

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
20 de enero de 2022 (20.01.2022)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2022/013477 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

A61K 9/51 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) *B82Y 5/00* (2011.01)
A61K 49/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2021/070526

(22) Fecha de presentación internacional:

16 de julio de 2021 (16.07.2021)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P202030733 16 de julio de 2020 (16.07.2020) ES

(71) Solicitantes: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, 28006 MADRID (ES). **UNIVERSIDAD DE SEVILLA** [ES/ES]; Pabellón de Brasil- Pº de las Delicias, s/n, 41015 SEVILLA (ES). **PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA MADRE Y MAESTRA (PUCMM)** [DO/DO]; Autopista Duarte Km 1 1/2, Santiago De Los Caballeros, 51000 (DO).

(72) Inventores: **KHIAR EL WAHABI, Noureddine**; INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS, Avda. Amerigo Vesputio, 49, Isla de la Cartuja, 41092 Sevilla (ES). **ROSALES BARRIOS, Cristian**; INSTITUTO DE

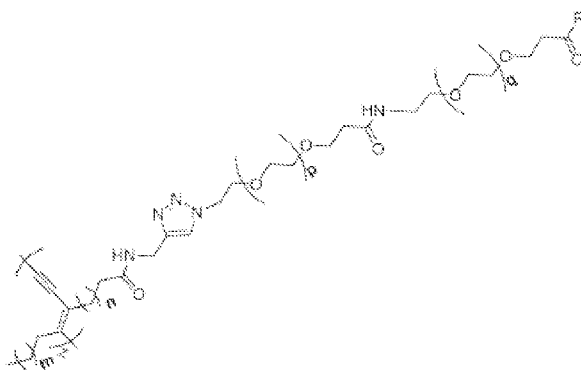
INVESTIGACIONES QUÍMICAS, Avda. Amerigo Vesputio, 49, Isla de la Cartuja, 41092 Sevilla (ES). **ROMERO BEN, Elena**; INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS, Avda. Amerigo Vesputio, 49, Isla de la Cartuja, 41092 Sevilla (ES). **POZO PÉREZ, David**; CABIMER-Universidad de Sevilla, Calle Américo Vesputio, 24, 41092 Sevilla (ES). **MUÑOZ FRANCO, Jaime**; CABIMER-Universidad de Sevilla, Calle Américo Vesputio, 24, 41092 Sevilla (ES). **GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, Zaira I.**; PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA MADRE Y MAESTRA (PUCMM), Autopista Duarte Km 1 1/2, Santiago De Los Caballeros, 51000 (DO).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Angel**; Glorieta Rubén Darío, 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: NANOPARTICLES FOR TUMOUR TREATMENT, PREVENTION AND/OR DIAGNOSIS

(54) Título: NANOPARTÍCULAS PARA TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y/O DIAGNÓSTICO DE TUMORES



Fórmula (I)

(57) Abstract: The present invention relates to nanoparticles of formula (I) for the active targeting of antitumour compounds and/or diagnostic agents to tumour tissues. The present invention also relates to the use of said nanoparticles as a medicinal product and, in particular, the use thereof for the treatment, prevention and/or diagnosis of cancer. Formula (I)

(57) Resumen: La presente invención se refiere a nanopartículas de fórmula (I) para el direccionamiento activo de compuestos antitumorales y/o agente de diagnóstico a tejidos tumorales. Asimismo, la presente invención se refiere al uso de dichas nanopartículas como medicamento y, en particular, para su uso en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de cáncer.



WO 2022/013477 A1

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas para tratamiento, prevención y/o diagnóstico de tumores

5 La presente invención se refiere a nanopartículas para el direccionamiento activo de compuestos antitumorales y/o agente de diagnóstico a tejidos tumorales. Por tanto, la presente invención se encuadra dentro del campo de las nanopartículas orgánicas y su aplicación en el campo de la Terapia y Diagnóstico (Teranóstia) de enfermedades.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer de próstata es uno de los cánceres más diagnosticados a nivel global y supone la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer en hombres. Aunque el número de muertes ha ido descendiendo paulatinamente, gracias, sobre todo, a la detección temprana y la mejora en su tratamiento, sigue siendo una de las
15 enfermedades que más muertes causa cada año en los países occidentales. Las dos causas principales que contribuyen a esta elevada mortalidad son: 1) la incapacidad para discernir el grado de agresividad de la enfermedad del paciente, complicando la elección de la terapia apropiada; y, 2) la dificultad para asegurar un margen quirúrgico claro para la prostatectomía, lo que podría acarrear posibles recaídas al no haber
20 retirado el tumor en su totalidad.

Los cánceres de próstata en etapas tempranas son tratados de manera exitosa, normalmente, a través de terapias convencionales (cirugía y radioterapia). Actualmente, la cirugía (prostatectomía radical) es el tratamiento más usado para
25 cánceres de próstata clínicamente localizados y proporciona una ventaja de supervivencia en comparación con la espera vigilante. Mediante este tipo de tratamiento se extrae por completo la próstata y los tejidos más adyacentes. Un problema acuciante de este tipo de tratamiento es la garantía de una resección completa del tumor, o sea, un margen quirúrgico negativo. Un margen quirúrgico
30 positivo requiere radioterapia adyuvante (se da en más del 25% de los pacientes). La radioterapia, además de emplearse para intentar limpiar la zona por completo tras la extracción, también puede ser utilizada para preparar la zona antes de la intervención. Es muy habitual el uso de la radioterapia aun sin ser necesitada, ya que, como hemos comentado, se carece de métodos para la visualización precisa de la masa tumoral al
35 completo. Esto supone unos costes anuales bastante elevados.

Si el cáncer se ha diseminado, se emplea con asiduidad la terapia hormonal. Este tipo de tratamiento no se puede emplear en la fase más temprana del cáncer de próstata. La evolución del cáncer de próstata está asociada a la acción de la testosterona, por lo que se trata de reducir los niveles de esta hormona o bloquear su acción con el fin de evitar el crecimiento del tumor. Se puede combinar con otros tratamientos.

Los cánceres de próstata en etapas avanzadas y metastásicos tienen peor pronóstico de tratamiento, haciendo necesario el desarrollo de nuevas técnicas para la mejora de los resultados de los pacientes. El tratamiento de estos cánceres más agresivos se basa en terapias no específicas como la quimioterapia. Los datos clínicos acumulados han mostrado que la quimioterapia puede alargar la vida de los pacientes con cáncer de próstata en estadios avanzados durante no más de 12-15 meses. La mayoría de los agentes quimioterapéuticos convencionales exhiben toxicidad no sólo hacia las células cancerosas, sino también hacia una gran variedad de tejidos sanos. Esto se debe al bajo Índice Terapéutico (IT) que presentan los fármacos utilizados en la terapia contra el cáncer, incapaces de alcanzar concentraciones terapéuticas en el tejido diana, lo que conlleva que la dosis requerida para producir un efecto antitumoral sea tóxica para los tejidos normales.

Los gliomas, por su parte, son tumores cerebrales originados en las células gliales del sistema nervioso. Las células gliales, llamadas por lo común neuroglía o simplemente glía, son células no neuronales que proporcionan soporte y nutrición, mantienen la homeostasia, forman la mielina e intervienen en la transmisión de señales en el sistema nervioso. Existen tres tipos diferentes de células gliales en el SNC: microglía, oligodendrocitos y astrocitos. Los dos tipos de glioma más importantes son los que afectan a los dos últimos tipos de células mencionadas (oligodendroglioma y astrocitoma). En el grupo de los astrocitomas se encuentra el glioblastoma multiforme (denominado en lo sucesivo glioblastoma) que es el tumor cerebral maligno más frecuente en adultos pues supone alrededor del 40% de los tumores cerebrales malignos y alrededor del 50% de los gliomas. El glioblastoma se clasifica en primario (de novo) y secundario dependiendo de las diferencias en el mecanismo génico de la transformación maligna que experimentan los astrocitos indiferenciados o las células precursoras gliales. El glioblastoma secundario afecta a personas jóvenes menores de 45 años. A lo largo de 4 o 5 años, en promedio, el glioblastoma secundario evoluciona de un astrocitoma de bajo grado a un astrocitoma indiferenciado. Por el contrario, el glioblastoma primario afecta sobre todo a personas más mayores, con una media de

edad de 55 años. Por norma general, el glioblastoma primario aparece como un glioblastoma fulminante caracterizado por la progresión del tumor en 3 meses desde el estado sin anomalías clínicas ni patológicas.

- 5 Este tipo de tumores son relativamente resistentes a la radioterapia y la quimioterapia, por lo que la recurrencia postratamiento es elevada. Pese a los avances en el tratamiento logrados merced a mejoras en las técnicas de neuroimagen, la microcirugía y las opciones terapéuticas como la temozolomida o la radiación, el glioblastoma sigue siendo incurable. La mortalidad causada por este tumor cerebral es
- 10 muy alta: la esperanza de vida media se sitúa entre 9 y 12 meses desde el diagnóstico.

- El grado de indiferenciación de las células tumorales del glioblastoma es el más elevado de todos los tumores cerebrales, lo que explica su alto potencial de migración
- 15 y proliferación y su elevada invasividad y, por ende, su pronóstico funesto. Los glioblastomas provocan la muerte por el crecimiento rápido, agresivo e infiltrante que demuestran en el cerebro. El crecimiento infiltrante es el responsable del carácter inoperable de estos tumores. Se ha descubierto recientemente que la microglía está implicada en esta capacidad invasiva de los glioblastomas. El nicho invasivo de los
- 20 glioblastomas (parte del tumor que va entrando en contacto con el tejido sano) no está bien irrigado por la vasculatura, llevando a una situación de hipoxia que provoca por una parte el escape e invasión de las células tumorales hacia zonas sanas y por otra parte la aparición de zonas necróticas en el tumor. La microglía está implicada en la retirada exclusiva de las células tumorales muertas y la promoción de angiogénesis,
- 25 facilitando así el crecimiento y expansión del tumor. Es por ello que la microglía ha surgido como una nueva diana potencial para evitar el rápido desarrollo de los glioblastomas (Saavedra-López E, Roig-Martínez M, Cribaro GP, Casanova PV, Gallego JM, Pérez-Vallés A, Barcia C. Brain Communications, **2020**, 2, fcz043).

- 30 La búsqueda de enfoques no invasivos que permitan tratar de manera eficiente estos y otros cánceres, con un mínimo o sin efectos tóxicos, ha sido una prioridad en la oncología moderna. El advenimiento de la nanomedicina ha tenido un impacto significativo en este campo. El objetivo final de la nanomedicina es transportar una cantidad suficiente de sustancias activas a través de barreras fisiológicas y alcanzar,
- 35 selectivamente, los tejidos enfermos. Para lograr este objetivo, las nanopartículas terapéuticas (NP) se están utilizando como vehículos para la liberación selectiva y / o

controlada de fármacos citotóxicos.

Las principales ventajas de usar nanopartículas como vehículos en la medicina incluyen: (1) la capacidad de mejorar las propiedades farmacéuticas y farmacológicas de los medicamentos, sin la necesidad de alterar el ingrediente activo, (2) aumentar la eficacia terapéutica mediante el suministro selectivo de medicamentos a tejidos específicos o células, (3) la administración de medicamentos a través de una serie de barreras biológicas y endoteliales, (4) la protección de un medicamento contra la degradación prematura, (5) la capacidad de mejorar la penetración intracelular y (6) la capacidad de administración de una combinación de agentes terapéuticos y de contraste para el monitoreo en tiempo real de la eficacia terapéutica.

Aunque no existe un consenso general, el tamaño ideal de las nanopartículas para uso clínico se encuentra por debajo de los 100 nanómetros. Este tipo de nanopartículas tenderían a acumularse en los tumores debido a su pobre extravasación de la vasculatura de los tejidos normales y su escape a la vigilancia del sistema inmune. Por otra parte, estas deben ser biocompatibles y biodegradables, para que el nanovector (sistemas de transporte de fármacos de tamaño nanométrico), una vez libere su carga, se degrade o metabolice en componentes no tóxicos que sean aclarados a través de la circulación). Teniendo el tamaño adecuado, los nanovectores pueden concentrarse de forma pasiva (direccionamiento pasivo), preferentemente en los tumores debido al Efecto de Permeabilidad y Retención aumentada (EPR) de la vasculatura de estos tejidos. Debido a este efecto, los nanovectores se incorporarían de manera preferente a los tumores debido a su vasculatura tumoral aberrante y se mantendrían en él por falta de un sistema linfático con un correcto funcionamiento). Para que la acumulación pasiva de las NPs en el tumor sea efectiva por efecto EPR, las nanopartículas deben tener una química de superficie adecuada que les permite tener un tiempo suficiente de circulación. Esto se consigue mediante el recubrimiento de las nanopartículas con un polímero de cadena flexible, soluble en agua y, sobre todo, biocompatible. Los polímeros de polietilenglicol (PEG) han destacado enormemente como una de las familias principales utilizadas como agentes de enmascaramiento. Las NPs “PEGiladas” exhiben, por ejemplo, una vida media 50 veces superior a la de otros polímeros, mayor estabilidad y solubilidad en agua y baja inmunogenicidad y antigenicidad, comportándose como si fueran “invisibles” ó “furtivos” en el organismo. Sin embargo, se ha demostrado que el direccionamiento pasivo no es adecuado para reducir los efectos secundarios de los compuestos antitumorales comparado con el

direccionamiento activo, que se basa en la programación de los nanovectores mediante la unión de un ligando, que interacciona de forma selectiva con los receptores de la superficie de la célula (Chen, Z.; Penet, M.F.; Nimmagadda, S.; Li, C.; Banerjee, S.R.; Winnard Jr, P.T.; Artemov, D.; Glunde, K.; Pomper, M.G.; Bhujwalla, Z.M. ACS Nano. **2012**, 6, 7752-7762). Es por ello que, encontrar nuevas dianas biológicas, específicas, sobreexpresadas respecto a las células normales, con alta eficiencia endocítica y poca tendencia a sufrir mutaciones es de suma importancia en nanomedicina.

Se ha observado que el uso de moléculas de bajo peso molecular como ligandos de direccionamiento, en lugar de anticuerpos, supondría una mejora significativa debido a sus grandes ventajas respecto a estos. Los ligandos pequeños son fáciles de preparar a gran escala, presentan propiedades farmacocinéticas favorables (mayor biodisponibilidad, vida media, penetración tumoral, etc.) y podrían penetrar la barrera hematoencefálica. Además, se pueden sintetizar numerosos análogos modificados de manera sencilla, de modo que se podría llegar a conseguir una especificidad y afinidad potenciadas (Lim, E. Transl. Cancer Rev. **2018**, 7, S676-S689).

En cuanto a la síntesis de nanopartículas, existen actualmente dos métodos diferentes, comúnmente denominadas aproximaciones “top-down” (“de lo más grande a lo más pequeño”), que consiste en una miniaturización de estructuras con métodos convencionales de foto-litografía mediante un haz de electrones, y “bottom-up” (“de lo más pequeño a lo más grande”), que contempla el uso de átomos y moléculas como unidades de fabricación para la construcción de arquitecturas nanométricas. Ésta última sería la más adecuada para modular tanto el tamaño como la función de las NPs. La gran ventaja de las aproximaciones del tipo “bottom-up” es su capacidad para generar sistemas nanométricos complejos a partir de moléculas o arquitecturas más sencillas. La química supramolecular se basa justamente en este principio para la construcción de un conjunto de sistemas estabilizados, no por enlaces covalentes, sino mediante asociaciones o fuerzas débiles. Concretamente, la autoasociación u autoorganización de monómeros mediante enlaces de tipo electrostático, Van der Waals o enlaces de hidrógeno, es hoy en día una de las aproximaciones más potentes y prometedoras para la construcción de nanomateriales funcionales complejos. En este sentido la búsqueda y el diseño de moléculas o bloques químicos sencillos capaces de realizar una autoorganización compleja y, en el mejor de los casos, modelable es de sumo interés. Un ejemplo ilustrativo de este tipo de moléculas lo

constituyen los lípidos en particular, o las moléculas anfifílicas en general, capaces de generar un gran número de estructuras autoorganizadas de diferentes tamaños y topologías (Palermo, V.; Samori, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 4428-4432). Esta aproximación bottom-up permite la escalabilidad de la síntesis, llegándose a poder sintetizar grandes cantidades del monómero que da lugar a los nanovectores, manteniendo sus propiedades. En otros casos, como el de las nanopartículas magnéticas, se llega a un límite de escalabilidad que, normalmente, es bastante bajo.

Es de destacar que tras más de dos décadas utilizando nanomateriales en medicina, el análisis del gran número de publicaciones en este campo revela que a pesar del éxito cosechado a nivel académico, su traslación a aplicaciones clínicas ha sido hasta la fecha muy limitada (Min, Y.; Caster, J.M.; Eblan, M.J.; Wang, A.Z. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 11147) debido a la alta complejidad del tema. En este sentido, los nanomateriales tienen que atravesar varias barreras biológicas, haciendo necesario un mayor entendimiento a nivel molecular de la interface bio-nano (McNeil, S. E. *Nat. Rev. Mater.* **2016**, 1, 16073), la formación de la corona proteica así como su importancia sobre la estabilidad y la actividad biológica de los nanovectores (Röcker, C.; Pötzl, M.; Zhang, F.; Parak, W.J.; Nienhaus, G.U. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4, 577). Por otra parte, datos recientes indican que el efecto Enhanced Permeation Retention (EPR) de los tumores es muy heterogéneo y depende de una serie de factores como, por ejemplo, la dinámica vascular, la presión arterial sistólica, el tamaño y tipo del tumor (lesión primaria vs. cáncer metastásico) (Tanaka, N. et al.; *Nat. Biomed. Eng.* **2017**, 7796). Consecuentemente, una aproximación única tipo "one size fits all", en el diseño de tratamientos basados en nanovectores, es poco probable que se traduzca en resultados clínicamente beneficiosos. Sin lugar a duda, uno de los problemas más acuciantes en la traslación al mercado de los nanomateriales terapéuticos, deriva de la dificultad en la producción a gran escala, de manera reproducible de la mayoría de los nanomateriales utilizados actualmente en los laboratorios de investigación básica. Es por ello, que desde el punto de vista sintético, para que las nanopartículas tengan un potencial de translación clínica, la complejidad en su diseño y desarrollo debe minimizarse tanto como sea posible para crear sistemas que puedan prepararse y caracterizarse de manera reproducible.

En el 2016, 51 nanofármacos han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration), y 77 estaban en algún estadio de ensayos clínicos. Aunque la mayoría de los nanomateriales aprobados por la FDA consiste en formulaciones

poliméricas, liposomales y de nanocristales existe actualmente una tendencia hacia el desarrollo de materiales más complejos tales como las micelas, nanopartículas basadas en proteínas, y partículas metálicas.

- 5 Los nanofármacos aprobados hasta la fecha por la FDA y de la EMA (European Medicine Agency), son buenos ejemplos de desarrollos recientes en la administración de fármacos, pero todavía hay mucho espacio para mejorar. Además de la capacidad de administrar el compuesto activo al sitio de acción, los nanovectores deben poseer otras características como el direccionamiento activo, biocompatibilidad, poca
10 toxicidad, solubilidad en agua y alta capacidad de carga. La facilidad de internalización y/o liberación del compuesto activo en las células objetivo y en su sitio de acción también es un requisito importante. Además, a menudo puede ser interesante proporcionar algunos medios para visualizar los nanovectores mediante técnicas de imágenes no invasivas. Esto es útil para seguir la orientación y el suministro del
15 compuesto activo con fines de investigación, así como para el diagnóstico.

En conjunto, a pesar de los avances recientes, todavía se necesitan estrategias para mejorar la eficacia terapéutica contra el cáncer al mejorar la administración y liberación de fármacos dirigidos a un sitio dado.

20

En esta solicitud de patente, se ha escogido como principal diana el Antígeno Prostático Específico de Membrana (PSMA), que es el biomarcador prevalente del cáncer de próstata y en menor medida de las células gliales.

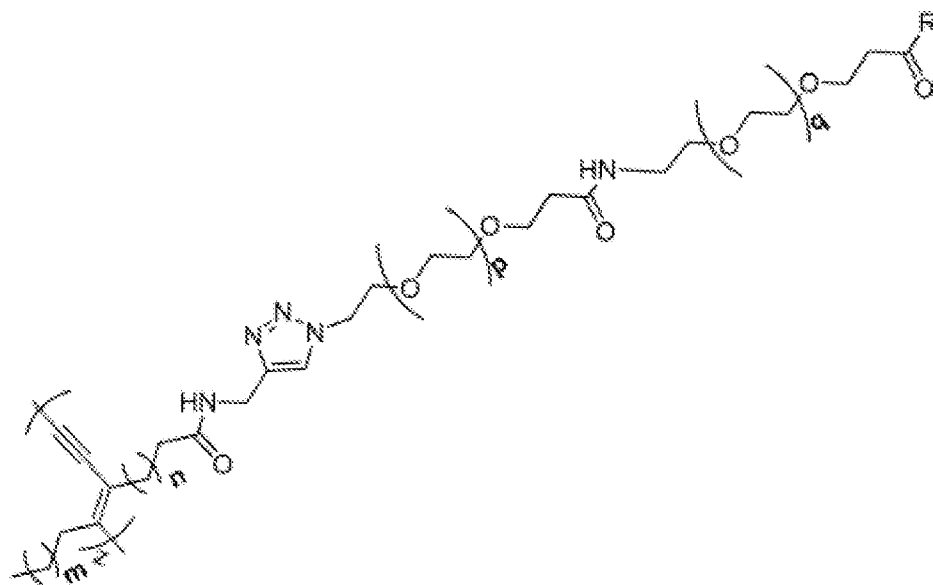
- 25 El PSMA, es una proteína integral de membrana de tipo II que presenta una expresión abundante en las células prostáticas cancerosas, sobre todo en estadios más avanzados y metastásicos (Banerjee, S.R.; Foss, C.A.; Castanares, M.; Mease, R.C.; Byun, Y.; Fox, J.J.; Hilton, J.; Lupold, S.E.; Kozikowski, A.P.; Pomper, M.G. J. Med. Chem., 2008, 51, 4504-4517). El PSMA se sobreexpresa entre 100 y 1000 veces más
30 en el cáncer de próstata que en los tejidos normales donde se expresa moderadamente, como en el intestino delgado, los riñones y el sistema nervioso de la glía. Además, el PSMA también se expresa en el endotelio de la gran mayoría de tumores sólidos (aparte del de próstata), lo que lo convierte en una diana aún más interesante ya que podría ser diana de fármacos específicos anti-angiogénicos (Kroon, J.; Metselaar, J.M.; Storm, G.; van der Pluijm, G. Cancer Treat. Rev. 2014, 40, 578-
35 584). El PSMA posee dos actividades enzimáticas, una actividad peptidasa

responsable de la degradación en el cerebro del péptido neurotransmisor N-acetil-L-aspartil-L-glutamato, y una actividad folato hidrolasa que hidroliza el folato poliglutamato. Los análogos del dipéptido N-acetil-L-aspartil-L-glutamato han mostrado una excelente actividad inhibidora del PSMA y constituyen excelentes ligandos para el transporte activo y dirigido hacia el cáncer de próstata. En este sentido el dipéptido urea Asp-CO-Glu, es un excelente inhibidor del PSMA con un IC_{50} de 45nM, y ha sido escogido como ligando para este estudio (Thangavel, C.; Perepelyuk, M.; Boopathi, E.; Liu, Y.; Polischak, S.; Deshpande, D.A.; Rafiq, K.; Dicker, A.P.; Knudsen, K.E.; Shoyele, S.A.; Den, R.B. Mol. Pharmaceutics. 2018, 15, 1778-1790). El PSMA es actualmente una diana clínicamente validada como biomarcador del cáncer de próstata y como receptor para el direccionamiento activo de nanofármacos y elemento de diagnóstico. En los últimos años varios nanomateriales de diferentes estructuras han sido desarrollados utilizando el PSMA como diana para el tratamiento activo del cáncer de próstata, incluyendo nanoplexos, liposomas, nanopartículas de oro, y polímeros, estos últimos probados clínicamente (Matsuoka, D.; Watanabe, H.; Shimizu, Y.; Kimura, H.; Yagi, Y.; Kawai, R.; Ono, M.; Saji, H. Bioorg. Med. Chem. 2018, 26, 2291-2301).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

20

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una nanopartícula que comprende el polímero de fórmula (I):



25

(I)

donde

n es un número entero entre 1 y 10,

m es un número entero entre 4 y 20,

5 p es un número entero entre 2 y 40,

q es un número entero entre 2 y 40,

z es el número de agregación, es decir, el número de monómeros en la nanopartícula, y está comprendido entre 50 y 200,

R es un agente de direccionamiento,

10 teniendo la nanopartícula forma esférica.

El agente de direccionamiento está unido covalentemente al resto del polímero de la manera indicada en la fórmula (I), a través de un grupo funcional presente en el mismo.

15

El término “nanopartícula” de la presente invención se refiere a una partícula esférica con un diámetro entre 10nm y 100nm, preferiblemente entre 15 nm y 50 nm. Las nanopartículas de la presente invención tienen preferiblemente una estructura micelar, ya que forman micelas en solución acuosa, presentando los grupos hidrófobos hacia adentro de la esfera y los grupos hidrófilos hacia afuera (hacia la fase de agua). En la presente invención el término “nanomicela” o “micela” se utiliza como sinónimo de nanopartícula. La determinación del tamaño de las mismas se lleva a cabo a través de Dispersión de Luz Dinámica (DLS), donde se obtiene el tamaño medio de la disolución micelar, o Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), donde se observa la morfología de las mismas además de permitir la medición de estructuras individuales.

25

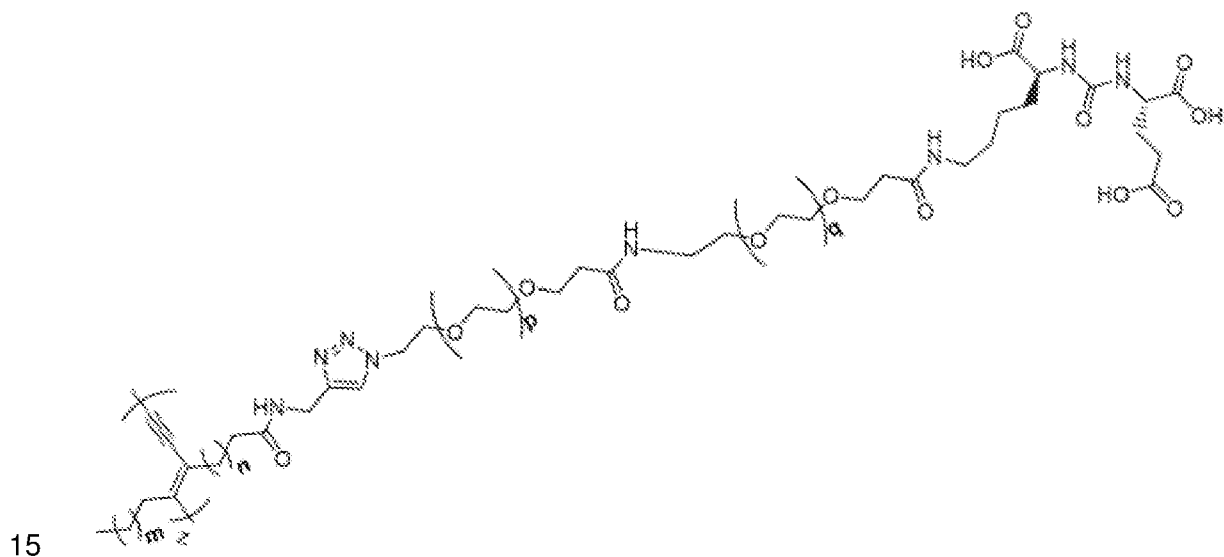
Un “agente de direccionamiento” (también denominado “ligando de direccionamiento”), de acuerdo a la presente invención, es un ligando específico a receptores biológicos que se sobreexpresan en las células/tejidos u órganos en los que existe un tumor. A modo de ejemplo, los agentes de direccionamiento pueden ser anticuerpos, ARN, ADN y/o aptámeros, también puede ser un pequeño compuesto como el ácido fólico, cuyo receptor se sobreexpresa en las células cancerosas, o azúcares como la lactosa, galactosa o galactosamina, reconocidos específicamente por la asialoglicoproteína que se sobreexpresa en los tejidos hepáticos tumorales, etc. Los agentes de direccionamiento en las nanopartículas de la presente invención ayudan a dirigir el agente activo al sitio deseado.

35

En una realización preferida, R es un agente de direccionamiento seleccionado de la lista que consiste en: PMPA (ácido 2-fosfonometil pentanedioico), análogos de los inhibidores de peptidasas NAAG como es el N-acetil-L-aspartil-L-glutamato, y ácido
 5 ((S)-2-(3-((S)-5-amino-1-carboxipentil)ureido)pentanodioico (en adelante ACUPA, del inglés ((S)-2-(3-((S)-5-Amino-1-Carboxypentyl)Ureido)Pentanedioic Acid).

Aún más preferiblemente, R es el agente de direccionamiento ACUPA. Este agente es específico al Antígeno Prostático Específico de Membrana (PSMA), que es el
 10 biomarcador prevalente del cáncer de próstata. Este agente se une al resto de la molécula a través de su grupo amino.

En el caso de que R sea ACUPA, la nanopartícula comprenderá el polímero de fórmula (I'):



(I')

donde z, m, n, p y q tienen el mismo significado indicado anteriormente.

20 En una realización preferida de la nanopartícula de la invención $m = 10$, $n = 7$, $p = 19$ y $q = 3$.

La nanopartícula puede comprender, además del polímero de fórmula (I), un fármaco y/o un agente de diagnóstico en el interior de la esfera que forma dicha nanopartícula.
 25 En este caso, tanto el fármaco como el agente de diagnóstico se encuentran dentro de la nanopartícula, pero no forman enlaces covalentes con el polímero de fórmula (I). Se

mantienen en el interior de la esfera por interacciones de tipo no covalente.

El término “fármaco”, también denominado “agente activo”, se refiere a un compuesto que proporciona algún efecto localizado o sistémico en un sujeto, con frecuencia
5 beneficioso. La referencia a un agente activo específico incluirá, en su caso, el agente activo y sus sales farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de agentes activos son compuestos anticancerígenos como camptotecina, topotecán, paclitaxel, docetaxel, sorafenib, aprepitant, doxorubicina; también oligonucleótidos antisentido, mARNi, pARNi y similares, así como los antivirales remdisivir, hidroxicloroquina, ritonavir,
10 lopinavir, ribavirina, arbidol, ente otros.

En general los agentes activos son insolubles en agua, limitando la carga óptima para su suministro. A modo de ejemplo, el paclitaxel es una molécula altamente hidrófoba y prácticamente insoluble en agua (menos de 0,1 microg/mL). El uso del paclitaxel con
15 la presente nanopartícula permite aumentar su solubilidad más de 100.000 veces. Además de insoluble en agua, el agente activo puede ser inactivo en medio fisiológico. Sin embargo, el agente activo se vuelve soluble en agua y químicamente estable cuando forma parte de la nanopartícula. Por ejemplo, la camptotecina es insoluble en agua y es químicamente inestable en medio fisiológico. De hecho, el resto de lactona
20 de camptotecina, que es vital para su actividad biológica, se abre en medios fisiológicos dando lugar a la forma carboxilato del fármaco que es menos activa y más tóxica. La inclusión de la camptotecina en la nanopartícula estabiliza la forma lactónica y mejora su solubilidad en agua en un factor de 137 veces. Se contempla que la estabilización de la forma lactónica del fármaco puede mejorar el perfil farmacológico
25 de la camptotecina y ayudar a prevenir cualquier efecto específico de la forma carboxílica contra diversas células o tejidos.

En el caso del sorafenib, la mejora de la solubilidad al incluirlo en la nanopartícula es del orden de 10.000 veces y en el caso del docetaxel de 88.000 veces.

30

Un “agente de diagnóstico” se refiere en la presente invención a un producto farmacéutico empleado para la determinación in vivo de una enfermedad o estado físico anormal. El agente de diagnóstico puede ser un agente fluorescente, un agente pasible de utilización en RMN de imagen o un agente para la imagen por ultrasonido.
35 Como en el caso de los agentes activos, los agentes de imagen son compuestos hidrófobos altamente insolubles en agua, y pueden solubilizarse con la ayuda de las

nanomicelas. Los agentes de diagnóstico en las composiciones terapéuticas de la presente divulgación pueden ayudar a identificar selectivamente un tumor sin ser relevante la concentración del mismo en la nanopartícula, aunque siempre por debajo del nivel de toxicidad de cada compuesto concreto.

5

En otra realización preferida, la nanopartícula comprende un agente activo o fármaco en el interior de la esfera que forma dicha nanopartícula.

En otra realización más preferida, la partícula comprende un agente activo y un agente de diagnóstico, de manera que la nanopartícula puede diagnosticar y tratar tumores.

10

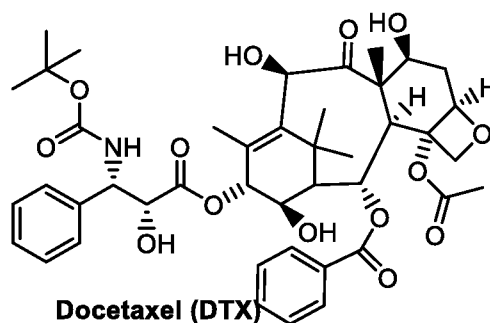
El fármaco está preferiblemente seleccionado de la lista que comprende camptotecina, topotecán, paclitaxel, docetaxel, sorafenib, aprepitant y doxorubicina. Mas preferiblemente, el fármaco es docetaxel (DTX).

15

El agente de diagnóstico está preferiblemente seleccionado de la lista que comprende: 3-DTTCI (3,3'-diethyltetracarboxianine yoduro), Rojo Nilo (Nile Red), fluoresceína y rodamina.

En otra realización preferida, R es el agente de direccionamiento ACUPA y el fármaco contenido en la nanopartícula es DTX. Aún más preferiblemente, R es el agente de direccionamiento ACUPA, el fármaco es DTX, $m = 10$, $n = 7$, $p = 19$ y $q = 3$.

20



25

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende las nanopartículas como se ha definido en el primer aspecto de la invención y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El "vehículo" es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es

30

facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en la composición farmacéutica para diluir cualquiera de los componentes de la misma hasta un volumen o peso determinado; o
5 bien que, aún sin diluir dichos componentes, es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

10 El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición de la presente invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Por tanto, el término “excipiente” se define como aquella materia que, incluida en las
15 formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. El excipiente “farmacéuticamente aceptable” debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, que sea
20 compatible con dichos componentes.

Además, como entiende el experto en la materia, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables, es decir, que el excipiente y el vehículo estén permitidos y evaluados de modo que no cause daño a los organismos a los que se
25 administra.

La composición farmacéutica se puede presentar bajo cualquier forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. Por ejemplo, puede estar en una forma adaptada a la administración oral, sublingual,
30 nasal, intratecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, subcutánea, intramuscular, inhalada, tópica o parenteral. La composición farmacéutica de la invención se puede formular en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, polvo, gránulo, ungüento, solución, supositorio, inyección, inhalante, gel, microesfera o aerosol. La forma adaptada a la administración oral se selecciona de la
35 lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora,

tableta, pastilla, trocisco o liofilizado. En una realización particular, la composición de la invención se presenta en una forma adaptada a la administración oral, sublingual, nasal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, inhalada o parenteral.

5 La "forma galénica" o "forma farmacéutica" es la disposición a que se adaptan los principios activos y excipientes para constituir un medicamento. Se define por la combinación de la forma en la que la composición farmacéutica es presentada por el fabricante y la forma en la que es administrada.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a la nanopartícula definida en el primer aspecto de la invención, o a la composición farmacéutica que lo comprende, para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere a la nanopartícula definida en el primer aspecto
15 de la invención, o a la composición farmacéutica que la comprende, para su uso en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de cáncer (tumores), por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer linfático, cáncer de hígado, cancer glial, etc. Más preferiblemente, la nanopartícula, o la composición farmacéutica que la comprende, se usa en el tratamiento, prevención
20 y/o diagnóstico de cáncer prostático, hepático o glial.

Otro aspecto de la invención se refiere a la nanopartícula definida en el primer aspecto de la invención, o a la composición farmacéutica que lo comprende, para su uso como sistema de liberación controlada de fármacos.

25

La expresión "liberación prolongada" se refiere a un periodo de liberación que dura desde varias horas hasta aproximadamente 24 horas, habitualmente hasta aproximadamente 12 horas y con frecuencia entre aproximadamente 4 y 14 horas.

30 El compuesto definido en el primer aspecto de la invención, o la composición farmacéutica que lo comprende, para sus usos como se ha definido previamente, puede administrarse de diferentes formas, por ejemplo, oral, sublingual, nasal, intratecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, subcutánea, intramuscular, inhalada, tópica o parenteral.

35

En la presente invención, el término "tratamiento" se refiere a combatir los efectos

causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

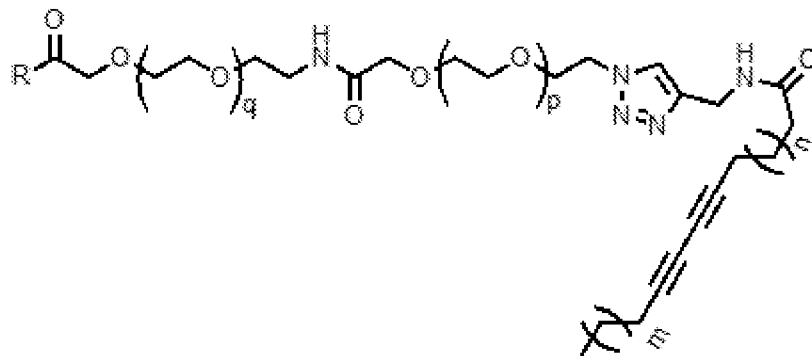
En la presente invención, el término “prevención” se refiere a evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica

Entre las ventajas de las nanopartículas de la presente invención se encuentran las siguientes: i) se trata de nanopartículas orgánicas formadas por auto-asociación de un monómero con estructura bien definida, ii) la sencillez de su síntesis y reproducibilidad iii) tamaño adecuado, iv) permite su síntesis en gran escala, v) permite la liberación controlada de fármacos, vi) presenta biocompatibilidad, etc.

Un último aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de preparación de la nanopartícula definida en el primer aspecto de la invención. Las nanopartículas se pueden obtener mediante la auto-asociación supramolecular de un monómero anfifílico, seguida por una reacción de fotopolimerización mediante una simple irradiación con luz UV.

De manera más particular, el procedimiento comprende:

- i) ultrasonificación en agua, en ausencia total de luz y a temperatura comprendida entre 20 y 25°C, de un monómero de fórmula (II), estando dicho monómero a una concentración superior a su concentración micelar crítica (CMC), concentración a partir de la cual los monómeros forman micelas en contacto con agua,



(II)

- ii) fotopolimerización de las micelas en agua formadas en la etapa anterior mediante irradiación con luz UV; de manera que los monómeros se unen entre sí formando micelas estables que son las nanopartículas (micelas fotopolimerizadas) de la presente invención como se han definido en el primer aspecto de la invención.
- Las micelas formadas en i) se pueden aislar por diálisis durante 48 horas a 250rpm para eliminar los monómeros libres.

La CMC de la micela se calcula previamente utilizando, por ejemplo, un espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse a temperatura ambiente, empleando el pireno como sonda fluorescente, tal y como es conocido en el estado de la técnica (véase por ejemplo para el cálculo de CMC: G. Basu Ray, I. Chkraborty, S.P. Moulik, J. Coll. Int. Sci. 2006, **294**, 248-254). El procedimiento ya conocido para el cálculo de la CMC comprende la realización de las siguientes etapas:

- preparación de varias disoluciones acuosas del monómero correspondiente a distintas concentraciones, generalmente de entre 0,01 mM y 1mM, manteniendo constante en todas ellas la concentración de pireno (en todas las disoluciones debe haber la misma concentración de pireno), que preferiblemente está entre 0,02μM y 1μM,
- las distintas muestras se excitan a 338nm. La relación entre las intensidades de fluorescencia a 375 nm y 395 nm (picos 1 y 3 del espectro de emisión del pireno) depende de la concentración del monómero y se muestra, alrededor de la CMC, como una curva sigmoideal típica. La representación de la concentración de monómero frente

a la relación entre las intensidades de fluorescencia a 375 nm y 395 nm permitirá obtener la CMC del monómero (la CMC será la concentración a partir de la cual la relación de las intensidades comience a variar drásticamente y deje de ser constante).

- 5 En una realización preferida, la ultrasonificación se lleva a cabo preferiblemente durante un tiempo entre 30 min y 60 min, más preferiblemente durante 40 min.

Preferiblemente, la ultrasonificación se lleva a cabo con una sonda de ultrasonificación (potencia de salida de 125 W) durante 40 min con intervalos de encendido / apagado
10 (on/off) de 5 s.

La fotopolimerización se lleva a cabo preferiblemente mediante excitación del monómero en agua con luz UV a 254 nm.

- El procedimiento puede comprender además una etapa adicional iii) de incorporación
15 de un agente activo y/o un agente de diagnóstico en la nanopartícula una vez formada la misma. Esta etapa se lleva a cabo mediante la adición del agente activo y/o un agente de diagnóstico a una solución de nanopartículas fotopolimerizadas obtenidas en ii) en agua y agitación, preferiblemente durante un tiempo comprendido entre 20 y 24h a una temperatura entre 50 y 54°C. La proporción en peso de agente activo o un
20 agente de diagnóstico con respecto a la cantidad de nanopartículas puede variar preferiblemente entre 1:1 a 2:1.

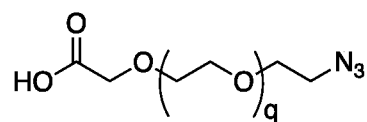
Una vez preparadas las nanopartículas (nanomicelas fotopolimerizadas sin incluir agente activo), éstas pueden ser aisladas por filtración y diálisis. Si las nanopartículas
25 (nanomicelas fotopolimerizadas) incluyen un agente activo, éstas se aíslan preferiblemente mediante centrifugación.

En una realización preferida del procedimiento, éste comprende además la liofilización de las nanomicelas fotopolimerizadas obtenidas.

30

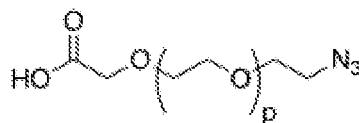
El monómero de fórmula (II) se obtiene llevando a cabo las siguientes etapas de reacción:

- a) Reacción del compuesto R (agente de direccionamiento), con el siguiente
35 espaciador bifuncional:

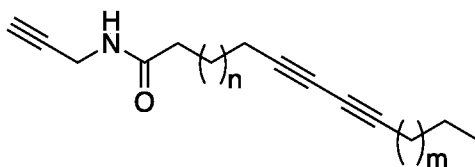


teniendo el compuesto R protegidos los sus grupos funcionales excepto aquél que va a reaccionar con el espaciador bifuncional,

- 5 b) Reducción del compuesto obtenido en la etapa a), que comprende una azida, para dar una amina, seguido de una reacción de amidación de la misma con el espaciador bifuncional:

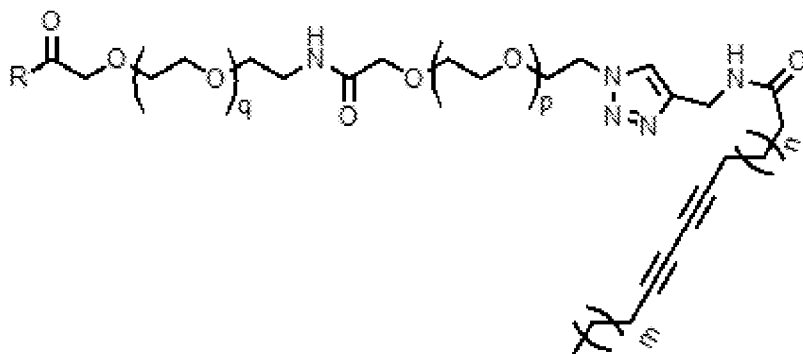


- 10 c) Reacción del compuesto obtenido en la etapa b) con el alquino de fórmula



mediante una cicloadición 1,3-dipolar de azida y alquino catalizada por cobre (I);

- 15 d) Desprotección de grupos protectores de R, dando lugar al monómero de fórmula (II):



- 20 Un "grupo funcional" es un grupo que se puede usar, en condiciones normales de

síntesis orgánica, para formar un enlace covalente entre la estructura a la que está unido y otra estructura, que típicamente contiene otro grupo funcional. El grupo funcional incluye generalmente un grupo carboxílico, heteroátomos, alcano- ó areno-sulfonatos.

5

Un "grupo protector" de un grupo funcional es un resto que evita o bloquea una reacción particular de ese grupo protector en un proceso particular. El grupo protector estará, por tanto, involucrado en la protección de un grupo funcional y evita la reacción de dicho grupo funcional en ciertos procesos. Los grupos funcionales que pueden protegerse incluyen, a modo de ejemplo, grupos hidroxilo, grupos tiol, ácidos carboxílicos, grupos amino y similares. Los grupos protectores representativos para ácidos carboxílicos incluyen ésteres, amidas e hidrazidas; para grupos amino carbamatos y amidas; para grupos hidroxilo, éteres y ésteres; para grupos tiol, tioéteres y tioésteres y tales grupos protectores son bien conocidos en el estado de la técnica.

15

En una realización particular en la que R presenta un grupo amino y otros grupos funcionales distintos de amino, se partirá del compuesto R que tenga estos últimos grupos protegidos, mientras que el amino estará libre para reaccionar con el grupo ácido carboxílico del espaciador bifuncional, formando una amida.

20

En una realización particular en la que R presenta un grupo alcohol (-OH) y otros grupos funcionales distintos de alcohol, se partirá del compuesto R que tenga estos últimos grupos protegidos, mientras que el alcohol estará libre para reaccionar con el grupo ácido carboxílico del espaciador bifuncional, formando un éster.

25

En una realización particular en la que R presenta grupos funcionales ácido carboxílico y un grupo amino, se partirá del compuesto R que tenga sus grupos ácido protegidos, mientras que el amino estará libre para reaccionar con el espaciador bifuncional. Preferentemente, el grupo ácido carboxílico se protege con un grupo terc-butilo.

30

En una realización preferida, en la etapa a) se realiza una reacción de amidación entre el compuesto R adecuadamente protegido y el espaciador bifuncional utilizando TBTU (tetrafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) como agente de deshidratación, DIPEA (N,N-diisopropiletilamina) como base, DMF (N,N-dimetilformamida) como disolvente a temperatura ambiente durante 24 horas, tras las

35

cuales se purifica el producto deseado mediante columna cromatográfica.

En una realización preferida de la etapa b), el producto obtenido en la etapa a) se hidrogena entre 1 y 4 bares durante un periodo de tiempo entre 12 y 24 horas, utilizando paladio sobre carbono como catalizador de la reacción. Seguidamente se vuelve a realizar una reacción de amidación en las mismas condiciones que las descritas en la etapa a).

En una realización preferida de la etapa c), a una disolución de sulfato de cobre (I) y ascorbato sódico en agua destilada se le añade una disolución del producto obtenido en la precedente etapa b) y el derivado del PCDA en diclorometano. La reacción se lleva a cabo en un microondas (Biotage) durante 20-60 minutos a 110°C. Tras ello, se purifica el compuesto mediante columna cromatográfica para la retirada del cobre.

Los valores de n, m, p y q en relación al procedimiento son los mismos que se han indicado previamente en el primer aspecto de la invención. De la misma manera, R tiene la misma significación indicada en el primer aspecto.

Otro aspecto de la invención se refiere a la nanopartícula obtenida por el procedimiento descrito en el anterior aspecto de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30

Fig. 1. Estructura general de la nanopartícula de la presente invención.

Fig. 2. Esquema sintético del compuesto de fórmula **11** (monómero autoorganizable).

Fig. 3. Esquema general de la generación de micelas fotopolimerizadas por autoorganización supramolecular y fotopolimerización del monómero **11**.

Fig. 4. Estudio de la incorporación de docetaxel por RMN de protón. En el espectro inferior se observa el espectro de las micelas cargadas disueltas en D₂O, donde no se

aprecian las señales características del fármaco. En el espectro central se observa el espectro de las micelas cargadas disueltas en DMSO-d6 (lo cual disgrega las micelas), donde recuadrado se pueden apreciar dichas señales sobre 7-8 ppm.

Fig. 5. Viabilidad celular de LnCAP (línea celular de cáncer de próstata) después del tratamiento con las micelas polimerizadas obtenidas a partir del monómero **11** con ligando (M11) o micelas polimerizadas obtenidas a partir del monómero **12** sin ligando (M12) durante 24 y 48h mediante un ensayo MTT. (a) Micelas vacías; (b) micelas cargadas con docetaxel. Se utilizó docetaxel libre como control positivo (nota: del término “ligando” en los ejemplos y figuras se está refiriendo al agente de direccionamiento R).

Fig. 6. Viabilidad celular de PC3 (línea celular de cáncer de próstata) después del tratamiento con micelas de monómero **11** con ligando o monómero **12** sin ligando durante 24 y 48h mediante un ensayo MTT. (a) micelas vacías; (b) micelas cargadas con docetaxel. Se utilizó PBS y docetaxel libre como control negativo y positivo, respectivamente.

Fig. 7. Imágenes de células LnCAP y PC3 mediante microscopía confocal después de 3h de tratamiento con micelas de monómero **11** con ligando o monómero **12** sin ligando, cargadas con Rojo Nilo (Nile Red) y co-tratado con pseudodipéptido libre.

Fig. 8. Viabilidad celular de BV-2 (líneas celulares de microglía) después del tratamiento con micelas de **11** vacías y cargadas con docetaxel durante 24h mediante un ensayo MTT. Se utilizó PBS y docetaxel libre como control negativo y positivo, respectivamente.

Fig. 9. Imágenes de células BV-2 y microglía primaria mediante microscopía confocal después de 3h de tratamiento con micelas de monómero **11** con ligando o monómero **12** sin ligando cargadas con Nile Red y co-tratado con dipéptido.

EJEMPLOS

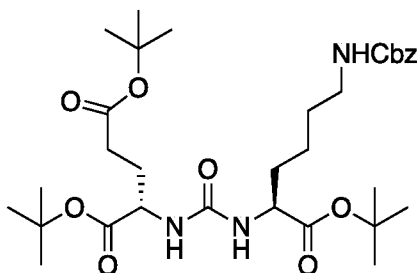
A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores.

Materiales y Métodos,

Los productos químicos empleados en esta memoria se compraron de Aldrich Chemical Co. y Carbosynth Co., y se usaron tal como se recibieron sin purificación adicional. Los disolventes secos se compraron a SDS en grado anhidro y además se secaron en un sistema de purificación de solventes (Pure Solv MD5, Innovative

technology). El seguimiento de las reacciones se llevó a cabo mediante cromatografía analítica en capa fina (TLC), empleando láminas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 F254 (fase normal) adquirido de la casa Merck. Las activaciones mediante sonicación se lograron mediante el uso de una punta de sonicación (Qsonica Ultrasonic Liquid Processor, modelo Q500) ó en un baño de agua (Ultrasonik®). Los espectros de RMN se registraron con aparatos DRX-300 (300 MHz), DPX-400 (400 MHz) y DRX-500 (500 MHz). Los disolventes deuterados se indican entre paréntesis. Los espectros se han registrado a partir de muestras en disolución en el disolvente deuterado que se indica entre paréntesis. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), usando como referencia la señal residual del disolvente no deuterado. Para la asignación de las estructuras más complejas se han utilizado experimentos bidimensionales de correlación protón-protón (COSY) y protón-carbono (HETCOR) usando secuencias de pulsos estándar. Los poderes rotatorios $[\alpha]^{20}_D$ se han determinado a temperatura ambiente, utilizando una celda de 10 cm de longitud. El polarímetro utilizado fue de la marca Perkin Elmer 341MC empleando la línea de emisión de sodio ($\lambda = 589$ nm) como fuente de luz. Los espectros de UV-Vis se registraron en un espectrómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 12, utilizando como disolvente agua milli-Q (18 $\mu\Omega$) o DMF comprados a Fluka Chemie en calidad espectroscópica adecuada. Los espectros de masas (EM) se obtuvieron empleando la técnica de ionización por electrospray (ESI) en un espectrómetro Bruker Esquire6000. Para ello se emplearon disoluciones de las muestras en CH_2Cl_2 , MeOH, o sus mezclas, a concentración en el rango μM . Las muestras se introdujeron mediante inyección directa usando una jeringa Cole-Palmer a un flujo de 120 $\mu\text{L/h}$. Los espectros de masas de alta resolución (EMAR) fueron realizados en un espectrómetro Kratos MS-80-RFA y en un espectrómetro de masas Micromass modelo AutoSpec. Los espectros de fluorescencia fueron realizados en un Jobin Yvon FLUOROLOG FL3-11 fluorimeter equipado con dos monocromadores, a una longitud de onda de excitación 345 nm. Las micrografías obtenidas del microscopio electrónico de transmisión (TEM) se obtuvieron en un microscopio Philips CM10 trabajando a 80 kV.) El tamaño de partícula y la distribución de las micelas se midieron usando un aparato Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Se usó un rayo láser a una longitud de onda de 632,8 nm. El ángulo de dispersión se ajustó a 90° cuando se realizaron las mediciones.

Ejemplo 1: Síntesis del agente de direccionamiento ACUPA adecuadamente funcionalizado.

Síntesis del compuesto 1.

5 A una disolución de trifosgeno (77 mg, 0,27 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (1,38 ml), en agitación y a 0°C , se añadió una mezcla de un derivado del aminoácido lisina (250 mg, 0,67 mmol) en CH_2Cl_2 (1,38 ml) y diisopropil etil amina (a partir de ahora referido como DIPEA; 0,3 ml) gota a gota.

10 Transcurrida 1 hora y 45 minutos, se preparó en otro matraz una mezcla de un derivado del aminoácido glutamato (198 mg, 0,67 mmol) en CH_2Cl_2 (1,38 ml) y DIPEA (0,3 ml). Se dejó en agitación durante 45 minutos, tras los cuales se añadió al matraz de la reacción mediante una cánula. Tras la adición se retiró el baño de hielo y la reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 2 horas y media.

15

Tras ello se evaporó el disolvente a vacío. La mezcla se lavó con CH_2Cl_2 (30 ml) y se separaron las fases utilizando KHSO_4 2M (2 x 15 ml) y una disolución saturada de NaCl (15 ml). Tras secado de la fase orgánica sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó el disolvente a presión reducida en un rotavapor, obteniéndose un crudo del cual se aisló el producto deseado mediante columna cromatográfica usando como mezcla de eluyentes AcOEt:Hex (1:2). Se obtuvo **1** con un rendimiento del 72% (300mg).

20

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7,38 (d, J = 4,4 Hz, 2H, C_6H_5), 7,36-7,30 (m, 3H, C_6H_5), 5,32 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 5,23-5,17 (d, J = 8,08Hz, 1H, NHCONH), 5,14-5,10 (d, J = 5,17Hz, 1H, NHCONH), 5,17-5,07 (m, 1H, CH_2NHCBz), 4,39-4,31 (m, 2H, NHCHCO), 3,25-3,15 (m, 2H, CH_2NHCBz), 2,41-2,23 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 1,93-1,75 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NHCBz}$), 1,58-1,33 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$), 1,48 (s, 9H, t-Bu), 1,474 (s, 9H, tBu), 1,458 (s, 9H, tBu), 1,31-1,26 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NHCBz}$).

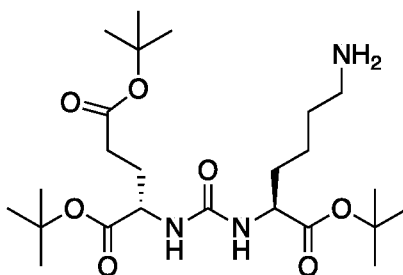
30

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 172,5, 172,4, 172,2 (CO_2tBu), 156,8 (NHCONH), 156,6 (NHCO), 136,7, 128,5, 128,1, 128,0 (C_6H_5), 82,1, 81,8, 80,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 66,6

(NHCO₂CH₂C₆H₅), 53,3, 53,1 (NHCHCO₂tBu), 40,6 (CH₂NHCbz), 32,7 (CH₂CH₂CO₂tBu), 31,6 (CH₂CH₂NHCbz), 29,4 (CH₂(CH₂)₃NHCbz), 28,36 (CH₂CH₂CO₂tBu), 28,1, 28,03, 28,01 (C(CH₃)₃), 22,2 (CH₂(CH₂)₂NHCbz).

- 5 **EMAR (EI):** calculado para C₃₂H₅₁O₉N₃Na m/z 622,3698; encontrado 622,3690.

Síntesis del compuesto 2.



- 10 A una disolución de **1** (322 mg, 0,52 mmol) en EtOH (8,62 ml) se añadieron formiato de amonio (328 mg, 5,2 mmol) y Pd (C) (55,3 mg, 0,052 mmol). La reacción se agitó ocasionalmente durante 2 horas.

- Una vez comprobamos que la reacción había terminado, pasamos la mezcla por una
15 placa filtrante con Celita®545, añadiendo una gran cantidad de CH₂Cl₂ repetidamente para que se filtrase el compuesto en su totalidad. Al no quedar rastros de producto de partida ni productos secundarios, no hubo necesidad de purificar en columna cromatográfica. Se obtuvo **2** con un rendimiento cuantitativo (310mg).

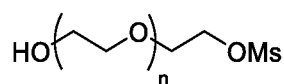
- 20 **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃):** δ 6,05-5,98 (d, J=7,61Hz, NHCONH), 5,97-5,91 (d, J=8,23Hz, NHCONH), 4,39-4,26 (m, 2H, NHCHCO₂tBu), 3,02-2,90 (m, 2H, CH₂NH₂), 2,42-2,26 (m, 4H, CH₂CH₂CO₂tBu), 2,14-2,01 (m, 2H, CH₂(CH₂)₃NH₂), 1,92-1,80 (m, 2H, CH₂CH₂NH₂), 1,77-1,61 (m, 2H, NH₂), 1,45 (s, 18H, tBu), 1,43 (s, 9H, tBu), 1,39-1,22 (m, 2H, CH₂(CH₂)₂NH₂).

25

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 173,19, 172,74, 172,44 (CO₂tBu), 157,48 (NHCONH), 82,07, 81,58, 80,54 (C(CH₃)₃), 53,31, 52,90 (NHCHCO₂tBu), 39,90 (CH₂NH₂), 31,74 (CH₂CH₂CO₂tBu), 31,68 (CH₂(CH₂)₃NH₂; CH₂CO₂tBu), 29,70 (CH₂CH₂NH₂), 28,09, 28,04 (C(CH₃)₃), 22,69 (CH₂CH₂CO₂tBu), 21,97 (CH₂(CH₂)₂NH₂).

30

EMAR (EI): calculado para C₂₄H₄₆O₇N₃ m/z 488,3330; encontrado 488,3323.

Ejemplo 2: Síntesis de los espaciadores bifuncionales**Ejemplo representativo: Síntesis de COOH-PEG₄-N₃****5 Síntesis del compuesto 3.**

Sobre una solución de tetraetilenglicol ($n = 3$) (22,7 ml, 140 mmol) en tetrahidrofurano (a partir de ahora referido como THF; 100 ml) y E_3N anhidro (15 ml), se adicionó gota a gota y a 0°C MsCl (10,8 ml, 140 mmol). Seguidamente, se dejó que la reacción alcanzara la temperatura ambiente, continuándose la agitación durante toda la noche. Tras ello se evaporó el THF a presión reducida. Se añadió CH_2Cl_2 hasta disolver bien el compuesto y se separaron las fases orgánica y acuosa con NH_4Cl (30ml) y NaCl (30ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó, purificándose el derivado deseado por columna cromatográfica con $CH_2Cl_2:MeOH$ (40:1) como eluyentes. Así, se obtuvo **3** como un sirupo amarillo y con un rendimiento del 33% (12,45 g).

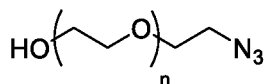
¹H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4,41-4,35 (m, 2H, CH_2OMs), 3,81-3,60 (m, 14H), 3,09 (s, 3H, $CH_2OSO_2CH_3$), 2,97 (sa, 1H, OH).

20

¹³C RMN (100,6 MHz, $CDCl_3$): δ 72,5 ($HOCH_2CH_2O$), 70,4, 70,3, 70,1, 69,4, 69,3, 69,0 (CH_2CH_2OMs), 61,6 (COH), 37,6 (OSO_2CH_3).

EMAR (EI): Calculado para $C_9H_{20}O_7SNa$ 273,1008 $[M+Na]^+$, encontrado 273,0997.

25

Síntesis del compuesto 4.

A una disolución de **3** ($n = 3$) (12,45 g, 45,7 mmol) en EtOH 95% (76,35 ml) se le añadió NaN_3 (3,56 g, 54,84 mmol), y se mantuvo en agitación a reflujo (80°C) durante toda la noche. Posteriormente, se neutralizó la mezcla con una disolución saturada de NaCl (50 ml), extrayéndose la fase acuosa con éter etílico (100 ml). Los extractos orgánicos se reunieron y secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras la filtración del mismo y evaporación del disolvente a vacío, se purificó el compuesto mediante columna cromatográfica, usando como eluyentes Hex:AcOEt (1:1), en primer lugar, y AcOEt (1)

30

con posterioridad. Siguiendo este procedimiento se aisló **4** como un sirope con rendimiento del 86% (8,57g).

La síntesis del compuesto **4a** ($n = 19$), se ha llevado a cabo siguiendo la misma ruta
5 sintética partiendo del correspondiente mesilato 3a ($n = 19$)

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 3,58 (t, 2H, $J = 4,8$ Hz, HOCH_2CH_2), 3,55-3,51 (m, 10H, 5 CH_2O), 3,46 (t, 2H, $J = 4,8$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3,26 (t, 2H, $J = 4,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3,10 (sa, 1H, OH).

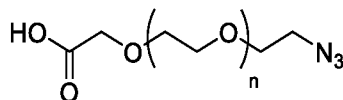
10

^{13}C RMN (125,7 MHz, CDCl_3): δ 72,5 ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70,6, 70,5, 70,4, 70,2, 69,9 (CH_2O), 61,5 (COH), 50,5 (CN_3).

EMAR (EI): Calculado para $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$ 220,1297 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, encontrado 220,1288.

15

Síntesis del compuesto 5.



Se agitó una disolución de NaH (9,5 g, 395 mmol) en 20 ml de hexano durante 5
20 minutos, pasados los cuales se dejó que se asentase durante un tiempo el NaH. El hexano se recogió cuidadosamente con una jeringuilla y lo que no se pudo retirar mediante este método se eliminó mediante vacío y decapador por aire caliente a potencia media. Una vez retirado el hexano, se añadió THF seco (197,5 ml) por goteo mediante un embudo de adición. A esta disolución se le añadió por goteo, con la
25 ayuda de un embudo de adición, una disolución del alcohol azida **4** ($n = 2$) (8,57 g, 39,09 mmol) en THF seco (197,5 ml). Tras agitar la disolución a temperatura ambiente durante una hora, se añadió por goteo, con la ayuda de un embudo de adición, una disolución de ácido bromoacético (11,1 g, 79 mmol) en THF seco (197,5 ml). La reacción se dejó en agitación durante 24 horas, pasadas las cuales se añadió agua
30 destilada (50 ml) para destruir el exceso de NaH, seguida de evaporación del THF. Se acidificó la fase acuosa obtenida con una disolución de HCl 1M (25 ml), y se extrajo con CH_2Cl_2 . Tras secar los extractos orgánicos sobre Na_2SO_4 anhidro, filtrar y evaporar el disolvente, el crudo obtenido fue purificado mediante columna cromatográfica, usando como mezcla de eluyentes CH_2Cl_2 :MeOH (40:1), obteniéndose
35 el compuesto **5** ($n = 3$) como un sirope claro con rendimiento del 57% (6,26 g).

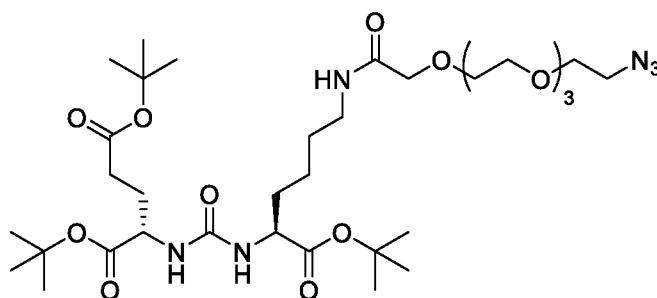
¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 9,30 (sa, 1H, COOH), 4,15 (s, 2H, CH₂COOH), 3,80-3,60 (m, 10H, OCH₂), 3,29 (t, 2H, J = 4,5 Hz, CH₂N₃).

5 **¹³C RMN (125,7 MHz, CDCl₃):** δ 173,5 (CO), 70,9 (CH₂COOH), 70,4, 70,3, 70,2, 69,9, 68,3 (OCH₂CH₂N₃), 50,5 (CN₃).

EMAR (EI): Calculado para C₈H₁₆N₃O₅ 234,1089 [M+H]⁺, encontrado 234,1085.

10 **Ejemplo 3: Síntesis del monómero auto-organizable 11.**

Síntesis del compuesto 6.



Una disolución del espaciador **5** (45,5 mg, 0,21 mmol), O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (a partir de ahora referido como TBTU; 44,5 mg, 0,19 mmol) y DIPEA (0,03 ml) en dimetilformamida seca (a partir de ahora referida como DMF; 0,5 ml) se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionó una disolución de **2** (97 mg, 0,19 mmol) y DIPEA (0,03 ml) en DMF (0,5 ml). La mezcla se dejó en agitación durante 24 horas.

20

Se evaporó la DMF empleando una bomba de vacío. Una vez evaporada la DMF se añadió CH₂Cl₂ (10 ml) y se lavó, en este orden, con una disolución de HCl 1M (15 ml), una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (15 ml) y una disolución saturada de NaCl (15 ml). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con Na₂SO₄ anhidro. Una vez filtrado y evaporado el disolvente, se purificó el producto deseado por cromatografía en columna, usando como mezcla de eluyentes CH₂Cl₂:MeOH (20:1), obteniéndose **6** con un rendimiento del 76% (111,2mg).

30 **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃):** δ 7,15-7,08 (t, J=5,50Hz, 1H, NHCOCH₂O), 5,379-5,34 (d, J=7,57Hz, NHCONH), 5,30-5,24 (d, J=7,89Hz, NHCONH), 4,40-4,25 (m, 2H, NHCHCO₂tBu), 4,07 (s, 2H, NHCOCH₂O), 3,74-3,66 (m, 12H, O(CH₂)₂O), 3,44-3,38 (t,

J=4,55Hz, 2H, OCH₂CH₂N₃), 3,39-3,20 (m, 2H, CH₂NHCOCH₂O), 2,42-2,24 (m, 2H, CH₂CH₂CO₂tBu), 2,14-2,01 (m, 2H, CH₂CH₂CO₂tBu), 1,92-1,75 (m, 2H, CH₂(CH₂)₃NHCO), 1,68-1,62 (m, 2H, OCH₂CH₂N₃), 1,62-1,51 (m, 2H, CH₂CH₂NHCO), 1,47 (s, 18H, tBu), 1,43 (s, 9H, tBu), 1,33-1,24 (m, 2H, CH₂(CH₂)₂NHCO).

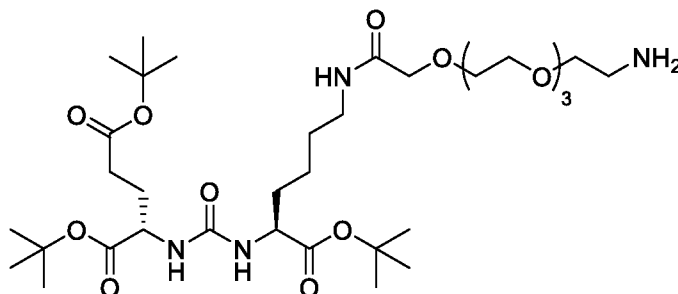
5

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 172,5, 172,2 (CO₂tBu), 170,3 (NHCO), 157,1 (NHCONH), 81,8, 81,5, 80,5 (C(CH₃)₃), 70,9 (NHCOCH₂O), 70,7, 70,6, 70,5 (O(CH₂)₂O), 70,4 (OCH₂CH₂N₃), 70,2, 70,0 (NHCOCH₂O(CH₂)₂O), 53,4, 52,9 (NHCHCO₂tBu), 50,7 (OCH₂CH₂N₃), 38,1 (CH₂NHCOCH₂O), 32,0 (CH₂CH₂CO₂tBu), 29,7 (CH₂CH₂NHCO), 29,1 (CH₂CH₂CO₂tBu), 28,6 (CH₂(CH₂)₃NHCO), 28,1, 28,0 (C(CH₃)₃), 22,2 (CH₂(CH₂)₂NHCO).

10

EMAR (EI): calculado para C₃₄H₆₂O₁₂N₆Na m/z 769,4318; encontrado 769,4307.

15 Síntesis del compuesto 7.



20

A una disolución de **6** (111,2 mg, 0,144 mmol) en CH₂Cl₂ (7,7 ml), contenida en un Fisher-Porter, se le añadió Pd (C) (15,3 mg, 0,0144 mmol) y se dejó en agitación durante 24 horas bajo presión de H₂ (4 bar).

La mezcla se filtró mediante una placa filtrante con Celita®545, añadiendo una cantidad abundante de CH₂Cl₂ repetidamente para que se filtrase en su totalidad. Tras la filtración, se obtuvo **7** con un rendimiento cuantitativo (126mg).

25

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,63-7,55 (t, J=5,60Hz, 1H, NHCO), 6,49-6,45 (d, J=7,67Hz, NHCONH), 6,38-6,34 (d, J=8,12Hz, NHCONH), 4,36-4,22 (m, 2H, NHCHCO₂tBu), 4,08 (s, 2H, NHCOCH₂O), 3,9-3,8 (t, J=4,72Hz, 2H, OCH₂CH₂NH₂), 3,75-3,6 (m, 12H, O(CH₂)₂O), 3,43-3,33 (m, 2H, OCH₂CH₂NH₂), 3,30-3,18 (m, 2H, CH₂NHCOCH₂O), 2,15-2,04 (m, 4H, CH₂CH₂CO₂tBu), 1,93-1,78 (m, 2H, CH₂(CH₂)₃NHCO), 1,77-1,61 (m, 2H, NH₂), 1,61-1,5 (m, 2H, CH₂CH₂NHCO), 1,44 (s,

30

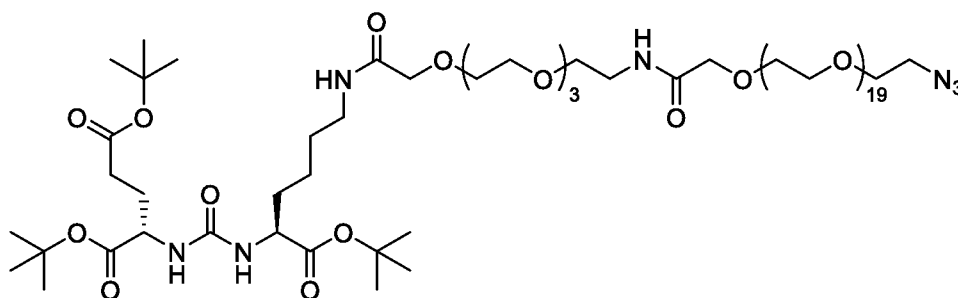
9H, tBu), 1,43 (s, 9H, tBu), 1.42 (s, 9H, tBu), 1,29-1,19 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}$).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 173,0, 172,4 (CO_2tBu), 170,7 (NHCO), 157,8 (NHCONH), 81,7, 81,2, 80,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 70,3 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 70,1 (NHCOCH_2O), 70,0, 69,9, 69,8, 69,5 ($\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$), 53,5, 53,0 ($\text{NHCHCO}_2\text{tBu}$), 39,6 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 38,4 (CH_2NHCO), 29,7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 29,3 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}$), 28,7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 28,1, 28,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 23,7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 22,4 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}$).

EMAR (EI): calculated for $\text{C}_{59}\text{H}_{104}\text{O}_{13}\text{N}_4\text{Na}$ m/z 1099,7492; found 1099,7477.

10

Síntesis del compuesto 8.



Se agitó durante 5 minutos una disolución del espaciador bifuncional **5a** ($n = 19$) (270 mg, 0,275 mmol), TBTU (58,5mg, 0,25 mmol) y DIPEA (0,06 ml) en DMF seca (0,6 ml). Tras ello, se le adicionó una disolución de **7** (180 mg, 0,25 mmol) y DIPEA (0,06 ml) en DMF (0,6 ml). Se dejó en agitación durante toda la noche.

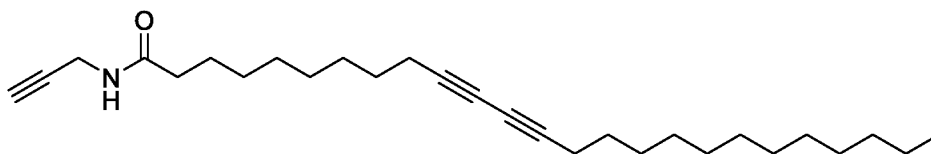
Transcurrido ese tiempo, se evaporó la DMF empleando una bomba de vacío y se purificó el producto mediante una columna cromatográfica (mezcla de eluyentes CH_2Cl_2 :MeOH 40:1, aumentando paulatinamente la proporción de metanol). Se obtuvo **8** con un rendimiento del 42,78% (198 mg).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 8,05-7,98 (m, 2H, NHCO), 7,90-7,85 (d, 1H, $J=7,97\text{Hz}$, NHCONH), 7,79-7,73 (d, 1H, $J=7,97\text{Hz}$, NHCONH), 4,25-4,12 (m, 2H, $\text{NHCHCO}_2\text{tBu}$), 4,04 (s, 2H, NHCOCH_2O), 4,01 (s, 2H, NHCOCH_2O), 3,87-3,82 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3,71 (s, 12H, $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$), 3,67 (s, 76H, $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$), 3,52-3,45 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3,43-3,38 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3,31-3,22 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{O}$), 2,43-2,25 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 2,15-2,00 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 1,89-1,73 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}$), 1,73-1,53 (2m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ / $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 1,50 (s, 18H, tBu), 1,47 (s, 9H, tBu), 1,19-1,13 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}$).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 172,5, 172,3, 172,0 (CO_2tBu), 171,5, 171,3 (NHCO), 158,5 (NHCONH), 81,4, 81,1, 80,3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 70,55, 70,52 (NHCOCH_2O), 70,2 ($\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$), 70,0 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 69,8 ($\text{NHCOCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 69,7 (NHCOCH₂OCH₂CH₂O), 69,4 (NHCOCH₂OCH₂CH₂O), 53,5, 52,7 (NHCHCO₂tBu), 50,4 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 38,4 (OCH_2NHCO), 38,2 (CH_2NHCO), 31,8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 31,1 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}$), 28,8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 27,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 22,5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 17,3 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}$).

10 **EMAR (EI):** calculado para $\text{C}_{76}\text{H}_{145}\text{O}_{33}\text{N}_7\text{Na}$ m/z 1706,9776; encontrado 1706,9770.

Síntesis del compuesto 9.



15 Se agitó una disolución de ácido 10,12-pentacosadiinoico (1000 mg, 2,6 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP; 32 mg, 0,26 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (16 ml) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIPC; 462 μl) durante 5 minutos, pasados los cuales se añadió la propargilamina (166 μl). La reacción se dejó en agitación durante 24 horas. El producto se purificó por columna cromatográfica con una mezcla de eluyentes

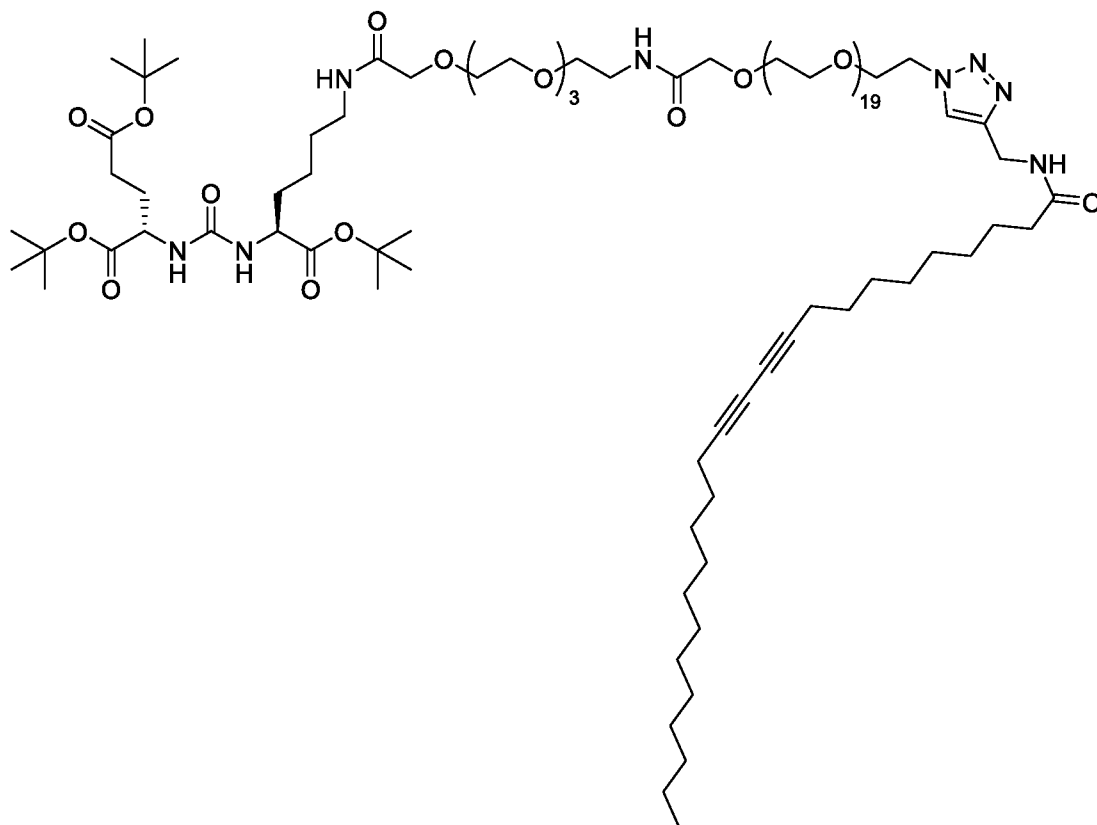
20 Hexano:AcOEt 5:1. Se obtuvo **9** con un rendimiento del 94% (939,6 mg).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 5,50 (sa, 1H, NHCO), 4,06-4,04 (m, 2H, CH_2NHCO), 2,23 (t, 4H, J = 6,9 Hz, 2 $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 2,18 (t, 2H, J = 7,6 Hz, COCH_2CH_2), 1,64-1,60 (m, 2H, COCH_2CH_2), 1,52-1,47 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 1,40-1,25 (m, 26H, 13 CH_2), 0,88 (t, 3H, J = 6,5 Hz, CH_3CH_2).

^{13}C RMN (125,7 MHz, CDCl_3): δ 172,6 (CO), 79,7 ($\text{HC}\equiv\text{C}$), 77,6 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 77,4 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 71,6 ($\text{HC}\equiv\text{C}$), 65,3 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 65,2 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 36,5 (NHCOCH_2), 31,9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 29,6, 29,5, 29,3, 29,2, 29,1, 28,9, 28,7, 28,4, 28,3, 25,5 (COCH_2CH_2), 22,6 (CH_2CH_3), 19,2 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 19,1 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 14,1 (CH_3CH_2).

EMAR (EI): Calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{NONa}$ 434,3398 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, encontrado 434,3394.

Síntesis del compuesto 10.



- Se añadió una disolución de CuSO_4 (1,45 mg, 0,009 mmol) y ascorbato sódico (5,35 mg, 0,027 mmol) en H_2O destilada (0,6 ml) a un tubo de microondas. A esta disolución se le añadió otra disolución de **8** (110 mg, 0,06 mmol) y **9** (24 mg, 0,072 mmol) en CH_2Cl_2 (0,06 ml). La reacción “click” se dejó en agitación durante una hora (periodos de 15min hasta no ver producto de partida) a 110°C en el microondas.
- Se purificó el producto deseado por cromatografía en columna, usando como mezcla de eluyentes $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ en gradiente (20:1 > 15:1 > 9:1), obteniéndose **10** con un rendimiento cuantitativo (140mg).

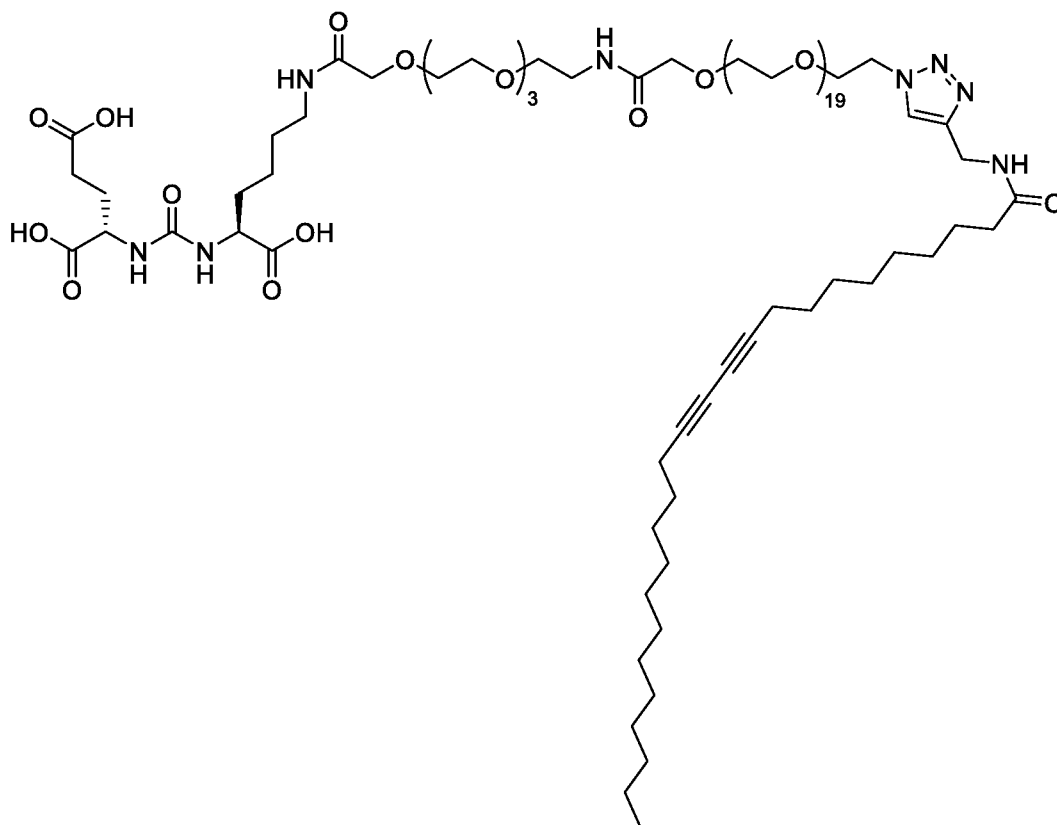
^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 8,28-8,22 (m, 1H, NHCO), 7,86 (s, 1H, NCHC), 7,72-7,60 (m, 2H, NHCO), 6,33-6,24 (t, 1H, $J=10,25\text{Hz}$, NHCONH), 5,76 (s, 1H, NHCONH), 4,53-4,46 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 4,30-4,26 (m, 2H, CCH_2NHCO), 4,09-4,00 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4,00-3,92 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,88 (s, 1H, NHCOCH_2O), 3,86 (s, 1H, NHCOCH_2O), 3,83-3,77 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3,59-3,47 (m, 88H, $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$), 3,20-3,16 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3,13-3,05 (m, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{O}$), 2,69 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 2,34 (s, 2H, $\text{C}\equiv\text{CCH}_2$), 2,31-2,18 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 2,13-2,03 (t,

$J=6,61\text{Hz}$, 2H, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$), 1,94-1,82 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}$), 1,74-1,56 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 1,56-1,37 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CC}\equiv\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,40 (s, 27H, tBu), 1,36-1,19 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}$), 1,25 (s, 26H, CH_2), 0,9-0,84 (t, $J=7,08\text{Hz}$, 3H, CH_3).

5 ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 172,5, 172,3 (CO_2tBu), 172,0, 171,5, 171,3 (NHCO), 158,5 (NHCONH), 131,0 (N_3CHC), 128,5 (N_3CHC), 81,4, 81,1, 80,3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 76,6, 76,5 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CC}\equiv\text{CH}_2$), 70,5, 70,4 (NHCOCH_2O), 70,0, 69,9 ($\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$), 69,8 (NHCOCH₂O(CH_2)₂O), 69,4 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 65,1 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CC}\equiv\text{CH}_2$), 54,5 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 53,5, 52,7 (NHCHCO₂tBu), 42,5, 38,5, 38,3 (CH_2NHCO), 35,1 ($\text{CCH}_2\text{NHCOCH}_2$), 31,8
10 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 31,7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 31,1 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}$), 29,4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 29,3, 29,2, 29,1, 28,9, 28,79, 28,76, 28,68, 28,5, 28,48, 28,2, 27,7 (CH_2), 27,02, 27,00, 26,98 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25,5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 22,5 (CH_2CH_3), 22,4 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}$), 18,4 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CC}\equiv\text{CH}_2$), 13,1 (CH_3).

15 **EMAR (EI)**: calculated for $\text{C}_{104}\text{H}_{190}\text{O}_{34}\text{N}_8\text{Na}$ m/z 2118,3277; found 2118,3241.

Síntesis del compuesto 11.



Se añadió ácido trifluoroacético (1 ml) a una disolución de **10** (134,3 mg, 0,064 mmol)
20 en CH_2Cl_2 (2,06 ml) en un tubo de microondas. Se mantuvo en agitación en un

microondas Biotage a 70°C durante 25 minutos. Se obtuvo **11** con un rendimiento cuantitativo (141,3 mg).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,27-8,21 (m, 1H, NHCO), 7,87 (s, 1H, NCHC), 7,75-7,60 (m, 2H, NHCO), 6,36-6,26 (m, 1H, NHCONH), 5,76 (s, 1H, NHCONH), 4,53-4,43 (m, 2H, NHCHCO₂H), 4,31-4,23 (m, 2H, CCH₂NHCO), 4,15-4,07 (m, 2H, OCH₂CH₂N), 4,07-4,00 (m, 2H, OCH₂CH₂N), 3,88 (s, 1H, NHCOCH₂O), 3,86 (s, 1H, NHCOCH₂O), 3,83-3,77 (t, J=4,98Hz, 2H, OCH₂CH₂NHCO), 3,59-3,48 (m, 88H, O(CH₂)₂O), 3,30-3,24 (m, 2H, OCH₂CH₂NHCO), 3,13-3,05 (m, CH₂NHCOCH₂O), 2,69 (s, 2H, CH₂C≡C), 2,34 (s, 2H, C≡CCH₂), 2,31-2,18 (m, 4H, CH₂CH₂CO₂H), 2,13-2,03 (t, J=7,48Hz, 2H, NHCOCH₂CH₂), 2,03-1,85 (m, 2H, CH₂(CH₂)₃NHCO), 1,84-1,59 (m, 4H, CH₂CH₂NHCO), 1,58-1,37 (m, 4H, CH₂CH₂C≡CC≡CCH₂CH₂), 1,36-1,22 (m, 2H, CH₂(CH₂)₂NHCO), 1,25 (s, 26H, CH₂), 0,9-0,84 (t, J=6,56Hz, 3H, CH₃).

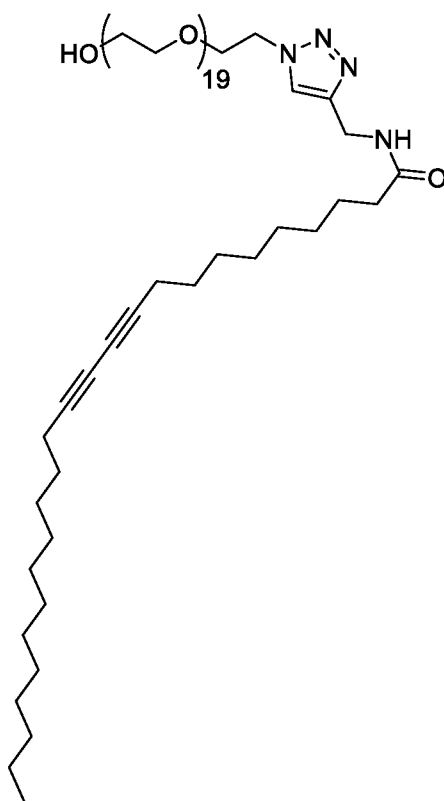
¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 175,0, 174,6, 174,2 (CO₂H), 172,5, 169,7, 169,5 (NHCO), 157,7 (NHCONH), 132,2 (N₃CHC), 123,9 (N₃CHC), 78,4 (CH₂C≡CC≡CCH₂), 70,7 (NHCOCH₂O), 70,4, 70,2 (O(CH₂)₂O), 70,1 (NHCOCH₂O(CH₂)₂O), 70,0 (OCH₂CH₂N), 65,8 (CH₂C≡CC≡CCH₂), 55,4 (OCH₂CH₂N), 52,8, 52,1 (NHCHCO₂H), 38,4, 38,3, 35,7 (CH₂NHCO), 34,6 (CCH₂NHCOCH₂), 32,3 (CH₂CH₂CH₃), 32,0 (CH₂(CH₂)₃NHCO), 31,8 (CH₂CH₂CO₂H), 30,4 (CH₂CH₂NHCO), 29,5, 29,4, 29,3, 29,2, 29,1, 28,8, 28,7, 28,6, 28,2, 28,1, 28,0 (CH₂), 25,6 (CH₂CH₂CO₂H), 23,0 (CH₂CH₃), 22,5 (CH₂(CH₂)₂NHCO), 18,7 (CH₂C≡CC≡CCH₂), 14,4 (CH₃).

EMAR (EI): calculado para C₉₂H₁₆₆O₃₄N₈Na m/z 1950,1399; encontrado 1950,1369

En la figura 2 se muestra el esquema de la síntesis del monómero **11**.

Ejemplo 4: Síntesis del monómero auto-organizable **12**.

Síntesis del compuesto **12**



A una disolución de sulfato de cobre (2,5mg, 0,02mmol) y ascorbato sódico (9mg, 0,05mmol) en agua destilada (1,1mL) se añadió una disolución **4a** (n = 19) (100mg, 0,11mmol) y el derivado de PCDA **9** (43mg, 0,13mmol) en diclorometano (1,1mL). Se mantuvo en agitación a 110°C en un microondas Biotage durante 30 minutos, tras los cuales se pasó a la purificación mediante columna cromatográfica con una mezcla de eluyentes CH₂Cl₂:MeOH (20:1), obteniéndose **12** con una rendimiento del 94,04% (138mg).

10

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.26 (t, 1H, J = 5.2Hz, NHCO), 7.86 (s, 1H, H Triazol), 4.60 (t, 1H, J = 5.0Hz, OH), 4.49 (t, 2H, J = 5.1Hz, CH₂N-Triazol), 4.28 (d, 2H, J = 5.1Hz, Triazol-CH₂NHCO), 3.80 (t, 2H, J = 5.2Hz, CH₂CH₂N-Triazol), 3.71-3.67 (m, HOCH₂), 3.58-3.52 (m, 74H, 37 CH₂O), 2.27 (t, 4H, J = 6.7Hz, 2 CH₂C≡C), 2.08 (t, 2H, J = 7.3Hz, CH₂NHCO), 1.49-1.43 (m, 6H, COCH₂CH₂, 2 CH₂CH₂C≡C), 1.25 (m, 26H, 13 CH₂), 0.86 (t, 3H, J = 6.8Hz, CH₃).

15

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 172,5 (CO), 145,4 (C Triazol), 123,6 (CH Triazol), 78,5 (CH₂C≡C), 72,8, 70,2, 69,2 (CH₂O), 65,8 (CH₂C≡C), 60,7 (CH₂OH), 49,7 (CH₂N-Triazol), 35,7, 34,5 (CH₂NHCO), 31,8 (CH₂CH₂CH₃), 29,5, 29,4, 29,3, 29,2, 29,1, 28,8, 28,7, 28,6, 28,2, 28,1 (CH₂), 25,7 (CH₂CH₂CO), 22,6 (CH₂CH₃), 18,7 (CH₂C≡C), 14,4

20

(CH₃).

EMAR (EI): calculado para C₆₈H₁₂₆O₂₁N₄Na 1357,8807 [M+Na]⁺; encontrado 1357,8802.

5

Ejemplo 5: Síntesis y Caracterización de las micelas fotopolimerizadas a partir de los monómeros 11 y 12

10 **5.1. Determinación de la Concentración Micelar Crítica (CMC).** La CMC es la concentración a partir de la cual los monómeros tipo **11** y **12** forman micelas de manera espontánea al contacto con el agua.

15 Las medidas para estimar la Concentración Micelar Crítica (CMC) se realizaron en un espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse a temperatura ambiente. Se utilizó el pireno como agente de fluorescencia hidrofóbico, que sería englobado por las micelas. Se prepararon muestras con diferentes concentraciones micelares (la concentración de pireno se mantiene constante: 0,2 µM).

20 Las distintas muestras fueron excitadas a 338nm. La relación entre las intensidades de fluorescencia a 375 nm y 395 nm (picos 1 y 3 del espectro de excitación del pireno) depende de la concentración total micelar y se muestra, alrededor de la CMC, como una curva sigmoidal típica. Esta curva fue posteriormente procesada para obtener la CMC.

25 5.2. Formación de las nanomicelas polimerizadas.

Una vez conocida las CMC de los monómeros **11** (363 µM) y **12** (233 µM) se llevó a cabo la formación de las nanomicelas (figura 3). Para ello, se disolvió una cantidad determinada de los monómeros **11** y **12**, superior a la CMC, en agua milliQ. Esta disolución se sometió a ultrasonificación durante 30 minutos a un 20% de amplitud bajo oscuridad total. Tras ello, la disolución micelar se dializó durante 48 horas a 250rpm para eliminar los monómeros libres, y se analizaron las micelas sin polimerizar por DLS y TEM. Tras el análisis por DLS y TEM de las micelas no polimerizadas, se mantuvieron durante 3 horas bajo luz ultravioleta para su polimerización (254nm). Teniendo en cuenta que la polimerización no necesita ningún catalizador ni iniciador, las micelas polimerizadas se obtienen puras y no necesitan de ninguna etapa adicional de purificación. Las micelas polimerizadas se volvieron a analizar DLS y TEM.

30

35

5.3. Ensayos de estabilización micelar.

El principal problema que presentan las nanomicelas no polimerizadas es su alta tendencia a la dilución. Esto se ha solventado con la polimerización de la función dialquino del ácido 10,12-pentacosadiinoico. Para comprobar si esta estrategia es efectiva, se han formado micelas en tampón PBS pH7,4 (0,1M) y se analizaron por DLS y TEM cada semana hasta el mes de estudio). Tras ello, se volvieron a analizar a los 3 y 6 meses.

A su vez, se formaron micelas por encima de la CMC y se diluyeron muy por debajo de ésta para ver si las micelas eran estables en el medio independientemente de su concentración.

Por último, las micelas ya polimerizadas fueron sometidas a altas temperaturas (80°C y 100°C) para ver si la estructura sufría alguna alteración debido a este cambio de temperatura).

Como conclusión de este estudio es la alta estabilidad de las micelas polimerizadas frente a dilución y su idoneidad como agente de transporte de fármacos, en comparación con las micelas no polimerizadas.

Ejemplo 6: Estudios de Incorporación y liberación de Fármacos y Agentes de Imagen.

Se estudió la incorporación y liberación de distintos fármacos (Docetaxel, Sorafenib, Aprepitant, Camptotecina) y agentes de diagnóstico ((3,3'-Dietiltiatricarbocianine ioduro), abreviado como DTTCl, y Rojo Nilo).

Para ello, se añadió el compuesto deseado (sorafenib: 1,54 mg/ml; docetaxel: 1,29 mg/ml; camptotecina: 0,72 mg/ml ó aprepitant: 1,43 mg/ml) a una disolución de nanomicelas (polimerizadas) 1,25mM en agua miliQ y se mantuvo en agitación durante 24h a 54°C. La disolución obtenida se centrifugó a 1500rpm durante 45 minutos, se separó el sobrenadante (nanomicelas polimerizadas con el fármaco o agente de diagnóstico incorporado) del precipitado (agente de diagnóstico o fármaco no incorporado) y se liofilizaron las muestras en un liofilizador (Ilshin BioBase, Freeze Dryer) a -70°C.

La incorporación del fármaco se verificó por ^1H RMN, utilizando como disolventes D_2O y DMSO. La cantidad de fármaco incorporado se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

- 5 En la figura 4 podemos apreciar la comprobación de la incorporación de docetaxel por RMN de protón. En primer lugar, se analizan las nanomicelas cargadas en agua deuterada, donde el fármaco debe estar dentro del núcleo hidrofóbico de la micela y no deberían verse las señales de protón del fármaco. Posteriormente se hace en dimetilsulfóxido deuterado, que desintegra las micelas y sale el fármaco de su interior, por lo que deberían verse las señales de protón de éste.

El principal problema que presenta la administración de estos fármacos es su baja solubilidad en agua, ya que son compuestos hidrófobos, y por tanto, se necesitan dosis altas de fármaco para obtener una biodisponibilidad adecuada. El diseño de las nanopartículas de la presente invención permite la incorporación de fármacos hidrófobos en su interior, aislándolos del entorno hidrófilo del medio, mejorando su solubilidad. De este modo, se podría reducir la dosis administrada de fármaco y se conseguiría minimizar los efectos secundarios de estos.

El contenido de fármaco de las nanomicelas cargadas (drug-loading content, -DL) y la eficiencia de encapsulación (EE) fue determinada por HPLC siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$\text{DL (\%)} = \frac{\text{Cantidad de fármaco añadido}}{\text{Cantidad del monómero} + \text{Cantidad de fármaco en la NP}} \times 100$$
$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{Carga real de fármaco}}{\text{Carga teórica de fármaco}} \times 100$$

- 25 Las nanomicelas pueden ser saturadas de fármaco, lo cual provoca la liberación inmediata de la mayoría de su contenido por el denominado 'efecto Burst', por el cual el fármaco que esté interaccionando de manera más débil con el núcleo hidrofóbico de la nanopartícula se liberará de forma pulsátil, o pueden ser cargadas con una pequeña cantidad de fármaco, con el cual se obtienen unos perfiles de liberación controlada y sostenida en el tiempo. Para ambos tipos de carga, la eficiencia de encapsulación de docetaxel es del 22%, de sorafenib el 25%, de aprepitant el 20,5% y de camptotecina el 9,4% mientras que el contenido de fármaco depende de las concentraciones de nanomicelas y fármaco que se utilice.

- 35 Una vez obtenidas las nanomicelas cargadas se estudió el perfil de liberación de estos

fármacos a dos pHs distintos (tampón PBS pH7,4; 0,1M y tampón acetato pH5,0 0,1M) utilizando el método de diálisis. Sería interesante que el perfil de liberación fuese más acentuado a pH ácido, al ser el pH al que se encuentra el ambiente tumoral. La cuantificación se llevó a cabo por HPLC. La disolución de nanomicelas con el agente
5 incorporado se transfirió a 8 tubos de diálisis (3500Da), los cuales se pusieron a dializar en tampón PBS (pH7,4; 0,1M, t.a.) o tampón acetato (pH5,0: 0,1M, t.a.) durante una semana con agitación continua (100rpm). A determinados tiempos (t_0 , 0,25; 0,5; 1; 5; 10; 24; 72; 168h) se retiró la totalidad de la muestra del tubo de diálisis seleccionado, se añadieron 200µl DMSO para romper las nanomicelas y se cuantificó
10 la cantidad de fármaco restante en el interior de éstas por HPLC. Se usó un detector UV/Vis (Waters 996 Photodiode Array Detector) ajustado a una longitud de onda de 254nm. Se utilizó una columna C₁₈ (5µm, 4,6 x 150mm) y como fase móvil una mezcla 50% acetonitrilo-0,1%TFA y 30% H₂O-0,05%TFA con un caudal de 1ml/min para el caso del docetaxel, sorafenib y aprepitant y 30% acetonitrilo-0,1%TFA y 70% H₂O-
15 0,05%TFA para la camptotecina. La temperatura de la columna fue de 30°C. Se inyectaron 10µl, 30µl o 50µl de la muestra en la columna.

Se muestra el perfil de liberación de docetaxel desde el interior de una nanomicela a pH neutro (figura 9) y la liberación de sorafenib en función del pH (figura 10).

20

Ejemplo 7: Ensayos de Crecimiento Celular

7.1. Líneas celulares y cultivo.

En este trabajo se utilizaron las líneas celulares de cáncer de próstata LnCAP y PC3 y las líneas celulares de microglía SIM-A9 y BV-2. Las células LnCAP y PC3 se
25 cultivaron en medio RPMI1640 con 10% de suero fetal bovino inactivado, 1% de penicilina, 1% de estreptomycin y aminoácidos no esenciales. Las células SIM-A9 en medio DMEM F12 con 10% de suero fetal bovino y 5% de suero de caballo ambos inactivados, 1% de penicilina, 1% de estreptomycin, glutamina y aminoácidos no esenciales. Las células BV-2 en medio "DMEM high glucose" con 10% de suero fetal
30 bovino inactivado, 1% de penicilina, 1% de estreptomycin y glutamina (Leal-Lasarte, FASEB J. 2017 Jul;31(7):2797-2816). Antes de cada experimento, las células se tripsinizaron y se resuspendieron en nuevos medios de cultivos completos. La extracción de microglía primaria se llevó a cabo como está descrito en la literatura (Leal-Lasarte, FASEB J. 2017 Jul;31(7):2797-2816) y se cultivaron en medio DMEM
35 F12 con 10% de suero fetal bovino inactivado, 1% de penicilina, 1% de estreptomycin, glutamina y aminoácidos no esenciales.

7.2. Ensayo de viabilidad celular por MTT

Se sembraron 180 μ l de células LnCAP, PC3 o BV-2 a $2,5 \times 10^4$ células/ml en placas de 96 pocillos y se incubaron durante la noche en una atmósfera humidificada (37 °C, 5% de CO₂) para permitir la adhesión celular. Las células se trataron posteriormente con nanomicelas de **11** vacías o cargadas con docetaxel, así como con docetaxel libre en concentraciones finales de 1, 10 o 100 nM durante 24 y 48 h. Después de eso, se agregaron 20 μ L de 3- bromuro de (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (5 mg / ml; MTT) a cada pocillo y se incubaron en oscuridad (37 °C, 5% de CO₂) durante 4 h. Los cristales de formazán producidos por las células viables se solubilizaron con 100 μ l de dimetilsulfóxido y se incubaron durante la noche en las mismas condiciones. Finalmente, la absorbancia se midió utilizando un lector de microplacas (ELISA) a 595 nm. Se usó PBS para el control negativo.

7.3. Internalización de M11

Se sembró 1 ml de células LnCAP, PC3 o SIM-A9 a $7,5 \times 10^4$ células / ml en cubreobjetos de 19 mm tratados previamente con poli-D-lisina y se incubaron durante la noche en una atmósfera humidificada (37 °C, 5% de CO₂) para permitir la adhesión celular. Luego, se agregaron a las muestras las nanomicelas, cargadas con rojo Nilo, **11** (con ligando ACUPA), **12** (sin ligando) o **11** (con ligando) más una concentración de ligando libre 100 veces superior a la encontrada en la nanomicela, y se incubó durante 3 horas. Después de eso, los cubreobjetos se enjuagaron tres veces con PBS y las muestras se fijaron con PFA (paraformaldehído) al 4% durante 15 minutos a 4°C y se lavaron tres veces con PBS. Luego, las muestras se bloquearon con BSA (albúmina de suero bovino) al 3% y Tritón al 0,5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se incubaron con faloidina durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS. Finalmente, se agregó DAPI y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y las muestras se lavaron tres veces con PBS y se montaron en portaobjetos de microscopio utilizando medio de montaje Vectashield para fluorescencia.

7.4. Resultados en cáncer de próstata:

Para evaluar la citotoxicidad de las nanomicelas vacías (sin docetaxel) con o sin el ligando ACUPA, se trataron LnCAP y PC3 durante 24 y 48 h con diferentes concentraciones de ambas nanomicelas y se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Como se ve en las figuras 5a y 6a, las nanomicelas vacías ni con

ligando ni sin él, producen ningún efecto significativo en la viabilidad celular de LnCAP y PC3, respectivamente. Una vez demostrado que las nanomicelas vacías no afectan a las células, las células LnCAP y PC3 se trataron con diferentes concentraciones de micelas cargadas con docetaxel durante 24 y 48 h. Como indica la Figura 5b, la LnCAP no muestra una muerte significativa a las 24 h, pero se puede observar un 40% de las muertes a las 48 h con todas las concentraciones analizadas. Por otro lado, como se muestra en la Figura 6b, la viabilidad de las células PC3 se vio afectada a las 24 y 48 h, alcanzando un 50% de muerte aproximadamente con la mayor concentración de docetaxel (libre y cargada en nanomicelas).

10

Para evaluar la especificidad del ligando al receptor PSMA, las células LnCAP y PC3 se trataron durante 3 h con nanomicelas cargadas de rojo Nilo (NR), con o sin el ligando, o micelas cargadas con NR con ligando más el dipéptido no escindible libre (glutamato-lisina) que se une específicamente al receptor de PSMA. Luego se adquirieron imágenes de fluorescencia en un microscopio confocal. La especificidad de la interacción entre las micelas con ligando y PSMA se muestra en la Figura 7a y b. Cuando las células se trataron con micelas sin ligando, se observaron pequeñas cantidades de rojo Nilo en las células, mientras que cuando las células se trataron con micelas con ligando, una cantidad significativa de NR entró en la célula, especialmente en las células LnCAP que sobreexpresan PSMA. Además, cuando las células se trataron conjuntamente con micelas con ligando y el dipéptido no escindible, la cantidad de rojo Nilo en el interior de las células disminuyó notablemente.

15

20

7.5. Resultados en microglía:

Del mismo modo, para evaluar la citotoxicidad de las micelas vacías con ligando en BV-2, se trataron las células durante 24 h con diferentes concentraciones de las micelas vacías y cargadas con docetaxel, así como docetaxel libre, empleando PBS como control negativo. A continuación, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Como se ve en la figura 8, las micelas vacías con ligando no producen ningún efecto significativo en la viabilidad celular de BV-2, mientras que las micelas cargadas con docetaxel muestran un efecto dependiente de la concentración superior al del docetaxel libre.

30

La especificidad del ligando se demostró también mediante microscopio confocal en SIM-A9 como en microglía primaria extraída de ratones neonatos. Para ello, las células se trataron durante 3 h con micelas cargadas de rojo Nilo, con o sin el ligando,

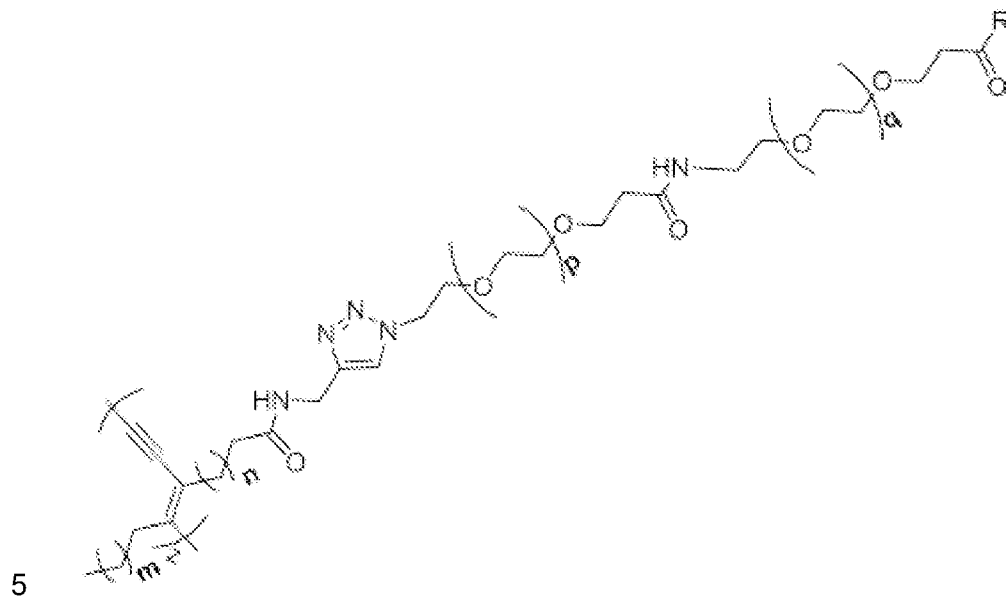
35

o micelas cargadas con NR con ligando más el dipéptido no escindible libre (glutamato-lisina). De nuevo, se demuestra la especificidad de la interacción entre las micelas con ligando y PSMA (figura 9). Cuando las células se trataron con micelas sin ligando, se observaron pequeñas cantidades de rojo Nilo en las células, mientras que
5 cuando las células se trataron con micelas con ligando, una cantidad significativa de NR entró en la célula, especialmente en las células LnCAP que sobreexpresan PSMA. Además, cuando las células se trataron conjuntamente con micelas con ligando y el dipéptido no escindible, la cantidad de rojo Nilo en el interior de las células disminuyó notablemente.

10

REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula que comprende el compuesto de fórmula (I):



(I)

donde

- 10 n es un número entero entre 1 y 10,
 m es un número entero entre 4 y 20,
 p es un número entero entre 2 y 40,
 q es un número entero entre 2 y 40,
 z es el número de agregación, o sea el número de monómeros en la nanopartícula y
 15 está comprendido entre 50 y 200,
 R es un agente de direccionamiento,
 teniendo la nanopartícula forma esférica.

2. Nanopartícula, según reivindicación 1, donde R es un agente de
 20 direccionamiento seleccionado de la lista que consiste en: PMPA (ácido 2-fosfonometil
 pentanedioico), N-acetil-L-aspartil-L-glutamato, y ácido ((S)-2-(3-((S)-5-amino-1-
 carboxipentil)ureido)pentanedioico.

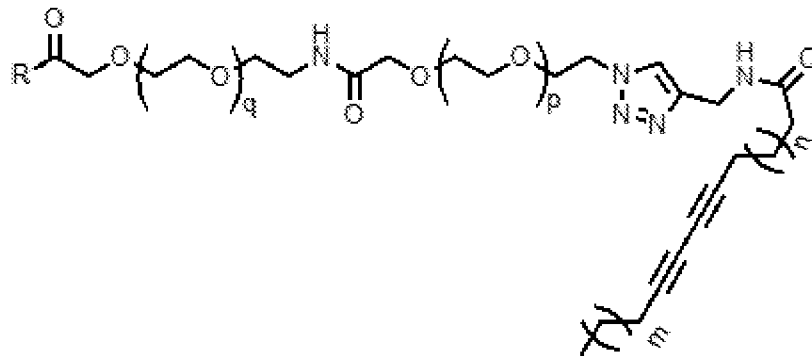
3. Nanopartícula, según reivindicación 2, donde R es el ácido ((S)-2-(3-((S)-5-
 25 amino-1-carboxipentil)ureido)pentanedioico.

4. Nanopartícula, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde $m = 10$, $n = 7$, $p = 19$ y $q = 3$.
5. Nanopartícula, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además del compuesto de fórmula (I), un fármaco y/o un agente de diagnóstico en el interior de la esfera que forma dicha nanopartícula.
6. Nanopartícula, según reivindicación 5, donde el fármaco está seleccionado de la lista que comprende camptotecina, topotecán, paclitaxel, docetaxel, sorafenib, aprepitant, doxorubicina, remdisivir, hidroxiclороquina, ritonavir, lopinavir, ribavirina y arbidol,
7. Nanopartícula, según reivindicación 5, donde el agente de diagnóstico está preferiblemente seleccionado de la lista que consiste en: 3-DTTCI (3,3'-dietiltiatricarbocianine yoduro), Rojo Nilo, fluoresceína y rodamina.
8. Composición farmacéutica que comprende nanopartículas según se han descrito en las reivindicaciones 1 a 7 y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. Nanopartícula, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 7 o composición farmacéutica, según reivindicación 8, para su uso como medicamento.
10. Nanopartícula, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 7 o composición farmacéutica, según reivindicación 8 para su uso en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de cáncer.
11. Nanopartícula, o composición farmacéutica, para su uso según reivindicación 10, donde el cáncer es seleccionado de la lista que comprende: cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer linfático, cáncer de hígado o cáncer glial.
12. Nanopartícula, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 7 o composición farmacéutica, según reivindicación 8, para su uso como sistema de liberación controlada de fármacos.
13. Procedimiento de preparación de la nanopartícula definida en cualquiera de las

reivindicaciones anteriores 1 a 7, que comprende:

- i) ultrasonificación en agua, en ausencia total de luz y a temperatura comprendida entre 20 y 25°C, de un monómero de fórmula (II), estando dicho monómero a una concentración superior a su concentración micelar crítica (CMC),

5



(II)

- ii) fotopolimerización de las micelas en agua formadas en la etapa anterior mediante irradiación con luz UV.

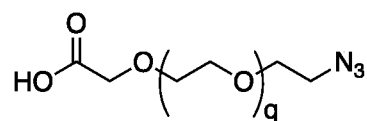
10

14. Procedimiento, según reivindicación 13, caracterizado porque comprende una etapa adicional iii) de incorporación de un agente activo y/o un agente de diagnóstico en la nanopartícula fotopolimerizada obtenida en la etapa ii).

15

15. Procedimiento, según reivindicación 13 o 14, caracterizado porque comprende la preparación del monómero de fórmula (II) mediante las siguientes etapas de reacción:

- a) reacción del agente de direccionamiento "R" con el siguiente espaciador bifuncional:

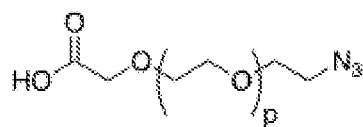


20

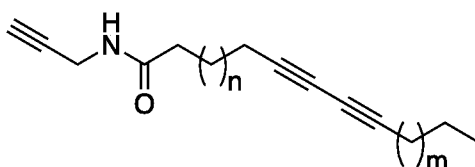
teniendo el agente de direccionamiento teniendo protegidos los sus grupos funcionales excepto aquél que va a reaccionar con el espaciador bifuncional,

- b) reducción del compuesto obtenido en la etapa a), que comprende una azida, para dar una amina, seguido de una reacción de amidación de la misma con el espaciador bifuncional:

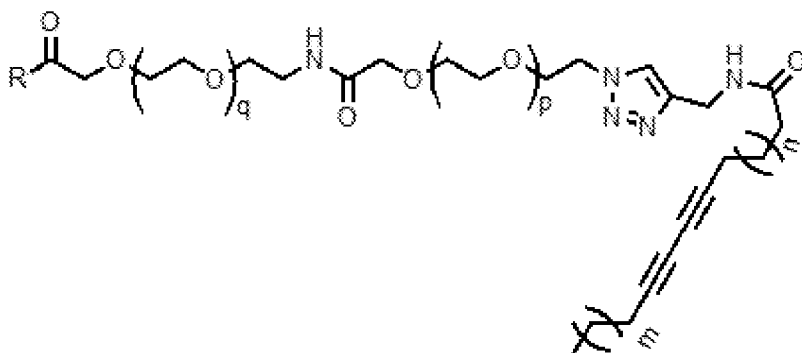
25



c) reacción del compuesto obtenido en la etapa b) con el alquino de fórmula



- 5 mediante una cicloadición 1,3-dipolar de azida y alquino catalizada por cobre (I);
d) desprotección de grupos protectores de R, dando lugar al monómero de fórmula (II):



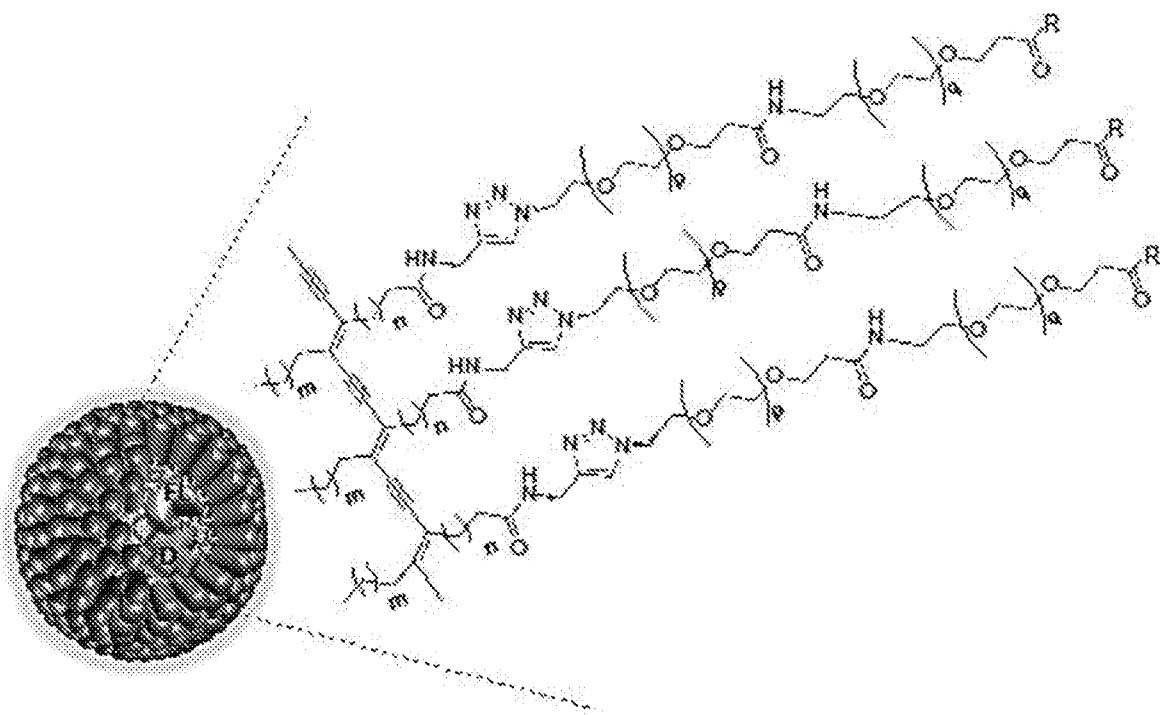


FIG. 1

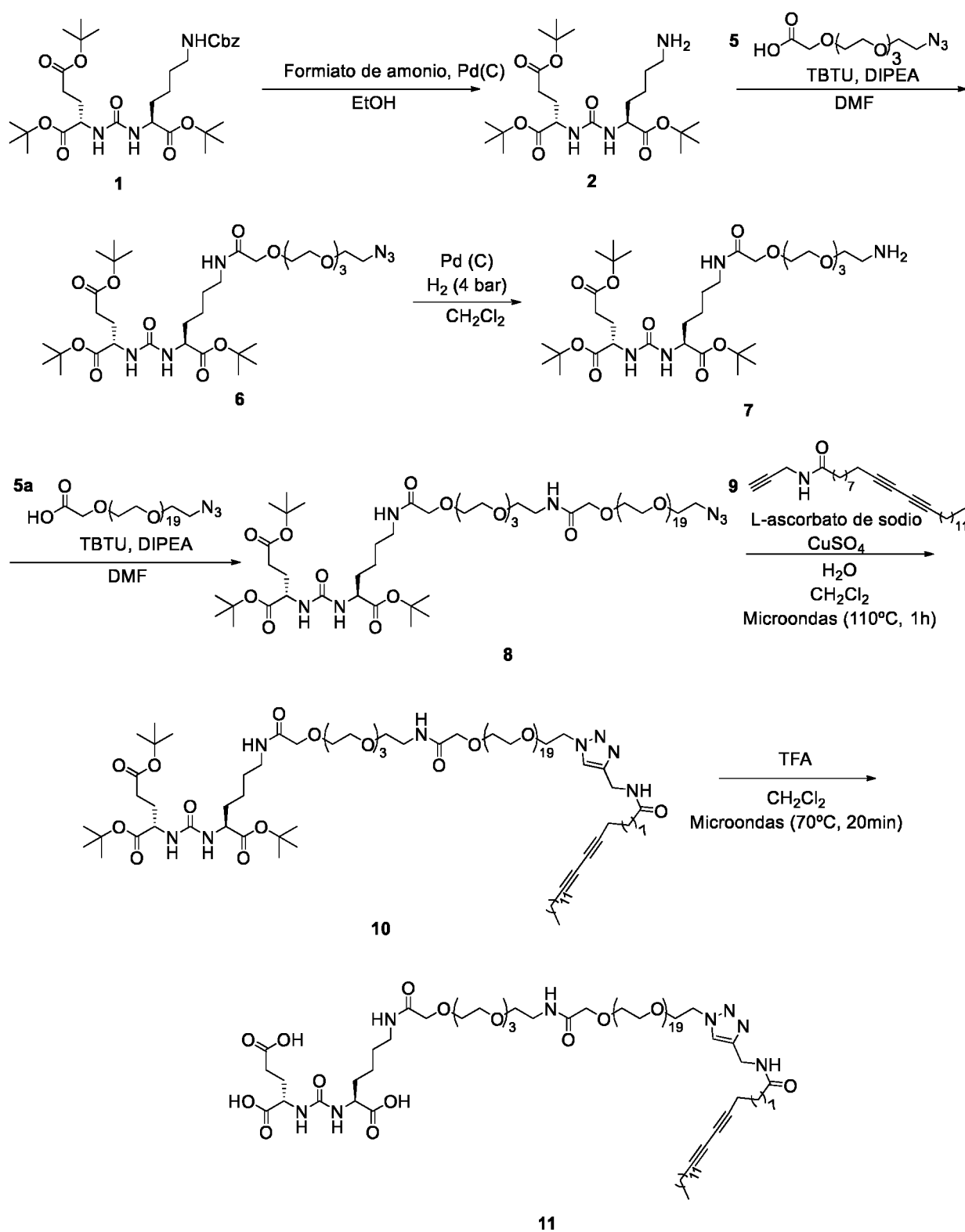


FIG. 2

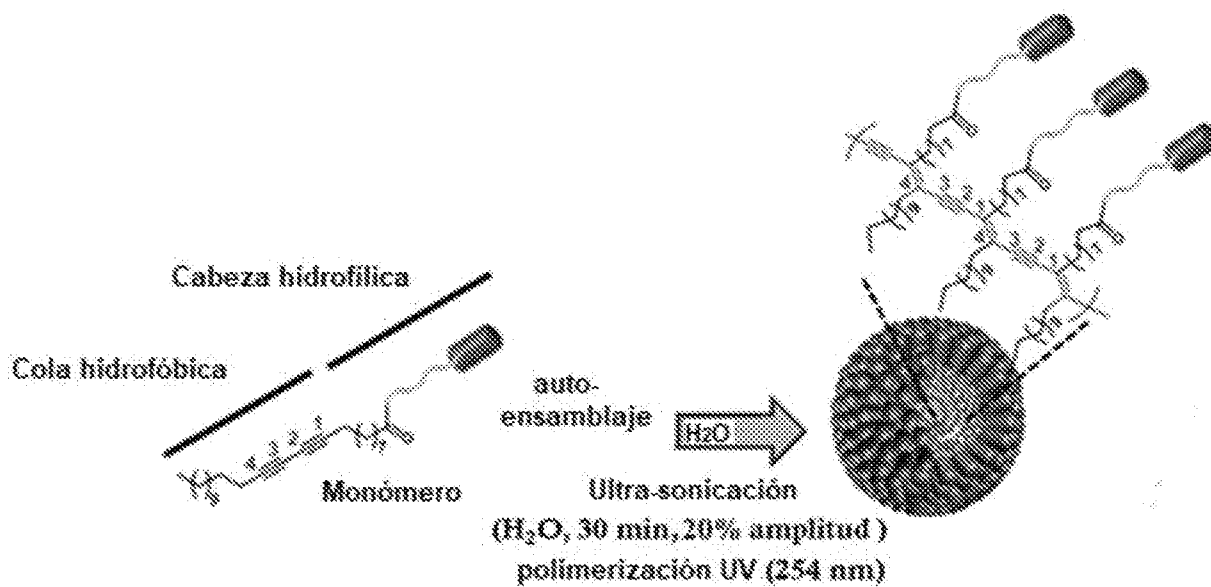


FIG. 3

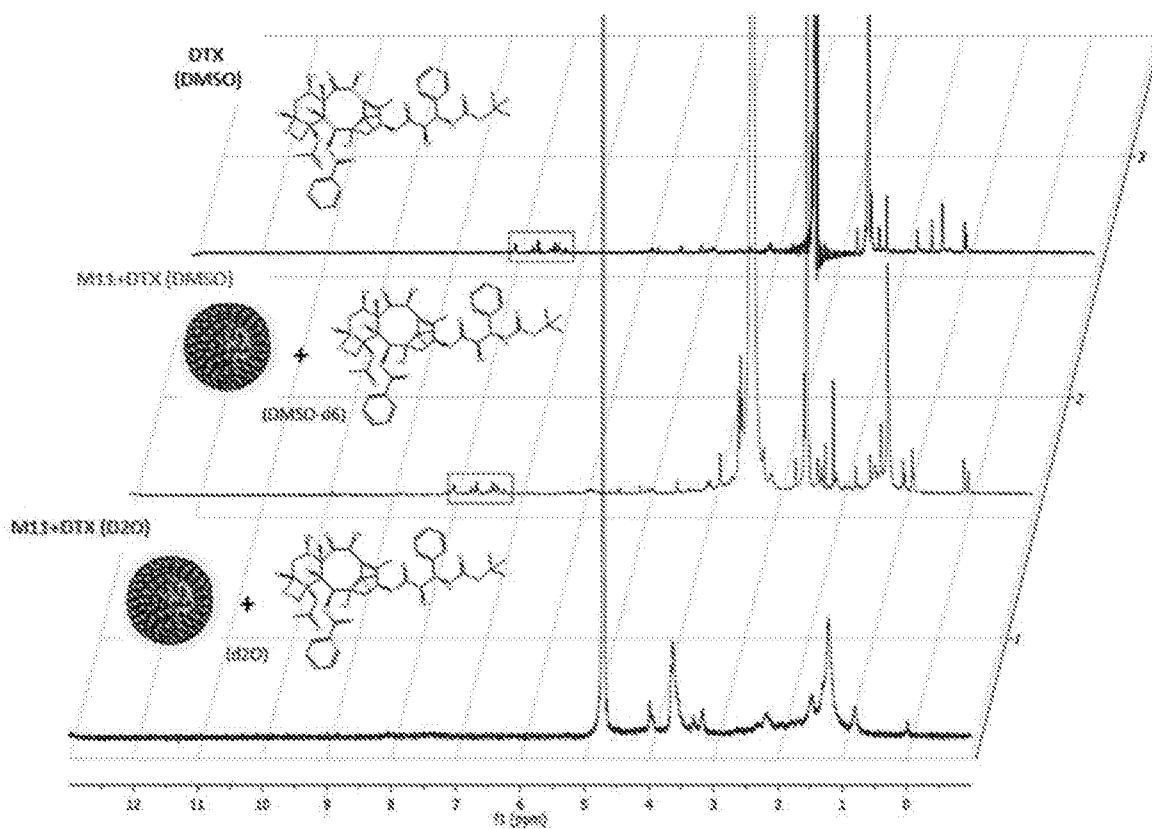


FIG. 4

(a)

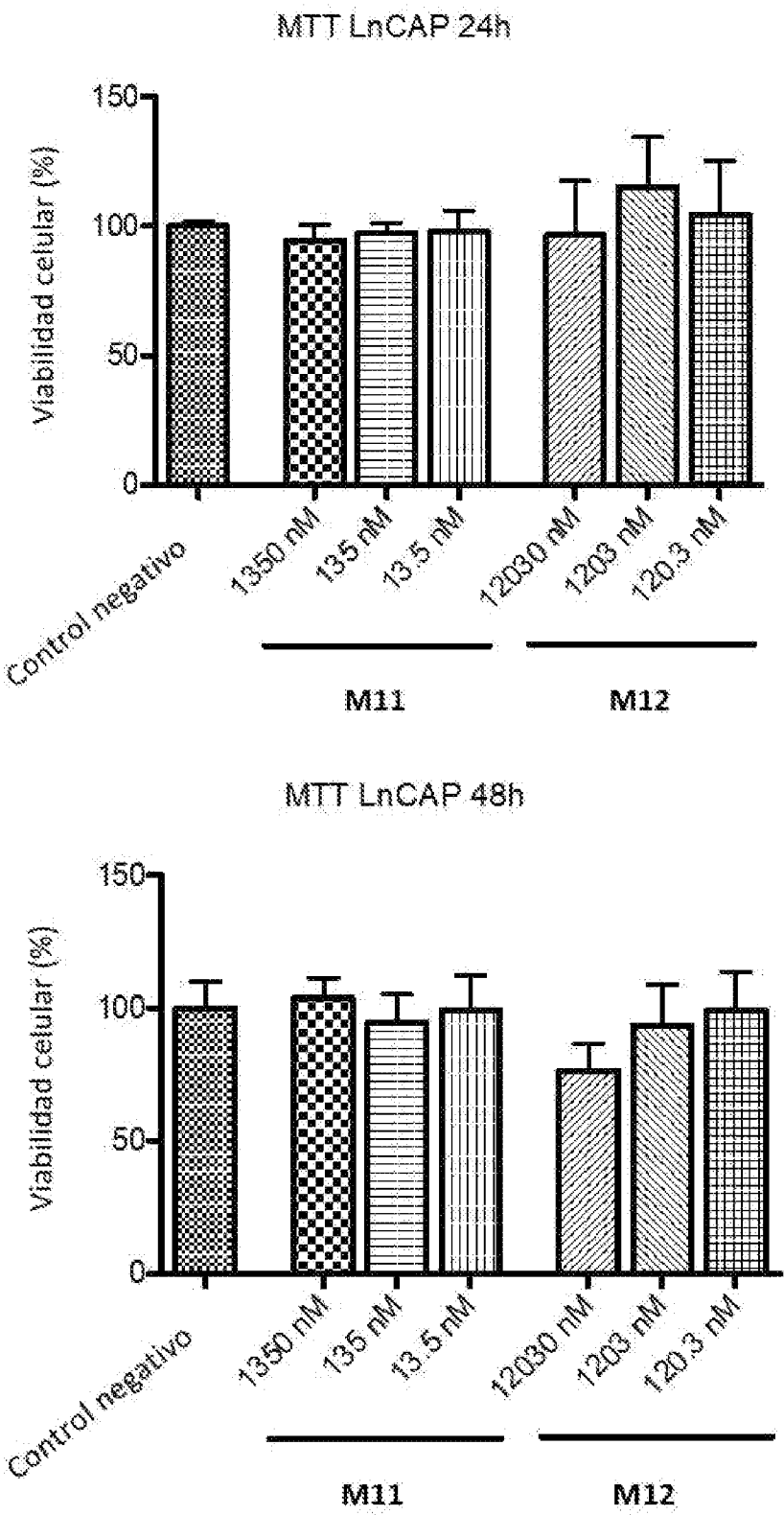


FIG. 5

(b)

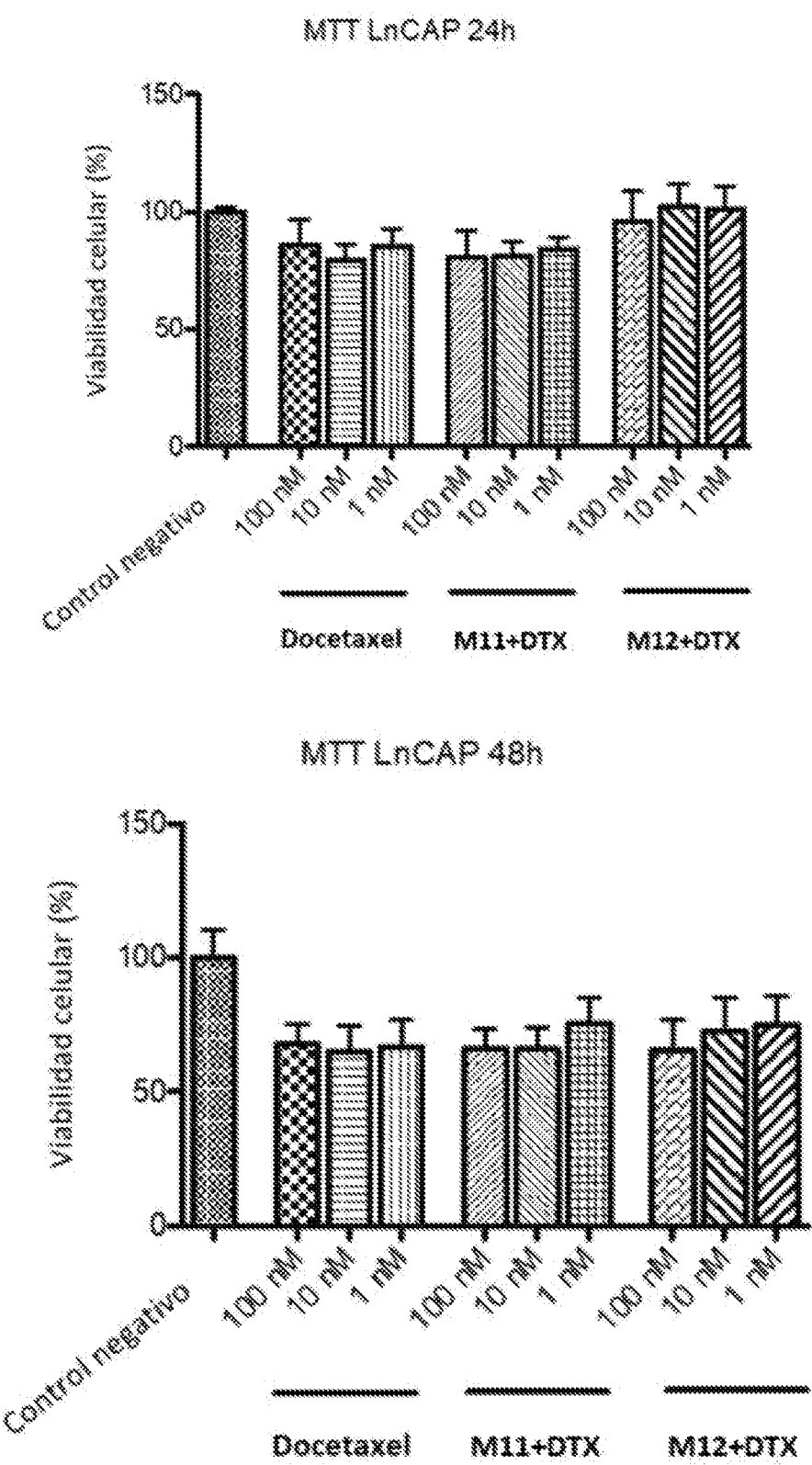


FIG. 5 cont.

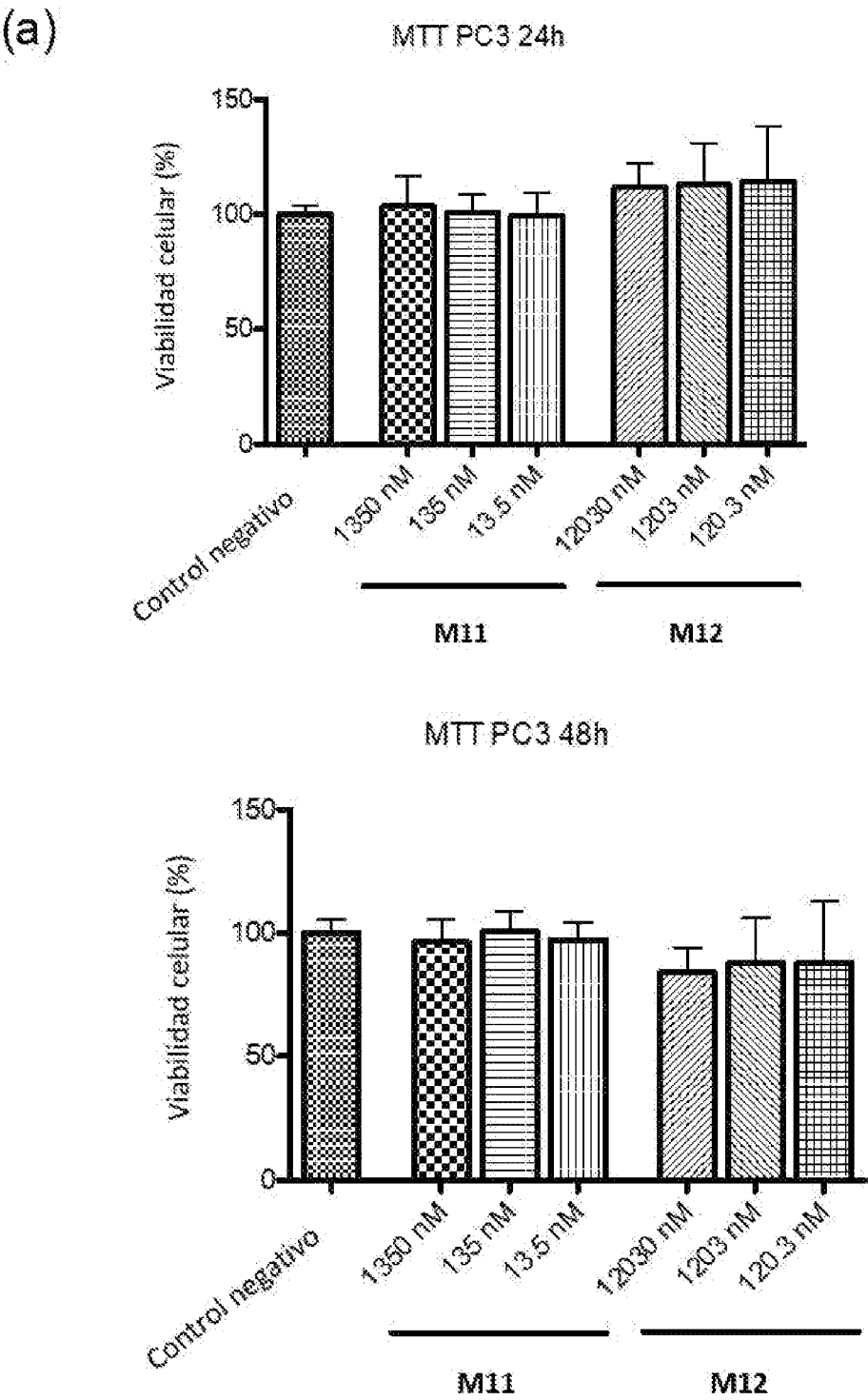


FIG. 6

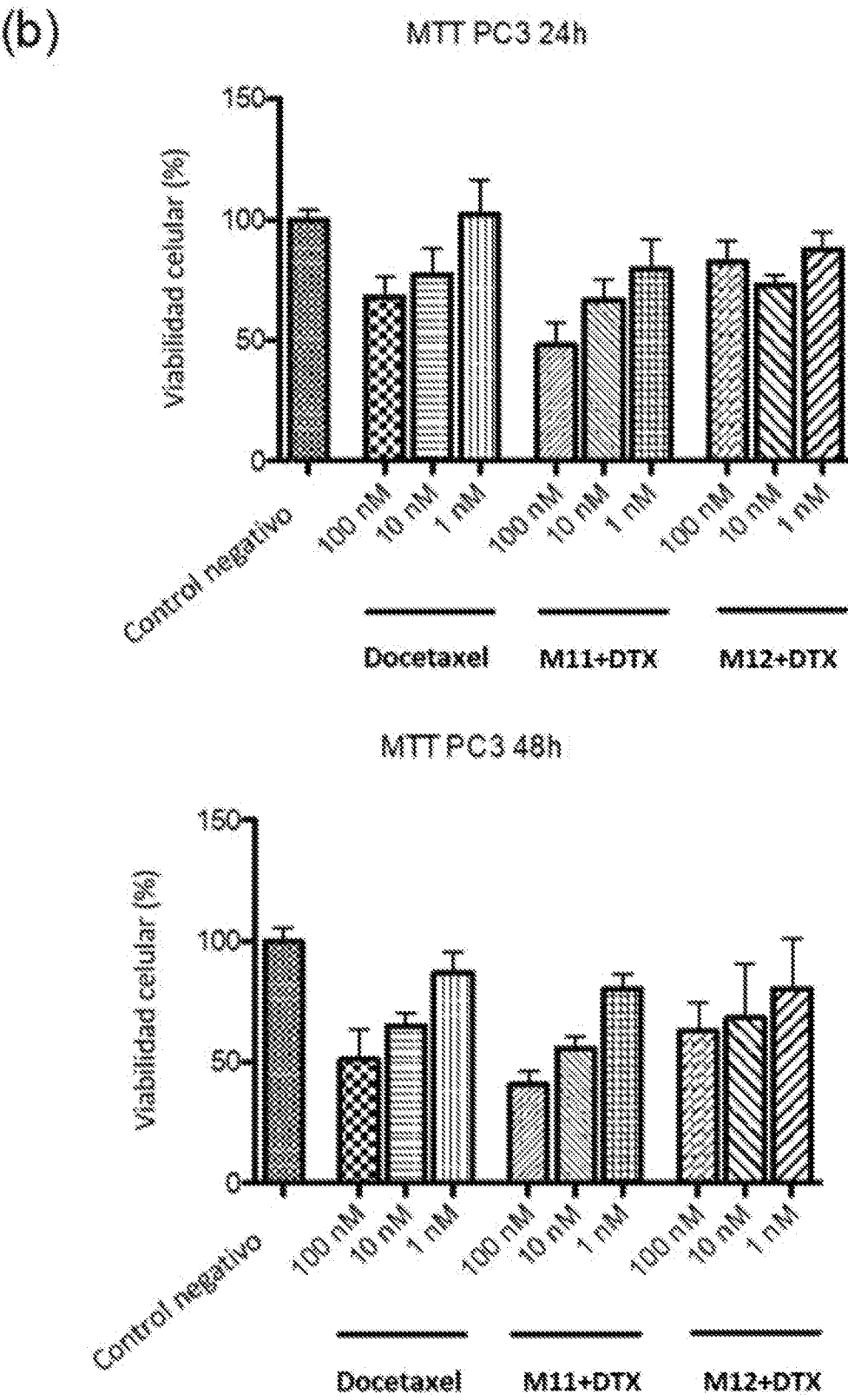


FIG. 6 cont.

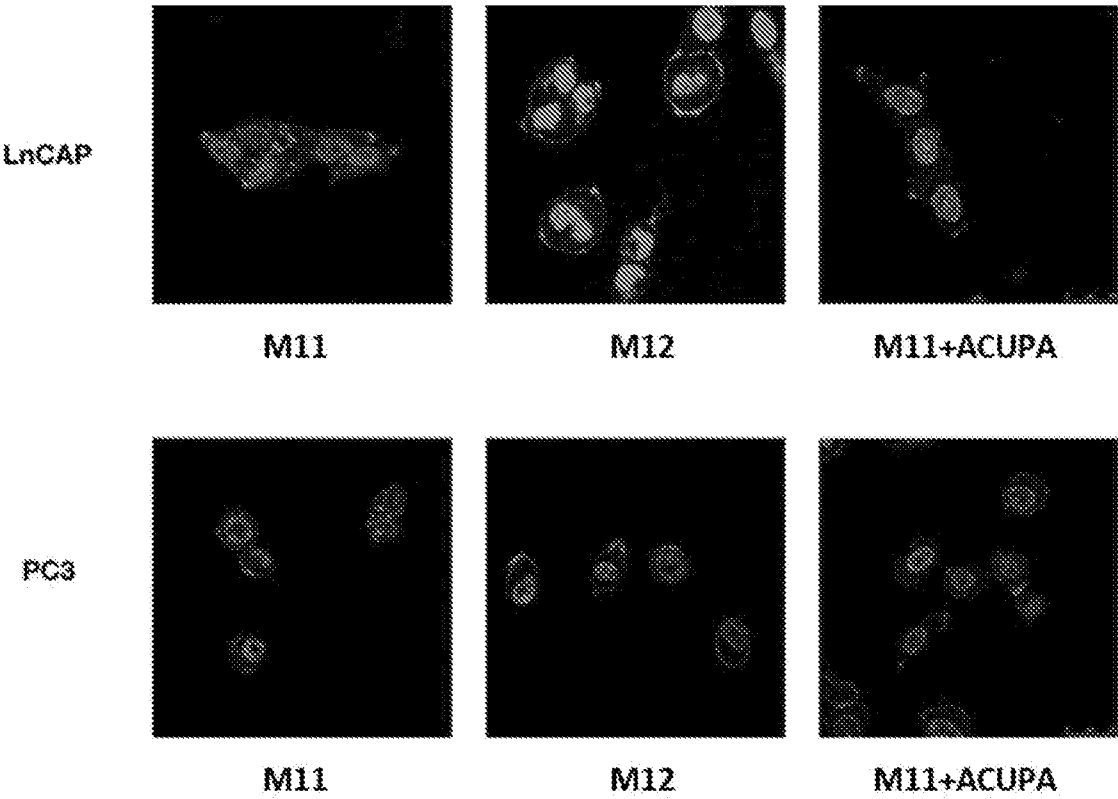


FIG. 7

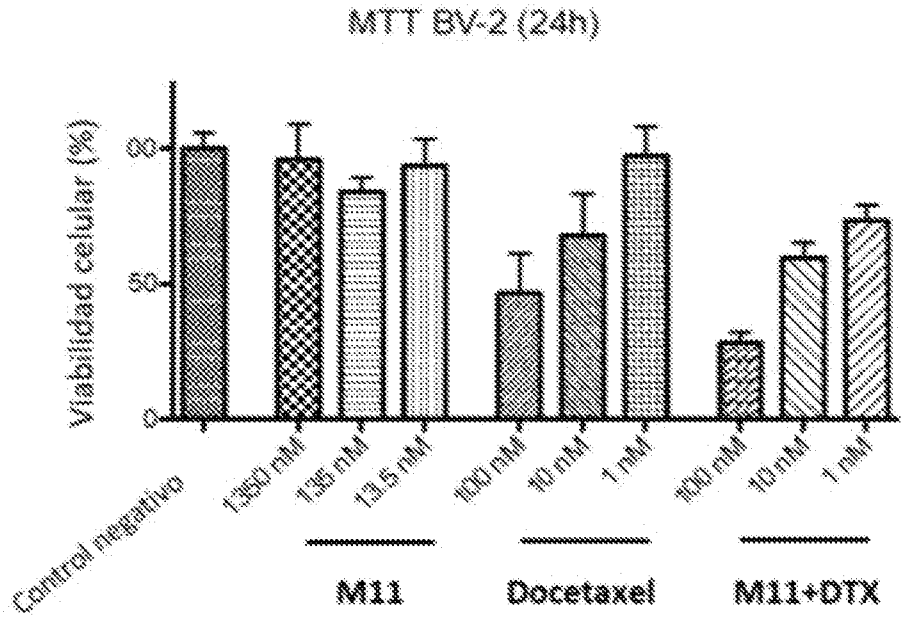


FIG. 8

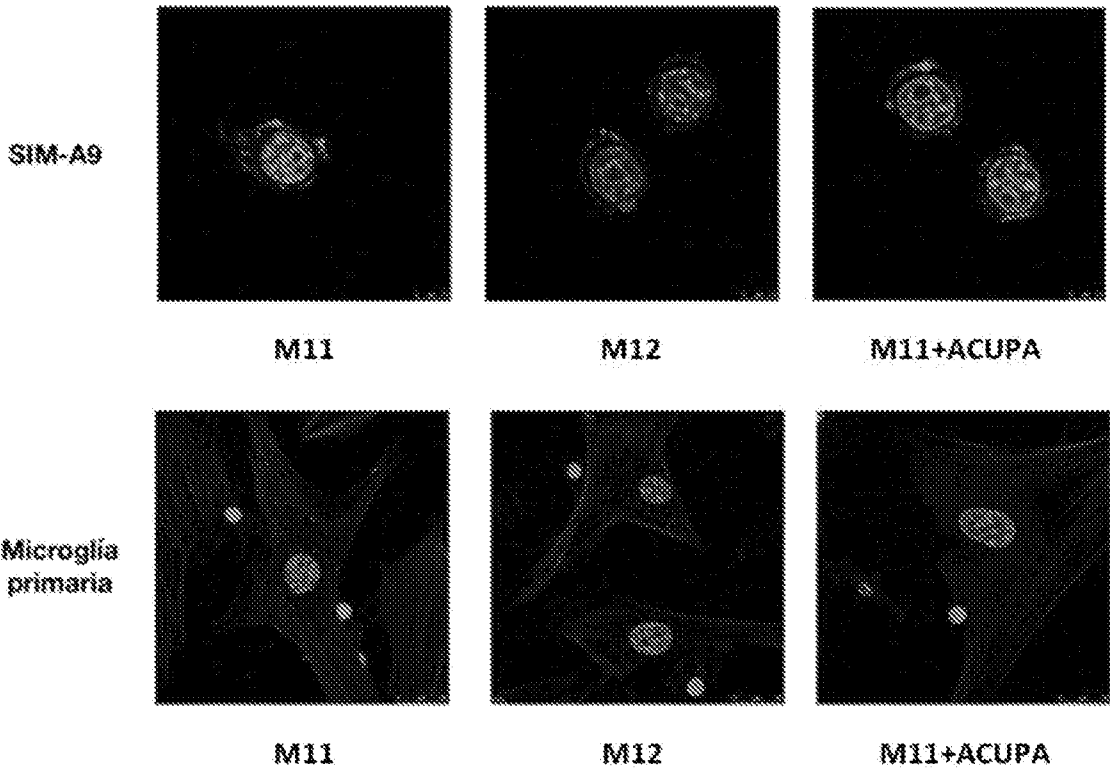


FIG. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070526

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P, B82Y

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, NPL, BIOSIS, XPESP, CAS.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YANG Y et al. "Synthesis, self-assembly, and in vitro doxorubicin release behavior of dendron-like/linear/dendron-like poly([ε]-caprolactone)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly([ε]-caprolactone) triblock copolymers. Biomacromolecules 20090810 American Chemical Society Usa, 10/08/2009, Vol. 10, N° 8, pages 2310 - 2318, ISSN 1525-7797 (print), <DOI: 10.1021/bm900497z>. See abstract; schemes 1 and 2; experimental.	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06/10/2021

Date of mailing of the international search report
(07/10/2021)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
N. Martín Laso

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493278

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070526

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEONARDO MANZONI et al. "Synthesis of Gd and ⁶⁸Ga Complexes in Conjugation with a Conformationally Optimized RGD Sequence as Potential MRI and PET Tumor-Imaging Probes. Chemmedchem, 20120605 Wiley-vch. , 05/06/2012, Vol. 7, Pages 1084 - 1093, ISSN 1860-7179, <DOI: doi:10.1002/cmdc.201200043>. See abstract; results and discussion; scheme 1.	1-15
A	MATSUOKA DAIKO et al. "Structure-activity relationships of succinimidyl-Cys-C(O)-Glu derivatives with different near-infrared fluorophores as optical imaging probes for prostate-specific membrane antigen". Bioorganic & Medicinal Chemistry 15/05/2018, Vol. 26, Pages 2291-2301, ISSN 0968-0896 (print) ISSN 1464-3391(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.bmc.2018.03.015>. See abstract; figure 1.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070526

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K9/51 (2006.01)

A61K47/18 (2017.01)

A61K49/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2021/070526

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A61K, A61P, B82Y

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, NPL, BIOSIS, XPESP, CAS.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	YANG Y et al. "Synthesis, self-assembly, and in vitro doxorubicin release behavior of dendron-like/linear/dendron-like poly([ε]-caprolactone)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly([ε]-caprolactone) triblock copolymers". Biomacromolecules 20090810 American Chemical Society Usa., 10/08/2009, Vol. 10, Nº 8, páginas 2310 - 2318, ISSN 1525-7797 (print), <DOI: 10.1021/bm900497z> Ver resumen; esquemas 1 y 2; sección experimental.	1-5

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
06/10/2021

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
07 de octubre de 2021 (07/10/2021)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
N. Martín Laso
Nº de teléfono 91 3493278

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2021/070526

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	LEONARDO MANZONI et al. “Synthesis of Gd and ⁶⁸Ga Complexes in Conjugation with a Conformationally Optimized RGD Sequence as Potential MRI and PET Tumor-Imaging Probes”. Chemmedchem, 20120605 Wiley-vch. 05/06/2012, Vol. 7, Páginas 1084 - 1093, ISSN 1860-7179, <DOI: doi:10.1002/cmdc.201200043>. Ver resumen; resultados y discusión; esquema 1.	1-15
A	MATSUOKA DAIKO et al. “Structure-activity relationships of succinimidyl-Cys-C(O)-Glu derivatives with different near-infrared fluorophores as optical imaging probes for prostate-specific membrane antigen”. Bioorganic & Medicinal Chemistry 15/05/2018, Vol. 26, Páginas 2291-2301, ISSN 0968-0896(print) ISSN 1464-3391(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.bmc.2018.03.015>. Ver resumen; figura 1.	1-15

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K9/51 (2006.01)

A61K47/18 (2017.01)

A61K49/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)