 2 nm en el pico de plasmón ($\lambda_{m\acute{a}x}$) de Au/IKI-1/ETA (figura 4A). Se midió la fluorescencia roja de imágenes de anticuerpos secundarios marcados con Alexa Fluor 568 de complejo Au/IKI-1/ETA usando un microscopio invertido (Nikon,

TE2000-U). Cada nanopartícula de oro mostró fluorescencia roja, lo que sugiere que cada partícula de oro se conjugó con anticuerpos ETA en la superficie (figura 4B). Se examinó adicionalmente el complejo Au/IKI-1/ETA mediante unión con anticuerpo secundario conjugado con AuNP 1-5 nm. En las imágenes de TEM del complejo Au/IKI-1/ETA, se observó unión de anticuerpos anti-IgG humana secundarios marcados con oro de 1-5 nm a ETA ubicado sobre la superficie de AuNP (figura 4C). Se investigó adicionalmente la capacidad de bloqueo de TNF α de ETA y Au/IKI-1/ETA. Se trataron células MCF-7 (5×10^5) con las mezclas de 12,5 ng/ml de TNF α y 62,5, 125, 250, 500 ng/ml ETA o complejo de Au/IKI-1/ETA durante 2 horas, respectivamente. Las células tratadas se incubaron a 37 °C durante 72 horas y después se contaron los números de células mediante el ensayo MTS [(3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolio)]. Se observó capacidad de bloqueo de TNF α tanto solo en ETA como en el complejo Au/IKI-1/ETA. Se usaron ETA y el complejo Au/IKI-1/ETA para evaluar su capacidad de bloqueo de la apoptosis de células MCF-7 inducida por TNF α , Tabla 4. El complejo Au/IKI-1/ETA mostró una capacidad de bloqueo de TNF α similar en comparación con ETA

Tabla 4. Capacidad del complejo Au/IKI-1/ETA para bloquear la apoptosis de células MCF-7 inducida por TNF α

TNF α 12,5 ng/ml Dosis (ng/ml)	% de supervivencia celular relativa	
	ETA	Complejo Au/IKI-1/ETA
62,5	36,7 \pm 1,4	35,6 \pm 4,9
125	68,5 \pm 2,3	54,9 \pm 3,1
250	82,1 \pm 6,5	67,2 \pm 2,2
500	103,3 \pm 0,9	100,9 \pm 5,4

5. Complejo Au/IKI-1/Doxorrubicina (Dox) Preparación del complejo Au/IKI-1/Dox

Se añadieron 1 eq. de doxorrubicina y 2 eq. de enlazador 1-1 (Enlazador I-amida (m=2)) a MeOH seco y se mezcló a temperatura ambiente. Se añadió TFA (1,3 eq.) a la mezcla resultante para su reacción durante una noche. La mezcla resultante se filtró para obtener una solución transparente. La solución transparente se añadió a un matraz con 50 ml de EtOAc mediante un gotero, se agitó durante 20 minutos y se filtró para obtener Dox-Enlazador-1 sólido. El sólido resultante se lavó con EtOAc y después se secó. Se añadieron 400 μ l de Dox/IKI-1 (2000 ppm) y 2 μ l de NaOH a 1 ml de AuNP (50 ppm) y después se mezcló durante 21 horas. La mezcla se centrifugó a 1400 rpm durante 20 minutos. El precipitado resultante se lavó con agua DI y el precipitado resultante se resuspendió en agua DI. Se añadieron PEG (2K, 2000 Da) a la suspensión y se mezclaron durante una noche para obtener el complejo Au/IKI-1/Dox.

Caracterización del complejo Au/IKI-1/Dox

Se analizó el complejo Au/IKI-1/DOX con un espectrofotómetro de UV-Vis (Beckman, DU 800). Los espectros de resonancia de plasmón superficial registrados mostraron un desplazamiento al rojo de 3 nm en el pico de plasmón ($\lambda_{\text{máx}}$) del complejo Au/IKI-1/Dox (figura 5).

Otros enlazadores, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 11-1, 11-2, 11-3, 11-4, IV-2, SHI-1 y SHI-4, se usaron para conjugar DOX y nanopartículas de oro para obtener diversos complejos de acuerdo con el proceso anteriormente mencionado.

Ejemplo 22 Ensayo de citotoxicidad de complejos de Au/enlazadores (LK)/Dox

Se examinó la citotoxicidad de complejos Au/IKs/Dox y se calculó el valor de la CI_{50} . Para la prueba de citotoxicidad se seleccionaron de adenocarcinoma de mama, MCF7, MDA-MB-453 y MDA-MB-231 y las células epiteliales mamarias humanas H184B5F5/M10. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se trataron con Doxorrubicina 2 μ M (Dox), nanopartículas de oro de 20-50 nm conjugadas con doxorrubicina usando diversos enlazadores, como se muestra en la tabla a continuación y rematados con SH-PEG (Au/IK/Dox, contenía doxorrubicina 2 μ M) y se incubaron adicionalmente durante 72 horas a 37 °C. Se adquirió el ensayo de proliferación celular CellTiter 96 \oplus Aqueous One Solution (MTS) de Promega (Madison, WI, EE. UU.) y el ensayo se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midió la absorbancia a 490 nm usando un lector de microplacas (Bio-tek, Powerwave X340, Winooski, VT, EE. UU.). La inhibición del crecimiento se comparó con controles no tratados para hallar la concentración de complejos Au/IKs/Dox que inhibía el crecimiento en un 50 % (CI_{50}).

Tabla. 5 Resumen del valor de CI_{50} de la citotoxicidad de Au/IKs/Dox en MCF7, MDA-MB-453 y MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano y células epiteliales mamarias humanas H184B5F5/M10 durante 72 horas.

Valor de CI_{50} para la citotoxicidad de complejos (μ M)	MCF7	MDA-MB-231	MDA-MB-453	M10
Au/enlazador I-1/Dox	0,54 \pm 0,03	0,5 \pm 0,082	1,93 \pm 0,2	0,49 \pm 0,0138
Au/enlazador I-2/Dox	0,7 \pm 0,0096	0,86 \pm 0,056	0,7 \pm 0,05	0,46 \pm 0,058
Au/enlazador I-3/Dox	> 2,0	> 2,0	> 2,0	> 2,0
Au/enlazador I-4/Dox	> 2,0	> 2,0	> 2,0	> 2,0

(continuación)

Valor de CI ₅₀ para la citotoxicidad de complejos (µM)	MCF7	MDA-MB-231	MDA-MB-453	M10
Au/enlazador I-5/Dox	> 2,0	> 2,0	> 2,0	> 2,0
Au/enlazador II-1/Dox	0,65 ± 0,037	0,83 ± 0,027	0,69 ± 0,026	0,56 ± 0,015
Au/enlazador II-2/Dox	> 2,0	0,98 ± 0,26	> 2,0	0,67 ± 0,1
Au/enlazador II-3/Dox	0,76 ± 0,03	0,46 ± 0,035	0,85 ± 0,319	0,19 ± 0,03
Au/enlazador II-4/Dox	> 2,0	> 2,0	1,9 ± 0,12	0,7 ± 0,137
Au/enlazador IV-2/Dox	0,77 ± 0,02	0,57 ± 0,048	0,73 ± 0,073	0,49 ± 0,031
Au/enlazador SHI-1/Dox	0,82 ± 0,09	> 2,0	> 2,0	> 2,0
Au/enlazador SHI-4/Dox	0,75 ± 0,15	> 2,0	> 2,0	> 2,0
Dox	0,41 ± 0,055	0,67 ± 0,088	0,65 ± 0,072	0,14 ± 0,034

Los valores de CI₅₀ fueron de 0,46-1,93 µM para el complejo Au/IK/Dox (LKI-1, LKI-2, LKII-1, LKII-3 y LKIV-2) para las células cancerosas (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453) similar a la de Dox. Para las células normales, M10, la toxicidad celular de los complejos es menor que la de Dox. Los datos sugieren que los complejos Au/IKs/Dox son más seguros que Dox.

Ejemplo 23 Prueba de liberación de LKI-1 sensible al pH del complejo Au/IKI-1/Dox

Se centrifugó 1 ml de solución de complejo Au/IKI-1/Dox a 14000 rpm durante 20 minutos. Se desechó el sobrenadante y se añadió un tampón con pH 5,5 o un tampón con pH 7,4. Después de diferentes puntos de tiempo, se centrifugó la solución de complejo a 14000 rpm durante 20 minutos y después se recogió el sobrenadante para escanear la fluorescencia a 557.6 nm (espectrofotómetro F-4500 FL) para obtener los valores de DO. Las cantidades de Dox liberadas por el complejo pueden obtenerse mediante interpolación con una curva patrón de Dox (X horas de cantidad liberada de Dox).

Se centrifugó 1 ml de solución de complejo Au/IKI-1/Dox a 14000 rpm durante 20 minutos. Se desechó el sobrenadante y se añadió un tampón con pH 1,0. Después de una hora, se centrifugó la solución de complejo a 14000 rpm durante 20 minutos y después se recogió el sobrenadante para escanear la fluorescencia a 557.6 nm (espectrofotómetro F-4500 FL) para obtener los valores de DO. Puede obtenerse la liberación al 100 % de Dox mediante interpolación con una curva patrón de Dox (pH = 1, incubación 1 h, cantidad liberada de Dox). El porcentaje de liberación acumulativo de Dox se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula.

• • % de liberación acumulativo de Dox - (cantidad de liberación de Dox a las X horas/cantidad liberada de dox con incubación de 1 h a pH=1)* 100 %

Tabla 6 Prueba de liberación de LKI-1 sensible al pH del complejo Au/IKI-1/Dox

Tiempo de incubación (h)	Liberación de Dox de Au/IKI-1/Dox, (%)	
	pH=5,5	pH=7,4
1	23,40	6,12
3	27,87	7,30
5	27,80	7,39
7	32,11	7,54
12	37,16	7,51
24	46,01	7,91
48	55,39	8,96
72	70,45	8,88

Los datos muestran que LKI-1 podía liberar más Dox a pH 5,5 que a pH 7,4. En Au/IKI-1/Dox, se liberó más cantidad de Dox de manera dependiente del tiempo.

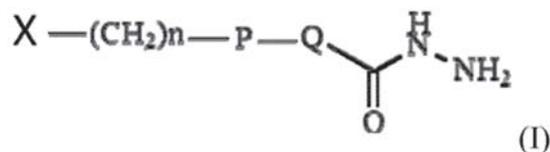
Ejemplo 24 Diseño de estudio de eficacia

Se adquirieron ratones BALB/c-nu/nu de BioLASCO Taiwan. Se inyectó unilateralmente a ratones macho de ocho semanas de edad $1,0 \times 10^7$ células de tumor de mama MDA-MB-231 en 200 µl de Matrigel/solución de Leibovitz 50:50 (L-15) en el dorso mediante inyección subcutánea. (1) Vehículo-PBS (control negativo), (2) Doxorubicina (control positivo), 5 mg/kg, (3) Au/PEG, (4) Complejo **Au/IKI-1/Dox**, 5 mg/kg de Dox. Se continuó con el tratamiento hasta que los síntomas clínicos indicaron que se necesitaba sacrificar. Se pesó a los ratones un mínimo de dos veces a la semana y se monitorizó el tamaño tumoral hasta que los síntomas clínicos indicaron que se necesitaba sacrificar (véase la figura 6A, 6B). Imágenes de TEM de células de tumor mamario MDA-MB-231 tratadas con

complejo Au/IKI-1/Dox en el modelo de xenoinjerto. Las flechas en la figura muestran que el complejo Au/IKI-1/Dox existe dentro de las células de tumor mamario MDA-MB-231, (véase la figura 6C) tinción de H&E de células tumorales MDA-MB-231 tratadas con complejo Au/IKI-1/Dox en el modelo de xenoinjerto, (véase la figura 6D)

REIVINDICACIONES

1. Un enlazador sensible al pH que tiene la siguiente fórmula (I),



5

en donde

X es

10



-SH, -NH₂, Boc-NH-, Fmoc-NH-, -COOH;

n es de 1 a 6;

15

P es -C(O)NH- o -C(O)O-;

Q es -R(CH₂CH₂O)_m-, R(-C(O)NH-)z o -R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]Y;

R es un enlace, -alquilo C₁₋₁₂ o alcoxi C₁₋₁₀;

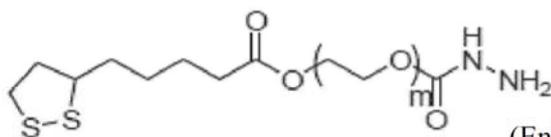
m es de 1 a 12;

z es de 1 a 4; y

20

Y es de 1 a 12.

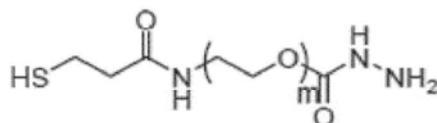
2. El enlazador sensible al pH de la reivindicación 1, que tiene una fórmula seleccionada entre:



(Enlazador I-C(O)O; Enlazador III).

25

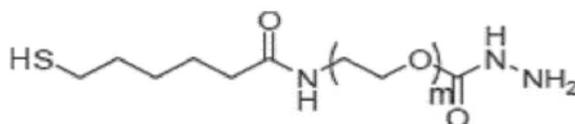
en donde m es de 1 a 12;



(SH-C₂-enlazador I),

30

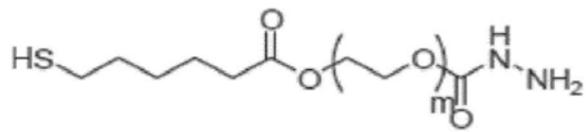
en donde m es de 1 a 12;



(SH-C₅-enlazador-I-amida),

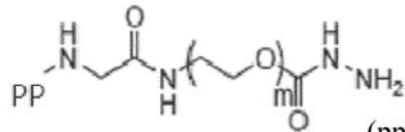
35

en donde m es de 1 a 12;



(SH-C₅-enlazador-I-C(O)O-;HS-C₅-enlazador-III),

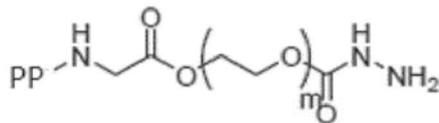
en donde m es de 1 a 12;



(ppNH-C₁-enlazador-I-amida),

5

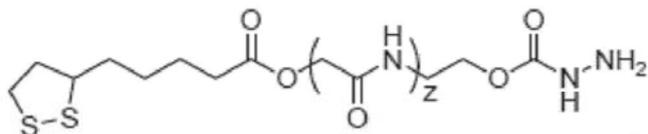
en donde pp es Boc o Fmoc y m es de 1 a 12;



(ppNH-C₁-enlazador-I-C(O)O-; NH₂-C₁-enlazador-III-C(O)O-),

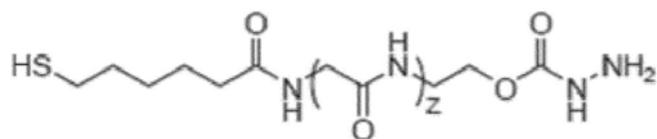
10

en donde pp es Boc o Fmoc y m es de 1 a 12;



(Enlazador II-C(O)O-),

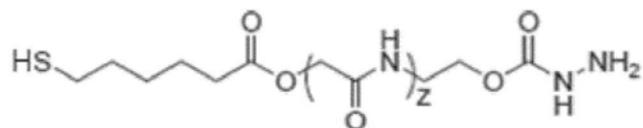
15 en donde z es de 1 a 4;



(SH-C₅-enlazador-II-amida),

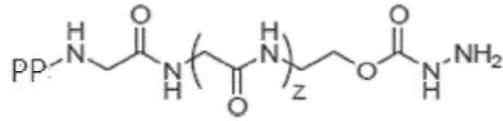
en donde z es de 1 a 4;

20



(SH-C₅-enlazador-II-C(O)O-),

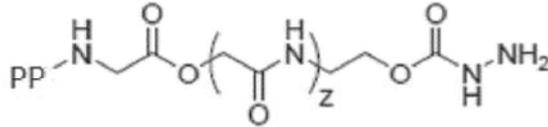
en donde z es de 1 a 4;



(ppNH-C₁-enlazador-II-amida),

en donde pp es Boc o Fmoc y
z es de 1 a 4;

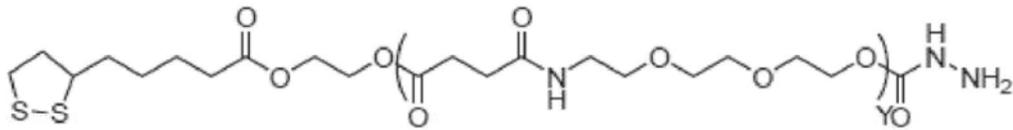
5



(ppNH-C₁-enlazador-II-C(O)O-),

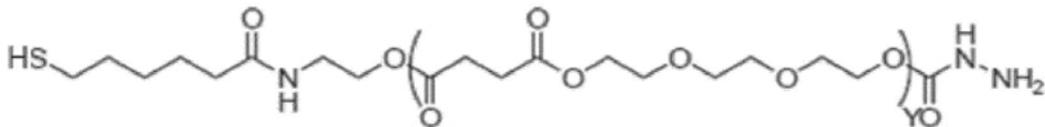
en donde pp es Boc o Fmoc y
z es de 1 a 4;

10



(Enlazador IV-C(O)O-),

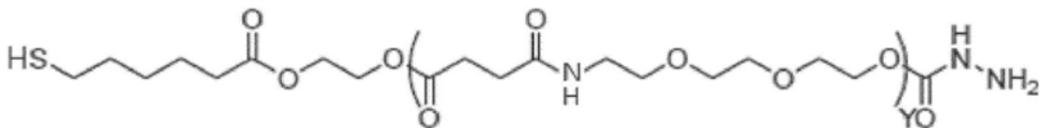
en donde Y es de 1 a 12;



(SH-C₅-enlazador-IV-amida),

15

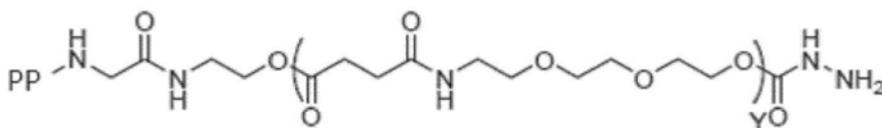
en donde Y es de 1 a 12;



(SH-C₅-enlazador-IV-C(O)O-),

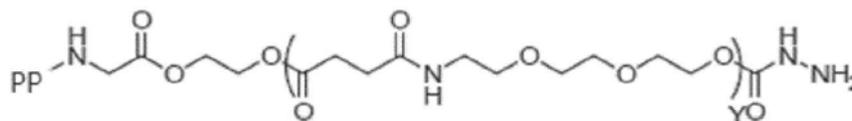
20

en donde Y es de 1 a 12;



(ppNH-C₁-enlazador-IV-amida),

25 en donde pp es Boc o Fmoc e Y es de 1 a 12; o

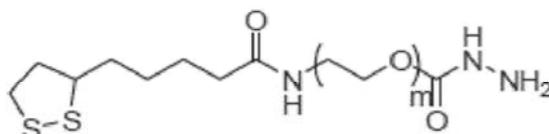


(ppNH-C₁-enlazador-IV-C(O)O-),

en donde pp es Boc o Fmoc e Y es de 1 a 12.

5

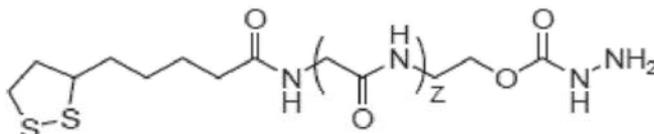
3. El enlazador sensible al pH de la reivindicación 1, que tiene la siguiente fórmula:



(Enlazador I-amida),

10 en donde m es de 1 a 12.

4. El enlazador sensible al pH de la reivindicación 1, que tiene la siguiente fórmula:

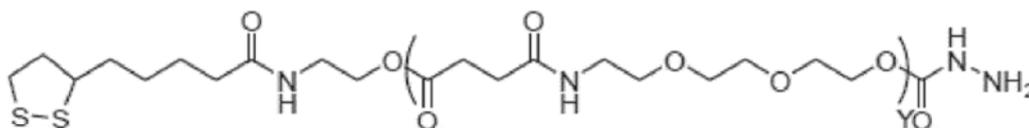


(Enlazador II-amida),

15

en donde z es de 1 a 4.

5. El enlazador sensible al pH de la reivindicación 1, que tiene la siguiente fórmula:



(Enlazador IV-amida),

20

en donde Y es de 1 a 12.

25 6. Un complejo de nanopartícula metálica, que comprende una nanopartícula metálica complejada con uno o más enlazadores de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, opcionalmente complejada con uno o más PEG.

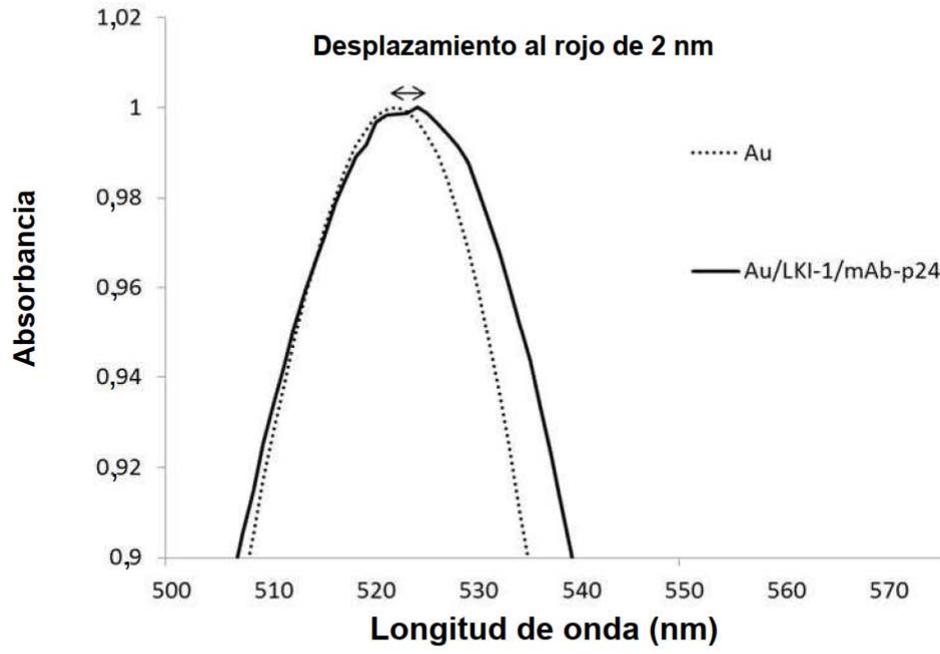
30 7. El complejo de nanopartícula metálica de la reivindicación 6, en donde: (a) la nanopartícula metálica es una nanopartícula de Au, nanopartícula de Pd, nanopartícula de Pt o nanopartícula de Ag; y/o (b) los uno o más enlazadores son iguales o diferentes; y/o (c) el complejo de nanopartícula metálica comprende varios enlazadores con diferentes longitudes moleculares; y/o (d) el peso molecular del PEG usado en la invención varía de 2000 a 20.000 Da; y/o (e) en donde la nanopartícula metálica tiene un tamaño menor de 80 nm.

35 8. El complejo de nanopartícula metálica de la reivindicación 6, en donde el complejo de nanopartícula metálica enlaza además uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico iguales o diferentes.

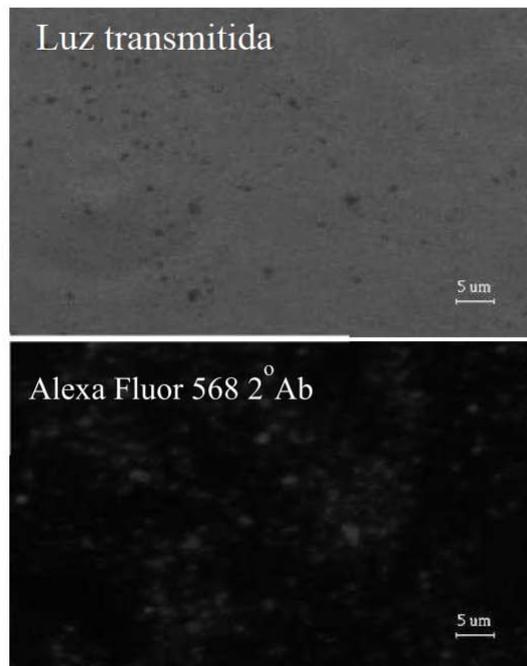
9. El complejo de nanopartícula metálica de la reivindicación 8, en donde el agente terapéutico es un fármaco antitumoral o un anticuerpo; preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo dirigido a una célula específica, tal como una célula tumoral o un anticuerpo antitumoral.

10. El complejo de nanopartícula metálica de la reivindicación 9, en donde el fármaco antitumoral es un fármaco anticáncer y, opcionalmente, en donde: (a) el fármaco anticáncer es un agente alquilante, un sulfonato de alquilo, una aziridina, un análogo de purina, un análogo de pirimidina, camptotecina o doxorubicina, cisplatino; y/o (b) la cantidad del agente anticáncer representa de un 1 % a un 50 % (peso/peso) del complejo de nanopartícula metálica.
- 5
11. Una composición farmacéutica, que comprende uno o más complejos de nanopartícula metálica que enlazan uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico iguales o diferentes y un portador farmacéuticamente aceptable.
12. El complejo de nanopartícula metálica de la reivindicación 8 para su uso como medicamento.
- 10
13. Un método para suministrar un agente de diagnóstico a un sujeto, que comprende administrar el complejo de nanopartícula metálica de la reivindicación 8 al sujeto.
- 15
14. Un sistema de suministro de fármaco, que comprende uno o más complejos de nanopartícula metálica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que se unen a uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico iguales o diferentes.

(A)



(B)



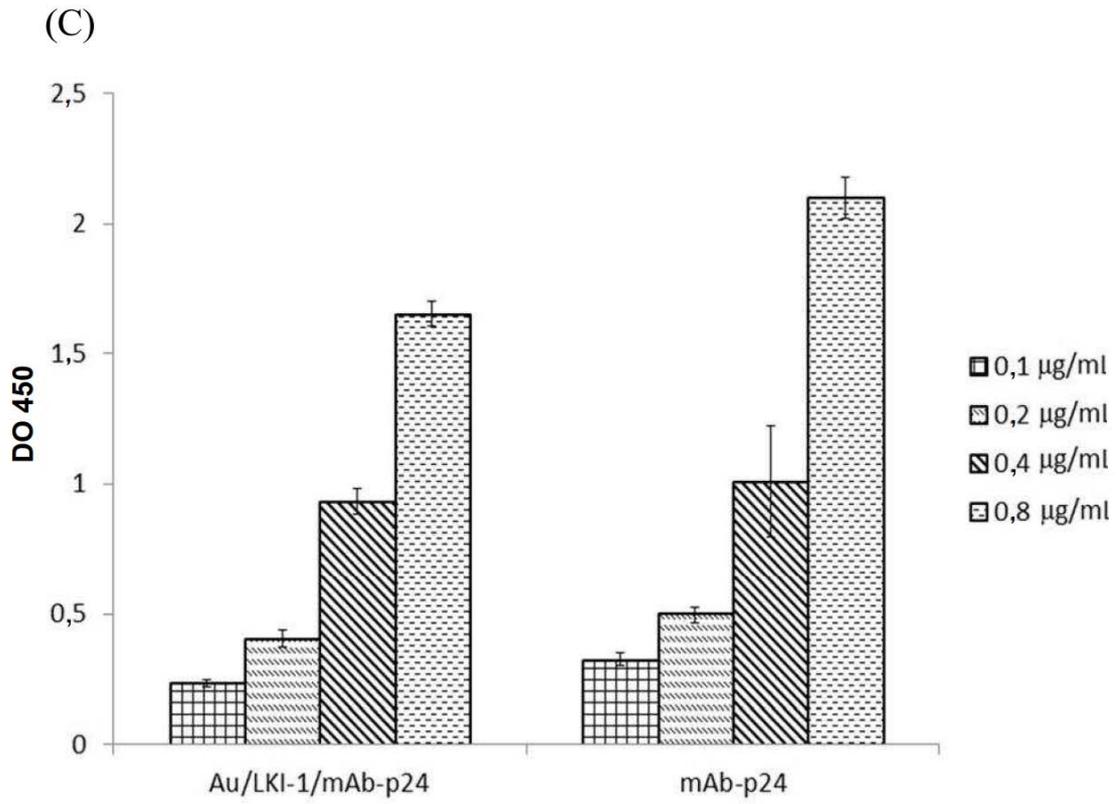
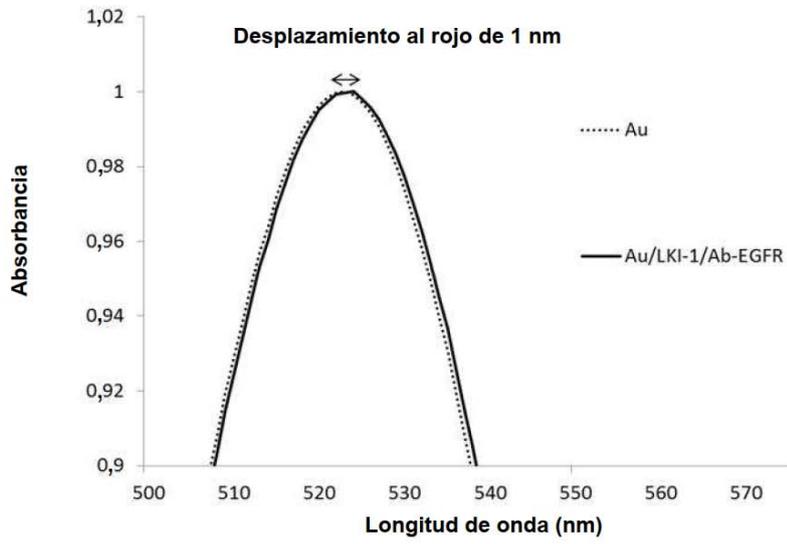


Fig. 1

(A)



(B)

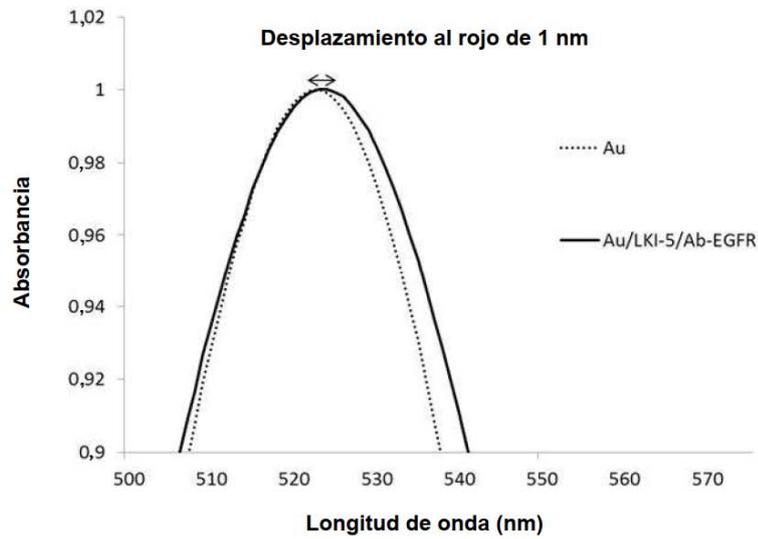


Fig. 2

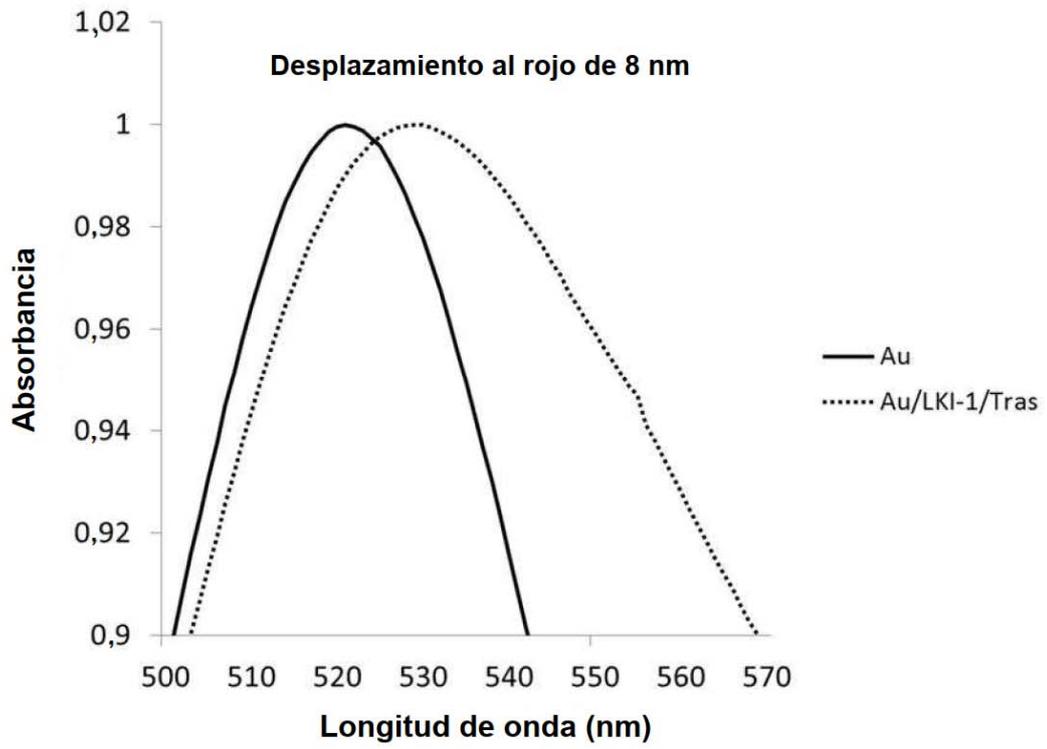


Fig. 3

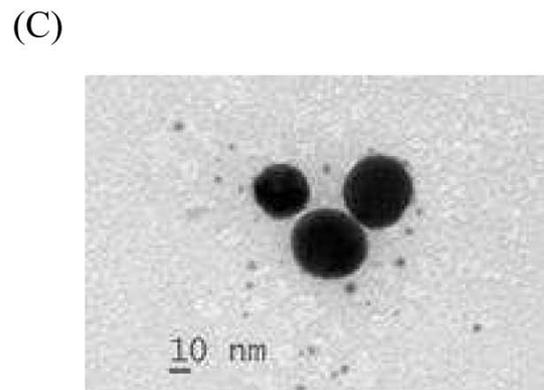
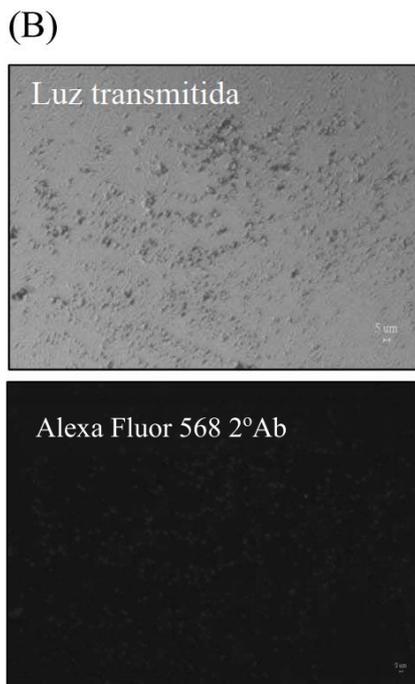
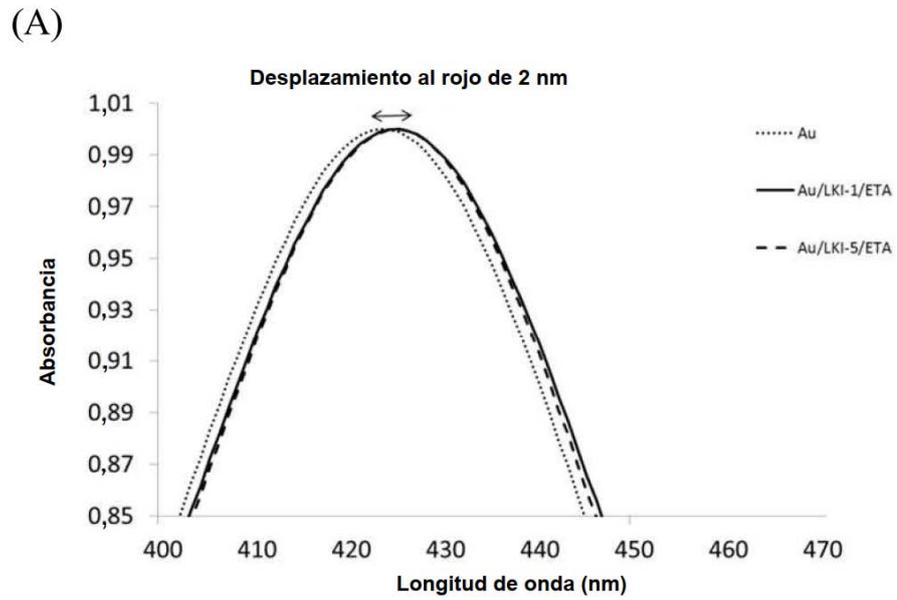


Fig. 4

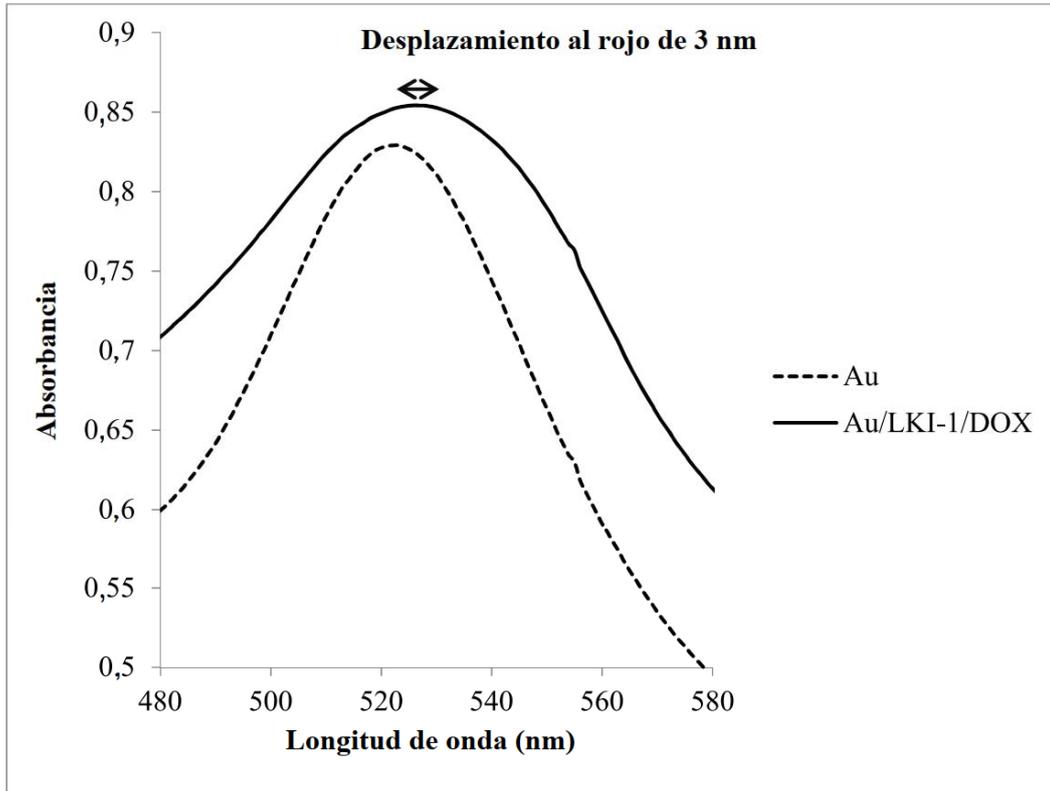
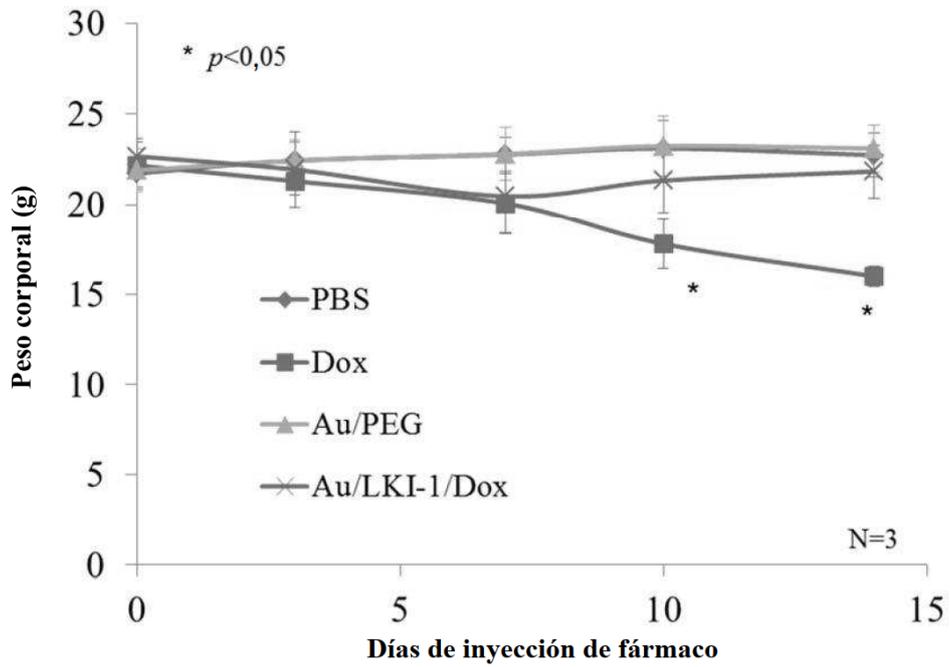
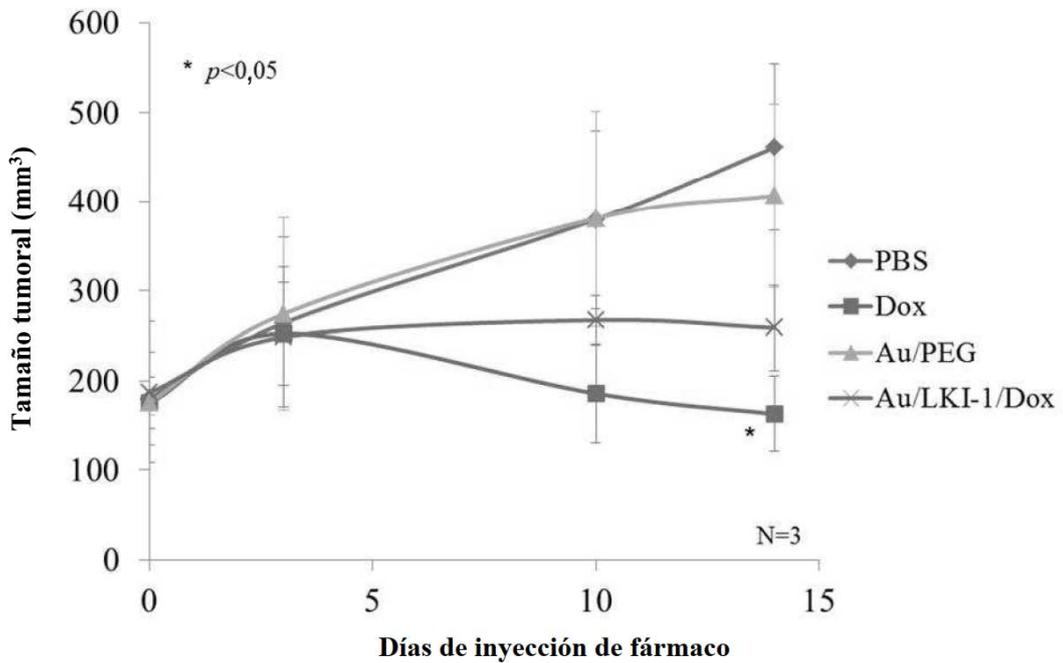


Fig. 5

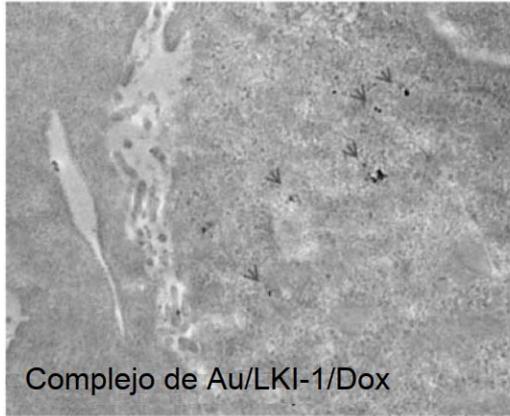
(A)



(B)



(C)



(D)

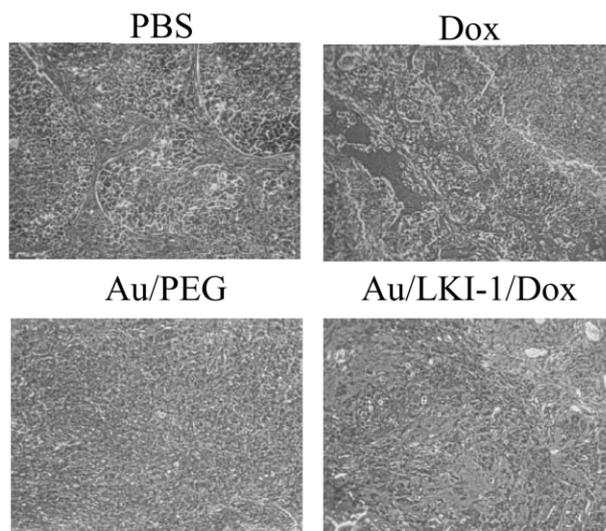


Fig. 6