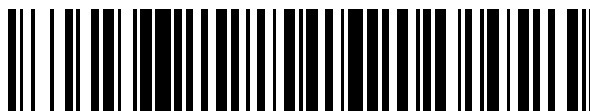


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 152**

51 Int. Cl.:

A61K 49/18 (2006.01)

A61K 49/04 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2010 PCT/EP2010/066429**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11051422**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2010 E 10771742 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2493512**

54 Título: **Tratamiento de nanopartículas insolubles en agua con conjugados del ácido hidroxifosfónico hidrofílico, las nanopartículas así modificadas y su uso como agentes de contraste**

30 Prioridad:

30.10.2009 US 609799

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

18.07.2019

73 Titular/es:

**GENERAL ELECTRIC COMPANY (100.0%)
1 River Road
Schenectady, NY 12345, US**

72 Inventor/es:

**BALES, BRIAN, C.;
HAY, BRUCE, ALAN y
KANDAPALLIL, BINIL, ITTY, IPE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 720 152 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

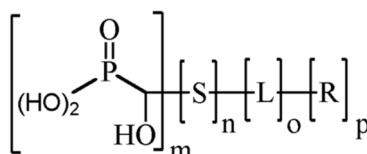
Tratamiento de nanopartículas insolubles en agua con conjugados del ácido hidroxifosfónico hidrofílico, las nanopartículas así modificadas y su uso como agentes de contraste

Antecedentes.

- 5 La invención se refiere en general al tratamiento de nanopartículas, particularmente aquellas basadas en óxidos de metales de transición, para hacerlas suficientemente hidrófilas para formar suspensiones acuosas estables y, por lo tanto ser útiles en aplicaciones que requieren hidrofiliidad, tales como agentes de contraste en imágenes de diagnóstico, como IRM y rayos X, para las nanopartículas hidrófilas resultantes de dicho tratamiento, a dichas suspensiones acuosas estables y al uso de dichas nanopartículas hidrófilas como agentes de contraste en dicha formación de imágenes. Las nanopartículas, es decir, partículas cuyos diámetros se miden adecuadamente en nanómetros, se han considerado para una amplia variedad de usos finales. Algunos de estos usos requieren cierto grado de hidrofiliidad pero el material sobre el cual se basan algunas nanopartículas puede carecer de este atributo. Por ejemplo, las nanopartículas con propiedades de imagen adecuadas para su uso como agentes de contraste para RM e imagen de rayos X se basan típicamente en óxidos de metales de transición que carecen de la hidrofiliidad adecuada. Por lo tanto, se han realizado esfuerzos para modificar las propiedades de la superficie de estas nanopartículas para que sean más compatibles con medios acuosos y dar a estas nanopartículas la capacidad de formar suspensiones acuosas estables. Sin embargo, en algunas aplicaciones tales como el uso como agentes de contraste también es deseable que las nanopartículas tengan una distribución de tamaño de partícula monodispersa y cualquier tratamiento de superficie que resulte en una distribución de tamaño de partícula polidispersa tal como agregación no uniforme mediante complejación en una matriz biológica basada en hidratos de carbono con grupos carboxilato es problemático. Además, en algunas aplicaciones, como el uso *in vivo* como agentes de contraste, es deseable que el tratamiento de la superficie tenga una estructura reproducible bien definida y esté sujeto a pruebas de seguridad. Los tratamientos de superficie a base de silano pueden ser problemáticos porque pueden sufrir una autocondensación que interfiere con estos objetivos.
- 25 Además, ha habido una necesidad de nanopartículas hidrófilas que no sufran una degradación de su hidrofiliidad como resultado de purificación y muestren estabilidad de suspensión en medios acuosos que contienen electrolitos. Por ejemplo, en la preparación de agentes de contraste para uso *in vivo* en sujetos humanos, las nanopartículas candidatas se someterían típicamente a filtración y se esperaría que mostraran estabilidad de suspensión en medios acuosos isotónicos, es decir, medios que contienen aproximadamente NaCl 150 mM. Se han realizado esfuerzos para utilizar la adhesión de fosfatos para óxidos de metales de transición para impartir este tipo de hidrofiliidad a nanopartículas utilizando solo materiales basados en fosfato, tal como ácido polifosfórico, o unidos a restos hidrófilos, como el polietilenglicol. En este sentido, existe una preferencia por restos hidrófilos con un potencial zeta esencialmente neutro para uso *in vivo* en sujetos humanos para evitar interacciones indeseables con tejido humano. Sin embargo, tales esfuerzos no han producido nanopartículas modificadas hidrófilamente que muestren la estabilidad deseada como una suspensión coloidal en un medio acuoso de NaCl 150 mM después de filtración. Por ejemplo, dichos esfuerzos no han producido suspensiones que muestren un tamaño de partícula esencialmente estable (sin aumento en el diámetro hidrodinámico (D_H)) medido por dispersión dinámica de la luz (DLS) después de filtración de flujo tangencial con un corte de 30 kDa y almacenamiento durante más de una semana en un medio tan acuoso.
- 40 La patente WO 2009/053596 A2 describe nanopartículas de óxido de hierro cubiertas con grupos de gem-bisfosfonato, en particular para uso en IRM.

Breve descripción.

- La presente invención implica el descubrimiento del rendimiento superior de conjugados de ácido α -hidroxifosfónico y un resto hidrófilo que se unen a través del átomo de carbono que lleva el grupo α -hidroxi como agentes para mejorar la hidrofiliidad de nanopartículas insolubles en agua, particularmente nanopartículas basadas en óxidos de metales de transición. En la presente invención, la nanopartícula es una nanopartícula superparamagnética basada en óxido de hierro o una nanopartícula radiopaca basada en óxido de tantalio. El enlace conjugado conserva los tres grupos hidroxilo del ácido α -hidroxifosfónico y se cree que esto da al conjugado adherencia superior a nanopartículas. El conjugado tiene la siguiente estructura I:



Estructura I

en donde S es un espaciador, L es un enlace entre S y R y R es un resto hidrófilo basado en unidades de óxido de etileno y m y p son 1-5 y n y o son 0-5. En algunas realizaciones, S es un enlace directo, un grupo alifático o cicloalifático

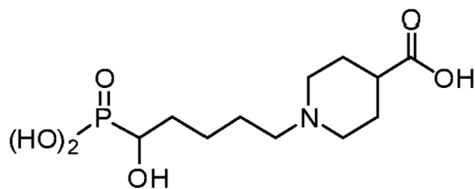
no sustituido o sustituido, un grupo arilo no sustituido o sustituido, un grupo heteroalifático o un grupo heteroarilo y en algunos casos es un grupo alquilo de cadena lineal de 1 a 10 átomos de carbono de longitud y L es un enlace directo, grupo carbonilo, grupo éter, grupo éster, amina secundaria o terciaria, grupo amina cuaternaria, grupo amida, grupo carbamato o grupo urea. Las nanopartículas adecuadas son aquellas que no son solubles en agua en el sentido clásico en el que las moléculas individuales del soluto se dispersan uniformemente en el disolvente en forma de azúcar o sal de mesa en agua. Por lo tanto, el tratamiento de nanopartículas que poseen cierto grado de capacidad de suspensión en agua con los conjugados de ácido alfa-hidroxifosfónico y las nanopartículas resultantes con los conjugados adheridos se incluyen en la presente descripción. En la presente invención, la nanopartícula insoluble en agua es una nanopartícula superparamagnética basada en óxido de hierro o una nanopartícula radiopaca basada en óxido de tantalio.

Es de particular interés que el conjugado no incluya grupos o restos que podrían tener reacciones indeseables con tejido humano. Por lo tanto, es conveniente que el conjugado muestre un potencial zeta entre aproximadamente -40 mV y 40 mV, preferiblemente entre aproximadamente -15 mV y 15 mV cuando se adhiere a una nanopartícula, siendo especialmente interesante que muestre un potencial zeta esencialmente neutro cuando se adhiere. Esto se logra convenientemente utilizando zwitteriones o restos no iónicos como el resto hidrófilo.

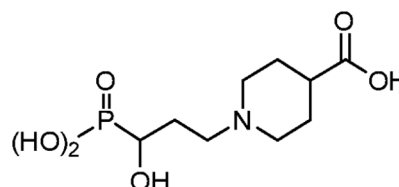
Los restos hidrófilos de la descripción pueden ser monoméricos o poliméricos pero es conveniente que tengan una carga neta iónica esencialmente neutral. Entre los restos hidrófilos poliméricos, son de especial interés aquellos poliéteres basados al menos parcialmente en unidades de óxido de etileno, tales como copolímeros de óxido de etileno/óxido de propileno y polietilenglicol. En la presente invención, el resto hidrófilo es un resto hidrófilo polimérico basado en unidades de óxido de etileno.

Restos hidrófilos monoméricos sin carga neta, particularmente los zwitteriones, son convenientes para conjugados utilizados para tratar nanopartículas para ser utilizados *in vivo* con sujetos humanos debido a la mayor facilidad para caracterizarlos para evaluaciones de seguridad. Entre estos, los basados en ácido 4-piperadinecarboxílico son de especial interés.

También es conveniente que los conjugados utilizados para tratar nanopartículas se usen *in vivo* con sujetos humanos, ya que el enlace entre el ácido α -hidroxifosfónico y un resto hidrófilo es un hidrato de carbono, es decir, en la estructura I A es un enlace simple. Esto minimiza la probabilidad de cualquier interacción entre dichas nanopartículas tratadas y el tejido humano. A este respecto, los conjugados de las siguientes estructuras II y III son de particular interés:



Estructura II



Estructura III

El conjugado es preferiblemente suficientemente hidrófilo que cuando se usa para tratar nanopartículas en una proporción de aproximadamente dos conjugados por nanopartícula hará que las nanopartículas sean capaces de formar suspensiones coloidales estables en medios acuosos con un D_H determinado por DLS de aproximadamente 500 nm o menos. Es particularmente conveniente que haga que las nanopartículas tratadas sean lo suficientemente hidrófilas para mostrar un valor inferior a uno para el logaritmo del coeficiente de distribución entre volúmenes iguales de n-octanol y tampón 0,1 M pH 7,0 ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS).

Las nanopartículas de la descripción que se tratan con el conjugado para lograr mayor hidrofiliidad se basan preferiblemente en metales de transición y compuestos de metales de transición tales como óxidos, carburos, sulfuros, nitruros, fosfuros, boruros, haluros, seleniuros, telururos y combinaciones de los mismos. Los óxidos son de particular interés. Se cree que la estructura del óxido contribuye a la adhesión del ácido α -hidroxifosfónico. Los compuestos de metales de transición son útiles para preparar agentes de contraste para imágenes de MR y rayos X. Los metales de transición del tercer período de la tabla periódica de elementos son útiles para formar compuestos que muestran paramagnetismo y convenientemente superparamagnetismo y por lo tanto son útiles como agentes de contraste de IRM. Especialmente convenientes son las nanopartículas superparamagnéticas basadas en óxido de hierro que forman parte de la presente invención y opcionalmente cobalto, cobre, manganeso, níquel o combinaciones de los mismos que forman parte de la descripción, pero no se reivindican.

De estos, los más convenientes son nanopartículas basadas en magnetita, maghemita o combinaciones de aproximadamente 15 nm o menos de diámetro y que muestran superparamagnetismo. Estas se conocen comúnmente como partículas de óxido de hierro superparamagnético (SPIO). Los metales de transición con un número atómico mayor que 34 y zinc son útiles para preparar compuestos útiles como agentes de contraste de rayos X. Entre estos

hafnio, molibdeno, plata, tantalio, wolframio y circonio son de interés particular, siendo el tantalio y particularmente el óxido de tantalio el más conveniente. La presente invención abarca también nanopartículas radiopacas basadas en óxido de tantalio.

5 Las nanopartículas modificadas hidrófilamente suelen tener un D_H determinado por DLS de 500 nm o menos. Es conveniente que su D_H sea de 50 nm o menos, más preferiblemente de 30 nm o menos y más preferiblemente que D_H esté entre 3 y 30 nm. Si las nanopartículas modificadas hidrófilamente se destinan para uso *in vivo* en sujetos humanos como, por ejemplo, agentes de contraste de IRM o rayos X, un D_H particularmente conveniente es de aproximadamente 8 nm o menos.

10 Las nanopartículas modificadas hidrófilamente se preparan convenientemente haciéndolas reaccionar con el conjugado. Un método conveniente es formar una suspensión coloidal de las nanopartículas en un disolvente orgánico como el tetrahidrofurano (THF) y después mezclarlo con una disolución orgánica del conjugado en la misma disolución orgánica o en otra diferente. La mezcla se puede mantener después a una temperatura elevada durante un período prolongado hasta que la reacción está esencialmente completada. Típicamente, son convenientes temperaturas de 50°C o más durante 16 horas o más.

15 Se obtienen fácilmente suspensiones coloidales acuosas monodispersas estables de las nanopartículas modificadas hidrófilamente. Dichas suspensiones deberían ser preferiblemente estables frente a filtración, como filtración de flujo tangencial frente a un corte de 30 kDa y la adición de electrolitos tal como la adición de NaCl para hacer que el medio acuoso sea isotónico, es decir, aproximadamente 150 mM de NaCl. Preferiblemente, las suspensiones son estables durante períodos de almacenamiento de una semana o más y, más preferiblemente son estables no solo frente
20 sedimentación sino también frente el crecimiento del D_H determinado por DLS de las nanopartículas suspendidas. Si las suspensiones están destinadas para uso *in vivo* en sujetos humanos, es conveniente hacerlas isotónicas mediante la adición de NaCl, dextrosa o combinaciones de las mismas.

25 Las suspensiones coloidales acuosas monodispersas estables se preparan convenientemente diluyendo una suspensión coloidal en un disolvente orgánico. Un método conveniente es simplemente diluir el disolvente orgánico o disolventes en los cuales las nanopartículas han reaccionado con el conjugado mediante la adición de agua. Otro método es hacer reaccionar una suspensión coloidal de las nanopartículas en un disolvente orgánico con el conjugado en agua. En cualquier caso, es conveniente eliminar los reactivos sin reaccionar por filtración o extracción orgánica con un disolvente como hexano o una combinación. Cualquier producto volátil en la fase acuosa después de la extracción con disolvente se puede eliminar mediante la aplicación de un vacío parcial. Después, las nanopartículas
30 modificadas hidrófilamente se pueden purificar por filtración de flujo tangencial contra un filtro de 30 kDa.

Las nanopartículas modificadas hidrófilamente se pueden usar convenientemente como agentes de contraste en diagnóstico por imagen. Los tipos comunes de tales imágenes de diagnóstico son la RM y rayos X. En cualquier caso, es conveniente usar nanopartículas modificadas hidrófilamente que tengan un potencial zeta entre aproximadamente -15 mV y 15 mV. Un método conveniente en la formación de imágenes *in vivo* de sujetos humanos es administrar las
35 nanopartículas por vía intravenosa, preferiblemente como una suspensión acuosa isotónica estable. Si la imagen debe ser por RM, las nanopartículas deberían comprender una especie paramagnética, preferiblemente superparamagnética, y lo más preferiblemente deberían estar basadas en óxido de hierro como magnetita o maghemita. Si la imagen debe ser por rayos X, las nanopartículas deberían comprender un compuesto de metal de transición de un metal con un número atómico mayor que 34 o zinc, preferiblemente oro, hafnio, molibdeno, plata.
40 tantalio, wolframio o circonio y lo más preferiblemente deberían estar basados en óxido de tantalio. En la presente invención, la nanopartícula es, por lo tanto, una nanopartícula superparamagnética basada en óxido de hierro o una nanopartícula radiopaca basada en óxido de tantalio.

En una realización particularmente interesante, las nanopartículas modificadas hidrófilamente tienen un D_H de 8 nm o menos y dejan el cuerpo del sujeto a través del riñón.

45 **Dibujos.**

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor cuando se lea la siguiente descripción detallada con referencia a los dibujos adjuntos, en los que los caracteres similares representan partes similares a los dibujos, en donde:

50 La figura 1 es una fórmula estructural genérica para ácidos alfa-hidroxi fosfónicos adecuados con los que se fabrican nanopartículas hidrófilas.

La figura 2 es la fórmula estructural para un ácido alfa-hidroxi fosfónico particularmente interesante con el que se fabrican nanopartículas hidrófilas en las que Me es un grupo metilo.

La figura 3 es una ruta sintética a ácidos alfa-hidroxifosfónicos con restos R hidrófilos unidos.

La figura 4 es una ruta sintética al ácido alfa-hidroxi fosfónico particularmente interesante mostrado en la figura 2.

La figura 5 es una representación esquemática hipotética de la unión de un ácido alfa-hidroximexfosfónico del tipo cuya síntesis se ilustra en la figura 3 con un resto hidrófilo R unido a una nanopartícula SPIO superparamagnética de óxido de hierro.

La figura 6A es una imagen ponderada en T_1 (TE = 4,1 ms) de un tumor según el ejemplo 12 sin agente de contraste.

- 5 La figura 6B es una imagen ponderada en T_1 (TE = 4,1 ms) de un tumor según el ejemplo 12, 30 minutos después de la administración del agente de contraste de nanopartícula del ejemplo 4.

La figura 6C es un mapa de diferencias de las diferencias entre la figura 6A y la figura 6B.

La figura 6D es una imagen ponderada en T_2^* (TE = 18,4 ms) de un tumor según el ejemplo 12 sin agente de contraste.

- 10 La figura 6E es una imagen ponderada en T_2^* (TE = 18,4 ms) de un tumor según el ejemplo 12 30 minutos después de la administración del agente de contraste de nanopartículas del ejemplo 4.

La figura 6F es un mapa de diferencia de relajación R_2^* de las diferencias entre la figura 6D y la figura 6E que muestra una clara distinción entre tumor y tejido muscular.

Descripción detallada.

- 15 Los conjugados de la presente invención se definen ampliamente para tener una amplia variedad de enlaces y restos hidrófilos. La característica clave es que el conjugado tiene los tres grupos hidroxilo del ácido α -hidroxi fosfónico que son química y estéricamente accesibles. Si bien la estructura tiene centros quirales, se espera que todos los enantiómeros individuales y las posibles mezclas racémicas sean adecuados para impartir hidrofiliidad a las nanopartículas insolubles en agua.

- 20 Estos conjugados pueden tener cualquiera de los enlaces químicos conocidos comúnmente entre la estructura del ácido α -hidroxifosfónico y el resto hidrófilo, incluidos los basados en carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre. Los grupos de interés particular son hidratos de carbono, carbonilo, éster, éter, amina secundaria o terciaria, amina cuaternaria, urea, carbamato y amida. El uso final previsto de las nanopartículas a tratar con el conjugado puede afectar la elección del grupo de enlace. Por ejemplo, si las nanopartículas se van a usar *in vivo*, particularmente en sujetos humanos, puede ser deseable evitar enlaces tales como grupos cuaternarios que puedan dar interacciones con componentes tisulares como proteínas. El grupo de enlace más interesante desde el punto de vista de la inercia es un hidrato de carbono.

- 30 El resto hidrófilo de la descripción puede ser cualquiera de los restos que se sabe que tienen buena compatibilidad con agua, incluyendo los conocidos como surfactantes. Pueden ser aniónicos, catiónicos o no iónicos. El resto hidrófilo puede ser un hidrato de carbono tal como mono, di u oligosacárido, un polialcohol monomérico sin hidrato de carbono, un poliéter con grupos de óxido de etileno, un polímero sin hidratos de carbono, otros distintos de los poliéteres con grupos de óxido de etileno, que tiene grupos hidroxilo colgantes tales como como alcohol de polivinilo, poli (etilenimina), una amina alifática o cicloalifática y sus combinaciones. Con respecto a la presente invención, el resto hidrófilo es un resto hidrófilo polimérico basado en unidades de óxido de etileno.

- 35 En algunas realizaciones, los restos hidrófilos se basan en óxido de etileno, siendo los poli (óxidos de etileno) de interés específico, particularmente aquellos con pesos moleculares iguales o menores que aproximadamente 5.000 daltons, especialmente aquellos con pesos moleculares iguales o menores que aproximadamente 2.000 daltons. Los poli (óxidos de etileno) con pesos moleculares de aproximadamente 350 daltons son de particular interés.

- 40 El resto hidrófilo de la descripción, pero que no es parte de la presente invención, también puede ser un zwitterión que tiene uno o más restos cargados positivamente, uno o más restos cargados negativamente y un grupo espaciador entre los restos cargados. Para los fines de esta solicitud, las combinaciones de restos cargados positivamente y restos cargados negativamente se consideran zwitteriones si a valores de pH fisiológico no muestran prácticamente ninguna carga neta. Restos cargados positivamente adecuados incluyen aminas primarias protonadas, aminas secundarias protonadas, alquil aminas terciarias protonadas, alquil aminas cuantitativas, amidinas protonadas, guanidinas protonadas, piridinas protonadas, pirimidinas protonadas, pirazinas protonadas, purinas protonadas, imidazoles protonados, pirroles protonados o combinaciones de los mismos, los grupos adecuados cargados negativamente incluyen ácidos carboxílicos desprotonados, ácidos sulfónicos desprotonados, ácidos sulfínicos desprotonados, ácidos fosfónicos desprotonados, ácidos fosfóricos desprotonados, ácidos fosfínicos desprotonados o combinaciones de los mismos y grupos espaciadores adecuados incluyen grupos alifáticos, cicloalifáticos y arilo no sustituidos y sustituidos, grupos heteroalifáticos, grupos heteroarilo, éteres, amidas, ésteres, carbamatos, ureas o combinaciones de los mismos. En una realización, los grupos espaciadores incluyen grupos alquilo de cadena lineal de 1 a 10 átomos de carbono de longitud.

- 50 Si el uso final previsto de las nanopartículas es compatible con las nanopartículas modificadas hidrófilamente con los conjugados de ácido alfa-hidroxifosfónico adheridos que tienen una carga iónica neta, el resto hidrófilo de la descripción puede ser cualquiera de los restos cargados positivamente o cualquiera de los restos cargados negativamente discutidos anteriormente como adecuados para la formación de zwitteriones.

El uso final previsto de las nanopartículas a tratar con el conjugado puede afectar la elección del resto hidrófilo. Por ejemplo, si las nanopartículas se van a usar *in vivo*, particularmente en sujetos humanos, puede ser deseable evitar restos hidrófilos tal como grupos iónicos, que pueden dar lugar a interacciones con componentes del tejido, como las proteínas. Para uso *in vivo*, restos hidrófilos con esencialmente ninguna carga neta tal como (no parte de la presente invención) y poliéteres con unidades de óxido de etileno (parte de la presente invención) son de particular interés. Para uso con sujetos humanos, son particularmente convenientes restos hidrófilos que se caracterizan fácil y reproduciblemente para evaluación de seguridad tales como los restos monoméricos y forman parte de la descripción, pero no de la presente invención. Particularmente los restos hidrófilos convenientes son aquellos basados en ácido 4-piperadinecarboxílico que son tanto monoméricos como los zwitterions no llevan carga neta. Para aplicaciones en las que la toxicidad es menos preocupante como la inoculación *in vitro* de cultivos celulares, poli(etileno)iminas pueden ser restos hidrófilos apropiados.

Zwitterions particularmente adecuados son parte de la descripción pero no de la presente invención se describen en la solicitud de patente de EEUU 12/344.604 presentada el 29 de diciembre de 2008, incorporada por referencia en la presente memoria. Estos incluyen restos hidrófilos que contienen nitrógenos catiónicos y grupos basados en ácidos aniónicos carboxílicos, fosfóricos y sulfónico, tales como ácido N, N-dimetil-3-sulfo N-(3-propil) propan-1-amonio, 3-(metil) propil) amino) propano-1-sulfónico, ácido 3-(propilamino) propano-1-sulfónico, ácido 2-(etoxi (hidroxi) fosforiloxi) -N, N, N-trimetiletanano, 2etil (hidroxi) fosforiloxi) -N, N, N-trimetiletanaminio, N, N, N-trimetil-3- (N-propionilsulfamoil) ropano-1 amonio, N-((2H-tetrazol-5-il) metil)-N, N-dimetil-propan-1-aluminio, N-(2-carboxietil) -N, N-dimetil-propan-1-amonio, ácido 3- (metilpropil) amino) propanoico, ácido 3- (propilamino) propanoico, N-(carboximetil)-N, N-dimetil -propan-1- amonio, ácido 2-(metilamino) acético, ácido 2-(propilamino) acético, ácido 2-(4-propilcarbamoil) piperazin-1-il) acético, ácido 3- (4propilcarbamoil) piperazin-1-il) propanoico, ácido 2-(metil (2-propilureido) etil) amino) acético y ácido 2-(2-(propilureido) etil) aminoacético.

Restos hidrófilos a base de poliéter hidrófilos adecuados se describen en la patente de EEUU 5.916.539 expedida el 29 de junio de 1999. Estos incluyen polietilen glicoles (PEG) de varios pesos moleculares con varios grupos terminales que incluyen amino e hidroxilo, así como copolímeros con polipropilenglicol (PPG).

El conjugado es preferiblemente suficientemente hidrófilo para que pueda hacer que las nanopartículas puedan formar suspensiones acuosas estables cuando reaccionan con las nanopartículas en una proporción de dos moles de conjugado a un mol de la base metálica de la nanopartícula. En este sentido, la nanopartícula se basará típicamente en un compuesto de metal de transición como un óxido o un metal de transición en sí mismo. Es conveniente especificar la proporción de reacción utilizando los moles de metal elemental, ya que esto se puede obtener fácilmente a partir de un análisis elemental de la suspensión de partida de nanopartículas en un disolvente orgánico. A partir del conocimiento de la composición química de las nanopartículas y su tamaño promedio antes del tratamiento, se puede realizar un cálculo aproximado de la cantidad de conjugado por nanopartícula. Es particularmente conveniente que el conjugado sea lo suficientemente hidrófilo para dar nanopartículas de óxido de hierro u óxido de tantalio de menos de 15 nm tratados en esta proporción con una hidrofiliidad suficiente para mostrar un valor inferior a uno para el logaritmo del coeficiente de distribución entre volúmenes iguales de n-octanol y tampón 0,1 M pH 7,0 MOPS.

Es de particular interés que las nanopartículas modificadas hidrófilamente con un conjugado de ácido alfa-hidroxifosfónico adherido sean suficientemente hidrófilas para formar una suspensión coloidal acuosa estable que no muestre un cambio sustancial en el diámetro hidrodinámico (D_H) según lo determinado por la dispersión dinámica de la luz (DLS) en agua 150 mM NaCl después de filtración de flujo tangencial y almacenamiento durante una semana a temperatura ambiente.

Las nanopartículas que forman parte de la descripción que deben ser tratadas con el conjugado pueden ser de cualquier material insoluble en agua que se pueda formar en partículas de 500 nm o menos a las que se adherirá el ácido α -hidroxi fosfónico de conjugado. Es de interés utilizar nanopartículas que tienen utilidad como agentes de contraste en imágenes RM o rayos X. Sin embargo, también son de interés las nanopartículas para otros usos finales, como la infusión de cultivos celulares por transfección de genes. La nanopartícula insoluble en agua de la presente invención es una nanopartícula superparamagnética basada en óxido de hierro o una nanopartícula radiopaca basada en óxido de tantalio.

Para su uso como agentes de contraste para IRM, la base de las nanopartículas debe ser un metal o sus compuestos que sean paramagnéticos, siendo de particular interés aquellos que son superparamagnéticos. Estos metales se extraen convenientemente de los metales de transición del período III de la tabla periódica de los elementos que comienzan con manganeso y terminan con zinc. Un grupo de materiales particularmente interesante son aquellos basados en óxido de hierro. Los materiales especialmente convenientes son aquellos conocidos como SPIO. Estos materiales tienen la fórmula general $[\text{Fe}_2^+ \text{O}_3] \times [\text{Fe}_2^+ \text{O}_3 (\text{M}^{2+} \text{O})]_{1-x}$ donde $1 \geq x \geq 0$. M^{2+} puede ser un ion metálico divalente como hierro, manganeso, níquel, cobalto, magnesio, cobre, zinc o una combinación de los mismos. Cuando el ion metálico (M^{2+}) es un ion ferroso (Fe^{2+}) y $x = 0$, el material es magnetita (Fe_3O_4), y cuando $x = 1$, el material es maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

En general, el superparamagnetismo ocurre cuando las regiones que contienen cristales de espines no apareados son lo suficientemente grandes como para que puedan considerarse como partículas de dominio único termodinámicamente independientes llamadas dominios magnéticos. Estos dominios magnéticos muestran un dipolo

magnético neto que es más grande que la suma de sus electrones individuales no pareados. En ausencia de un campo magnético aplicado, todos los dominios magnéticos están orientados aleatoriamente sin magnetización neta. La aplicación de un campo magnético externo hace que los momentos dipolares de todos los dominios magnéticos se reorienten dando como resultado un momento magnético neto. En algunas realizaciones, estos materiales demuestran una estructura cristalina de espinela como se muestra por análisis de microscopio electrónico de transmisión (TEM).

Para su uso como agentes de contraste de rayos X, la base de las nanopartículas debe ser un metal o sus compuestos que sean sustancialmente más radiopacos que los materiales que normalmente se encuentran en los organismos vivos. Es conveniente utilizar materiales con un número atómico efectivo mayor o igual a 34 cuando se encuentra en una concentración de aproximadamente 50 mM. Es probable que dichos materiales produzcan una mejora de contraste apropiada de aproximadamente 30 unidades Hounsfield (UH) o mayor, lo cual es una mejora mínima de particular interés. Ejemplos de elementos de metales de transición que pueden proporcionar esta propiedad incluyen tungsteno, tantalio, hafnio, circonio, molibdeno, plata y zinc. El óxido de tantalio es un ejemplo particular de una composición de núcleo adecuada para usar en aplicaciones de imágenes de rayos X. De especial interés son los materiales que conducen a una señal CT en un intervalo de aproximadamente 100 Hounsfield a aproximadamente 5.000 unidades Hounsfield.

Las nanopartículas modificadas hidrófilamente a las que se han adherido los ácidos alfa-hidroxifosfónicos se pueden usar como agentes de contraste en el diagnóstico por imagen. En una aplicación de este tipo, estas nanopartículas se administran a un sujeto, en algunas realizaciones un sujeto de mamífero, y luego el sujeto se somete a imágenes. Estas nanopartículas tienen una utilidad particular en imágenes RM y rayos X, aunque también pueden encontrar utilidad como agentes de contraste en imágenes de ultrasonido o marcador radioactivo.

Cuando se usan en imágenes de diagnóstico, particularmente de sujetos mamíferos y más particularmente de sujetos humanos, las nanopartículas modificadas hidrófilamente a las que se han adherido los ácidos alfa-hidroxifosfónicos se toman típicamente en un vehículo farmacéuticamente aceptable que puede o no comprender uno o más excipientes. Si la administración tiene que ser por inyección, particularmente inyección parenteral, el vehículo es típicamente un medio acuoso que se ha vuelto isotónico mediante la adición de aproximadamente 150 mM de NaCl, 5% de dextrosa o combinaciones de los mismos. Normalmente, también tiene un pH fisiológico de entre aproximadamente 7,3 y 7,4. La administración puede ser intravascular (IM), subcutánea (SQ) o más comúnmente intravenosa (IV). Sin embargo, la administración también puede ser a través de implantación de un depósito que luego libera lentamente las nanopartículas a la sangre o tejido del sujeto.

Alternativamente, la administración puede ser por ingestión para obtener imágenes del tracto GI o por inhalación para obtener imágenes de los pulmones y las vías respiratorias.

La administración a sujetos humanos, particularmente administración IV, requiere que las nanopartículas modificadas hidrófilamente a las que se han adherido los ácidos alfa-hidroxifosfónicos no sean tóxicas en las cantidades utilizadas y estén libres de agentes infecciosos, como bacterias y virus, y también libres de pirógenos. Por lo tanto, estas nanopartículas deben ser estables a los procedimientos de purificación necesarios y no sufrir una degradación en su hidrofiliidad.

Estas nanopartículas se pueden suministrar al sitio de administración como una suspensión coloidal acuosa estable con la osmolalidad y el pH adecuados, como una suspensión coloidal acuosa concentrada adecuada para la dilución y el ajuste o como un polvo, tal como se obtiene por liofilización, adecuado para reconstitución.

Ejemplo 1.

Síntesis de un conjugado PEG-350.

Síntesis de PEG-350 mono (metil éter) acetaldehído. A una disolución que contenía PEG-350 mono (metil éter) (3,438 g, 9,82 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (98 ml), se añadió Dess-Martin Periodinane (5,00 g, 11,79 mmol) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Durante la reacción se formó un precipitado fino, blanco y se eliminó al final de la reacción mediante filtración a través de una almohadilla de celite. El disolvente se eliminó del filtrado al vacío para dejar un sólido blanco suspendido en un aceite amarillo. El sólido se trituró con éter dietílico y el sólido se eliminó por filtración a través de una capa de celite. La eliminación del disolvente del filtrado a vacío dejó el producto PEG-350 mono (metil éter) acetaldehído (3,42 g, 100%) en forma de un aceite amarillo. ^1H NMR (CDCl_3) δ 9,73 (t, J = 4 Hz, 1H), 4,16 (d, J = 4 Hz, 2H), 3,65 (m, 24H), 3,38 (s, 3H) ppm. IR (puro) 2.873, 1.732, 1.455, 1.350, 1.109, 1.040, 948, 851, 749 cm^{-1} .

Síntesis de dietil α -hidroxi PEG-350 mono (metil éter) fosfonato. A una disolución que contenía PEG-350 mono (metil éter) acetaldehído (3,71 g, 10,7 mmol) disuelto en tetrahidrofurano (53 ml) se le añadió dietil fosfito (1,77 g, 12,8 mmol). La disolución se enfrió a 0°C y 1, 8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (1,94 g, 12,8 mmol). Después de agitar a 0°C durante 10 min, la temperatura se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 24 h adicionales. El disolvente se eliminó al vacío para dejar un aceite amarillo oscuro que se purificó mediante cromatografía en columna (100% de CH_2Cl_2 a 15% de MeOH/85% de CH_2Cl_2) para dar 3,30 g (64%) del producto deseado dietil α -hidroxi PEG-350 mono

(metil éter) fosfonato como un aceite amarillo. ^1H NMR (CDCl_3) δ 4,19 (m, 6H), 3,65 (m, 24H), 3,38 (s, 3H), 1,34 (m, 6H) ppm. ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 23,1 ppm. IR (puro) 3.343, 2.872, 1.725, 1.453, 1.248, 1.105, 965, 850, 791 cm^{-1} .

Síntesis del ácido α -hidroxi PEG-350 mono (metil éter) fosfónico. A una disolución que contenía dietil α -hidroxi PEG-350 mono (metil éter) fosfonato (3,61 g, 7,43 mmol) disuelto en cloruro de metileno (74 ml) se añadió bromuro de trimetilsililo (3,41 g, 22,3 mmol) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente se eliminó a vacío para dejar un aceite marrón. El aceite resultante se disolvió en acetona (74 ml) y agua (0,5 ml) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó luego a vacío para dejar el producto de ácido mono (metil éter) fosfónico α -hidroxi PEG-350 deseado (2,66 g, 84%) como un aceite de oro ^1H NMR (CDCl_3) δ 3,65 (m, 24H), 3,38 (s, 3H). ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 24,0 ppm IR (puro) 3.460, 2.870, 1.727, 1.456, 1.351, 945, 849 cm^{-1} .

Ejemplo 2.

Síntesis de un conjugado PEG-1900.

Síntesis de PEG-1900 mono (metil éter) acetaldehído. A una disolución que contenía PEG-1900 mono (metil éter) (16,32 g, 8,60 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (86 ml) se le añadió Dess-Martin Periodinane (4,00 g, 9,44 mmol) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Durante la reacción, se formó precipitado fino y blanco y se eliminó al final de la reacción mediante filtración a través de una almohadilla de celite. El disolvente se eliminó del filtrado al vacío para dejar un sólido blanco que se recrystalizó en THF/hexanos para dar el producto deseado (11,6 g, 71%) como un sólido blanco. ^1H NMR (CDCl_3) δ 9,74 (t, J = 1 Hz, 1H), 4,17 (d, J = 1 Hz 2H), 3,83 (m, 2H), 3,65 (m, 170H), 3,39 (s, 3H).

Síntesis de dietil α -hidroxi PEG-1900 mono (metil éter) fosfonato. A una disolución que contenía PEG-1900 mono (metil éter) acetaldehído (10,74 g, 5,66 mmol) disuelto en tetrahidrofurano (57 ml) se le añadió dietil fosfito (0,938 g, 6,79 mmol) seguido de 1, 8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (1,03 g, 6,79 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 72 h. El disolvente se eliminó a vacío para dejar un sólido amarillo anaranjado que se recrystalizó en THF/hexanos para dar el producto deseado (11,08 g, 96%) como un sólido blanquecino. ^1H NMR (CDCl_3) δ 4,18 (m, 4H), 3,64 (m, 172H), 3,38 (s, 3H).

Síntesis del ácido α -hidroxi PEG-350 mono (metil éter) fosfónico. A una disolución que contenía dietil α -hidroxi PEG-1900 mono (metil éter) fosfonato (11,08 g, 5,44 mmol) disuelto en cloruro de metileno (54 ml) se añadió bromuro de trimetilsililo (2,49 g, 16,3 mmol) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El disolvente se eliminó a vacío para dejar un aceite marrón. El aceite resultante se disolvió en acetona (54 ml) y agua (0,5 ml) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El disolvente se eliminó luego a vacío para dejar un sólido naranja, que se recrystalizó en THF/hexanos para dar el producto deseado (10,77 g, 86%) como un sólido blanquecino. ^1H RMN (CDCl_3) δ 4,12 (m, 2H), 3,65 (m, 170H), 3,38 (s, 3H).

Ejemplo comparativo 3.

Síntesis de un fosfato hidrófilo.

Síntesis de difenil PEG-350 mono (metil éter) fosfato. A una disolución que PEG-350 contenía mono (metil éter) (8,54 g, 24,4 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (80 ml) se le añadió trietilamina (3,68 g, 36,6 mmol) seguida de 4-N, N dimetilaminopiridina (0,298 g, 2,44 mmol). La disolución resultante se enfrió a 0°C y se añadió gota a gota clorofosfato de difenilo (7,87 g, 29,3 mmol) y la reacción se agitó a 0°C durante 10 min. La reacción se calentó luego a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h adicionales. La reacción se detuvo con la adición de HCl al 10% (80 ml) y las capas resultantes se separaron. La capa orgánica se lavó con agua (80 ml) y salmuera (80 ml) y se secó sobre MgSO_4 anhidro. La filtración y eliminación del disolvente al vacío dejaron el producto deseado (14,2 g, 100%) como un aceite dorado. ^1H NMR (CDCl_3) δ 7,34 (m, 4H), 7,22 (m, 6H), 4,38 (m, 2H), 3,73 (m, 2H), 3,64 (m, 24H), 3,54 (m, 2H), 3,38 (s, 3H).

Síntesis de ácido PEG-350 mono (metil éter) fosfórico. A una disolución que contenía difenil PEG-350 mono (metil éter) fosfato (14,2 g, 24,4 mmol) disuelto en ácido acético (108 mL) se le añadió hidrato de óxido de platino (IV) (200 mg) y la suspensión resultante se calentó a 50°C y se colocó en atmósfera de H_2 hasta que cesa la captación de hidrógeno. La reacción se filtró a través de una almohadilla de celite para eliminar el catalizador y el disolvente se eliminó a vacío para dejar el producto deseado (10,49 g, 100%) en forma de un aceite amarillo transparente. ^1H NMR (CDCl_3) δ 4,20 (m, 2H), 3,67 (m, 24 H), 3,56 (m, 2H), 3,39 (s, 3H).

Ejemplo 3.

Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPIO). Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 100 ml se cargó con $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (0,706 g, 2,0 mmol) y alcohol bencílico anhidro (20 ml). La disolución resultante se roció con nitrógeno y se calentó a 165°C durante 4 horas bajo una atmósfera de nitrógeno. La suspensión coloidal resultante de partículas de óxido de hierro de 5 nm (según lo determinado por DLS) se enfrió y se almacenó a temperatura ambiente.

Ejemplo 4.

Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético recubiertas con α -hidroxi PEG-350 mono-éter fosfonato. A una suspensión coloidal de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas del ejemplo 3 en THF a 1 mg de Fe/ml se le añadió el conjugado de ácido α -hidroxi fosfónico del ejemplo 1 (en una proporción de 1 mol de conjugado por mol de Fe) y la suspensión resultante se calentó a 50°C durante 16 h. La reacción se enfrió luego a temperatura ambiente, se diluyó con agua y la disolución acuosa marrón se lavó tres veces con hexanos. Cualquier producto volátil restante en la capa acuosa se eliminó al vacío y las nanopartículas resultantes se purificaron mediante lavado con H₂O contra un filtro de corte molecular de 30 kDa utilizando filtración de flujo tangencial.

Ejemplo 5.

Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético recubiertas con α -hidroxi PEG-1900 mono (metil éter) fosfonato. El ejemplo 4 se repitió utilizando el conjugado del ejemplo 2 en lugar del conjugado del ejemplo 1.

Ejemplo comparativo 2.

Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético recubiertas con α -hidroxi PEG-350 mono(metil éter) fosfato. El ejemplo 4 se repitió utilizando el conjugado del ejemplo comparativo 1.

Ejemplo 6.

Síntesis de 5-bromo 1-pentanal. Se mezcló cloruro de oxalilo (2,42 ml, 0,022 mol) con diclorometano anhidro (40 ml) en un matraz de fondo redondo de 250 ml. El matraz se cubrió con nitrógeno y la disolución se enfrió a -78°C en un baño de hielo seco/acetona. La mezcla de reacción se agitó y se añadió lentamente dimetilsulfóxido anhidro (3,4 ml, 0,044 mol) al matraz seguido de 5-bromo-1-pentanol (3,34 g, 0,020 mol) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a -78°C. Se añadió lentamente trietilamina (14,0 ml, 0,1 mol) a la mezcla de reacción. Cuando se completó la adición de trietilamina, la reacción se agitó durante 5 minutos a -78 °C. La reacción se retiró del baño de acetona con hielo seco, se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente.

Se añadió agua (100 ml) a la mezcla de reacción. La mezcla de dos fases se agitó vigorosamente en un embudo de separación de 500 ml. La capa acuosa se retiró y se extrajo con diclorometano (100 ml). Este diclorometano se combinó con el diclorometano de la mezcla de reacción. La disolución de diclorometano combinada se lavó sucesivamente con 100 ml cada uno de HCl_(aq) al 1%, agua, NaHCO_{3(aq)} saturado y NaCl_(aq) saturado. La disolución de diclorometano se secó con sulfato de magnesio y la disolución de diclorometano se recuperó por filtración. El disolvente se eliminó por vacío dejando un líquido amarillo (1,80 g). Se confirmó que el producto principal era 5-bromo 1-pentanal por ¹H NMR. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9,81 (m, 1H), 3,43 (m, 3H), 2,50 (m, 2H), 2,0-1,4 (m, 8H). El producto de reacción se llevó al ejemplo 7 sin purificación adicional.

Ejemplo 7.

Síntesis de dietil (5-bromo-1-hidroxi-pentil) fosfonato. Se disolvió 5-bromopentanal (1,64 g, 0,010 mol) en dietiléter (15 ml) en un matraz de fondo redondo de 250 ml. La reacción se cubrió con nitrógeno. Se añadió perclorato de litio (7,92 g, 0,075 mol) a la reacción y la disolución de reacción se enfrió a 0°C en un baño de hielo. Se añadió clorotrimetilsilano (0,631 ml, 0,010 moles) al matraz seguido de trimetilfosfito (2,1 ml, 0,012 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente.

Después de 18 horas a temperatura ambiente, se añadió agua (40 ml) a la reacción, seguido de diclorometano (40 ml). La fase orgánica se transfirió a un embudo de decantación y se lavó sucesivamente con agua (40 ml) y salmuera (40 ml). La disolución de cloruro de metileno se secó con sulfato de magnesio y se filtró para recuperar la disolución de cloruro de metileno. El disolvente se eliminó al vacío dejando un aceite amarillo (3,01 g). El aceite se caracterizó por ¹H NMR y ³¹P NMR y se confirmó que el producto principal era dietil (5-bromo-1-hidroxi-pentil) fosfonato. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,25-4,00 (m, 4H), 3,00-3,43 (m, 2H), 1,78-1,95 (m, 2H), 1,78-1,61 (m, 3H), 1,61-1,41 (m, 2H), 1,40-1,25 (m, 6H). ³¹P NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 26,5 (s, 1P), 24,2-24,7 (m, 0,3P). El producto de reacción se llevó al ejemplo 8 sin purificación adicional.

Ejemplo 8.

Síntesis de dietil 5-(4-(etoxicarbonil) piperidin-1-il) -1-hidroxipentilfosfonato. Se disolvió dietil (5-bromo-1-hidroxi-pentil) fosfonato (3,02 g, 0,0099 mol) en tolueno anhidro (100 ml) en un matraz de fondo redondo de 300 ml. Se añadió trietilamina (2,08 ml, 0,015 mol) a la mezcla de reacción, seguido de etilisonipecotato (1,84 ml, 0,012 mol). La mezcla se calentó a reflujo durante 18 horas. El disolvente se eliminó al vacío dejando una goma naranja. La goma se disolvió en diclorometano (100 ml) y se lavó sucesivamente con NaHCO₃ acuoso saturado (100 ml) y salmuera (100 ml). La disolución de cloruro de metileno se secó con sulfato de magnesio y se recuperó por filtración. El disolvente se eliminó al vacío dejando un líquido naranja (1,70 g).

El líquido naranja se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice. Se eluyó una columna de gel de sílice (40 g) con un gradiente de disolvente, comenzando con diclorometano al 100% y cambiando a metanol al 20% en volumen

en diclorometano durante 30 minutos. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y el disolvente se eliminó al vacío, dejando un líquido amarillo (0,66 g). El líquido amarillo se caracterizó por ^1H NMR y el producto principal se identificó como dietil 5-(4-(etoxicarbonil) piperidin-1-il) -1-hidroxipentilfosfonato. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,9-4,5 (s, 1H), 4,2-4 (m, 5H), 3,8-3,7 (m, 1H), 2,9-2,7 (m, 2H), 2,4-2,1 (m, 3H), 2,1-1,9 (m, 2H), 1,9-1,8 (m, 2H), 1,8-1,3 (m, 8H), 1,3-1,2 (m, 5H), 1,2-1,1 (m, 3H). El producto de reacción se llevó al ejemplo 9 sin purificación adicional.

Ejemplo 9.

Síntesis del ácido 5- (4-(etoxicarbonil) piperidin-1-il) -1-hidroxipentilfosfónico. El dietil 5- (4-(etoxicarbonil) piperidin-1-il) -1-hidroxipentilfosfonato (0,66 g, 0,0017 mol) se disolvió en diclorometano (25 ml) en un matraz de 100 ml. Se añadió bromotrimetilsilano (0,69 ml, 0,0052 mol) a la mezcla de reacción. La reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Después de agitar durante la noche, se eliminó el disolvente al vacío dejando una goma naranja. La goma se disolvió en acetona (20 ml). Se añadió agua (0,4 ml). Precipitó una goma. El disolvente se eliminó al vacío, dejando una goma roja (0,6 g). La goma se caracterizó por ^1H NMR y se determinó que el producto era ácido 5- (4-(etoxicarbonil) piperidin-1-il) -1-hidroxipentilfosfónico. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 4,3-4,1 (m, 2H), 3,9-3,4 (m, 3H), 3,4-2,5 (m, 7H), 2,5-1,35 (m, 11H), 1,35-1,2 (m, 3H).

Ejemplo 10.

Síntesis de -(4-(etoxicarbonil) piperidin-1-il) -1- hidroxipentilfosfonato recubierto de nanopartículas de óxido de tantalio. Una disolución de metanol anhidro (17 mL) que contiene ácido isobutírico (0,242 g, 2,75 mmol) y agua (0,08 g, 4,44 mmol) se desgasificó durante 40 minutos rociando con N_2 . Esto se añadió gota a gota con $\text{Ta}_2(\text{OEt})_5$ (1 g, 2,46 mmol) y la mezcla de reacción se agitó en atmósfera de N_2 durante 5 h para producir una suspensión de 3 a 4 nm de nanopartículas. Se añadió gota a gota una disolución de ácido 5- (4-(etoxicarbonil) piperidin-1-il) -1-hidroxipentilfosfónico (0,088 g, 0,205 mmol) en metanol (0,5 ml) a la suspensión de nanopartículas de óxido de tantalio (1 ml) y se calentó a 70°C durante la noche bajo N_2 . Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió agua (~3 ml) gota a gota a la mezcla de reacción. Después de eliminar el metanol por evaporación a presión reducida en un evaporador rotatorio, se añadió NH_4OH 1 M (0,33 ml) y la reacción se agitó a 50°C durante la noche. La mezcla de reacción se dializó frente a agua DI (3 x 2 l) durante 24 h usando una membrana de celulosa regenerada de corte de peso molecular de 3.500 Da. El tamaño se determinó que era 7 nm en agua por DLS.

Ejemplo 11.

Caracterización de suspensiones coloidales de nanopartículas SPIO. Las suspensiones coloidales obtenidas como resultado de la filtración de flujo tangencial en los ejemplos 4 y 5 y el ejemplo comparativo 2 se evaluaron para determinar la estabilidad y el potencial zeta.

El diámetro hidrodinámico (D_H) se midió mediante dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando NaCl 150 mM en agua como medio de suspensión. La suspensión de SPIO purificada de la filtración de flujo tangencial se diluyó en NaCl 150 mM en agua y se pasó a través de un filtro de 100 nm para eliminar el polvo antes del análisis de DLS utilizando un Brookhaven ZetaPALS. La dilución se llevó a cabo para producir un mínimo de 20.000 conteos por segundo durante la medición de DLS. Las mediciones se realizaron poco después de fabricar las nanopartículas modificadas y después de dos semanas de almacenamiento a temperatura ambiente. Un aumento significativo en la D_H después del almacenamiento era una indicación de que las nanopartículas se habían agregado y que, por lo tanto, la suspensión coloidal en particular no era estable.

El potencial zeta se midió utilizando un Brookhaven ZetaPALS después de diluir la suspensión SPIO purificada de la filtración de flujo tangencial 14x con 10 mM NaCl y pasar la disolución SPIO diluida a través de un filtro de 100 nm para eliminar el polvo. El potencial zeta para las tres suspensiones coloidales estaba dentro del intervalo ± 15 mV, comúnmente aceptado como neutral.

Los resultados se exponen en la tabla 1.

Tabla 1

Recubrimiento de nanopartícula	D_H post síntesis	D_H 2 semanas post síntesis	Potencial zeta
PEG-350 α -hidroxi fosfonato	10 ± 1 nm	9 ± 1 nm	-0,5 mV
PEG-350 fosfato	50 ± 1 nm	> 100 nm	7,3 mV
PEG-1900 α -hidroxi fosfonato	20 ± 1 nm	22 ± 1 nm	-5,0 mV
5-(4-(etoxicarbonil)piperidin-1-il)-1-hidroxi fosfonato	7 ± 1 nm		-1,7 mV

Ejemplo 12.

Imagen de tumores *in vivo* por IMR. Todos los procedimientos que involucran animales se completaron según los protocolos aprobados por GE Global Research Institutional Animal Care and Use Committee. Se indujeron tumores en ratas Fischer 344 hembras (~150 g) mediante inyección subcutánea de 2×10^6 células Mat B III (ATCC # CRL1666, ATCC, Manassas, VA) en 0,1 ml de disolución salina equilibrada de Hank. El sitio de inyección se localizó dorsalmente entre los omóplatos. Se tomaron imágenes de los tumores 9 días después de la implantación, cuando los tumores tenían ~1 cm de diámetro.

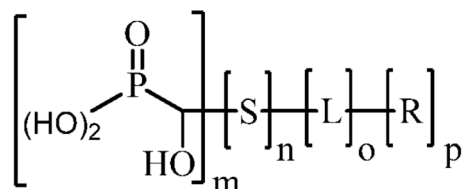
Las imágenes se realizaron en un escáner 3 T GE MR750 clínico utilizando una bobina de RF de recepción de solenoide de ~6 cm hecha a medida. Para prepararse para la obtención de imágenes, las ratas se anestesiaron mediante inyección IP de ketamina y diazepam con dosis de 75 y 5 mg/kg, respectivamente. Una vez inmóvil, se colocó un catéter de calibre 24 en una vena lateral de la cola y se conectó a una extensión de línea de catéter de microconducción con una disolución salina y una llave de parada. El volumen muerto del catéter, la línea y la llave de paso fue de 0,5 ml. El animal preparado se colocó dentro de la bobina de RF y se colocó dentro del orificio del escáner. Se adquirió un conjunto de imágenes pre-inyección, y luego, sin mover la mesa o el animal, se inyectaron las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas recubiertas con PEG-350 α -hidroxifosfonato a través de la llave de detención, seguido de una disolución salina (~0,8 ml). Inmediatamente después de la inyección (a partir de ~30 s después de la inyección), los conjuntos de imágenes se recolectaron durante un período de adquisición dinámico de ~30 minutos, lo que dio como resultado la recopilación de ~16 puntos de tiempo posteriores al contraste. Para la inyección, el agente SPIO estaba en disolución salina fisiológica a una concentración de 10 mg de Fe/ml, se filtró de forma estéril antes de la inyección y se analizó la presencia de endotoxina. El agente se dosificó a 3 mg de Fe/kg de peso corporal.

Se empleó una secuencia de pulso de eco de gradiente rápido en 3D que permitió la recolección de imágenes en tiempos de eco 10. La placa de imagen se colocó a través de la interfaz gráfica de prescripción, de manera que el tumor se centró dentro de los cortes transaxiales y la cobertura incluyó la mayoría del tumor en profundidad. Los parámetros de la secuencia de pulsos fueron los siguientes: secuencia de pulsos: 3D ME fGRE; TE: osciló entre 4,1 y 68 ms, con un espaciado de 7,1 ms; TR: 75.5 ms; ángulo de giro: 25 grados; ancho de banda: 62,5 MHz; matriz: 256 x 256; espesor de corte: 0,9 mm; campo de visión: 8 cm, que produce un tamaño de vóxel de 0,31 x 0,31 x 0,9. El tiempo de adquisición de la secuencia fue de ~2 min.

Los conjuntos de datos de imágenes se analizaron utilizando una herramienta de software personalizada (CineTool v8.0.2, GE Healthcare) construida sobre la plataforma IDL (IDL v. 6.3, ITT Corp., Boulder, CO). En resumen, la herramienta de análisis de imágenes permitió el dibujo manual de regiones 3D de interés (ROIs) en la serie de pre-inyección con el cálculo posterior de la constante de tiempo T_2^* por regresión exponencial para cada vóxel dentro de los ROIs dibujados en todos los puntos de tiempo. Imágenes representativas y mapas de diferencia se dan en figura 5.

REIVINDICACIONES

1. Una composición adecuada para usar en la obtención de imágenes de un sujeto mamífero que comprende:
una nanopartícula insoluble en agua a la que se adhiere al menos un resto alfa-hidroxifosfonato que tiene la fórmula:

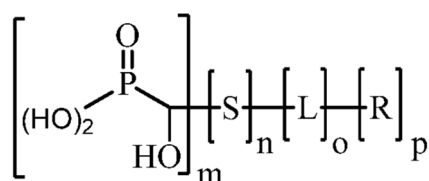


en donde S es un espaciador, L es un enlace entre S y R y R es un resto hidrófilo polimérico basado en unidades de óxido de etileno y m y p son 1-5 y n y o son 0-5;

y un portador farmacéuticamente aceptable

y en el que la nanopartícula es una nanopartícula superparamagnética basada en óxido de hierro o una nanopartícula radiopaca basada en óxido de tantalio.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que los restos hidrófilos poliméricos se basan en óxido de etileno y en la que el poli (óxidos de etileno) tiene un peso molecular igual o inferior a 5.000 daltons.
3. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la nanopartícula es una nanopartícula superparamagnética basada en óxido de hierro.
4. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que m es igual a 1.
5. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que S es un grupo alquilo de cadena lineal de 1 a 10 átomos de carbono de longitud y L es un enlace directo.
6. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
7. La composición de la reivindicación 6 para uso como un agente de contraste para IRM adecuado para inyección en un sujeto humano.
8. Un proceso de utilización de nanopartículas insolubles en agua a las que se adhieren restos alfa-hidroxifosfonato en imágenes de diagnóstico que comprenden imágenes de un sujeto que se ha administrado previamente con una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que las nanopartículas de dicha composición actúan como un agente de contraste.
9. Un proceso para fabricar nanopartículas insolubles en agua a las que se adhieren restos de alfa-hidroxifosfonato que comprenden:
- proporcionar una suspensión de nanopartículas en un agente de suspensión en el que cada una de dichas nanopartículas es una nanopartícula superparamagnética basada en óxido de hierro o una nanopartícula radiopaca basada en óxido de tantalio; y
 - poner en contacto dicha suspensión con dichos restos alfa-hidroxifosfonato, en donde los restos alfa-hidroxifosfonato tienen la fórmula:



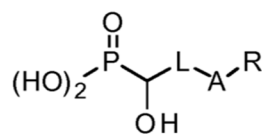
en la que S es un espaciador, L es un enlace entre S y R y R es un resto hidrófilo polimérico basado en unidades de óxido de etileno, m y p son 1-5 y n y o son 0-5.

10. El proceso de la reivindicación 9, en el que los restos hidrófilos poliméricos se basan en óxido de etileno y en el que el poli (óxidos de etileno) tiene un peso molecular igual o inferior a 5.000 daltons.

11. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en el que m es igual a 1.

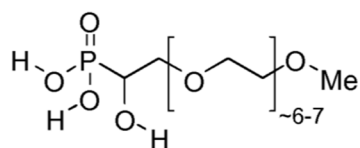
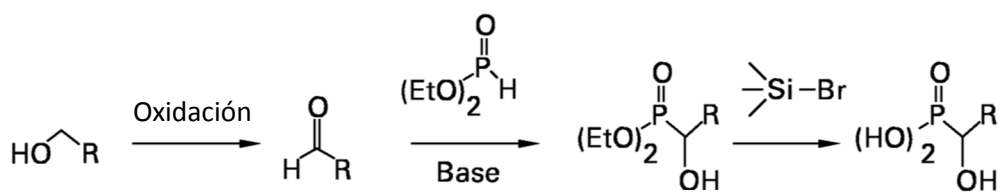
12. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que S es un grupo alquilo de cadena lineal de 1 a 10 átomos de carbono de longitud y L es un enlace directo.

13. Una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en un método de diagnóstico.

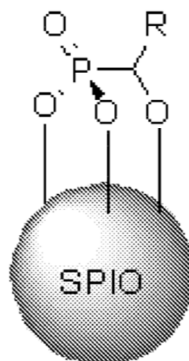
Fig. 1

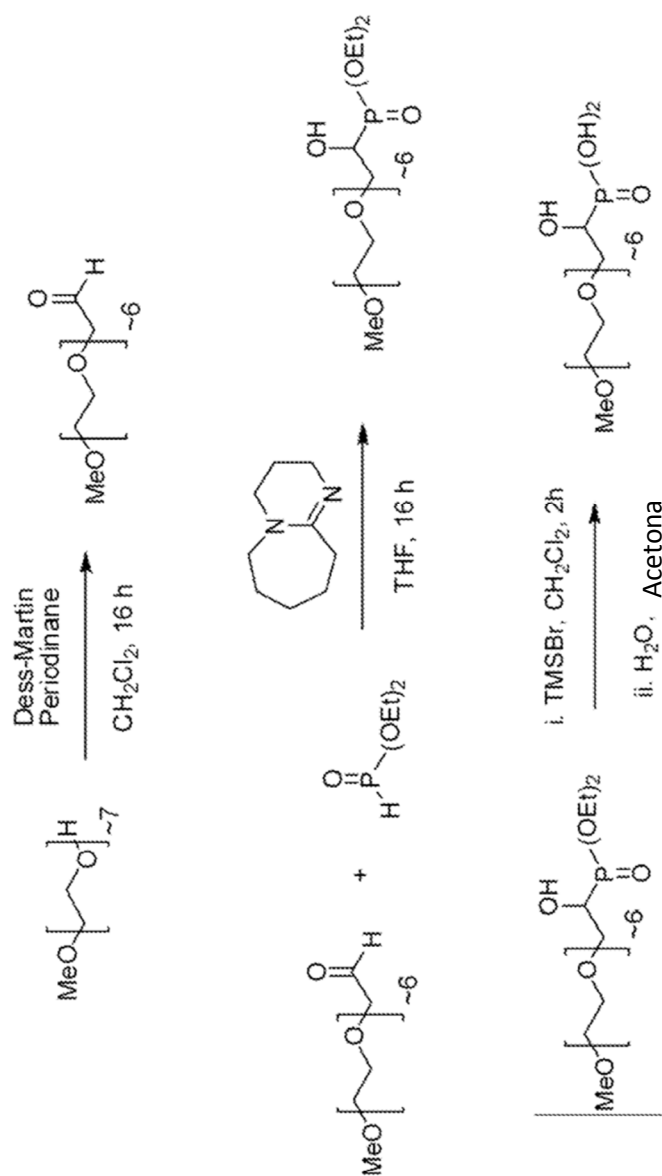
Estructura I

Donde L es un enlace simple o un grupo alifático, cicloalifático o aromático de entre 1 y 10 átomos de carbono, A es un enlace simple o una unión seleccionada del grupo que consiste en éster, éter, amina secundaria o terciaria, grupo cuaternario, urea, carbamato y amida y R es un resto hidrófilo

Fig. 2Ácido PEG-350 monometil éter
alfa-hidroxi fosfónico

Un esquema de síntesis de ácidos α-hidroxi fosfónicos

Fig. 3**Fig. 5**



Síntesis de ácido α -hidroxi PEG-350 fosfónico

Fig. 4

Fig. 6A

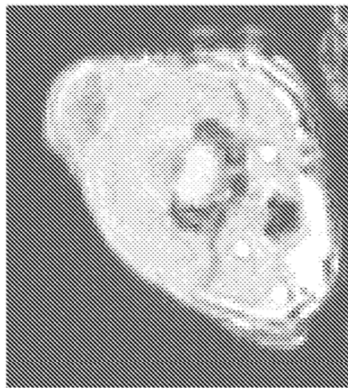


Fig. 6B

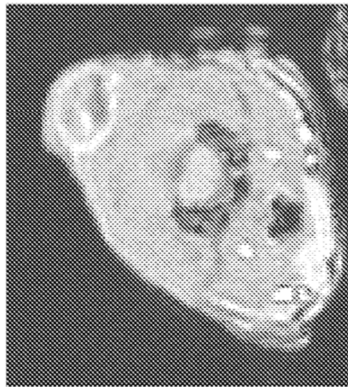


Fig. 6C

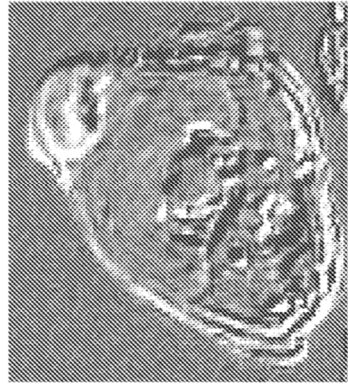


Fig. 6D

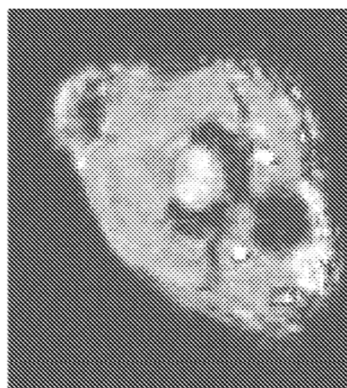


Fig. 6E



Fig. 6F

