(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 744 834**

(51) Int. CI.:

A61K 49/00 (2006.01)
B82B 1/00 (2006.01)
C08G 63/08 (2006.01)
C08G 63/91 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2008 PCT/US2008/082529**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2009 WO09061854**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2008 E 08846997 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2209496**

(54) Título: **Nanopartículas degradables multifuncionales con control sobre el tamaño y las funcionalidades**

(30) Prioridad:

05.11.2007 US 985608 P
19.03.2008 US 38041 P
28.09.2008 US 100752 P
29.09.2008 US 101039 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2020

(73) Titular/es:

VANDERBILT UNIVERSITY (100.0%)
Office of Technology Transfer, 305 Kirkland Hall
Nashville, TN 37240, US

(72) Inventor/es:

HARTH, EVA M.;
VAN DER ENDE, ALICE E.;
HAMILTON, SHARON K. y
CROCE, TERESA A.

(74) Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas degradables multifuncionales con control sobre el tamaño y las funcionalidades.

Antecedentes

Las nanopartículas biodegradables han recibido una atención creciente como andamiajes versátiles de administración de fármacos para potenciar la eficacia de los terapéuticos. Sin embargo, la efectividad de la administración puede verse influida por el tamaño y morfología de las partículas, ya que estos parámetros pueden afectar mucho a la función y destino biológicos del material [Zweers, M. L. T.; Grijpma, D. W.; Engbers, G. H. M.; Feijen, J., J. Controlled Release 87, 252-254, 2003]. Las partículas dispersadas estrechamente resultan altamente preferentes para la utilización en aplicaciones de administración o detección con respecto a la monitorización y predicción de su comportamiento, ya que muestran una respuesta más constante a estímulos externos [Lubetkin, S.; Mulqueen, P.; Paterson, E. Pesti. Sci. 55:1123-1125, 1999].

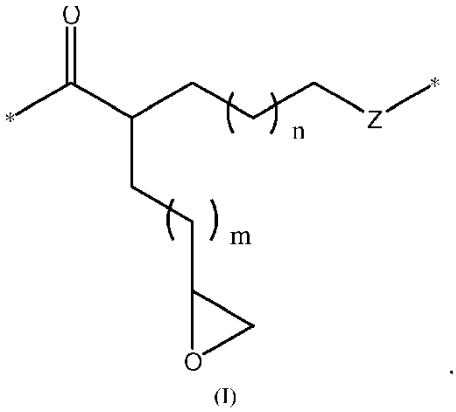
Una desventaja de los métodos convencionales es la irreproducibilidad del tamaño y forma de las partículas, y que éstas pueden verse profundamente influidas por el estabilizador y solvente utilizados [Kumar, M. N. V. R.; Bakowsky, U.; Lehr, C. M., Biomaterials 25, 1771-1777, 2004]. Otra desventaja importante de las nanopartículas biodegradables convencionales, basadas en poli(ε-caprolactona) y otros poliésteres alifáticos, es la falta de grupos funcionales colgantes, los cuales pueden dificultar la modificación de las propiedades físicoquímicas, mecánicas y biológicas [(a) Riva, R.; Lenoir, S.; Jerome, R.; Lecomte, P. Polymer 46, 8511-8518, 2005; (b) Sasatsu, M.; Onishi, H.; Machida, Y. Inter. J. Pharm. 317:167-174, 2006]. La disponibilidad de grupos funcionales es un medio deseable de adaptar las propiedades de una partícula, incluyendo la hidrofilicidad, tasa de biodegradación y bioadhesión.

Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de métodos y composiciones que superen dichas deficiencias y que proporcionen eficazmente nanopartículas degradables funcionalizadas con reproducibilidad del tamaño y forma de las partículas.

Sumario

La presente invención se refiere a nanopartículas y nanopartículas funcionalizadas, y a métodos de producción de las mismas. En particular, la presente invención divulga nanopartículas degradables, nanopartículas funcionalizadas y métodos de producción de las mismas según las reivindicaciones 1 a 15.

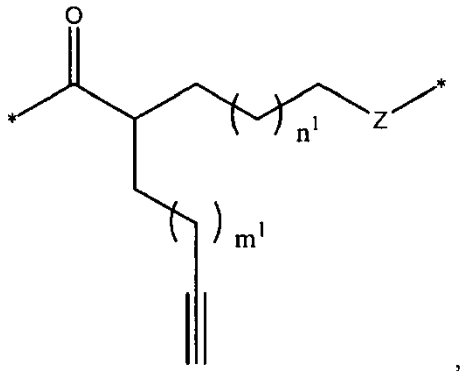
Se dan a conocer polímeros que comprenden por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura opcionalmente sustituida por la fórmula (I):



(I)

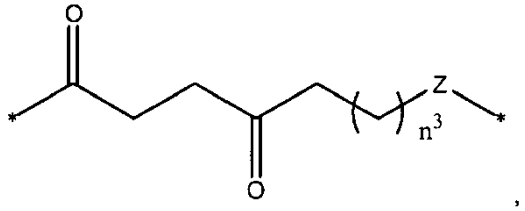
en la que Z es O o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6; en el que m es un número entero entre 0 y 6; en el que m es un número entero entre 0 y 2; y en el que el residuo monómero comprende menos de aproximadamente 10% en peso del residuo monómero de halógeno seleccionado de cloro, bromo y yodo.

Se dan a conocer además polímeros que comprenden residuos monómeros seleccionados de dos o más de un residuo monómero funcionalizado con epóxido que presenta una estructura opcionalmente sustituida representada por la fórmula (I), anteriormente, y un residuo monómero funcionalizado con propargilo que presenta una estructura opcionalmente sustituida representada por la fórmula (II):



(II)

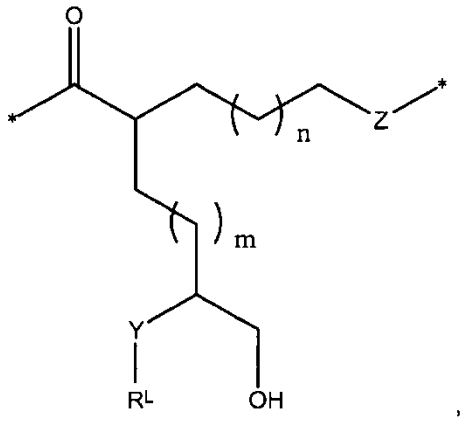
en la que Z es O o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, en el que m^1 es un número entero entre 0 y 6, y en el que n^1 es un número entero entre 0 y 2, y un residuo monómero funcionalizado con ceto que presenta una estructura opcionalmente sustituida que se representa por la fórmula (III):



(III)

en la que Z es O o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, y en el que n^3 es un número entero entre 0 y 2.

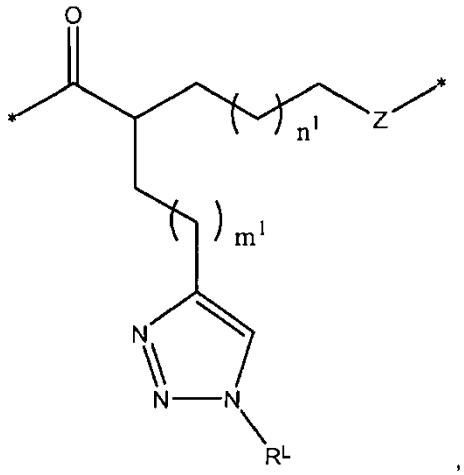
Se dan a conocer además polímeros que comprenden por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura opcionalmente sustituida que se representa por la fórmula (IV):



(IV)

en la que Z es O o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, en el que Y es O, S o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, en el que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido opcionalmente y alcoxileno sustituido opcionalmente, en el que m es un número entero entre 0 y 6, y en el que m es un número entero entre 0 y 2, y uno o más de entre: un residuo monómero funcionalizado con propargilo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (II), anteriormente, y un residuo monómero funcionalizado con ceto que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (III), anteriormente.

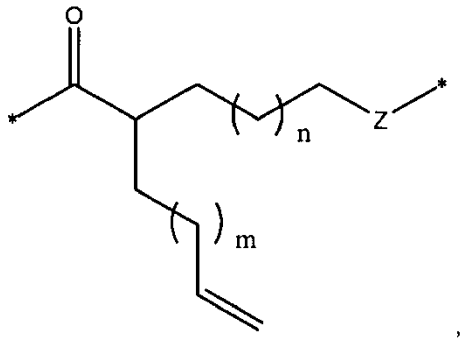
Se divulgan además polímeros que comprenden por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura opcionalmente sustituida que se representa por la fórmula (V):



(V)

en la que Z es O o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, en el que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido opcionalmente y alcoxileno sustituido opcionalmente, en el que m^1 es un número entero entre 0 y 6, y en el que n^1 es un número entero entre 0 y 2, y uno o más de entre: un residuo monómero funcionalizado con epóxido que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (I), anteriormente, y un residuo monómero funcionalizado con ceto que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (III), anteriormente.

Se dan a conocer además métodos de preparación de un polímero, que comprenden la etapa de copolimerización de una mezcla de dos o más de un monómero funcionalizado con alqueno, que proporciona un residuo que presenta una estructura sustituida opcionalmente, representada por la fórmula (VI):



(VI)

en la que Z es o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, en el que m es un número entero entre 0 y 6, en el que m es un número entero entre 0 y 2; un monómero funcionalizado con propargilo que proporciona un residuo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (II), anteriormente, y un monómero funcionalizado con ceto que proporciona un residuo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (III), anteriormente.

Se dan a conocer además métodos de preparación de un polímero funcionalizado con epóxido, que comprenden la etapa de oxidar un polímero que presenta por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (VI).

Se dan a conocer métodos de entrecruzamiento de un polímero que comprenden la etapa de hacer reaccionar un polímero que comprende por lo menos un residuo monómero seleccionado de un residuo monómero funcionalizado con epóxido que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (I), anteriormente, y un residuo monómero funcionalizado con propargilo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (II), anteriormente, con un entrecruzante que presenta la estructura representada por la fórmula $X\text{-}R^L\text{-}X'$, en la que X y X' son, independientemente, N_3, OH, SH, NH_2 o NHR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, y en el que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido opcionalmente y alcoxileno sustituido opcionalmente.

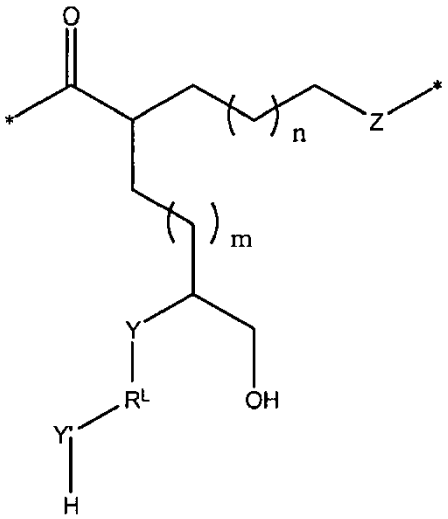
Se dan a conocer además métodos para funcionalizar un polímero, que comprenden la etapa de hacer

reaccionar un residuo monómero funcionalizado con epóxido que presenta una estruct opcionalmente que se representa por la fórmula (I), anteriormente, con un nucleófilo que presenta la estructura representada por la fórmula X-R^1, en la que X es OH, SH, NH_2 o NHR, en el que R es H o alquilo C1 a C6; y en el que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende 1 a 24 átomos de carbono.

Se dan a conocer además métodos de funcionalización de un polímero que comprenden la etapa de hacer reaccionar un residuo monómero funcionalizado con propargilo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (II), anteriormente, con una azida que presenta la estructura representada por la fórmula N_3-R^1, en la que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende 1 a 24 átomos de carbono.

Se dan a conocer además métodos de funcionalizar un polímero que comprende las etapas de hacer reaccionar un monómero funcionalizado con ceto que proporciona un residuo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (III) anteriormente, con una amina que presenta una estructura representada por la fórmula H_2N- R^1, en la que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono, y reducir la imina resultante.

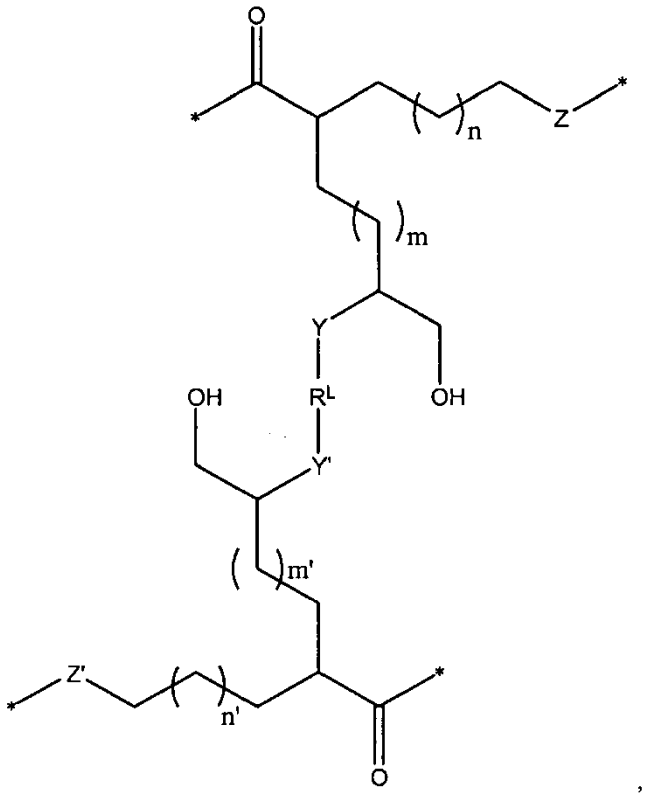
Se dan a conocer además métodos para funcionalizar un polímero, que comprenden la etapa de hacer reaccionar un residuo monómero funcionalizado con nucleófilo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (VII):



(VII)

en la que Z es O o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6; en el que m es un número entero entre 0 y 6, en el que m es un número entero entre 0 y 2; en el que Y e Y' son, independientemente, O, S o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6; y en el que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido opcionalmente y alcoxileno sustituido opcionalmente, con un electrófilo que presenta una estructura representada por la fórmula E-R^1, en la que 'E' es una fracción electrofílica, y en la que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono.

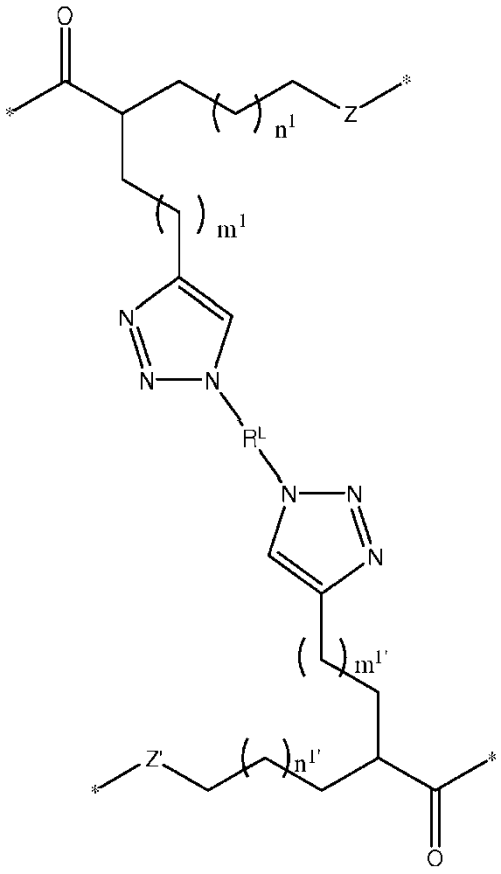
Un aspecto de la presente invención divulga nanopartículas poliméricas degradables que comprenden por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente representada por la fórmula (VIII):



(VIII)

en la que m y m' son, independientemente, números enteros entre 0 y 6, en el que n y n' son, independientemente, números enteros entre 0 y 2, y en el que Z y Z' son, independientemente, O o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, en el que Y e Y' son, independientemente, O, S o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, y en el que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido opcionalmente y alcoxileno sustituido opcionalmente, en el que la nanopartícula presenta un tamaño de partícula de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 850 nm.

Se dan a conocer además nanopartículas poliméricas degradables que comprenden por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura opcionalmente sustituida que se representa por la fórmula (IX):



(IX)

en la que m^1 y $m^{1'}$ son, independientemente, números enteros entre 0 y 6, en el que n^1 y $n^{1'}$ son, independientemente, números enteros entre 0 y 2, y en el que Z y Z' son, independientemente, O o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, y en el que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido opcionalmente y alcoxileno sustituido opcionalmente, en el que la nanopartícula presenta un tamaño de partícula de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 850 nm.

Según un aspecto particular de la presente invención se proporciona un método para preparar las nanopartículas degradables de la presente invención, comprendiendo el método la etapa de añadir un polímero que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura representada por la fórmula (I), anteriormente, a una solución de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 equivalentes molares de un dinucleófilo (fracción nucleofílica:funcionalidad epóxido) que presenta la estructura X-R^L-X', en la que X y X' son, independientemente, OH, SH, NH_2 o NHR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, y en el que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido o no sustituido, y alcoxileno sustituido o no sustituido, produciendo de esta manera nanopartículas.

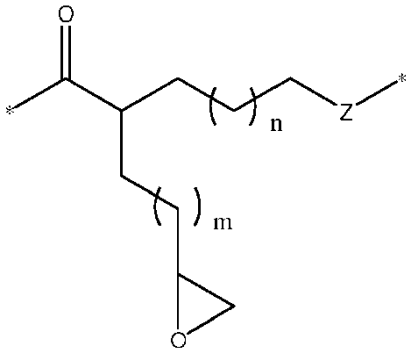
Se dan a conocer además métodos para preparar una nanopartícula degradable, que comprenden la etapa de añadir un polímero que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta la estructura representada por la fórmula (II), anteriormente, a una solución de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 equivalentes molares de una bis-azida (fracción azida: funcionalidad alquino) que presenta la estructura N_3-R^L-N_3, en la que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido opcionalmente y alcoxileno sustituido opcionalmente.

Se dan a conocer además métodos para controlar el tamaño de partícula durante la preparación de una nanopartícula degradable, que comprenden la etapa de añadir un polímero funcionalizado con epóxido a una solución de un entrecruzante dinucleofílico, en el que la estequiometría del entrecruzante se selecciona para proporcionar un tamaño de partícula deseado.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporcionan además métodos para funcionalizar una nanopartícula polimérica degradable que comprenden por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (VIII), anteriormente, y que presenta un tamaño de partícula de 5 nm a aproximadamente 850 nm. Según un aspecto particular de la presente invención, los métodos comprenden la etapa de hacer reaccionar una nanopartícula degradable que comprende por lo menos un residuo monómero funcionalizado con epóxido que presenta una estructura sustituida opcionalmente

que se representa por la fórmula (VIII), anteriormente, y que presenta un tamaño de partícu aproximadamente 850 nm, con un nucleófilo que presenta una estructura representada por la fórmula X-R', en la que X es OH, SH, NH_2 o NHR, en el que R es H o alquilo C1 a C6; y en el que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono. Según otro aspecto particular de la presente invención, los métodos para funcionalizar una nanopartícula comprenden la etapa de hacer reaccionar una nanopartícula que comprende por lo menos un residuo monómero funcionalizado con propargilo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (VIII), anteriormente, y que presenta un tamaño de partícula de 5 nm a aproximadamente 850 nm; con una azida que presenta la estructura representada por la fórmula N_3-R^1, en la que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono. Según otro aspecto particular de la presente invención, los métodos para funcionalizar una nanopartícula comprende las etapas de hacer reaccionar una nanopartícula que comprende por lo menos un monómero funcionalizado con ceto que proporciona un residuo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (III), anteriormente, con una amina que presenta la estructura representada por la fórmula H_2N-R^1, en la que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende 1 a 24 átomos de carbono, y reducir la imina resultante. Se dan a conocer además métodos para funcionalizar una nanopartícula que comprenden la etapa de hacer reaccionar una nanopartícula que comprende por lo menos un residuo monómero funcionalizado con nucleófilo, que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (VII), anteriormente, en la que Y e Y' son, independientemente, O, S o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, y en el que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido opcionalmente y alcoxileno sustituido opcionalmente, con un electrófilo que presenta la estructura representada por la fórmula E-R^1, en la que E es una fracción electrofílica, y en la que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende 1 a 24 átomos de carbono.

Según un aspecto de la presente invención se proporciona un método para preparar nanopartículas degradables, que comprende la etapa de hacer reaccionar un polímero que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta la estructura representada por la fórmula (X):



(X)

en la que Z es O, S o NR, en la que R es H, alquilo o arilo, y en el que m y n son, independientemente, números enteros no negativos, presentando un dinucleófilo la estructura X-R^L-X', en la que X y X' son, independientemente, OH, SH, NH_2 o NHR, en la que R es H, alquilo o arilo, y en el que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, alcoxileno sustituido o no sustituido, y ésteres sustituidos o no sustituidos, produciendo de eta manera una nanopartícula polimérica degradable que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta la estructura sustituida opcionalmente que se representa por la fórmula (VIII), anteriormente, y que presenta un tamaño de partícula de 5 nm a aproximadamente 850 nm.

Se dan a conocer además polímeros funcionalizados y nanopartículas funcionalizadas y métodos de preparación y utilización de los mismos.

Se dan a conocer además métodos de administración intracelular que comprenden administrar en un sujeto una cantidad eficaz de una nanopartícula divulgada.

Se dan a conocer además métodos para la preparación de un medicamento para la administración de un agente biológicamente activo, un agente farmacéuticamente activo y/o una fracción para la obtención de imágenes, que comprende combinar por lo menos un polímero divulgado o por lo menos una nanopartícula divulgada, con un portador farmacéuticamente aceptable.

Se dan a conocer además usos de un polímero divulgado o de una nanopartícula divulgada para la administración de un agente biológicamente activo, un agente farmacéuticamente activo y/o una fracción para la obtención de imágenes.

Se divulgan además composiciones farmacéuticas: que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de

uno o más polímeros dados a conocer y/o una o más nanopartículas dadas a conocer farmacéuticamente aceptable para la administración en un sujeto, por ejemplo, un mamífero.

Se divulgan composiciones farmacéuticas para el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de trastornos oftálmicos, comprendiendo las composiciones una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más polímeros dados a conocer y/o una o más nanopartículas dadas a conocer y un portador farmacéuticamente aceptable para la administración en un sujeto, por ejemplo, un mamífero. En un aspecto, las composiciones pueden administrarse transcornealmente.

Breve descripción de las figuras

Las figuras adjuntas, que se incorporan y constituyen una parte de la presente especificación, ilustran varios aspectos y junto con la descripción sirven para explicar los principios de la invención.

La figura 1 muestra precursores lineales multifuncionales de poliéster con una entidad entrecruzante de epóxido.

La figura 2 muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) de nanopartículas AB; (1) 2 equivalentes de amina; (2) 5 equivalentes de amina; (3) 8 equivalentes de amina.

La figura 3 muestra el incremento polinomial del diámetro de nanopartícula (nm) con el incremento del entrecruzante diamina; (■) nanopartículas de ABD; (◆) nanopartículas de AB; (●) nanopartículas de ABC.

La figura 4 muestra la superposición de RMN ^{1}H para nanopartículas de poli(vl-evl) con entrecruzamiento creciente.

La figura 5 muestra el incremento polinomial del diámetro de nanopartícula (nm) con el incremento de entrecruzante diamina para (◆) las nanopartículas de AB de la figura 3.

La figura 6 muestra el incremento polinomial del diámetro de nanopartícula (nm) con el incremento de entrecruzante diamina para (■) las nanopartículas de ABD de la figura 3.

La figura 7 muestra el incremento polinomial del diámetro de nanopartícula (nm) con el incremento de entrecruzante diamina para (● las nanopartículas de ABC de la figura 3.

La figura 8 muestra el incremento polinomial del diámetro de nanopartícula (nm) con el incremento de entrecruzante diamina para nanopartículas AB de poli(vl-evl) (2% evl) (■).

La figura 9 muestra el incremento polinomial del diámetro de nanopartícula (nm) con el incremento de entrecruzante diamina para nanopartículas AB de poli(vl-evl) (7% evl) (◆).

La figura 10 muestra el incremento polinomial del diámetro de nanopartícula (nm) con el incremento de entrecruzante diamina para nanopartículas AB de poli(vl-evl) (19% evl) (◆).

La figura 11 muestra una representación esquemática de las estructuras de FD-1 y FD-2.

La figura 12 muestra el curso temporal de internalización de (a) FD-1 y (b) FD-2 en fibroblastos NIH-3T3 a 37ºC. La concentración de conjugado era de 10 µM.

La figura 13 muestra el efecto de la temperatura sobre la internalización de (a) FD-1 y (b) FD-2. Se incubaron células endoteliales microvasculares humanas (HMEC, por sus siglas en inglés) con conjugados (10 µM) durante 2.5 min a 4ºC o a 37ºC.

La figura 14 muestra el efecto de la temperatura sobre la internalización de (a) FD-1 y (b) FD-2. Las células HMEC se incubaron con conjugados (1 µM) durante 30 min a 4ºC o a 37ºC.

La figura 15 muestra experimentos de control: (a) se incubaron las células HMEC con conjugados de FITC libres (10 µM) durante 60 min a 37ºC, (b) las células HMEC se incubaron con FD-2 guanidinilado protegido con Boc (10 µM) durante 60 min a 37ºC.

Las figuras 6A y 6B muestran un esquema sintético ejemplar para la preparación de FD-1, FD-2 e intermediarios de los mismos.

La figura 17 muestra una micrografía de una colección de puntos cuánticos orgánicos formados mediante el pliegue de la cadena intramolecular. Los diversos puntos se representan en las imágenes con diferentes colores como una función de la fracción funcional seleccionada.

La figura 18 muestra una representación esquemática de un esquema sintético para preparar los diversos tipos de puntos cuánticos orgánicos dados a conocer.

La figura 19 muestra una representación esquemática de un esquema sintético para preparar puntos cuánticos orgánicos de tipo ABA.

La figura 20 muestra una representación esquemática de la composición de un precursor de punto cuántico orgánico de tipo ABA, un copolímetro tribloque ABA.

La figura 21 muestra una representación esquemática de un punto cuántico orgánico y su aplicabilidad como sonda biológica y/o un vehículo de administración de fármaco.

La figura 22 muestra un esquema para reacciones de acoplamiento de derivados bencociclobuteno.

La figura 23 muestra una síntesis ejemplar de monómero bencociclobuteno Q4.

La figura 24 muestra una síntesis ejemplar de poliestireno lineal funcionalizado con benzociclobuteno, Q8.

La figura 25 muestra un gráfico de la variación de peso molecular de la macromolécula final, Mw, con la concentración total de grupos BCB en solución (los círculos representan una estrategia de dilución ultraelevada; los cuadrados representan una estrategia de adición continua; I representa que se ha producido un gel insoluble) (polímero lineal de partida, Mw=95,000, PDI=1.11).

La figura 26 muestra una representación esquemática del pliegue intramolecular del polímero lineal Q8 para proporcionar la nanopartícula Q9.

La figura 27 muestra una comparación del espectro de RMN 1H Para (a) el polímero lineal de partida, 8, 80/20 Sty/BCB, Mw=95,000, PDI=1.12, y la nanopartícula resultante 9, Mw=65,000, PDI=1.10.

La figura 28 muestra una superposición de registros de GPC para (a) el polímero lineal de partida, Q8, Mw=105000, PDI=1.12, y las nanopartículas Q9 con (a) incorporación de BCB 0% molar, (b) incorporación de BCB 5% molar, (c) incorporación de BCB 10% molar, (d) incorporación de BCB 20% molar y (e) incorporación de BCB 25% molar.

La figura 29 muestra la variación en el porcentaje de reducción del peso molecular para las nanopartículas Q9 con el % molar de unidades de BCB en el polímero lineal de partida Q8 para las series de 44 K (b), 110 K (9) y 230 K (b).

La figura 30 muestra una representación esquemática del pliegue intramolecular de un polímero lineal a base de acrilato de n-butilo aleatorio, Q10, que proporciona la nanopartícula Q11.

La figura 31 muestra un esquema de la formación y pliegue intramolecular del copolímero en bloque PEG-b-PSt/BCB, Q15, que proporciona un copolímero de híbrido lineal-nanopartícula, Q16.

La figura 32 muestra registros de GPC para (a) el poli(etilenglicol)-b-poli(estireno-co-benzociclobuteno) inicial, Q15 (Mw=95,000, PDI=1.11) y (b) el híbrido final de nanopartícula-copolímero en bloque lineal, Q16, (Mw) 52,000, PDI=1.09).

La figura 33 muestra un esquema de nanopartículas multimodales ejemplares.

La figura 34 muestra un esquema de una síntesis ejemplar de precursores lineales de ABA-copolímero tribloque antes y después del pliegue de cadenas.

La figura 35 muestra un esquema que ilustra la conjugación de los materiales dendriméricos dados a conocer con los materiales de punto cuántico orgánico dados a conocer (conjuación con conector cortable):

La figura 36 muestra una preparación ejemplar de una nanopartícula orgánica entrecruzada.

La figura 37 muestra una conjugación ejemplar de un material dendrimérico divulgado con una nanopartícula orgánica entrecruzada divulgada.

La figura 38 muestra un esquema que ilustra un sistema de administración divulgado (p.ej., la administración génica).

La figura 39 ilustra la preparación de un sistema de administración divulgado (p.ej., la administración génica).

La figura 40 muestra micrografías que muestran la localización mitocondrial de los sistemas de administración dados a conocer (p.ej., de administración génica).

La figura 41 muestra micrografías que muestran la incorporación de un sistema de administración divulgado (p.ej., de administración génica) en células endoteliales.

La figura 42 muestra la flexibilidad del ensamblaje de los sistemas de administración dados a conocer.

La figura 43 muestra micrografías de células HeLa expuestas a FD-1 10 µM durante 1 h, fijadas con paraformaldehído al 3.3%, teñidas con Mitotracker® Red 580 FM 100 nM. Las regiones iluminadas muestran la penetración celular (izquierda), la localización mitocondrial (centro) y el solapamiento (derecha).

La figura 44 muestra micrografías de células HeLa expuestas a FD-2 20 µM durante 1 h, fijadas con paraformaldehído al 3.3%, teñidas con Mitotracker® Red 580 FM 100 nM. Las regiones iluminadas muestran la penetración celular (izquierda), la localización mitocondrial (centro) y el solapamiento (derecha).

La figura 45 muestra micrografías que demuestran el transporte intercelular de un conjugado de fluoróforo aprotinina-transportador (FD-1, ilustrado) al interior de células HAEC.

La figura 46 muestra micrografías que demuestran el transporte intercelular de un conjugado de aprotinina-fluoróforo-transportador (FD-2) al interior de células HAEC.

La figura 47 muestra micrografías que demuestran la ausencia de incorporación (es decir, ningún transporte intercelular al interior de las células HAEC) de un conjugado de control de aprotinina-fluoróforo (ilustrado).

La figura 48 muestra varias estrategias químicas para la unión de fracciones de transporte a diversos grupos funcionales de proteína (p.ej., amina, tiol, carbonilo).

La figura 49 presenta estrategias para el desarrollo de vacunas mediante la incorporación de aprotinina mediante la conjugación con proteínas funcionalizadas con carbonilo (p.ej., residuos de tirosina) mediante reacción de Mannich.

La figura 50 ilustra la incorporación de fluoróforos mediante la conjugación con proteínas funcionalizadas con carbonilo (p.ej., residuos de tirosina) mediante reacción de Mannich.

La figura 51 ilustra la incorporación de fracciones de transportador mediante la conjugación con proteínas funcionalizadas con carbonilo.

La figura 52 muestra el análisis de TEM de las nanopartículas (225.6 nm) producidas mediante el entrecruzamiento de poli(vl-evl-avl-opd) (ABbD).

La figura 53 muestra la distribución de tamaños de partícula medida mediante análisis dinámico de dispersión lumínica de nanopartículas “en un solo reactor” (272.3 ± 23.3 nm) producidas a partir del entrecruzamiento de poli(vl-evl-avl-opd) (ABbD).

La figura 54 muestra un esquema de una reacción de intercambio de tiol con un anticuerpo IgG para formar un bioconjugado IgGMT.

La figura 55 muestra imágenes de microscopía de la incorporación de IgGMT en células HEp-2 durante 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h y un experimento de control negativo (CN) con IgG marcadas con Alexa Fluor® 568.

La figura 56 muestra imágenes de microscopía de células HEp-2 infectadas con VSR durante 24 h, lavadas y captadas en imagen 48 h después de la infección para la fluorescencia de GFP (c). Células HEp-2 infectadas por VSR durante 24 h, incubadas durante 30 min con IgGMT y captadas en imagen tras 48 h para la fluorescencia de GFP (a) y Alexa Fluor® 568 de IgGMT (b), imágenes fusionadas (a) y (b) (a + b fusionados).

La figura 57 muestra imágenes de microscopía de células HEp-2 infectadas por VSR durante 24 h, incubadas durante 30 min con IgGMT y captadas en imagen inmediatamente para la fluorescencia verde de GFP (a) y la fluorescencia roja del conjugado IgGMT (b), imágenes fusionadas de (a) y (b) (a + b fusionados). Células HEp-2 infectadas por VSR durante 24 h, incubadas durante 30 min con IgGMT y captadas en imagen tras 48 h para la fluorescencia de GFP (a) y Alexa Fluor® 568 del conjugado IgGMT (b), imágenes fusionadas (a) y (b) (a + b fusionados).

La figura 58 muestra los resultados para el transporte dirigido de nanopartículas-péptidos guiados por radiación en un modelo de tumor de carcinoma pulmonar de Lewis.

La figura 59 muestra un esquema para la administración de una sustancia biológica activa.

La figura 60 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de partes del ojo de una rata tras la administración de un bioconjugado de nanopartícula que comprende un agente de captación de imágenes.

Se explican ventajas adicionales de la invención en parte en la descripción siguiente, y en parte resultarán evidentes a partir de la descripción o podrán aprenderse mediante la práctica de la invención. Las ventajas de la invención se identificarán y conseguirán mediante los elementos y combinaciones particularmente señalados en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que tanto la descripción general anterior y la descripción detallada a continuación son sólo ejemplares y explicativas y no limitativas de la invención, según las reivindicaciones.

Descripción

La presente invención podrá entenderse más fácilmente haciendo referencia a la descripción detallada siguiente de la invención y los ejemplos incluidos en la misma.

Antes de dar a conocer y describir los presentes compuestos, composiciones, artículos, sistemas, dispositivos y/o métodos, debe entenderse que no se encuentran limitados a métodos sintéticos específicos a menos que se indique lo contrario, o a reactivos particulares, a menos que se indique lo contrario, ya que estos pueden, evidentemente, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria presenta el propósito de describir realizaciones particulares únicamente, y que no pretender ser limitativa. Aunque también pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales ejemplares.

Las publicaciones comentadas en la presente memoria se proporcionan únicamente para su exposición antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no posee el derecho de anteceder a dicha publicación en virtud de invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas en la presente memoria pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, que pueden requerir una confirmación independiente.

A. Definiciones

Tal como se utiliza en la memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el” o “la” incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a “un grupo funcional”, “un alquilo” o “un residuo” incluye mezclas de dos o más de dichos grupos funcionales, alquilos o residuos, y similares.

Los intervalos pueden expresarse en la presente memoria como entre “aproximadamente” un valor particular y/o “aproximadamente” otro valor particular. En el caso de que se exprese dicho intervalo, otro aspecto incluye entre un valor particular y/o el otro valor particular. De manera similar, en el caso de que se expresen valores como aproximaciones, mediante la utilización del antecedente “aproximadamente”, se entenderá que el valor particular forma otro aspecto. Se entenderá además que los extremos de cada uno de los intervalos son significativos en relación al otro extremo, e independientemente del otro extremo. Se entiende además que existe un número de valores dados a conocer en la presente memoria, y que cada valor también se divulga en la presente memoria como “aproximadamente” ese valor particular además del valor mismo. Por ejemplo, en el caso de que se dé a conocer el valor “10”, entonces también se divulga “aproximadamente 10”. Se entiende además que cada unidad entre dos unidades particulares también se divulga. Por ejemplo, en el caso de que se den a conocer 10 y 15, entonces 11, 12, 13 y 14 también se han divulgado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “opcional” u “opcionalmente” se refiere a que el suceso o circunstancia seguidamente indicado puede producirse o no producirse y que la descripción incluye casos en los que dicho suceso o circunstancia se produce y casos en los que no se produce.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “tratamiento” se refiere a la gestión médica de un paciente con la intención de curar, mejorar, estabilizar o evitar una enfermedad, condición patológica o trastorno. Dicho término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente a la mejora de una enfermedad, condición patológica o trastorno, e incluye además el tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido a la eliminación de la causa de la enfermedad, condición patológica o trastorno asociado. Además, dicho término incluye el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas y no la curación de la enfermedad, condición patológica o trastorno; el tratamiento preventivo, es decir, el tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad asociada, condición patológica o trastorno, y el tratamiento de soporte, es decir, el tratamiento utilizado para complementar otra terapia específica dirigida a la mejora de la enfermedad, condición patológica o trastorno asociado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “prevenir” o “prevención” se refiere a impedir, evitar,

obviar, anticipar, detener o dificultar la incidencia de algo, especialmente mediante acción ı
entiende que donde se utiliza en la presente memoria reducir, inhibir o evitar, a menos que se ındıque específicamente lo contrario, también se divulga expresamente la utilización de los otros dos términos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos “administrar” y “administración” se refieren a cualquier método de provisión de una preparación farmacéutica en un sujeto. Dichos métodos son bien conocidos por el experto en la materia y entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, la administración oral, la administración transdérmica, la administración mediante inhalación, la administración nasal, la administración tópica, la administración intravaginal, la administración oftálmica, la administración intraaural, la administración intracerebral, la administración rectal y la administración parenteral, incluyendo inyectable, tal como la administración intravenosa, la administración intraarterial, la administración intramuscular y la administración subcutánea. La administración puede ser continua o intermitente. Puede administrarse una preparación terapéuticamente; es decir, se administra para tratar una enfermedad o condición existente. Además, puede administrarse una preparación profilácticamente; es decir, se administra para la prevención de una enfermedad o condición.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “sujeto” se refiere a una diana de administración. El sujeto de los métodos dados a conocer en la presente memoria puede ser un vertebrado, tal como un mamífero, un pez, un ave, un reptil o un anfibio. De esta manera, el sujeto de los métodos dados a conocer en la presente memoria puede ser un ser humano, primate no humano, caballo, cerdo, conejo, perro, oveja, cabra, vaca, gato, cobaya o roedor. El término no se refiere a ninguna edad o sexo en particular. De esta manera, se pretende que estén cubiertos sujetos adultos y neonatos, así como fetos, sean masculinos o femeninos. Un paciente se refiere a un sujeto afectado por una enfermedad o trastorno. El término “paciente” incluye sujetos humanos y veterinarios.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad que resulta suficiente para conseguir un resultado deseado o que presenta un efecto sobre síntomas no deseados, pero que resulta generalmente insuficiente para provocar efectos secundarios adversos. El nivel de dosis eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores, entre ellos el trastorno bajo tratamiento y la gravedad del trastorno, el compuesto específico utilizado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y dieta del paciente, el momento de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción del compuesto específico utilizado, la duración del tratamiento, los fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el compuesto específico utilizado y factores similares bien conocidos de la técnica médica. Por ejemplo, se encuentra perfectamente comprendido en los conocimientos del experto en la materia iniciar con dosis de un compuesto a niveles inferiores a los necesarios para alcanzar el efecto deseado y gradualmente incrementar la dosis hasta conseguir el efecto deseado. Si se desea, la dosis diaria eficaz puede dividirse en múltiples dosis con fines de administración. En consecuencia, las composiciones monodosis pueden contener tales cantidades o submúltiples de las mismas para alcanzar la dosis diaria. La dosis puede ser ajustada por el médico individual en el caso de cualesquiera contraindicaciones. Las dosis pueden variar y pueden administrarse en una o más administraciones de dosis diariamente, durante uno o varios días. Puede encontrarse una guía en la literatura de las dosis apropiadas para clases dadas de productos farmacéuticos. Puede administrarse una preparación en una “cantidad diagnósticamente eficaz”, es decir, una cantidad eficaz para el diagnóstico de una enfermedad o condición. Además, puede administrarse una preparación en una “cantidad terapéuticamente eficaz”, es decir, una cantidad eficaz para el tratamiento de una enfermedad o condición. Además, puede administrarse una preparación en una “cantidad terapéuticamente eficaz”, es decir, una cantidad eficaz para la prevención de una enfermedad o condición.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles, así como polvos estériles para la reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles inmediatamente antes de la utilización. Entre los ejemplos de portadores, diluyentes, solventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados se incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez correcta, por ejemplo, mediante la utilización de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante la utilización de surfactantes. Dichas composiciones pueden contener además adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. El bloqueo de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede resultar deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes, tales como monoestearato de aluminio y gelatina, que retrasan la absorción. Las formas de depósito inyectable se preparan mediante la formación de matrices de microcápsulas del fármaco en polímeros biodegradables, tales como poliláctido-poliglicólido, poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Dependiendo de la proporción de fármaco a polímero y de la naturaleza del polímero particular utilizado, puede controlarse la tasa de liberación de fármaco. Las formulaciones de depósito inyectable también se preparan atrapando el fármaco

en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejidos corporales. Las formulacion pueden esterilizarse mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención bacteriana o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o suspenderse en agua estéril u otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de la utilización. Entre los portadores inertes adecuados pueden incluirse azúcares, tales como lactosa. Deseablemente, por lo menos 95% en peso de las partículas del ingrediente activo presentan un tamaño de partícula efectivo en el intervalo de 0.01 a 10 micrómetros.

Tal como se utilizan en la presente memoria, la expresión “agente biológicamente activo” o “agente bioactivo” se refiere a un agente que es capaz de proporciona un efecto biológico, fisiológico o terapéutico local o sistémico en el sistema biológico en el que se aplica. Por ejemplo, el agente bioactivo puede actuar controlando la infección o inflamación, potenciando el crecimiento celular y la regeneración de tejidos, controlando el crecimiento tumoral, actuando como un analgésico, estimulando la unión anticélula y potenciando el crecimiento óseo, entre otras funciones. Entre otros agentes bioactivos adecuados pueden incluirse agentes antivíricos, hormonas, anticuerpos o proteínas terapéuticas. Entre otros agentes bioactivos se incluyen profármacos, que son agentes que no son biológicamente activos al administrarlos pero que, tras la administración en el sujeto, se convierten en agentes bioactivos mediante metabolismo o algún otro mecanismo. Adicionalmente, las composiciones pueden contener combinaciones de dos o más agentes bioactivos. Se entiende que puede utilizarse un agente biológicamente activo en relación a la administración en diversos sujetos, por ejemplo en seres humanos (es decir, la administración médica) o en animales (es decir, la administración veterinaria).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “agente farmacéuticamente activo” incluye un “fármaco” o una “vacuna”, y se refiere a una molécula, grupo de moléculas, complejo o sustancia administrado en un organismo con fines diagnósticos, terapéuticos, preventivos, médicos o veterinarios. Dicho término incluye farmacéuticos, tratamientos, remedios, nutracéuticos, cosmecéuticos, agentes biológicos, dispositivos, diagnósticos y anticonceptivos humanos y animales administrados externa e internamente por vía tópica, localizada y sistémica, incluyendo preparaciones útiles en el cribado, prevención, profilaxis, curación, bienestar, detección, obtención de imágenes, diagnóstico, terapia, cirugía, monitorización, cosmética, prostética, estudios forenses clínicos y veterinarios, y similares. Dicho término puede utilizarse además en referencia a terapéuticos o remedios agricéuticos, del lugar de trabajo, militares, industriales y ambientales, que comprenden moléculas seleccionadas o secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas capaces de reconocer receptores celulares, receptores membranales, receptores hormonales, receptores terapéuticos, microbios, virus o dianas seleccionadas que comprenden o son capaces de entrar en contacto con plantas, animales y/o seres humanos. Dicho término también puede incluir específicamente ácidos nucleicos y compuestos que comprende ácidos nucleicos que producen un efecto bioactivo, por ejemplo ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Entre los agentes farmacéuticamente activos se incluyen las categorías dadas a conocer en la presente memoria y ejemplos específicos. No se pretende que la categoría se encuentre limitada por los ejemplos específicos. El experto ordinario en la materia también reconocerá otros numerosos compuestos que se encuentran comprendidos dentro de las categorías y que resultan útiles. Entre los ejemplos se incluyen un radiosensibilizador, la combinación de un radiosensibilizador y un quimioterapéutico, un esteroide, una xantina, un broncodilatador beta-2-agonista, un agente antiinflamatorio, un agente analgésico, un antagonista de calcio, inhibidores del enzima conversor de la angiotensina, un beta-bloqueante, un agonista alfa activo centralmente, un antagonista alfa-1, un agente anticolinérgico/antiespasmódico, un análogo de vasopresina, un agente antiarrítmico, un agente antiparquinsoniano, un agente antiangina/antihipertensor, un agente anticoagulante, un agente antiplaquetario, un sedante, un agente ansiolítico, un agente peptídico, un agente biopolimérico, un agente antineoplásico, un laxante, un agente antidiarreico, un agente antimicrobiano, un agente antifúngico, una vacuna, una proteína o un ácido nucleico. El agente farmacéuticamente activo puede ser coumarina, albúmina, bromolidina, esteroides tales como betametasona, dexametasona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona, budesónido, hidrocortisona y derivados de hidrocrotisona farmacéuticamente aceptables, xantinas tales como teofilina y doxofilina, broncodilatadores beta-2-agonistas tales como salbutamol, fenterol, clenbuterol, bambuterol, salmeterol, fenoterol; agentes antiinflamatorios, incluyendo agentes antiinflamatorios antiasmáticos, agentes antiinflamatorios antiartritis y agentes antiinflamatorios no esteroidos, entre los ejemplos de los cuales se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, sulfuros, mesalamina, budesónido, salazopirina, diclofenac, sales diclofenac farmacéuticamente aceptables, nimesúlido, naproxeno, acetominofeno, ibuprofeno, cetoprofeno y piroxicam; agentes analgésicos, tales como salicilatos; bloqueantes de los canales del calcio, tales como nifedipina, amlodipina y nicardipina; inhibidores del enzima conversor de la angiotensina, tales como captopril, hidrocloruro de benzepril, fosinopril sodio, trandolapril, ramipril, lisinopril, enalapril, hidrocloruro de quinapril e hidrocloruro de moexipril; beta-bloqueantes (es decir, agentes bloqueantes beta-adrenérgicas), tales como hidrocloruro de sotalol, maleato de timolol, hidrocloruro de esmolol, carteolol, hidrocloruro de propanolol, hidrocloruro de betaxolol, sulfato de penbutolol, tartrato de metoprolol, succinato de metoprolol, hidrocloruro de acetbutolol, atenolol, pindolol y fumarato de bisoprolol; agonistas alfa-2 activos centralmente, tales como clonidina; antagonistas alfa-1, tales como doxazosina y prazosina; agentes anticolinérgicos/antiespasmódicos, tales como hidrocloruro de diciclomina, hidrobromuro de escopolamina, glicopirrolato, bromuro de clidinio, flavoxato y oxibutinina; análogos de vasopresina, tales como vasopresina y desmopresina; agentes antiarrítmicos, tales como quinidina, lidocaína, hidrocloruro de tocainida, hidrocloruro de mexiletina, digoxina, hidrocloruro de verapamilo, hidrocloruro de propafenona, acetato de flecainida, hidrocloruro de procainamida,

hidrocloruro de moricizina y fosfato de disopiramida; agentes antiparquinsonianos, tales como Dopa/Carbidopa, selegilina, dihidroergocriptina, pergólido, lisúrido, apomorfina y bromocriptına; agentes antiangina y agentes antihipertensores, tales como mononitrato de isosórbido, dinitrato de isosórbido, propanolol, atenolol y verapamilo; agentes anticoagulantes y antiplaquetarios, tales como coumadina, warfarina, ácido acetilsalicílico y ticlopidina; sedantes, tales como benzodiazepinas y barbitúricos; agentes ansiolíticos, tales como lorazepam, bromazepam y diazepam; agentes peptídicos y biopoliméricos, tales como calcitonina, leuprólido y otros agonistas de LHRH, hirudina, ciclosporina, insulina, somatostatina, protirelina, interferón, desmopresina, somatotropina, timopentina, pidotimod, eritropoyetina, itnerleuquinas, melatonina, CSF de granulocitos/macrófagos y heparina; agentes antineoplásicos, tales como etopósido, fosfato de etopósido, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, vincristina, doxorrubicina, cisplatino, hidroxiurea, leucovorina calcio, tamoxifeno, flutamida, asparaginasa, altretamina, mitotano e hidrocloruro de procarbazina; laxantes, tales como concentrato de senna, casantranol, bisacodilo y picosulfato sódico; agentes antidiarreicos, tales como hidrocloruro de difenoxina, hidrocloruro de loperamida, furazolidona, hidrocloruro de difenoxilato y microorganismos; vacunas, tales como vacunas bacterianas y víricas; agentes antimicrobianos, tales como penicilinas, cefalosporinas y macrólidos, agentes antifúngicos, tales como derivados imidazólicos y triazólicos, y ácidos nucleicos, tales como secuencias de ADN codificantes de proteínas biológicas y oligonucleotidos antisentido. Se entiende que puede utilizarse un agente farmacéuticamente activo en relación a la administración en diversos sujetos, por ejemplo en seres humanos (es decir, la administración médica) o en animales (es decir, la administración veterinaria).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “trastornos oftálmicos” y/o “condiciones oftálmicas” se refiere a enfermedades, condiciones y/o trastornos oftálmicos, incluyendo, aunque sin limitación, los asociados a la cámara anterior del ojo (es decir, hifema, sinequia), la coroide (es decir, desprendimiento coroidal, melanoma coroidal, síndromes de coroidopatía multifocal), la conjuntiva (es decir, conjuntivitis, penfigoide cicatricial, complicaciones de Bleb filtrante, melanoma conjuntival, fiebre faringoconjuntival, pterigión, carcinoma de células escamosas conjuntival), trastornos del tejido conectivo (es decir, espondilitis anquilosante, pseudoxantoma elástico, abrasión o edema corneal, dermoide limbal, queratitis de distrofia del cristalino, queratoconjuntivitis, queratocono, queratopatía, megalocórnea, úlcera corneal), trastornos dermatológicos (es decir, ecrodermatitis enteropática, dermatitis atópica, rosácea ocular, soriasis, síndrome de Stevens-Johnson), trastornos endocrinos (es decir, apoplejía hipofisaria), trastornos extraoculares (es decir, parálisis del nervio abducens, síndrome de Brown, síndrome de Duane, esotropia, exotropia, parálisis del nervio oculomotor), trastornos hematológicos y cardiovasculares (es decir, arteritis de células gigantes, hipertensión, leucemias, sídnrome isquémica ocular, enfermedad de células falciformes), enfermedades infecciosas (es decir, actinomicosis, botulismo, VIH, difteria, Escherichia coli, tuberculosis, manifestaciones oculares de la sífilis), presión intraocular (es decir, glaucoma, hipotonía ocular, síndrome de Posner-Schlossman), el iris y el cuerpo ciliar (es decir, aniridia, prolapso del iris, xantogranuloma juvenil, melanoma de cuerpos ciliares, melanoma del iris, uveítis), el sistema lacrimal (es decir, alacrima, síndrome del ojo seco, tumores de la glándula lacrimal), el cristalino (es decir, cataratas, lente ectópica, descentrado o dislocación de la lente intraocular), el párpado (es decir, blefaritis, dermatocalasis, distiquiasis, ectropión, coloboma de párpado, síndrome del ojo fláccido, triquiasis, xantelasma), trastornos metabólicos (es decir, gota, hiperlipoproteinemia, síndrome oculocerebrorenal), trastornos neurológicos (es decir, parálisis de Bell, diplopia, esclerosis múltiple), oftalmológicos generales (es decir, ojo rojo, cataratas, degeneración macular), el nervio óptico (es decir, miningioma, neuritis óptica, neuropatía óptica, papiledema), la órbita (es decir, celulitis orbitaria, dermoide orbitaria, tumores orbitarios), facomatosis (es decir, ataxia-telangiectasia, neurofibromastosis-1), presbiopia, la pupila (es decir anisoria, síndrome de Homer), trastornos refractivos (es decir, astigmatismo, hiperopia, miopia), la retina (es decir, enfermedad de Coats, enfermedad de Eales, edema macular, retinitis, retinopatía) y la esclerótida (es decir, episclerisis, escleritis).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “fracción de obtención de imágenes” se refiere a cualesquiera grupos o sustancias químicos útiles para aplicaciones de captación de imágenes, tal como son conocidas por el experto en la materia. Entre los ejemplos de agentes de obtención de imágenes se incluyen radioconjugados, citotoxinas, citoquinas, gadolinio-DTPA o un punto cuántico, óxido de hierro y óxido de manganeso. Puede proporcionarse un agente de obtención de imágenes en forma nanoparticulada o en forma microparticulada. Opcionalmente, un agente de obtención de imágenes comprende nanopartículas de gadolinio-DTPA y óxido de hierro (magnetita), como agentes de contraste de imágenes de resonancia magnética (IRM) específicos. Además, un agente de obtención de imágenes puede comprender por lo menos un pigmento del infrarrojo cercano a base de una porfirina y/o una ftalocianina. Ver Ghoroghchian et al., Near-infrared-emissive polymersomes: Self-assembled soft matter for *in vivo* optical imaging, PNAS, vol. 102, nº 8, 2922-2927, 2005.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “punto cuántico orgánico” se refiere a un compuesto generalmente a base de carbono que presenta una estructura global generalmente de tipo partícula y que comprende una fracción funcional generalmente central. Puede prepararse un punto cuántico orgánico mediante el pliegue de cadenas intramoleculares. Además, puede prepararse un punto cuántico orgánico a partir de un copolímero en bloque que comprende por lo menos dos fracciones reactivos y por lo menos una fracción funcional.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “polímero” se refiere a un compuesto orgánico de peso

molecular relativamente elevado, natural o sintético, cuya estructura puede representarse mediar pequeña repetitiva, el monómero (p.ej., polietileno, caucho, celulosa). Los polímeros sintéticos se forman típicamente mediante polimerización por adición o condensación de monómeros.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “copolímero” se refiere a un polímero formado a partir de dos o más unidades repetitivas diferentes (residuos monómeros). A título de ejemplo no limitativo, un copolímero puede ser un copolímero alternante, un copolímero aleatorio, un copolímero en bloque o un copolímero injertado. También se encuentra contemplado que diversos segmentos de bloque de un copolímero en bloque puedan ellos mismos comprender copolímeros.

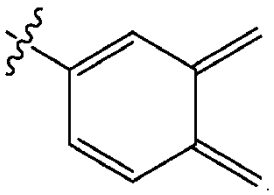
Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “oligóimero” se refiere a un polímero de peso molecular relativamente bajo en el que el número de unidades repetitivas es de dos a diez, por ejemplo de dos a ocho, de dos a seis, o de dos a cuatro. Una colección de oligómeros puede presentar un número medio de unidades repetitivas de aproximadamente dos a aproximadamente diez, por ejemplo de aproximadamente dos a aproximadamente ocho, de aproximadamente dos a aproximadamente seis, o de aproximadamente dos a aproximadamente cuatro.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “residuo reactivo” se refiere a una fracción (p.ej., un residuo monómero) capaz de experimentar una reacción química a una temperatura de reacción y/o en respuesta a un estímulo para formar un intermediario reactivo. Un residuo reactivo puede ser una fracción capaz de experimentar una reacción de entrecruzamiento intramolecular para proporcionar el pliegue de cadenas intramoleculares.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “grupo polimerizable” se refiere a un grupo (es decir, una funcionalidad química) capaz de experimentar una reacción de polimerización a una temperatura de polimerización y/o en respuesta a un iniciador de polimerización para formar un polímero o un oligómero. Opcionalmente, la reacción de polimerización es una polimerización de radicales (p.ej., una polimerización de vinilo). Se entiende que pueden utilizarse catalizadores en relación a la reacción de polimerización. Se encuentra contemplado que puedan utilizarse opcionalmente grupos polimerizables en reacciones de crecimiento escalonado o de crecimiento de cadena. Entre los grupos polimerizables ejemplares se incluyen residuos de compuestos de vinilo, estirilo, acriloilo, metacriloilo, arilo y heteroarilo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “intermediario reactivo” se refiere a una especie química formada a partir de una fracción reactivo y en respuesta a un estímulo y/o a una temperatura de reacción y capaz de experimentar una reacción química adicional (p.ej., entrecruzamiento9 con otro intermediario reactivo. Dos intermediarios reactivos pueden experimentar una reacción de entrecruzamiento para proporcionar el pliegue de las cadenas intramoleculares.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “fracción *o*-quinoide” se refiere a un intermediario reactivo formado a partir de, por ejemplo, una fracción benzociclobuteno, una temperatura de reacción y/o en respuesta a un estímulo. Una fracción o-quinoide puede presentar la estructura general:



Se entiende que puede proporcionarse una fracción reactiva capaz de formar una fracción *o*-quinoide en forma de, por ejemplo, un residuo o en forma de un grupo colgante en un copolímero. Opcionalmente, una fracción *o*-quinoide puede sustituirse adicionalmente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “fracción funcional” se refiere a una fracción (p.ej., un residuo monomérico) capaz de llevar a cabo una función, por ejemplo una función de obtención de imágenes o una función de administración de fármaco. Puede proporcionarse una fracción funcional en una parte generalmente central de un punto cuántico orgánico. Una fracción funcional puede comprender una fracción semiconductora, una fracción de obtención de imágenes y/o una fracción de administración de fármaco.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “estímulo” se refiere a una condición o suceso externo que es capaz de actuar sobre una especie reactiva, por ejemplo una fracción reactiva, para producir un intermediario reactivo, por ejemplo una fracción *o*-quinoide. Un estímulo puede referirse a la temperatura (es decir, un estímulo térmico), una especie química (es decir, un estímulo químico), tal como un radical o un incremento o reducción del pH, o la luz (es decir, un estímulo electromagnético) o una mezcla de los mismos.

Un residuo de una especie química, tal como se utiliza en la especificación y reivindicaciones final
una fracción que es el producto resultante de la especie química en un esquema de reacción particular o la formulación o producto químico consecuente, con independencia de si la fracción se obtiene de hecho a partir de la especie química. De esta manera, un residuo etilenglicol en un poliéster se refiere a una o más unidades de -OCH_2CH_2O- en el poliéster, con independencia de si se utilizó etilenglicol para preparar el poliéster. De manera similar, un residuo ácido sebácico en un poliéster se refiere a una o más fracciones - $CO(CH_2)_8CO$- en el poliéster, con independencia de si el residuo se obtuvo haciendo reaccionar ácido sebácico o un éster del mismo para obtener el poliéster.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “sustituido” se encuentra contemplado que incluye todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. Entre los sustituyentes permisibles se incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, y aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Entre los sustituyentes ilustrativos se incluyen, por ejemplo, los indicados posteriormente. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más e iguales o diferentes de los compuestos orgánicos apropiados. Para los fines de la presente exposición, los heteroátomos, tales como nitrógeno, pueden presentar sustituyentes de hidrógeno y/o cualesquiera sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos indicados en la presente memoria que satisfagan las valencias de los heteroátomos. La presente exposición no se pretende que se encuentre limitada en modo alguno a los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. Además, las expresiones “sustitución” o “sustituido con” incluyen el caso implícito de que dicha sustitución se realiza de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente, y que la sustitución resulta en un compuesto estable, p.ej., un compuesto que no experimenta espontáneamente transformación, tal como mediante reorganización, ciclización, eliminación, etc.

En la definición de diversos términos, "A^1," "A^2," "A^3," y "A^4" se utilizan en la presente memoria como símbolos genéricos para representar diversos sustituyentes específicos. Estos símbolos pueden ser de cualquier sustituyente, no limitados a los dados a conocer en la presente memoria, y en el caso de que se defina que son determinados sustituyentes en un caso, pueden, en otro caso, definirse como algún otro sustituyente.

El término “alquilo” tal como se utiliza en la presente memoria es un grupo hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado de 1 a 24 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, s-butilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, s-pentilo, neopentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo y similares. El grupo alquilo también puede encontrarse sustituido o no sustituido. El grupo alquilo puede sustituirse con uno o más grupos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, alquilo sustituido opcionalmente, cicloalquilo, alcoxi, amino, éter, haluro, hidroxi, nitro, sililo, sulfo-oxo o tiol, tal como se indica en la presente memoria. Un grupo “alquilo inferior” es un grupo alquilo que contiene entre uno y seis átomos de carbono.

Durante toda la especificación, “alquilo” se utiliza generalmente para referirse a grupos alquilo no sustituidos y a grupos alquilo sustituidos; sin embargo, también se hace referencia específica a los grupos alquilo sustituidos en la presente memoria mediante la identificación del sustituyente o sustituyentes específicos en el grupo alquilo. Por ejemplo, la expresión “alquilo halogenado” se refiere específicamente a un grupo alquilo que ha sido sustituido con uno o más haluros, p.ej., flúor, cloro, bromo o yodo. El término “alcoxialquilo” se refiere específicamente a un grupo alquilo que está sustituido con uno o más grupos alcoxi, tal como se indica posteriormente. El término “alquilamino” se refiere específicamente a un grupo alquilo que está sustituido con uno o más grupos amino, tal como se indica posteriormente, y similares. En el caso de que se utilice “alquilo” en un caso y un término específico tal como “alcohol alquílico” se utilice en otro caso, no pretende implicar que el término “alquilo” no se refiere también a términos específicos tales como “alcohol alquílico” y similares.

Esta práctica también se utiliza para otros grupos indicados en la presente memoria. Es decir, aunque un término tal como “cicloalquilo” se refiere a fracciones cicloalquilo tanto no sustituidas como sustituidas, las fracciones sustituidas pueden, además, identificarse específicamente en la presente memoria; por ejemplo, un cicloalquilo sustituido particular puede denominarse, p.ej., “alquilcicloalquilo”. De manera similar, un alcoxi sustituido puede denominarse específicamente, p.ej., “alcoxi halogenado”, un alquenilo sustituido particular puede ser, p.ej., un “alcohol alquenílico”, y similares. Nuevamente, la práctica de utilizar un término general, tal como “cicloalquilo”, y un término específico, tal como “alquilcicloalquilo”, no pretende implicar que el término general no incluye también el término específico.

El término “cicloalquilo” tal como se utiliza en la presente memoria es un anillo a base de carbono no aromático compuesto de por lo menos tres átomos de carbono. Entre los ejemplos de grupos cicloalquilo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, norbornilo y similares. El término “heterocicloalquilo” es un tipo de grupo cicloalquilo tal como se ha definido anteriormente y se encuentra incluido dentro del significado del término “cicloalquilo”, donde por lo menos uno de los átomos de carbono del anillo se sustituye por un heteroátomo tal como, aunque sin limitarse a ellos, nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo. El grupo cicloalquilo y el grupo heterocicloalquilo pueden encontrarse sustituidos o no sustituidos. El grupo cicloalquilo y el grupo heterocicloalquilo pueden sustituirse con uno o más grupos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, alquilo sustituido opcionalmente, cicloalquilo, alcoxi, amino, éter, haluro, hidroxi, nitro, sililo, sulfooxo o tiol tal

como se indican en la presente memoria.

La expresión “grupo polialquileno” tal como se utiliza en la presente memoria es un grupo que presenta dos o más grupos CH_2 unidos entre sí. El grupo polialquileno puede representarse por la fórmula $-(CH_2)_a-$, donde "a" es un número entero entre 2 y 500.

Los términos “alcoxi” y “alcoxilo” tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a un grupo alquilo o cicloalquilo unidos mediante un enlace éter; es decir, un grupo “alcoxi” puede definirse como $-OA^1$ en el que A^1 es alquilo o cicloalquilo tal como se ha definido anteriormente. "Alcoxi" incluye además polímeros de grupos alcoxi tal como se ha indicado anteriormente; es decir, un alcoxi puede ser un poliéter, tal como $-OA^1-OA^2$ o $-OA^1-(OA^2)_a-OA^3$, en el que "a" es un número entero entre 1 y 200, y A^1, A^2 y A^3 son grupos alquilo y/o cicloalquilo.

El término “alquenilo” tal como se utiliza en la presente memoria es un grupo hidrocarburo entre 2 y 24 átomos de carbono con una fórmula estructural que contiene por lo menos un doble enlace carbono-carbono. Estructuras asimétricas tales como $(A^1A^2)C=C(A^3A^4)$ pretende incluir isómeros tanto *E* como *Z*. Lo anterior puede suponerse en fórmulas estructurales en la presente memoria en las que se encuentra presente un alqueno asimétrico, o puede indicarse explícitamente mediante el símbolo de enlace C=C. El grupo alquenilo puede sustituirse con uno o más grupos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, aldehído, amino, ácido carboxílico, éster, éter, haluro, hidroxi, cetona, azida, nitro, sililo, sulfo-oxo, o tiol sustituido opcionalmente, tal como se indica en la presente memoria.

El término “cicloalquenilo” tal como se utiliza en la presente memoria es un anillo a base de carbono no aromático compuesto de por lo menos tres átomos de carbono y que contiene por lo menos un doble enlace carbono-carbono, es decir, C=C. Entre los ejemplos de grupos cicloalquenilo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclopentadienilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo, norbornenilo y similares. El término “heterocicloalquenilo” es un tipo de grupo cicloalquenilo tal como se ha definido anteriormente y se encuentra incluido dentro del significado del término “cicloalquenilo”, donde por lo menos uno de los átomos de carbono del anillo se sustituye por un heteroátomo tal como, aunque sin limitarse a ellos, nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo. El grupo cicloalquenilo y el grupo heterocicloalquenilo pueden encontrarse sustituidos o no sustituidos. El grupo cicloalquenilo y el grupo heterocicloalquenilo pueden sustituirse con uno o más grupos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, aldehído, amino, ácido carboxílico, éster, éter, haluro, hidroxi, cetona, azida, nitro, sililo, sulfo-oxo, o tiol sustituido opcionalmente, tal como se indica en la presente memoria.

El término “alquinilo” tal como se utiliza en la presente memoria es un grupo hidrocarburo de 2 a 24 átomos de carbono con una fórmula estructural que contiene por lo menos un triple enlace carbono-carbono. El grupo alquinilo puede encontrarse no sustituido o sustituido con uno o más grupos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, aldehído, amino, ácido carboxílico, éster, éter, haluro, hidroxi, cetona, azida, nitro, sililo, sulfo-oxo o tiol sustituido opcionalmente, tal como se indica en la presente memoria.

El término “cicloalquinilo tal como se utiliza en la presente memoria es un anillo a base de carbono no aromático compuesto de por lo menos siete átomos de carbono y que contiene por lo menos un triple enlace carbono-carbono. Entre los ejemplos de grupos cicloalquinilo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, cicloheptinilo, ciclooctinilo, ciclononinilo y similares. El término “heterocicloalquinilo” es un tipo de grupo cicloalquinilo tal como se ha definido anteriormente y se encuentra incluido dentro del significado del término “cicloalquinilo”, donde por lo menos uno de los átomos de carbono del anillo se sustituye por un heteroátomo tal como, aunque sin limitarse a ellos, nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo. El grupo cicloalquinilo y el grupo heterocicloalquinilo pueden encontrarse sustituidos o no sustituidos. El grupo cicloalquinilo y el grupo heterocicloalquinilo pueden sustituirse con uno o más grupos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, aldehído, amino, ácido carboxílico, éster, éter, haluro, hidroxi, cetona, azida, nitro, sililo, sulfo-oxo, o tiol sustituido opcionalmente, tal como se indica en la presente memoria.

El término “arilo” tal como se utilice en la presente memoria es un grupo que contiene cualquier grupo aromático a base de carbono, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, benceno, naftaleno, fenilo, bifenilo, fenoxibenceno y similares. El término “arilo” incluye además “heteroarilo”, que se define como un grupo que contiene un grupo aromático que presenta por lo menos un heteroátomo incorporado dentro del anillo del grupo aromático. Entre los ejemplos de heteroátomos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. De manera similar, la expresión “no heteroarilo”, que también se encuentra incluida en el término “arilo”, define un grupo que contiene un grupo aromático que no contiene un heteroátomo. El grupo arilo puede encontrarse sustituido o no sustituido. El grupo arilo puede encontrarse no sustituido o sustituido con uno o más grupos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, aldehído, amino, ácido carboxílico, éster, éter, haluro, hidroxi, cetona, azida, nitro, sililo, sulfo-oxo o tiol sustituido opcionalmente, tal como se indica en la presente memoria. El término “biarilo” es

un tipo específico de grupo arilo y se encuentra incluido en la definición de “arilo”. Biarilo se refiere a dos grupos arilo que se unen entre sí mediante una estructura de anillos fusionados, tal como en naftaleno, o se unen mediante uno o más enlaces carbono-carbono, tal como en bifenilo.

El término “aldehído” tal como se utiliza en la presente memoria se representa por la fórmula -C(O)H. Durante toda la presente especificación, “C(O)” es la notación abreviada para un grupo carbonilo, es decir, C=O.

Los términos “amina” o “amino” tal como se utilizan en la presente memoria se representan por la fórmula $NA^1A^2A^3$, en la que A^1, A^2 y A^3 pueden ser, independientemente, hidrógeno o grupo alquilo sustituido opcionalmente, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo o heteroarilo tal como se indica en la presente memoria.

La expresión “ácido carboxílico” tal como se utiliza en la presente memoria se representa por la fórmula -C(O)OH.

El término “éster” tal como se utiliza en la presente memoria se representa por la fórmula $-OC(O)A^1$ o $-C(O)OA^1$, en la que A^1 puede ser un grupo alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo o heteroarilo sustituido opcionalmente, tal como se indica en la presente memoria. El término “poliéster” tal como se utiliza en la presente memoria se representa por la fórmula $(A^1O(O)C\text{-}A^2\text{-}C(O)O)_a$- o $-(A^1O(O)C\text{-}A^2\text{-}OC(O))_a$-, en la que A^1 y A^2 pueden ser, independientemente, un grupo alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo o heteroarilo sustituido independientemente indicado en la presente memoria, y “a” es un número entero entre 1 y 500. “Poliéster” es el término utilizado para referirse a un grupo que se produce mediante la reacción entre un compuesto que presenta por lo menos dos grupos ácido carboxílico con un compuesto que presenta por lo menos dos grupos hidroxilo.

El término “éter” tal como se utiliza en la presente memoria se representa por la fórmula A^1OA^2, en la que A^1 y A^2 pueden ser, independientemente, un grupo alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo o heteroarilo sustituido opcionalmente indicado en la presente memoria. El término “poliéter” tal como se utiliza en la presente memoria se representa mediante la fórmula $-(A^1O\text{-}A^2O)_a$-, en la que A^1 y A^2 pueden ser, independientemente, un grupo alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo o heteroarilo sustituido independientemente indicado en la presente memoria, y “a” es un número entero entre 1 y 500. Entre los ejemplos de grupos poliéter se incluyen óxido de polietileno, óxido de polipropileno y óxido de polibutileno.

El término “haluro” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los halógenos flúor, cloro, bromo y yodo.

El término “heterociclo”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos monocíclicos y multicíclicos en los que por lo menos uno de los elementos del anillo es diferente de carbono. Entre los heterociclos se incluyen piridina, pirimidina, furano, tiofeno, pirrol, isoxazol, isotiazol, pirazol, oxazol, tiazol, imidazol, oxazol, incluyendo 1,2,3-oxadiazol, 1,2,5-oxadiazol and 1,3,4-oxadiazol, tiadiazol, incluyendo 1,2,3-tiadiazol, 1,2,5-tiadiazol y 1,3,4-tiadiazol, triazol, incluyendo 1,2,3-triazol, 1,3,4-triazol, tetrazol, incluyendo 1,2,3,4-tetrazol y 1,2,4,5-tetrazol, piridina, piridazina, pirimidina, pirazina, triazina, incluyendo 1,2,4-triazina y 1,3,5-triazina, tetrazina, incluyendo 1,2,4,5-tetrazina, pirroldina, piperazina, morfolina, tetrahidropirano, tetrahidrofurano, dioxano y similares.

El término “hidroxilo” tal como se utiliza en la presente memoria se representa mediante la fórmula -OH.

El término “cetona” tal como se utiliza en la presente memoria se representa mediante la fórmula $A^1C(O)A^2$, en la que A^1 y A^2 pueden ser, independientemente, un grupo alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo o heteroarilo sustituido opcionalmente, tal como se indica en la presente memoria.

El término “azida” tal como se utiliza en la presente memoria se representa mediante la fórmula $-N_3$.

El término “nitro” tal como se utiliza en la presente memoria se representa mediante la fórmula $-NO_2$.

El término “nitrilo” tal como se utiliza en la presente memoria se representa mediante la fórmula -CN.

El término “sililo” tal como se utiliza en la presente memoria se representa mediante la fórmula $-SiA^1A^2A^3$, en la que A^1, A^2 y A^3 pueden ser, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo, cicloalquilo, alcoxi, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo o heteroarilo sustituido opcionalmente, tal como se indica en la presente memoria.

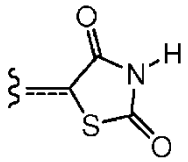
El término "sulfo-oxo" tal como se utiliza en la presente memoria se representa mediante las fórmulas $-S(O)A^1$, $-S(O)2A^1$, $-OS(O)_2A^1$, o $-OS(O)_2OA^1$, en las que A^1 puede ser hidrógeno o un grupo alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo o heteroarilo sustituido opcionalmente, tal como

se indica en la presente memoria. Durante toda la especificación, "S(O)" es una notación abreviad
término "sulfonilo" se utiliza en la presente memoria para referirse al grupo sulfo-oxo que se representa mediante la fórmula $-S(O)_2A^1$, en la que A^1 puede ser hidrógeno o un grupo alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo o heteroarilo sustituido opcionalmente, tal como se indica en la presente memoria. El término “sulfona” tal como se utiliza en la presente memoria se representa mediante la fórmula $A^1S(O)_2A^2$, en la que A^1 y A^2 pueden ser, independientemente, un grupo alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo o heteroarilo sustituido opcionalmente, tal como se indica en la presente memoria. El término “sulfóxido” tal como se utiliza en la presente memoria se representa mediante la fórmula $A^1S(O)A^2$, en la que A^1 y A^2 pueden ser, independientemente, un grupo alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo o heteroarilo sustituido opcionalmente, tal como se indica en la presente memoria.

El término “tiol” tal como se utiliza en la presente memoria se representa mediante la fórmula -SH.

La expresión “residuo orgánico” define un residuo que contiene carbono, es decir, un residuo que comprende por lo menos un átomo de carbono, e incluye, aunque sin limitación, grupos, residuos o radicales que contienen carbono definidos anteriormente en la presente memoria. Los residuos orgánicos pueden contener diversos heteroátomos, o unirse a otra molécula mediante un heteroátomo, incluyendo oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo o similar. Entre los ejemplos de residuos orgánicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, alquilo o alquilo sustituido, alcoxi o alcoxi sustituido, grupos de amida, amino monosustituido o disustituido, etc. Los residuos orgánicos preferentemente pueden comprender 1 a 18 átomos de carbono, 1 a 15 átomos de carbono, 1 a 12 átomos de carbono, 1 a 8 átomos de carbono, 1 a 6 átomos de carbono o 1 a 4 átomos de carbono. Además, un residuo orgánico puede comprender 2 a 18 átomos de carbono, 2 a 15 átomos de carbono, 2 a 12 átomos de carbono, 2 a 8 átomos de carbono, 2 a 4 átomos de carbono o 2 a 4 átomos de carbono.

Un sinónimo muy próximo del término “residuo” es el término “radical”, que tal como se utiliza en la especificación y reivindicaciones finales, se refiere a un fragmento, grupo o subestructura de una molécula indicada en la presente memoria, con independencia de cómo se prepare la molécula. Por ejemplo, un radical 2,4-tiazolidindiona en un compuesto particular presenta la estructura



con independencia de si se utiliza tiazolidindiona para preparar el compuesto. En algunas realizaciones, el radical (por ejemplo, un alquilo) puede modificarse adicionalmente (es decir, alquilo sustituido) uniendo al mismo uno o más “radicales sustituyentes”. El número de átomos en un radical dado no resulta crucial para la presente invención, a menos que se indique lo contrario en otros sitios en la presente memoria.

“Radical orgánico”, tal como se define y utiliza la expresión en la presente memoria, contiene uno o más átomos de carbono. Un radical orgánico puede presentar, por ejemplo, 1 a 26 átomos de carbono, 1 a 18 átomos de carbono, 1 a 12 átomos de carbono, 1 a 8 átomos de carbono, 1 a 6 átomos de carbono o 1 a 4 átomos de carbono. Además, un radical orgánico puede presentar 2 a 26 átomos de carbono, 2 a 18 átomos de carbono, 2 a 12 átomos de carbono, 2 a 8 átomos de carbono, 2 a 6 átomos de carbono o 2 a 4 átomos de carbono. Los radicales orgánicos con frecuencia presentan hidrógeno unido a por lo menos algunos de los átomos de carbono del radical orgánico. Un ejemplo de un radical orgánico que no comprende átomos inorgánicos es un radical 5,6,7,8-tetrahidro-2-naftilo. En algunas realizaciones, un radical orgánico puede contener 1 a 10 heteroátomos inorgánicos unidos al mismo o en el mismo, incluyendo halógenos, oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo y similares. Entre los ejemplos de radicales orgánicos se incluyen, aunque sin limitación, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, amino monosustituido, amino disustituido, aciloxi, ciano, carboxi, carboalcoxi, alquilcarboxamida, alquilcarboxamida sustituida, dialquilcarboxamida, dialquilcarboxamida sustituida, alquilsulfonilo, alquilsulfinilo, tioalquilo, tiohaloalquilo, alcoxi, alcoxi sustituido, haloalquilo, haloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, radicales heterocíclicos o heterocíclicos sustituidos, en los que los términos se definen en otros sitios en la presente memoria. Entre unos cuantos ejemplos no limitativos de radicales orgánicos que incluyen heteroátomos se incluyen radicales alcoxi, radicales trifluorometoxi, radicales acetoxi, radicales dimetilamino y similares.

“Radical inorgánico”, tal como se define y utiliza el término en la presente memoria, no contiene átomos de carbono y, por lo tanto, comprende únicamente átomos diferentes del carbono. Los radicales inorgánicos comprenden combinaciones unidas de átomos seleccionados de hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, silicio, fósforo, azufre, selenio y halógenos tales como flúor, cloro, bromo y yodo, que pueden encontrarse presentes individualmente o unidos entre sí en sus combinaciones químicamente estables. Los radicales inorgánicos presentan 10 o menos, o preferentemente uno a seis o uno a cuatro átomos inorgánicos tal como se ha indicado anteriormente unidos entre sí. Entre los ejemplos de radicales inorgánicos se incluyen, aunque sin limitación,

amino, hidroxi, halógenos, nitro, tiol, sulfato, fosfato y radicales inorgánicos comúnmente conoc
Los radicales inorgánicos no presentan unidos a ellos elementos metálicos de la tabla periódica (tales como los metales alcalinos, metales alcalino-térreos, metales de transición, metales lantánidos o metales actínidos), aunque tales iones metálicos en ocasiones pueden servir como catión farmacéuticamente aceptable para radicales inorgánicos aniónicos, tales como un sulfato, fosfato o radical inorgánico aniónico similar. Los radicales inorgánicos no comprenden elementos metaloides, tales como boro, aluminio, galio, germanio, arsénico, estaño, plomo o telurio, o elementos gases nobles, a menos que se indique específicamente lo contrario en la presente memoria.

Los compuestos indicados en la presente memoria pueden contener uno o más dobles enlaces y, de esta manera, potencialmente dan lugar a isómeros cis/trans (E/Z), así como otros isómeros conformacionales. A menos que se indique lo contrario, la invención incluye la totalidad de tales posibles isómeros, así como mezclas de tales isómeros.

A menos que se indique lo contrario, una fórmula con enlaces químicos mostrada sólo como líneas continuas y no como cuñas o líneas discontinuas contempla cada posible isómero, p.ej., cada enantiómero y diastereómero, y una mezcla de isómeros, tal como una mezcla racémica o escalémica. Los compuestos indicados en la presente memoria pueden contener uno o más centros asimétricos y, de esta manera, potencialmente dan lugar a diastereómeros e isómeros ópticos. A menos que se indique lo contrario, la presente incluye la totalidad de todos los posibles diastereómeros posibles, así como sus mezclas racémicas, sus enantiómeros resueltos sustancialmente puros, todos los posibles isómeros geométricos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. También se encuentran incluidas mezclas de estereoisómeros, así como estereoisómeros específicos aislados. Durante el curso de los procedimientos sintéticos utilizados para preparar tales compuestos, o durante la utilización de procedimientos de racemización o epimerización conocidos por el experto en la materia, los productos de tales procedimientos pueden ser una mezcla de estereoisómeros.

Se dan a conocer los componentes que deben utilizarse para preparar las composiciones de la invención, así como las composiciones mismas que deben utilizarse en los métodos dados a conocer en la presente memoria. Estos y otros materiales se dan a conocer en la presente memoria, y se entiende que, en donde se dan a conocer combinaciones, subgrupos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales, aunque la referencia específica a cada una de las diversas combinaciones individuales y colectivas y la permutación de estos compuestos no puede darse a conocer explícitamente, cada uno se encuentra específicamente contemplado e indicado en la presente memoria. Por ejemplo, en el caso de que se dé a conocer y comente un compuesto particular y se comenten varias modificaciones que pueden realizarse en varias moléculas, incluyendo los compuestos, se encuentra contempladas específicamente todas y cada una de las combinaciones y permutaciones del compuesto y las modificaciones que resultan posibles, a menos que se indique específicamente lo contrario. De esta manera, en el caso de que se dé a conocer una clase de moléculas A, B y C, así como una clase de moléculas D, E y F, y un ejemplo de una molécula de combinación, se divulga A-D, aunque cada uno no se recite individualmente, cada uno se encuentra individual y colectivamente contemplado, es decir, las combinaciones A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E y C-F se consideran dadas a conocer. De manera similar, también se divulga cualquier subgrupo o combinación de ellos. De esta manera, por ejemplo, se consideraría divulgado el subgrupo de A-E, B-F y C-E. Este concepto se aplica a todos los aspectos de la presente solicitud, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, las etapas en los métodos de preparación y utilización de las composiciones de la invención. De esta manera, en el caso de que exista una diversidad de etapas adicionales que pueden llevarse a cabo, se entiende que puede llevarse a cabo cada una de estas etapas adicionales con cualquier realización específica o combinación de realizaciones de los métodos de la invención.

Se entiende que las composiciones dadas a conocer en la presente memoria presentan determinadas funciones. En la presente memoria se dan a conocer determinados requisitos estructurales para llevar a cabo las funciones dadas a conocer, y se entiende que existe una diversidad de estructuras que pueden realizar la misma función que están relacionadas con las estructuras dadas a conocer y que estas estructuras típicamente conseguirán el mismo resultado.

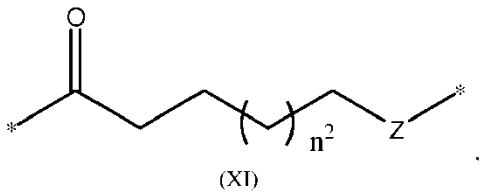
B. Polímeros

Se entiende que los polímeros dados a conocer pueden utilizarse en relación a las nanopartículas dadas a conocer y métodos dados a conocer. A menos que se indique lo contrario, las estructuras dadas a conocer pueden utilizarse en relación a los métodos dados a conocer, los polímeros dados a conocer y las nanopartículas dadas a conocer.

1. Polímeros funcionalizados con epóxido

En la presente memoria se comenta un polímero que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (I), anteriormente, y en el que el residuo monómero comprende menos de aproximadamente 10% en peso del residuo monómero de halógeno seleccionado de cloro, bromo y yodo. Opcionalmente, el residuo monómero puede comprender menos

de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4 aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, o menos de aproximadamente 1% de halogeno seleccionado de cloro, bromo y yodo, en peso del residuo monómero. Opcionalmente, un polímero funcionalizado con epóxido puede comprender además por lo menos un residuo monómero seleccionado de un residuo monómero funcionalizado con propargilo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (II), anteriormente; un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (XI):



(XI)

en la que Z es O o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, y en el que n^2 es un número entero entre 0 y 2, y un residuo monómero funcionalizado con ceto que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (III), anteriormente.

Opcionalmente, Z es O. Es decir, el residuo polímero puede ser un residuo poliéster. Opcionalmente, el polímero es un poliéster. Opcionalmente, el polímero es un co-poliéster.

Opcionalmente, la Z es NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6. Opcionalmente, el residuo polímero puede ser un residuo poliamida. Opcionalmente, el polímero es una poliamida. Opcionalmente, el polímero es una co-poliamida. El alquilo opcionalmente puede sustituirse adicionalmente. R puede ser alquilo C1 a C6, C2 a C6, C1 a C5, C2 a C5, C1 a C4, C2 a C4, C1, C2, C3, C4, C5 o C6.

Se dan a conocer polímeros que comprenden por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura opcionalmente sustituida por la fórmula (IV), anteriormente.

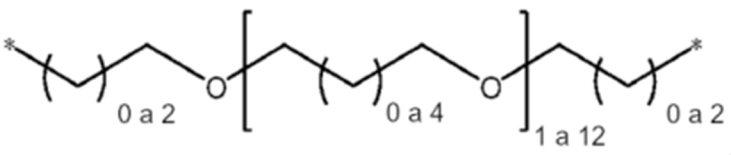
Opcionalmente, el polímero comprende además por lo menos un residuo monómero seleccionado de un monómero funcionalizado con propargilo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (II), anteriormente; un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (XI), anteriormente; y un residuo monómero funcionalizado con ceto que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (III), anteriormente.

Opcionalmente, el polímero comprende una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (VIII), anteriormente.

Opcionalmente, m puede ser un número entero entre 0 y 6, entre 1 y 6, entre 0 y 5, entre 1 y 5, entre 0 y 4, entre 1 y 4, entre 0 y 3, entre 1 y 3, entre 0 y 2, entre 1 y 2, 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Opcionalmente, m' puede ser un número entero entre 0 y 6, entre 1 y 6, entre 0 y 5, entre 1 y 5, entre 0 y 4, entre 1 y 4, entre 0 y 3, entre 1 y 3, entre 0 y 2, entre 1 y 2, 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Opcionalmente, m^1 puede ser un número entero entre 0 y 6, entre 1 y 6, entre 0 y 5, entre 1 y 5, entre 0 y 4, entre 1 y 4, entre 0 y 3, entre 1 y 3, entre 0 y 2, entre 1 y 2, 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

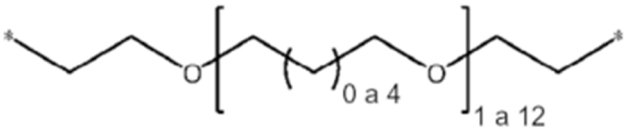
Opcionalmente, n puede ser un número entero entre 0 y 2, entre 1 y 2, entre 0 y 1, o 0, 1 o 2. Opcionalmente, n' puede ser un número entero entre 0 y 2, entre 1 y 2, entre 0 y 1, o 0, 1 o 2. Opcionalmente, n^1 puede ser un número entero entre 0 y 2, entre 1 y 2, entre 0 y 1, o 0, 1 o 2. Opcionalmente, n^2 puede ser un número entero entre 0 y 2, entre 1 y 2, entre 0 y 1, o 0, 1 o 2. Opcionalmente, n^3 puede ser un número entero entre 0 y 2, entre 1 y 2, entre 0 y 1, o 0, 1 o 2.

R^L puede seleccionarse de alquilo sustituido opcionalmente y alcoxileno sustituido opcionalmente. Entre los alquilos adecuados se incluyen radicales orgánicos divalentes seleccionados de etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, decilo, dodecilo, hexadecilo y alquilo superior. Entre los alcoxilenos adecuados se incluyen radicales orgánicos seleccionados de grupos que presentan una estructura por la fórmula:

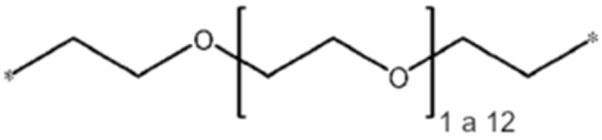


Entre los alcoxilenos adecuados adicionales se incluyen radicales orgánicos seleccionados de grupos que

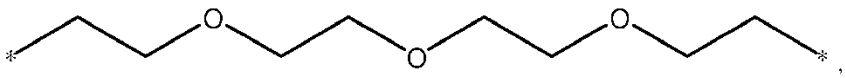
presentan una estructura por la fórmula:



o



Entre los alcoxilenos adecuados adicionales se incluyen un radical orgánico divalente que presenta la estructura por la fórmula:



que puede derivarse de 2,2-(etilén-dioxi)bis(etilamina).

Los polímeros y copolímeros típicamente presentan un peso molecular medio en número (Mn) de entre aproximadamente 3500 y 4800 daltons con una polidispersidad estrecha de aproximadamente 1.17 a aproximadamente 1.27. Se entiende que el peso molecular puede ser superior o inferior y que el experto en la materia podrá manipular fácilmente las condiciones de reacción para conseguir un peso molecular deseado diferente.

2. Polímeros multifuncionales

Opcionalmente, un polímero puede ser un polímero multifuncional. Es decir, el polímero comprende residuos monómeros seleccionados de dos o más de un residuo monómero funcionalizado con epóxido que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (I), anteriormente, y un residuo monómero funcionalizado con propargilo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (II), anteriormente, y un residuo monómero funcionalizado con ceto que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (III), anteriormente.

Opcionalmente, el residuo monómero funcionalizado con epóxido se encuentra presente y comprende menos de aproximadamente 10% en peso del residuo monómero de halógeno seleccionado de cloro, bromo y yodo. Opcionalmente, el residuo monómero puede comprender menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, o menos de aproximadamente 1% de halógeno seleccionado de cloro, bromo y yodo, en peso del residuo monómero.

Opcionalmente, el polímero comprende además por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura opcionalmente sustituida que se representa mediante la fórmula (XI), anteriormente.

Opcionalmente, un polímero comprende por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (IV), y uno o más de entre:

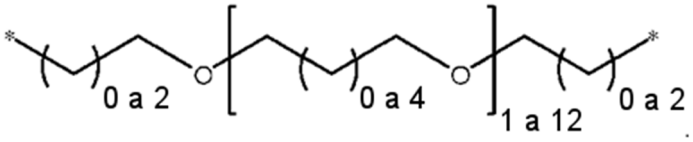
un residuo monómero funcionalizado con propargilo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (II), anteriormente, y un residuo monómero funcionalizado con ceto que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (III), anteriormente. Opcionalmente, el polímero comprende además por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura opcionalmente sustituida que se representa mediante la fórmula (XI), anteriormente. Opcionalmente, dicho por lo menos un residuo monómero presentan una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (VIII), anteriormente.

Opcionalmente, m puede ser un número entero entre 0 y 6, entre 1 y 6, entre 0 y 5, entre 1 y 5, entre 0 y 4, entre 1 y 4, entre 0 y 3, entre 1 y 3, entre 0 y 2, entre 1 y 2, 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Opcionalmente, m' puede ser un número entero entre 0 y 6, entre 1 y 6, entre 0 y 5, entre 1 y 5, entre 0 y 4, entre 1 y 4, entre 0 y 3, entre 1 y 3, entre 0 y 2, entre 1 y 2, 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Opcionalmente, m^1 puede ser un número entero entre 0 y 6, entre 1 y 6, entre 0 y 5, entre 1 y 5, entre 0 y 4, entre 1 y 4, entre 0 y 3, entre 1 y 3, entre 0 y 2, entre 1 y 2, 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Opcionalmente, $m^{1'}$ puede ser un número entero entre 0 y 6, entre 1 y 6, entre 0 y 5, entre 1 y 5, entre 0 y 4,

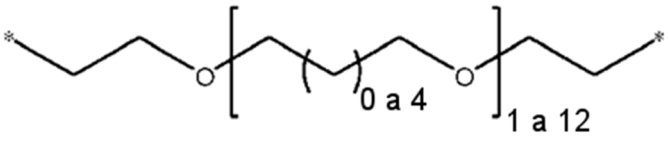
entre 1 y 4, entre 0 y 3, entre 1 y 3, entre 0 y 2, entre 1 y 2, 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Opcionalmente, n puede ser un número entero entre 0 y 2, entre 1 y 2, entre 0 y 1, o 0, 1 o 2. Opcionalmente, n' puede ser un número entero entre 0 y 2, entre 1 y 2, entre 0 y 1, o 0, 1 o 2. Opcionalmente, n^1 puede ser un número entero entre 0 y 2, entre 1 y 2, entre 0 y 1, o 0, 1 o 2. Opcionalmente, $n^{1'}$ puede ser un número entero entre 0 y 2, entre 1 y 2, entre 0 y 1, o 0, 1 o 2. Opcionalmente, n^2 puede ser un número entero entre 0 y 2, entre 1 y 2, entre 0 y 1, o 0, 1 o 2. Opcionalmente, n^3 puede ser un número entero entre 0 y 2, entre 1 y 2, entre 0 y 1, o 0, 1 o 2.

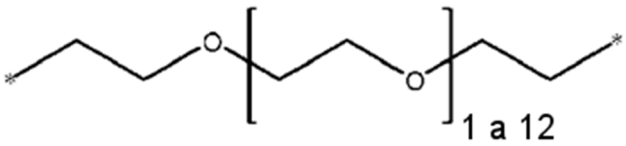
R^L puede seleccionarse de alquilo sustituido opcionalmente y alcoxileno sustituido opcionalmente. Entre los alquilos adecuados se incluyen radicales orgánicos divalentes seleccionados de etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, decilo, dodecilo, hexadecilo y alquilo superior. Entre los alcoxilenos adecuados se incluyen radicales orgánicos seleccionados de grupos que presentan una estructura por la fórmula:



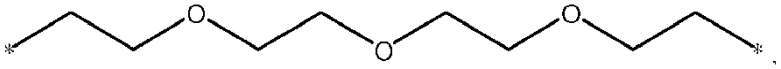
Entre los alcoxilenos adecuados adicionales se incluyen radicales orgánicos seleccionados de grupos que presentan una estructura por la fórmula:



O



Entre los alcoxilenos adecuados adicionales se incluyen un radical orgánico divalente que presenta una estructura por la fórmula:



que puede derivarse de 2,2-(etilén-dioxi)bis(etilamina) o 2,2-(etilén-dioxi)bis(etilazida).

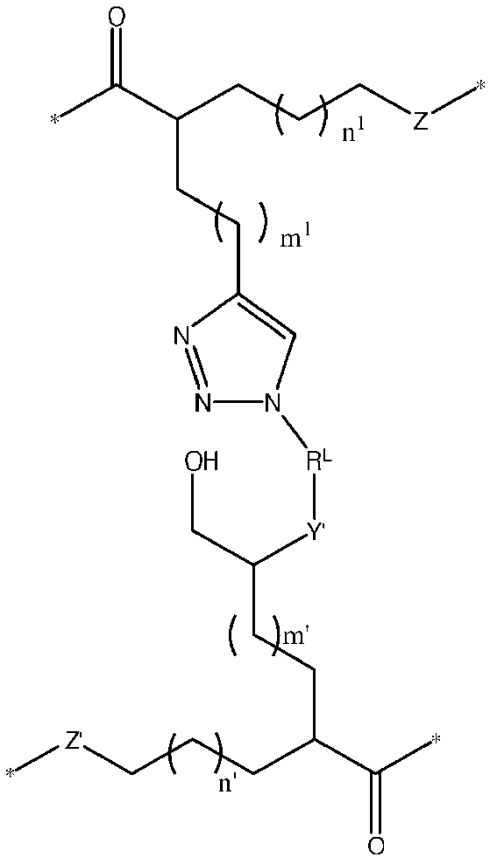
Opcionalmente, un polímero puede comprender por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (V), anteriormente, y uno o más de entre:

un residuo monómero funcionalizado con epóxido que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (I), anteriormente, y un residuo monómero funcionalizado con ceto que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (II), anteriormente. Opcionalmente, el residuo monómero funcionalizado con epóxido se encuentra presente y comprende menos de aproximadamente 10% en peso del residuo monómero de halógeno seleccionado de cloro, bromo y yodo.

Opcionalmente, el polímero comprende además por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura opcionalmente sustituida que se representa mediante la fórmula (XI), anteriormente.

Opcionalmente, por lo menos un residuo monómero presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (IX), anteriormente.

Opcionalmente, por lo menos un residuo monómero presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula:



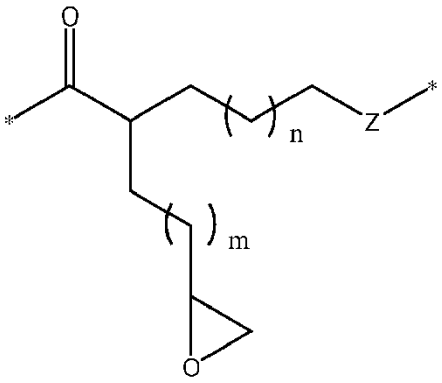
en la que m^1 y m' son, independientemente, números enteros entre 0 y 6; en el que n^1 y n' son, independientemente, número enteros entre 0 y 2; y en el que Z y Z' son, independientemente, O o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6; y en el que Y' es O, S, o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6; en el que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido opcionalmente y alcoxileno sustituido opcionalmente.

C. Nanopartículas degradables

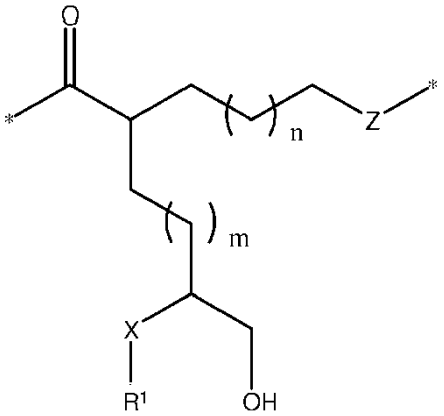
Se entiende que las nanopartículas dadas a conocer pueden utilizarse en relación a los polímeros dados a conocer y métodos dados a conocer. A menos que se indique lo contrario, las estructuras dadas a conocer pueden utilizarse en relación a los métodos dados a conocer, los polímeros dados a conocer y las nanopartículas dadas a conocer.

En un aspecto, la presente invención proporciona una nanopartícula polimérica degradable que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (VIII), anteriormente, en la que la nanopartícula presenta un tamaño de partícula de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 850 nm, que se comenta en la presente memoria. Según un aspecto particular de la presente invención, la nanopartícula comprende además por lo menos un residuo monómero seleccionado de un residuo monómero funcionalizado con propargilo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (II), anteriormente; un residuo monómero funcionalizado con ceto que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (III), anteriormente; y un residuo monómero funcionalizado que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (XI), anteriormente.

Según un aspecto particular de la presente invención, la nanopartícula comprende además por lo menos un residuo monómero funcionalizado con epóxido que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula



Según un aspecto particular de la presente invención, la nanopartícula comprende además por lo menos un residuo monómero funcionalizado que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula

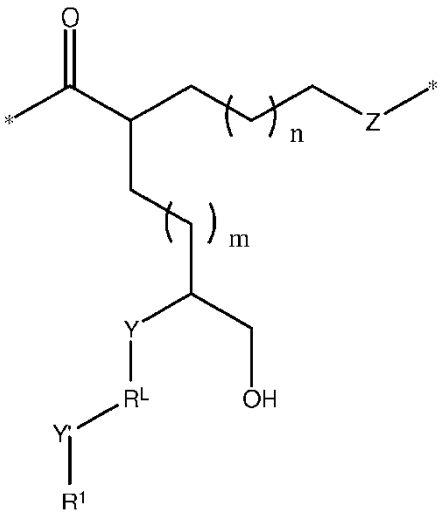


en la que X es OH, SH, NH_2 o NHR, en la que R es H o alquilo C1 a C6, y en la que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono.

Opcionalmente, R^1 se sustituye adicionalmente con por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes.

Opcionalmente, la nanopartícula comprende además por lo menos un residuo monómero funcionalizado con nucleófilo que presenta una estructura opcionalmente sustituida que se representa mediante la fórmula (VII), anteriormente.

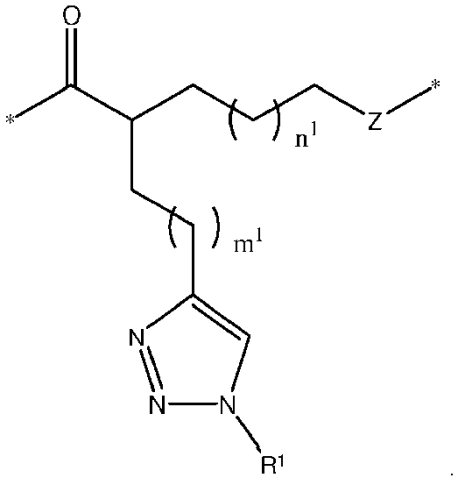
Opcionalmente, la nanopartícula comprende además por lo menos un residuo monómero funcionalizado que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula:



en la que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono.

Opcionalmente, R^1 se sustituye adicionalmente con por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes.

Según un aspecto particular de la presente invención, la nanopartícula comprende además por lo menos un residuo monómero funcionalizado que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula



en la que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono. Opcionalmente, R^1 se sustituye adicionalmente con por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes.

D. Métodos

Se entiende que los métodos dados a conocer pueden utilizarse en relación a los polímeros dados a conocer y nanopartículas dadas a conocer. A menos que se indique lo contrario, las estructuras dadas a conocer pueden utilizarse en relación a los métodos dados a conocer, los polímeros dados a conocer y las nanopartículas dadas a conocer.

1. Métodos de producción de polímero

Para resolver las deficiencias de las composiciones de nanopartículas y métodos convencionales, se resolvió la disponibilidad de nuevos poliésteres funcionales que permiten enfoques de modificación ortogonal. Además, se dan a conocer estrategias de entrecruzamiento de cadenas controlado para obtener nanopartículas diferentes en una diversidad de dimensiones nanoscópicas. En contraste con la investigación de técnicas de emulsificación en solvente [Hans, M. L.; Lowman, A. M. Curr. Opin. Solid State Mater. Sci. 6, 319-327, 2002.] o los métodos de emulsificación-difusión [Kallinteri, P.; Higgins, S.; Hutcheon, G. A.; St. Pourcain, C. B.; Garnett, M. C. Biomacromolecules 6, 1885-1894, 2005] que requieren surfactantes o sales, los métodos y composiciones dados a conocer implican técnicas de entrecruzamiento controlado.

Puede proporcionarse una entidad de entrecruzamiento limpia y no tóxica a partir de grupos epóxido que reaccionan con dinucleófilos (p.ej., diaminas) para formar grupos -OH de alcano. Aunque se ha utilizado esta unidad de entrecruzamiento para formar micropartículas basadas en acrilato [Burke, S. K.; Slatopolsky, E. A.; Goldberg, D. I., Nephrol. Dial. Transplant. 12, (8), 1640-1644, 1997], en ningún caso se ha investigado la formación de nanopartículas degradables debido a la falta de precursores lineales adecuados.

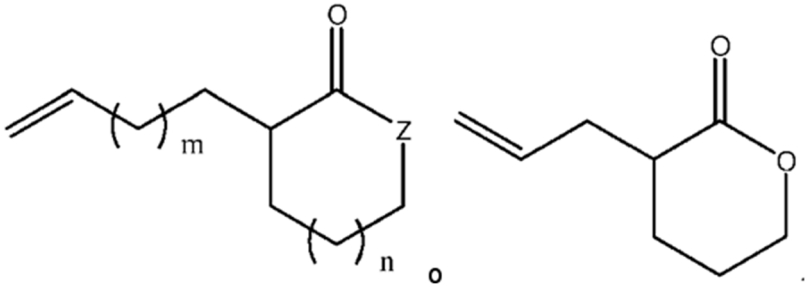
La entidad epóxido para la formación de nanopartículas entrecruzadas discretas puede integrarse mediante polimerización de un copolímero lineal de peso molecular bajo, Ab, con grupos alilo colgantes. Ver la figura 1. Los grupos alilo colgantes representan valiosos intermediarios a muchos grupos funcionales y pueden incorporarse en el esqueleto del polímero mediante copolimerización de α-alil-δ-valerolactona, (b), y δ-valerolactona disponible comercialmente, (A), mediante polimerización de apertura de anillos (PAA). [Parrish, B.; Quansah, J. K.; Emrick, T. J. Polym. Sci. Parte A: Polym. Chem. 40:1983-1990, 2002]. Con la copolimerización, los grupos alilo colgantes pueden oxidarse mediante una oxidación de Baeyer-Villiger con ácido meta-cloroperbenzoico (m-CPBA) para convertir los dobles enlaces en anillos epóxido, que entonces se convierten en un grupo de acoplamiento en la preparación de las nanopartículas. [(a) Mecerreyes, D.; Miller, R. D.; Hedrick, J. L.; Detrembleur, C.; Jerome, R. J. Polym. Sci. Parte A: Polym. Chem. 38:870-875, 2000. (b) Latere, J.P.;

Lecomte, P.; Dubois, P.; Jérôme, R. Macromolecules 35, 7857-7859, 2002]. El artículo de F "Functionalization of poly(epsilon-caprolactone) by pendant hydroxyl, carboxylic acid and epoxide groups by atom transfer radical addition", Polymer, páginas 8511-8518, 8 de septiembre de 2005, describe la funcionalización de una cadena poliéster biodegradable (poli(ε-caprolactona) con grupos hidroxilo, ácido carboxílico y epóxido. Para introducir grupos funcionales adicionales en la nanopartícula, pueden sintetizarse monómeros adicionales, por ejemplo α-propargil-δ-valerolactona, (C), y 2-oxepán-1,5-diona, (D). A continuación, estos monómeros pueden copolimerizarse individualmente con (B) y δ-valerolactona, (A), de una manera similar a Ab**,** dando lugar a poliésteres lineales con funcionalidades propargilo o ceto adicionales, respectivamente. Para incrementar el número de funcionalidades que permiten enfoques de modificación ortogonal, se copolimerizaron (C) y (D) juntos con (b) y δ-valerolactone (A), tal como se resume en la figura 1. Los copolímeros se obtuvieron típicamente en intervalos de peso molecular de 3500 a 4800 Da con polidispersidades estrechas, de 1.17 a 1.27. En la presente memoria se comenta un método para preparar un polímero, que comprende la etapa de copolimerizar una mezcla de dos o más de un monómero funcionalizado con alqueno que proporciona un residuo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (VI), anteriormente; un monómero funcionalizado con propargilo que proporciona un residuo sustituido opcionalmente que se representa mediante la fórmula (II), anteriormente, y un monómero funcionalizado con ceto que proporciona un residuo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (III), anteriormente.

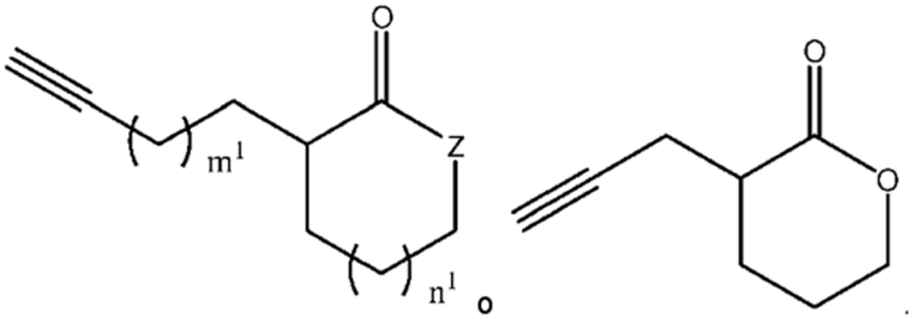
Opcionalmente, la mezcla comprende además por lo menos un monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (XI), anteriormente.

Opcionalmente, el monómero funcionalizado con alqueno se encuentra presente y el método comprende además la etapa de oxidar el polímero resultante para proporcionar un residuo monómero funcionalizado con epóxido que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (I), anteriormente.

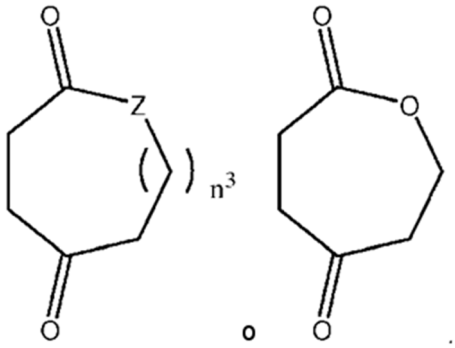
Opcionalmente, el monómero funcionalizado con alqueno se encuentra presente y presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula:



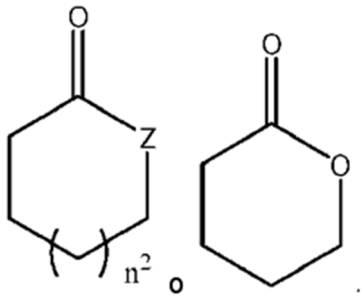
Opcionalmente, el monómero funcionalizado con propargilo se encuentra presente y presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula:



Opcionalmente, el monómero funcionalizado con ceto se encuentra presente y presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula:



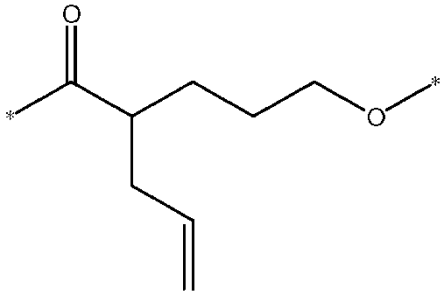
Opcionalmente, el monómero que proporciona un residuo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (XI) presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula:



En la presente memoria se comenta un método para preparar un polímero funcionalizado con epóxido que comprende la etapa de oxidar un polímero que presenta por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (VI), anteriormente.

Opcionalmente, el polímero comprende además por lo menos un residuo monómero seleccionado: la fórmula (II), anteriormente; la fórmula (XI), anteriormente, y la fórmula (III), anteriormente.

Opcionalmente, por lo menos un residuo monómero presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (VI), anteriormente, en el que Z es O. Por ejemplo, opcionalmente, m es 1 y n es 0, proporcionando una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula:



Opcionalmente, el polímero funcionalizado con epóxido presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (I).

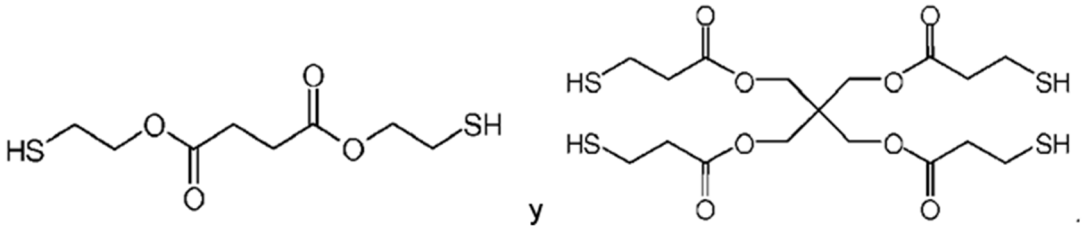
2. Métodos de entrecruzamiento

Se comenta en la presente memoria un método para entrecruzar un polímero que comprende la etapa de hacer reaccionar un polímero que comprende por lo menos un residuo monómero seleccionado de un residuo monómero funcionalizado con epóxido que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (I), anteriormente, y un residuo monómero funcionalizado con propargilo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (II), anteriormente, con un entrecruzante que presenta la estructura por la fórmula X-R^L-X', en la que X y X' son, independientemente, N_3, OH, SH, NH_2 o NHR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, y en el que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido opcionalmente y alcoxileno sustituido opcionalmente.

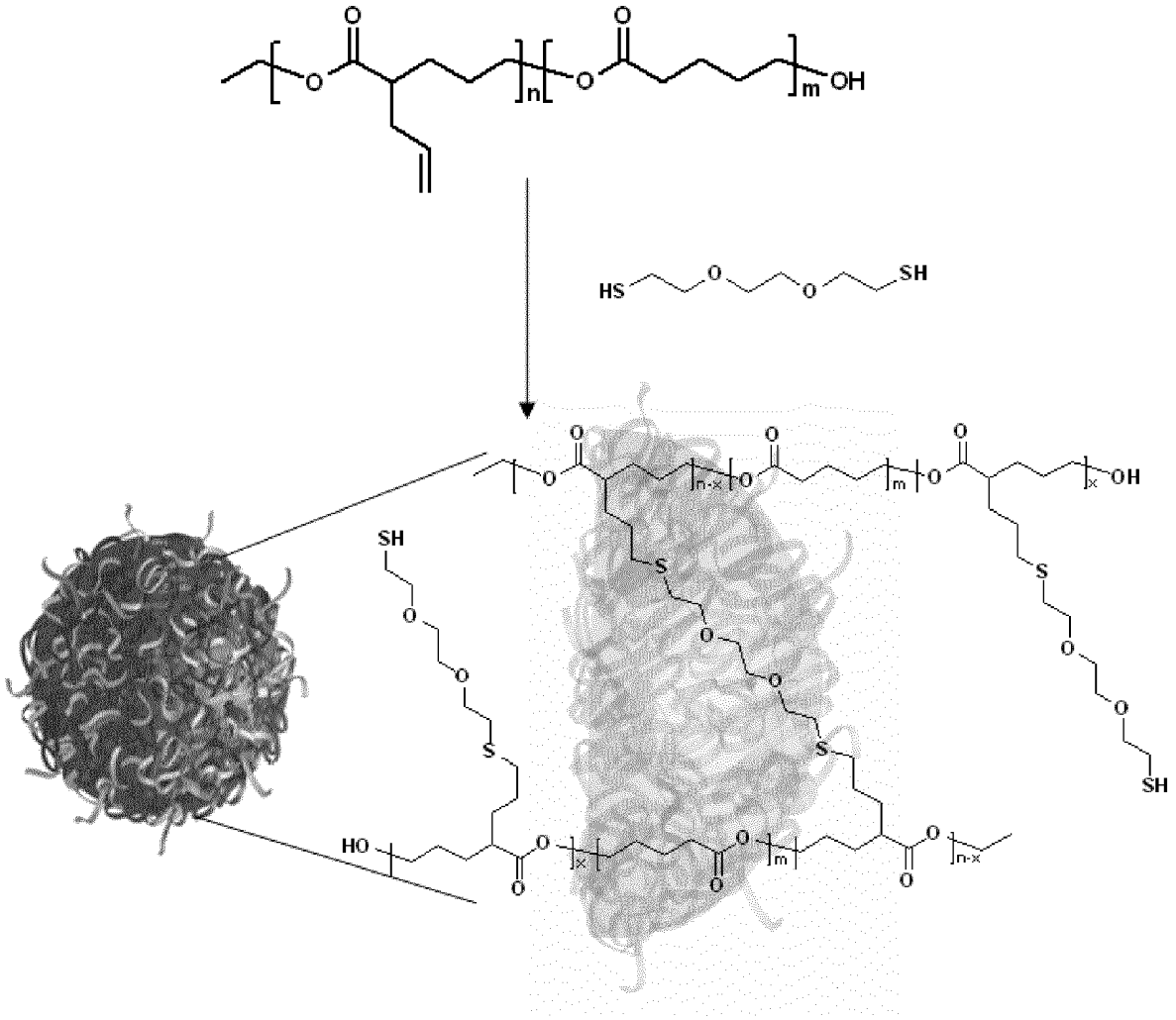
Opcionalmente, los grupos conectores pueden ser compuestos bis-nucleofílicos (p.ej., diamina) óxidos de alquileno (p.ej., diamino poli(óxido de etileno)) y/o alquilos (p.ej., 1,8-diaminooctano; jeтamınas) y sus derivados.

Opcionalmente, los grupos conectores pueden ser tioles. Por ejemplo, el dinucleófilo puede presentar una estructura X-R^L-X', en la que X y X' son, cada uno, SH, en el que R es H o alquilo C1 a C6, y en la que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido opcionalmente, alcoxileno sustituido opcionalmente y ésteres sustituidos opcionalmente.

Entre los tioles adecuados para el entrecruzamiento se incluyen análogos monotiol y ditiol de compuestos derivados de óxidos de alquileno (p.ej., diamino poli(óxidos de etileno)) y/o alquilos (p.ej., 1,8-diaminooctano, jefaminas) y sus derivados. Entre otros ditioles adecuados para el entrecruzamiento se incluyen:



Una reacción de entrecruzamiento ejemplar, un producto ejemplar del mismo, se muestra a continuación:



Opcionalmente, el entrecruzante reacciona con dos cadenas de polímero. Opcionalmente, X-R^L-X' reacciona con dos residuos monómero funcionalizados con epóxido. Opcionalmente, X-R^L-X' reacciona con dos residuos monómero funcionalizados con propargilo. Opcionalmente, X-R^L-X' reacciona con un residuo monómero funcionalizado con epóxido y un residuo monómero funcionalizado con propargilo. Opcionalmente, X=X'.

Opcionalmente, X=X'=NH_2. Opcionalmente, R^L comprende dos o más residuos de óxido de etilenc trimetileno. Opcionalmente, X-R^L-X' es 2,2-(etilén-dioxi)bis(etilamina). Opcionalmente, X=X'=N_3.

Opcionalmente, el polímero comprende por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante una fórmula (I), anteriormente, y en la que X=X'=NH_2. Opcionalmente, el polímero y el entrecruzante se hacen reaccionar en una proporción de aproximadamente 1:1 (polímero:entrecruzante). Opcionalmente, el polímero y el entrecruzante se hacen reaccionar en una proporción de aproximadamente >1:1 (polímero:entrecruzante) para proporcionar un polímero con exceso de funcionalización con epóxido. Opcionalmente, el polímero y el entrecruzante se hacen reaccionar en una proporción de aproximadamente <1:1 (polímero:entrecruzante) para proporcionar un polímero con exceso de funcionalización con amino.

Opcionalmente, el polímero comprende por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (II), anteriormente, y en la que X=X'=NH_3. Opcionalmente, el polímero y el entrecruzante se hacen reaccionar en una proporción de aproximadamente 1:1 (polímero:entrecruzante). Opcionalmente, el polímero y el entrecruzante se hacen reaccionar en una proporción de aproximadamente >1:1 (polímero:entrecruzante) para proporcionar un polímero con exceso de funcionalización con alquino. Opcionalmente, el polímero y el entrecruzante se hacen reaccionar en una proporción de aproximadamente <1:1 (polímero:entrecruzante) para proporcionar un polímero con exceso de funcionalización con azida.

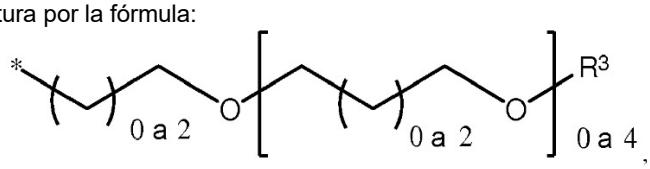
Opcionalmente, el polímero comprende además por lo menos un monómero funcionalizado con ceto, proporcionando un residuo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (III), anteriormente.

Opcionalmente, el polímero comprende además por lo menos un monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (XI), anteriormente.

3. Métodos de funcionalización de polímeros

Se comenta en la presente memoria un método para funcionalizar un polímero, que comprenden la etapa de hacer reaccionar un residuo monómero funcionalizado con epóxido que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (I), anteriormente, con un nucleófilo que presenta la estructura por la fórmula X-R^1, en la que X es OH, SH, NH_2 o NHR, en el que R es H o alquilo C1 a C6; y en el que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende 1 a 24 átomos de carbono.

Entre los radicales orgánicos adecuados para la utilización como R^1 se incluyen radicales orgánicos monovalentes sustituidos o no sustituidos seleccionados de etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, decilo, dodecilo, hexadecilo y alquilos superiores. El alquilo puede ser lineal o ramificado y puede ser cíclico o acíclico. Opcionalmente, R^1 puede comprender un alcoxileno sustituido opcionalmente. Entre los alcoxilenos adecuados se incluyen radicales orgánicos monovalentes sustituidos o no sustituidos seleccionados de grupos que presentan una estructura por la fórmula:



en la que R^3 comprende alquilo C1 a C6.

Opcionalmente, R^1 se sustituye adicionalmente con por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes, proporcionando de esta manera un método conveniente para funcionalizar el polímero con uno o más agentes biológicamente activos, agentes farmacéuticamente activos y/o fracciones de obtención de imágenes mediante una reacción de sustitución nucleofílica. Es decir, R^1 puede comprender por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes. Opcionalmente, R^1 puede comprender por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes. Opcionalmente, R^1 puede unirse covalentemente con por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes.

Un método para funcionalizar un polímero puede comprender opcionalmente la etapa de hacer reaccionar un residuo monómero funcionalizado con propargilo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (II), anteriormente, con una azida que presenta la estructura por la fórmula N_3-R^1, en la que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono. Opcionalmente, R^1 se sustituye adicionalmente con por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos

un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes.

Un método para funcionalizar un polímero puede comprender opcionalmente las etapas de hacer reaccionar un monómero funcionalizado con ceto que proporciona un residuo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (III), con una amina que presenta una estructura por la fórmula H_2N-R^1, en la que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono, y reducir la imina resultante. Opcionalmente, la etapa de reacción y la etapa de reducción se llevan a cabo simultáneamente. Opcionalmente, R^1 se sustituye adicionalmente con por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes.

Un método para funcionalizar un polímero puede comprender opcionalmente la etapa de hacer reaccionar un residuo monómero funcionalizado con nucleófilo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (VII), anteriormente, con un electrófilo que presenta la estructura por la fórmula E-R^1, en la que E es una fracción electrofílica, y en la que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono.

Opcionalmente, Y' es NH_2 o NHR. Opcionalmente, en la que Y=Y'. Opcionalmente, la fracción electrofílica se selecciona de entre haluro de alquilo, pseudohaluro de alquilo y derivado carboxilo. Opcionalmente, R^1 se sustituye adicionalmente con por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes.

4. Métodos de producción de nanopartículas

La formación de nanopartículas en dimensiones de tamaño controlado puede realizarse a partir de polímeros lineales que contienen grupos epóxido colgantes que se entrecruzan con 2,2'-(etilén-dioxi)bis(etilamina). Para evaluar la formación de partículas bajo condiciones controladas, se estudiaron reacciones en las que los equivalentes de entrecruzante diamina se incrementaron linealmente con respecto a los grupos epóxido reactivos de los polímeros.

Para conseguir un grado elevado de entrecruzamiento entre las cadenas de poliéster individuales, la solución de polímero con las entidades epóxido colgantes puede añadirse gota a gota a una solución bajo reflujo de diferentes equivalentes de dinucleófilo (p.ej., diamina) en diclorometano. En esta estrategia, la amina difuncional se encuentra en amplio exceso durante la adición (13 ml/min) de la solución de polímero lineal (0,5 M) y, de esta manera, proporciona reacciones de entrecruzamiento óptimas (Tabla 1; tamaño de partícula informado en nm de diámetro mediante dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) en relación a proporciones de amina variables).

Tabla 1: dimensiones de tamaño de partícula (nm)

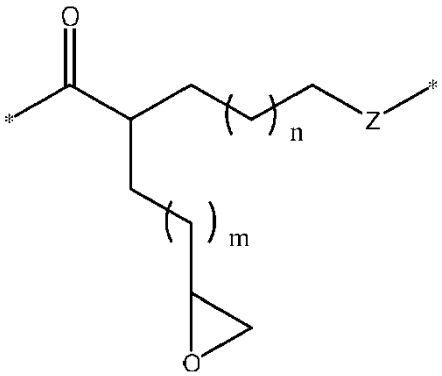
Amina/ 1 Epóxido	Diámetro (nm) Poli(vl-evl) **AB**	Diámetro (nm) Poli(vl-evl-opd) **ABD**	Diámetro (nm) Poli(vl-evl-pvl) **ABC**
1	30.71 ± 2.21	34.29 ± 3.22	21.40 ± 2.90
2	58.06 ± 6.20	63.46 ± 7.68	41.70 ± 5.36
3	82.1 ± 5.73	118.3 ± 13.6	114.9 ± 8.9
4	115.6 ± 25.4	164.9 ± 65.7	148.3 ± 25.2
5	255.7 ± 60.3	292.7 ± 80.3	186.1 ± 37.5
6	342.2 ± 52.2	341.0 ± 86.6	253.9 ± 41.4
8	425.1 ± 100	525.0 ± 100	472.1 ± 103.1
10	725.1 ± 94.3	800.0 ± 135	675.0 ± 126.1

Amina/ 1 Epóxido	Diámetro (nm) Nanopartículas AB_1[a]	$M_{w,RI}$ (g/mol)[b]	PDI[c]	M_w (kg/mol)[d]
1	30.71 ± 2.21	3403	1.16	60.5 ± 3.5
2	58.06 ± 6.20	3445	1.16	81.5 ± 4.6
3	82.61 ± 5.73	3544	1.17	96.1 ± 4.9
4	115.6 ± 12.5	3860	1.18	112 ± 6
5	255.7 ± 26.9	4005	1.18	187 ± 8
6	342.2 ± 42.2	4267	1.21	222 ± 11
8	425.1 ± 44.6	4470	1.21	328 ± 15
10	725.1 ± 94.3	4887	1.22	525 ± 28

La primera prueba se utilizó con polímero (AB) e implementó 1 a 10 equivalentes de funcionalidades amina a la entidad de entrecruzamiento con epóxido colgante. Las partículas resultantes se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), que proporciona el tamaño real, y mediante dispersión de luz dinámica (DLS), para obtener el diámetro hidrodinámico como medida representativa de la partícula bajo condiciones fisiológicas. Se muestran en la figura 2 micrografías de nanopartículas representativas. También se encuentra contemplado que pueda seleccionarse la estequiometría de la reacción para utilizar más de diez (10) equivalentes, proporcionando de esta manera micropartículas, materiales para el uso en ingeniería de tejidos y biogeles en aplicaciones y dispositivos médicos.

Tal como se ilustra en la figura 3, el tamaño de partícula se incrementa en tendencia polinómica a medida que se incrementan los equivalentes de amina. Por ejemplo, dos equivalentes de amina rindieron partículas de 58 nm y cinco equivalentes produjeron partículas con dimensiones de 255 nm (Tabla 1). Se encontró que los polímeros lineales sintetizados que contenían funcionalidades adicionales (ABC y ABD) respondían de la misma manera a las condiciones controladas de entrecruzamiento de cadenas intermoleculares, tal como con el polímero (AB) de la prueba original, y se obtuvieron nanopartículas bien definidas (Tabla 1). Tal como se muestra en la figura 4, la caracterización de las partículas con RMN ^1H confirmó la formación de nanopartículas para cada prueba con un incremento de las señales a 3.5 y 2.89 ppm, correspondiente a protones vecinos de la amina secundaria del conector polietilenglicol (PEG) después de un suceso de entrecruzamiento con éxito. En particular, se observó un desplazamiento de la resonancia de 2.86 a 2.89 ppm debido al cambio de amina primaria a amina secundaria después del entrecruzamiento. En consecuencia, el incremento continuo de equivalentes de entrecruzante amina no sólo se extiende al tamaño de partícula, sino que también introduce funcionalidades amina adicionales conectadas a un conector PEG corto que se encuentran disponibles para estrategias de modificación adicionales.

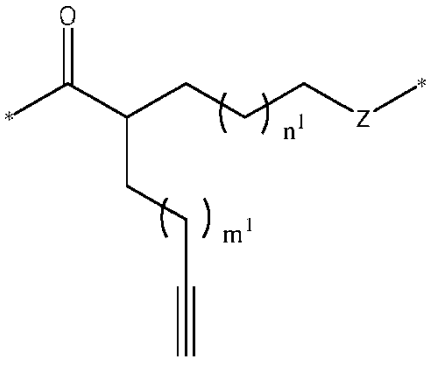
En un aspecto particular, la presente invención se refiere a un método para preparar una nanopartícula degradable, que comprende la etapa de añadir un polímero que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura por la fórmula:



en la que Z es O o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, en el que m es un número entero entre 0 y 6, y en el que n es un número entero entre 0 y 2; a una solución de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 equivalentes molares de un dinucleófilo (fracción nucleofílica:funcionalidad epóxido) que presenta la estructura X-R^L-X', en la que X y X' son independientemente OH, SH, NH_2 o NHR, en la que R es H o alquilo C1 a C6, y en el que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido opcionalmente y alcoxileno sustituido opcionalmente. En un aspecto adicional, el residuo monómero comprende menos de aproximadamente 10% en peso del residuo monómero de halógeno seleccionado de cloro, bromo y yodo. En un aspecto adicional, Z es O.

En un aspecto, la solución comprendía desde aproximadamente 1 equivalente molar de un dinucleófilo (fracción nucleofílica: funcionalidad epóxido) y la nanopartícula resultante presentaba un tamaño de partícula de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 55 nm. En un aspecto adicional, la solución comprende entre aproximadamente 1 equivalente molar de un dinucleófilo (fracción nucleofílica: funcionalidad epóxido) y la nanopartícula resultante presenta un tamaño de partícula de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 55 nm. En un aspecto adicional, la solución comprende entre aproximadamente 2 equivalentes molares de un dinucleófilo (fracción nucleofílica: funcionalidad epóxido) y la nanopartícula resultante presenta un tamaño de partícula de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 80 nm. En un aspecto adicional, la solución comprende entre aproximadamente 3 equivalentes molares de un dinucleófilo (fracción nucleofílica: funcionalidad epóxido) y la nanopartícula resultante presenta un tamaño de partícula de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 120 nm. En un aspecto adicional, la solución comprende entre aproximadamente 4 equivalentes molares de un dinucleófilo (fracción nucleofílica: funcionalidad epóxido) y la nanopartícula resultante presenta un tamaño de partícula de aproximadamente 110 nm a aproximadamente 170 nm. En un aspecto adicional, la solución comprende entre aproximadamente 5 equivalentes molares de un dinucleófilo (fracción nucleofílica: funcionalidad epóxido) y la nanopartícula resultante presenta un tamaño de partícula de aproximadamente 175 nm a aproximadamente 300 nm. En un aspecto adicional, la solución comprende entre aproximadamente 6 equivalentes molares de un dinucleófilo (fracción nucleofílica: funcionalidad epóxido) y la nanopartícula resultante presenta un tamaño de partícula de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 350 nm. En un aspecto adicional, la solución comprende entre aproximadamente 8 equivalentes molares de un dinucleófilo (fracción nucleofílica: funcionalidad epóxido) y la nanopartícula resultante presenta un tamaño de partícula de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 550 nm. En un aspecto adicional, la solución comprende entre aproximadamente 10 equivalentes molares de un dinucleófilo (fracción nucleofílica: funcionalidad epóxido) y la nanopartícula resultante presenta un tamaño de partícula de aproximadamente 650 nm a aproximadamente 850 nm. También se encuentra contemplado que la estequiometría de la reacción pueda seleccionarse para utilizar más de diez (10) equivalentes molares, proporcionando de esta manera tamaños de partícula mayores.

En la presente memoria se divulga además un método para preparar una nanopartícula degradable que comprende la etapa de añadir un polímero que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura por la fórmula:



en la que Z es O o NR, en la que R es H o alquilo C1 a C6, en el que m^1 es un número entero entre 0 y 6, y en el que n^1 es un número entero entre 0 y 2, a una solución de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 equivalentes molares de una bis-azida (fracción azida:funcionalidad alquino) que presenta la estructura N_3-R^L-N_3, en la que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido opcionalmente y alcoxileno sustituido opcionalmente. El residuo monómero comprende menos de aproximadamente 10% en peso del residuo monómero de halógeno seleccionado de cloro, bromo y yodo. En un aspecto adicional, Z es O.

En la presente memoria se comenta un método para controlar el tamaño de partícula durante la preparación de una nanopartícula degradable, que comprende la etapa de añadir un polímero funcionalizado con epóxido a una solución de un entrecruzante dinucleofílico, en el que la estequiometría del entrecruzante (proporción de fracción nucleofílica:funcionalidad epóxido) se selecciona para proporcionar un tamaño de partícula deseado según uno o más de los gráficos mostrados en figura 5 - figura 10.

5. Métodos de funcionalización de nanopartículas

En un aspecto, la invención se refiere a un método para preparar una nanopartícula degradable, que comprende funcionalizar una nanopartícula, comprendiendo la etapa de hacer reaccionar una nanopartícula que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (VIII), anteriormente, y que presenta un tamaño de partícula de entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 850 nm, comprendiendo además por lo menos un residuo monómero funcionalizado con epóxido que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (I), anteriormente, con un nucleófilo que presenta la estructura por la fórmula X-R^1, en la que X es OH, SH, NH_2 o NHR, en la que R es H o alquilo C1 a C6, y en la que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono. En un aspecto adicional, R^1 se sustituye adicionalmente con por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes. En un aspecto, la invención se refiere a un método para preparar una nanopartícula degradable, que comprende funcionalizar una nanopartícula, comprendiendo la etapa de hacer reaccionar una nanopartícula que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (VIII), anteriormente, y que presenta un tamaño de partícula de entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 850 nm, comprendiendo además por lo menos un residuo monómero funcionalizado con propargilo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (II), anteriormente, con una azida que presenta la estructura por la fórmula N_3-R^1, en la que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono. En un aspecto adicional, R^1 se sustituye adicionalmente con por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para preparar una nanopartícula degradable, que comprende funcionalizar una nanopartícula, comprendiendo las etapas de hacer reaccionar una nanopartícula que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (VIII), anteriormente, y que presenta un tamaño de partícula de entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 850 nm, comprendiendo además por lo menos un monómero funcionalizado con ceto que proporciona un residuo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (III), anteriormente, con una amina que presenta la estructura por la fórmula H_2N-R^1, en la que R^1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono, y reducir la imina resultante. En un aspecto adicional, la etapa de reacción y la etapa de reducción se llevan a cabo simultáneamente. En un aspecto adicional, R^1 se sustituye adicionalmente con por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para preparar una nanopartícula degradable que comprende funcionalizar una nanopartícula que comprende la etapa de hacer reaccionar una nanopartícula que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (VIII), anteriormente, y que presenta un tamaño de partícula de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 850 nm, que comprende además por lo menos un residuo monómero funcionalizado con nucleófilo que presenta una estructura sustituida opcionalmente que se representa mediante la fórmula (VII), anteriormente, con un electrófilo que presenta la estructura por la fórmula E-R^1, en la que E es una fracción electrofílica, y en la que R1 es un radical orgánico sustituido opcionalmente que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono. En un aspecto adicional, Y' es NH_2 o NHR. En un aspecto adicional, Y=Y'. En un aspecto adicional, la fracción electrofílica se selecciona de entre haluro de alquilo, pseudohaluro de alquilo y derivado de carboxilo. En un aspecto adicional, R^1 se sustituye adicionalmente con por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes.

6. Métodos de degradación de nanopartículas

En la presente memoria se comenta un método para degradar una nanopartícula degradable, que comprende

someter la nanopartícula a condiciones de reacción suficientes para hidrolizar un éster. Opcio condiciones son condiciones biológicas. Opcionalmente, las condiciones implican la exposición a una esterasa. Opcionalmente, las condiciones existen dentro de un organismo.

En la presente memoria se comenta un método para degradar un polímero degradable, que comprende someter el polímero a condiciones de reacción suficientes para hidrolizar un éster. Opcionalmente, el polímero degradable es un polímero divulgado o un producto de un método divulgado.

7. Métodos de administración intracelular

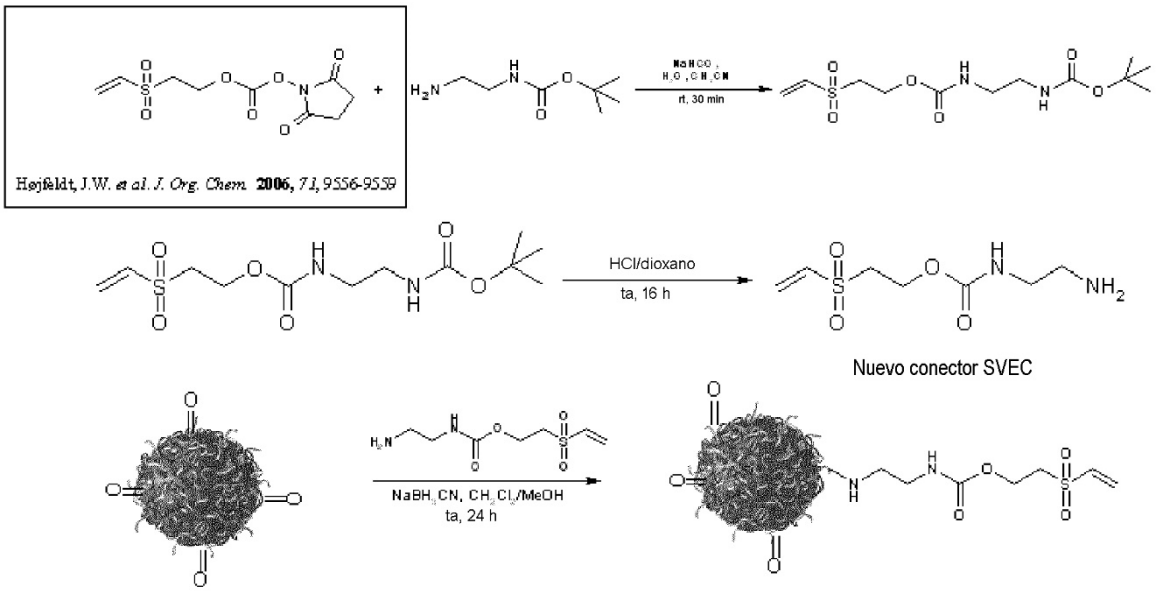
En la presente memoria se comenta un método de administración intracelular que comprenden administrar en un sujeto una cantidad eficaz de una nanopartícula dadivulga. Opcionalmente, la nanopartícula se sustituye adicionalmente con por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes. Opcionalmente, el método comprende además la etapa de degradar la nanopartícula.

En la presente memoria se comenta un método de administración intracelular que comprende administrar una cantidad eficaz de un polímero divulgado o producto de un método divulgado en un sujeto. Opcionalmente, el polímero o producto de un método divulgado se sustituye adicionalmente con por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes. Opcionalmente, el método comprende además la etapa de degradar el polímero o producto de un método divulgado.

E. Polímeros funcionalizados y nanopartículas

Opcionalmente, las nanopartículas dadas a conocer pueden funcionalizarse con, por ejemplo, compuestos dendriméricos. Es decir, puede producirse un conjugado de nanopartícula-dendrímero. Opcionalmente, la nanopartícula puede ser un punto cuántico orgánico divulgado mediante pliegue de cadenas intramoleculares. Opcionalmente, la nanopartícula puede ser una nanopartícula degradable divulgada. Opcionalmente, el dendrímero puede ser una composición de administración intracelular divulgada.

Tal como se divulga en la presente memoria, determinadas nanopartículas pueden portar funcionalidades electrofílicas (p.ej., cetona). Puede introducirse una funcionalidad vinilsulfonilo en las nanopartículas dadas a conocer. De esta manera, se preparó una fracción conectora vinilsulfonilo que podía unirse en un procedimiento de aminación reductora a grupos ceto de la partícula. La síntesis de dicho conector aparece en el esquema 1. Se entiende que la cadena alquilo puede homologarse mediante selección de reactivos apropiados.



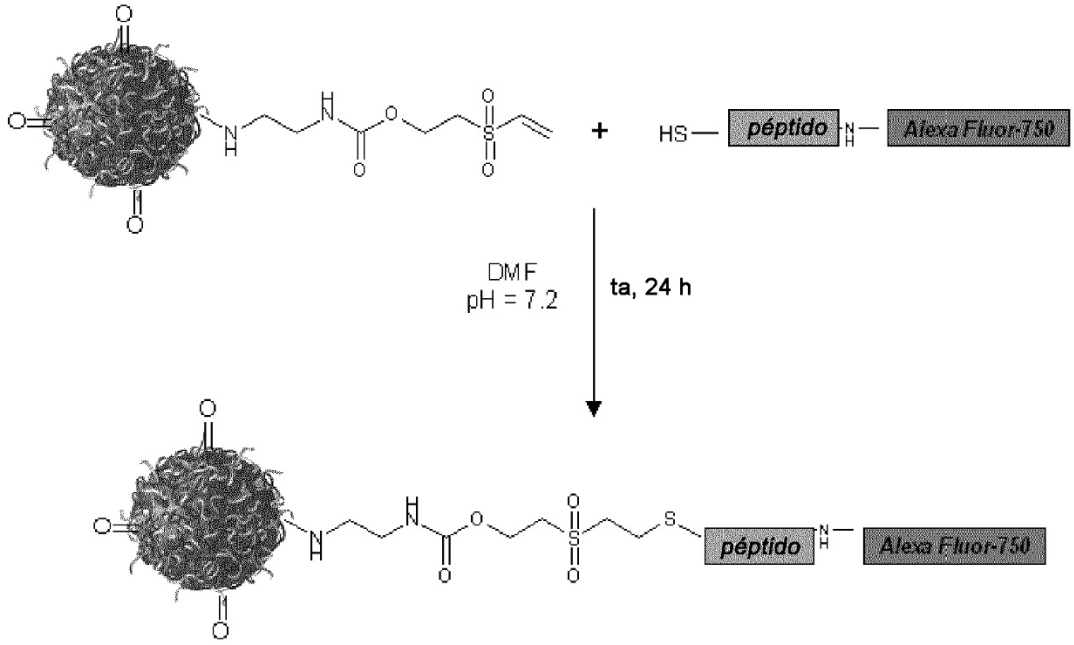
Esquema 1. Síntesis de conector SVEC (vinilsulfonilo-carbonato de etilo) y unión a la partícula

La fracción vinilsulfonilo reacciona fácilmente con un nucleófilo (p.ej., un tiol) para formar un enlace covalente, funcionalizando adicionalmente de esta manera una nanopartícula. Estos conectores pueden utilizarse para unir péptidos que se marcan con moléculas de pigmento en el punto focal del péptido u otros grupos amina del

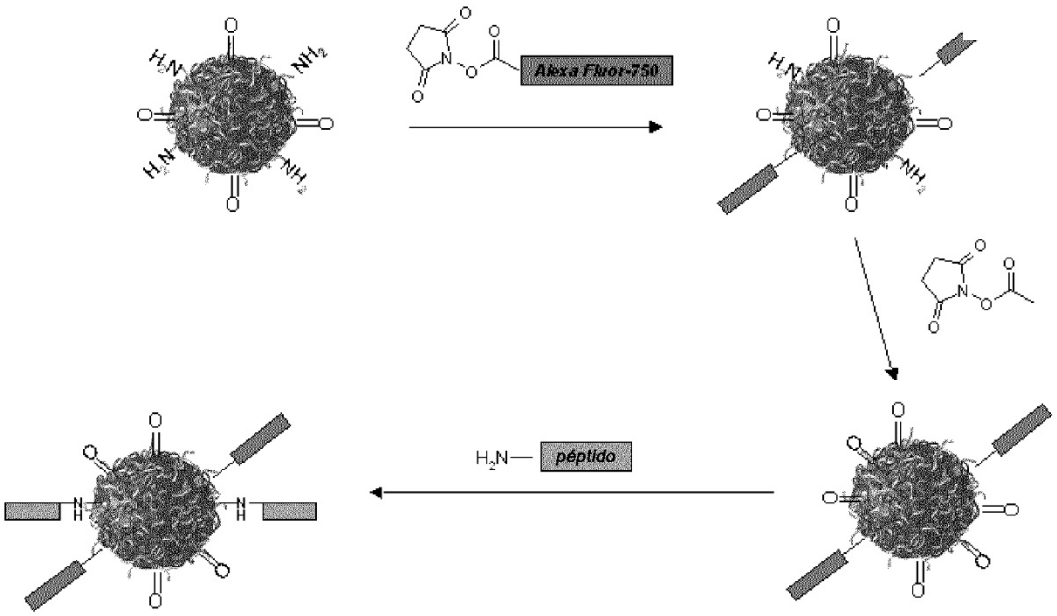
péptido. Los grupos tiol de las cisteínas pueden utilizarse para la unión a la función vinilc vinilsulfonilo. Además, el grupo tiol en el punto focal de los transportadores moleculares dendríticos dados a conocer puede unirse al grupo vinilsulfonilo (o alilo), permitiendo de esta manera unir un transportador a cualquier nanopartícula post-modificada.

Puede utilizarse la misma reacción para unir péptidos que no están marcados con pigmento. En tales casos, la partícula puede marcarse con pigmento o no marcarse.

Los péptidos (u otras aminas) también pueden unirse directamente mediante el extremo amino-terminal del péptido al grupo ceto mediante aminación reductora. Ver el esquema 2. En éste, resulta preferente que el péptido contenga únicamente un grupo amina. Antes de llevar a cabo la aminación reductora, la partícula puede marcarse con un pigmento que se añade a la funcionalidad amina de la partícula. Después de la reacción, pueden inhibirse los pigmentos residuales de manera que no interfieran con la aminación reductora siguiente.



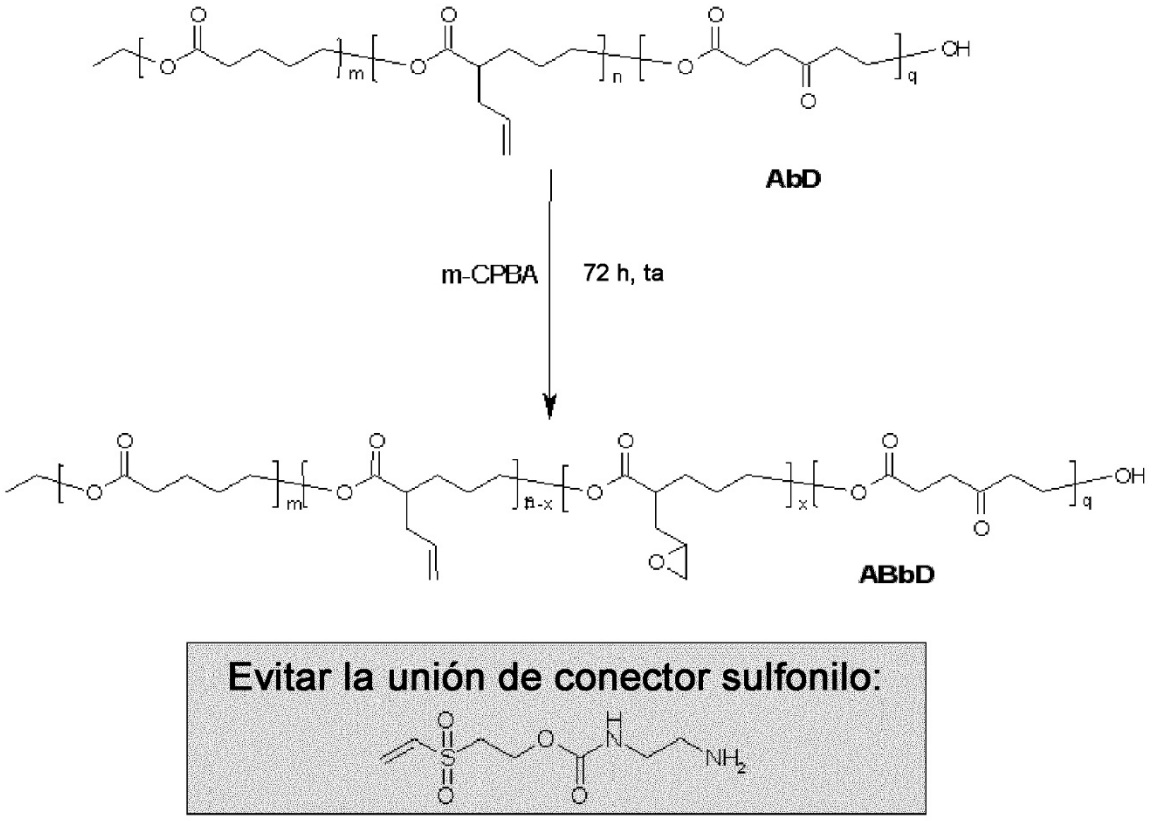
Esquema 2. Unión de péptido con grupo tiol integrado de cisteínas con partícula modificada con conector



Esquema 3. Unión de pigmento Alexa Fluor a grupos amina libres de la partícula (éster de NHS a amina) y desactivación de las aminas residuales antes de la aminación reductora de aminas de péptidos (compuestos bioactivos) en los grupos ceto de la partícula

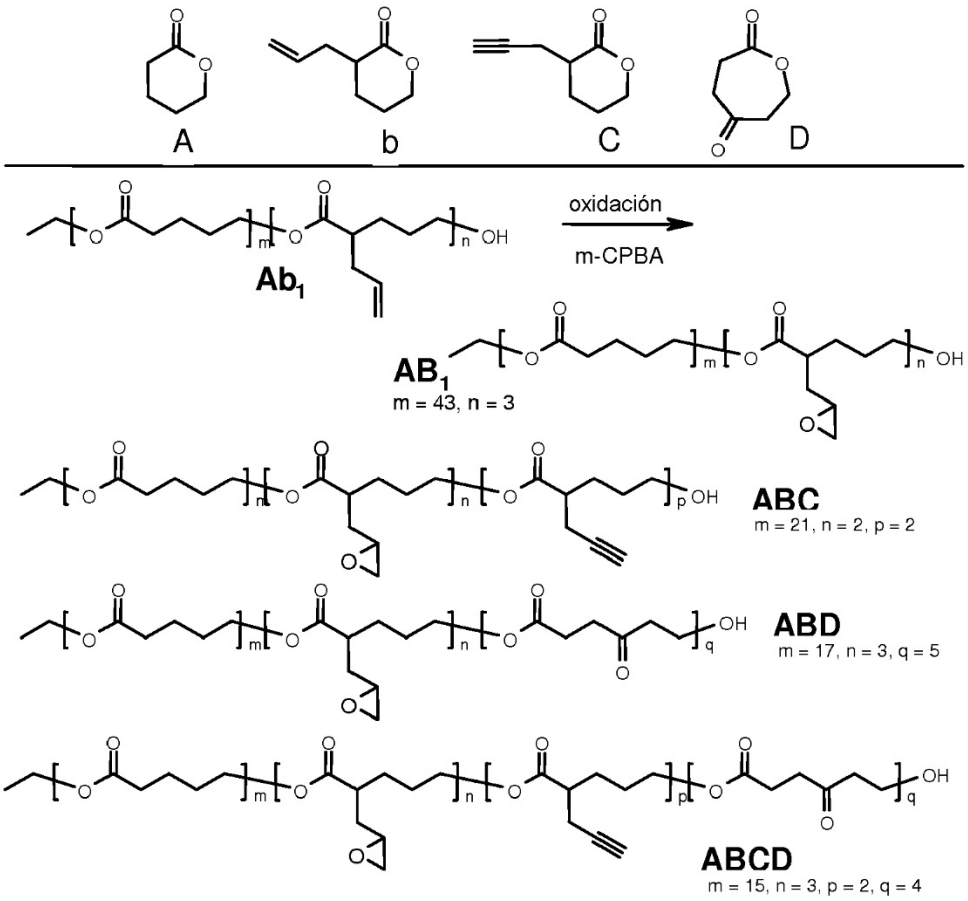
Pueden construirse sistemas similares con partículas de reacciones de entrecruzamiento intramolecular. La sustitución de N-BED por un equivalente óxido de etileno potencia la solubilidad del sistema.

Otro enfoque puede permitir la formación de conjugados de nanopartícula-dendrímero implica la unión directa de fracciones funcionalizadas con nucleófilo (p.ej., péptidos o composiciones de administración intracelular dadas a conocer) a una función alílica en las nanopartículas degradables dadas a conocer. Tal como se muestra en el esquema 4, la unión directa de un tiol con un polímero o nanopartícula funcionalizado con alilo puede evitar la utilización del conector SVEC divulgado.



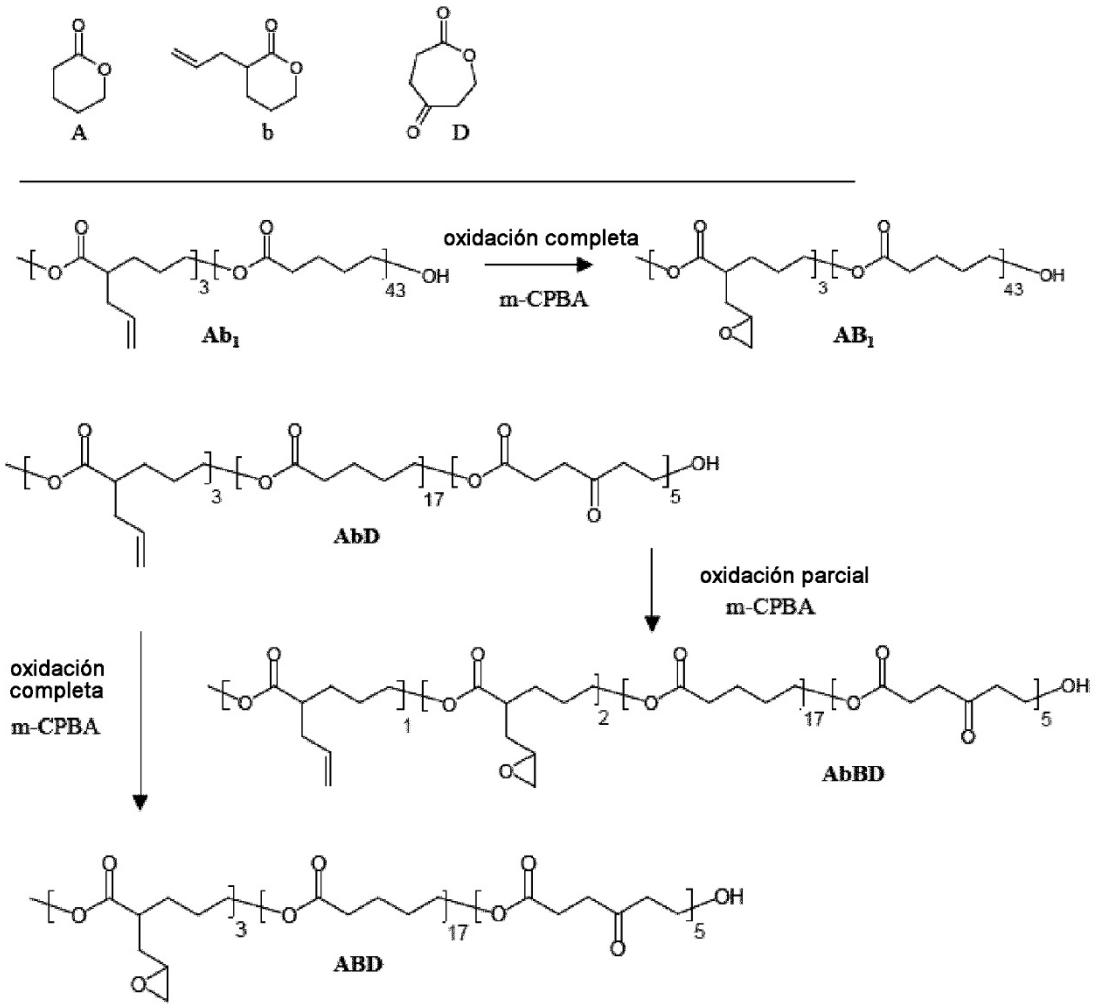
Esquema 4. Síntesis de precursor lineal de ABdD funcionalizado con alilo

Puede proporcionarse una función alílica en nanopartículas degradables dadas a conocer mediante la oxidación incompleta de funcionalidades epóxido, tal como se muestra en el esquema 5a.



Esquema 5a. Precursor lineal.

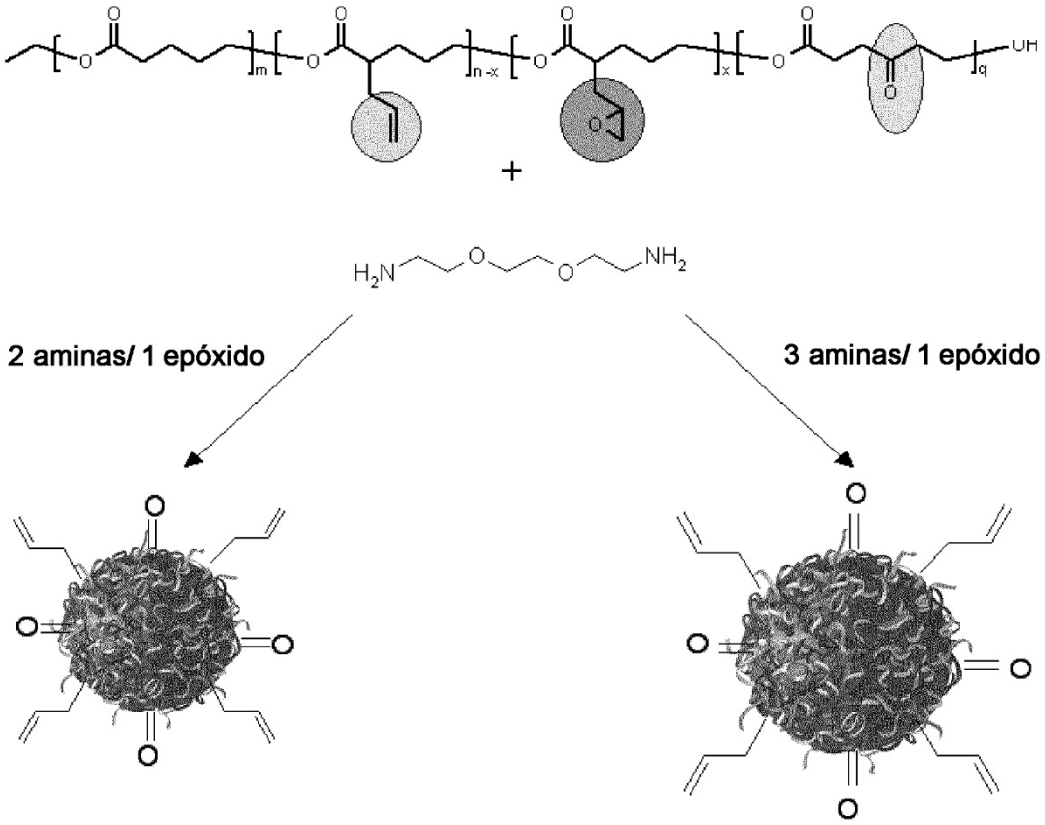
Pueden prepararse todavía otros ejemplos de precursores lineales según el esquema 5b.



Esquema 5b. Precursor lineal.

De esta manera, se encuentra disponible una funcionalidad alilo para la funcionalización y permite condiciones muy suaves para la unión de péptidos y otras fracciones que contienen grupos nucleofílicos (p.ej., tiol). Los grupos alilo de precursores lineales Ab pueden conservarse parcialmente mediante oxidación parcial al epóxido que resulta necesario para el entrecruzamiento a la nanopartícula al polímero lineal AbB. Esta reacción química también es compatible con el precursor lineal ABD que contiene grupo ceto con AbBD.

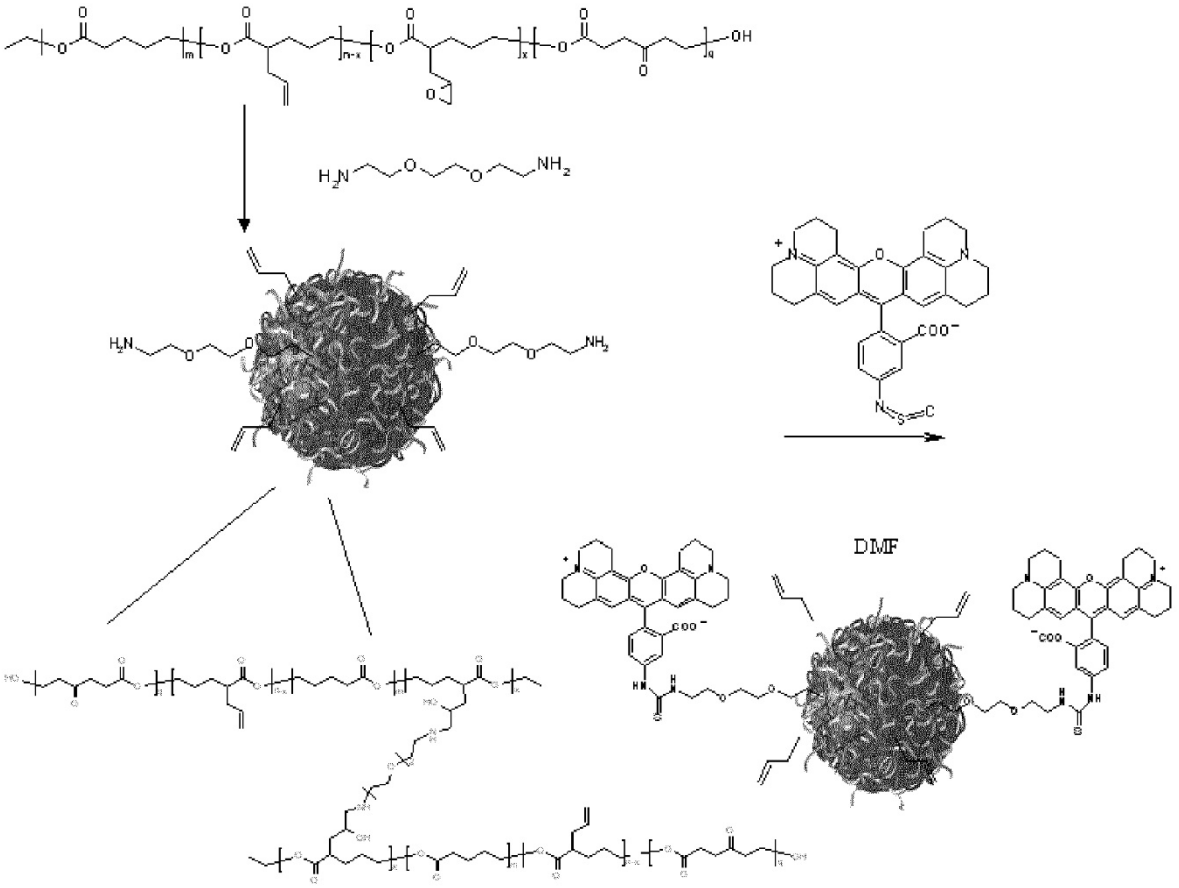
La formación de nanopartículas no participa en la reacción de entrecruzamiento y, por lo tanto, se encuentra disponible para la modificación adicional. El grupo alilo es inerte bajo las condiciones utilizadas durante el procedimiento de entrecruzamiento. La reacción de entrecruzamiento se ilustra en el esquema 6.



Esquema 6. Formación de nanopartículas a partir de precursor lineal de ABbD funcionalizado con alilo con diaminas

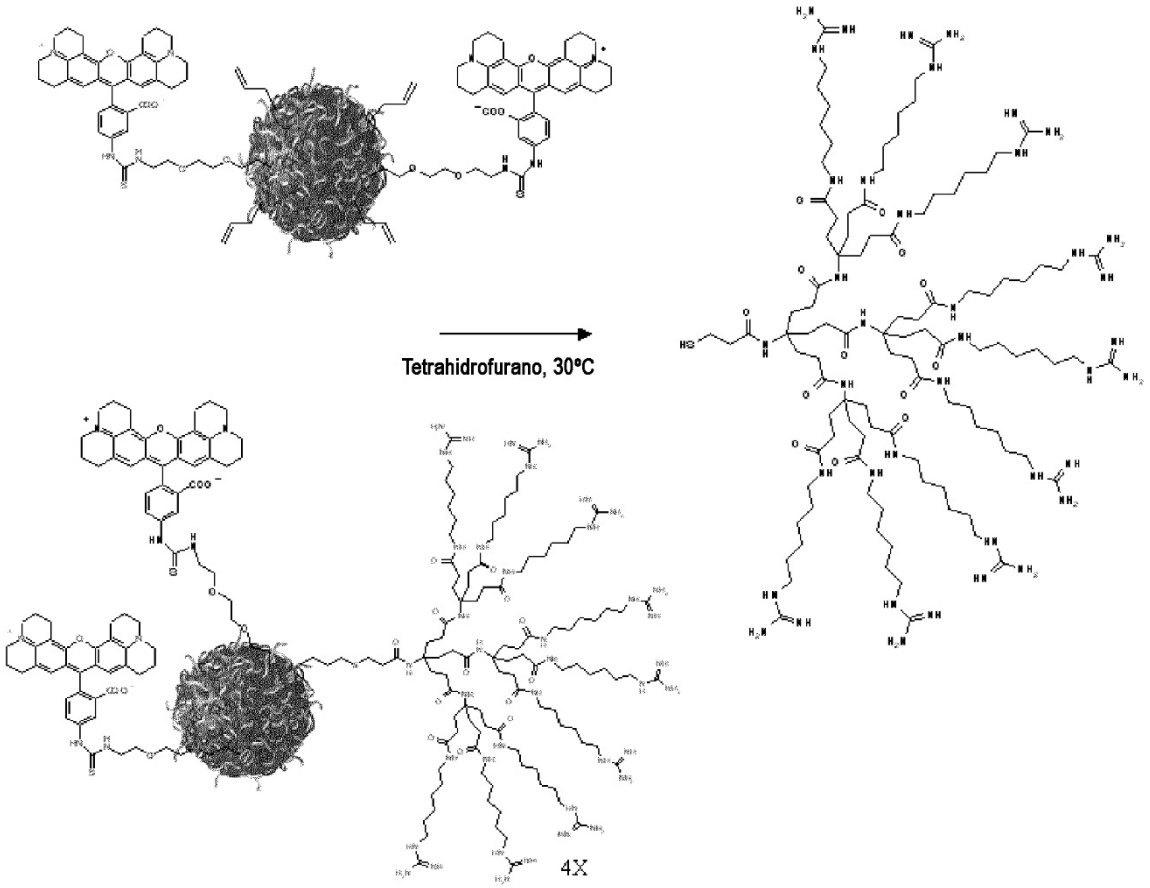
Nuevamente, el grupo tiol del punto focal del transportador molecular dendrítico puede unirse al grupo alilo. Una ventaja de dicha unión es que no requiere ningún otro agente. Lo anterior puede permitir que el transportador se una a cualquier nanopartícula ya post-modificada debido a las condiciones suaves de reacción.

Con el fin de seguir el sistema de administración de fármaco y estudiar la incorporación en los tejidos, una fracción de obtención de imágenes (p.ej., una molécula de pigmento, tal como rodamina y otro pigmento) que presenta funcionalidad para reaccionar con aminas tales como éster de NH o isotiocianatos, puede unirse a los grupos amina libres que resultan de la reacción de entrecruzamiento, tal como se muestra en el esquema 7. Los grupos alilo o todos los demás grupos introducidos no resultan afectados.



Esquema 7. Formación de nanopartícula a partir de precursor lineal de ABbD funcionalizado con alilo con diaminas

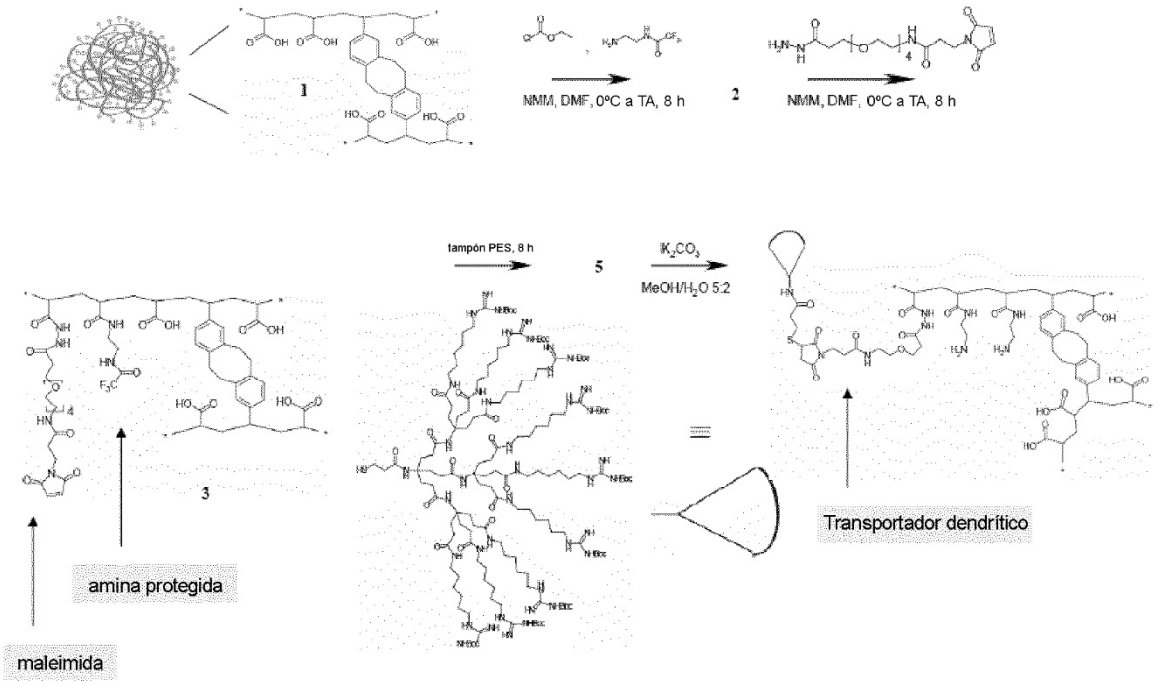
A continuación, los grupos alilo pueden hacerse reaccionar con grupos tiol del punto focal del transportador dendrítico, tal como se ilustra en el esquema 8, proporcionando de esta manera nanopartículas degradables múltiplemente funcionalizadas.



Esquema 8a. Formación de nanopartícula a partir de precursor lineal de **ABbD** funcionalizado con alilo con diaminas

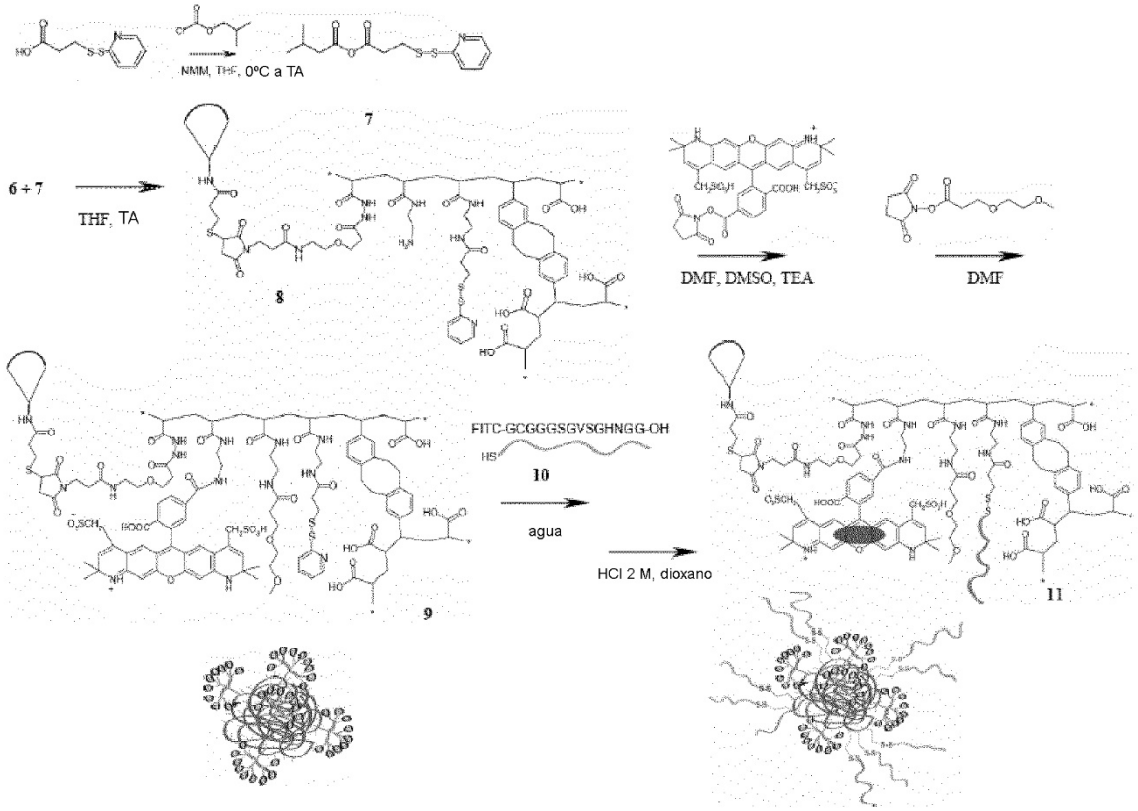
El número de transportadores moleculares unidos a la partícula puede seleccionarse modificando la estequiometría de los reactivos añadidos a los grupos alilo. Puede llevarse a cabo la misma reacción con grupos tiol unidos a péptidos. Se ha encontrado que temperaturas elevadas tales como 37ºC aceleran la reacción pero no destruyen el péptido.

Además, puede unirse una nanopartícula a un transportador molecular dendrítico divulgado mediante una estrategia ejemplar mostrada en el esquema 8b.



Esquema 8b. Estrategia para unir transportador dendrítico a nanopartícula.

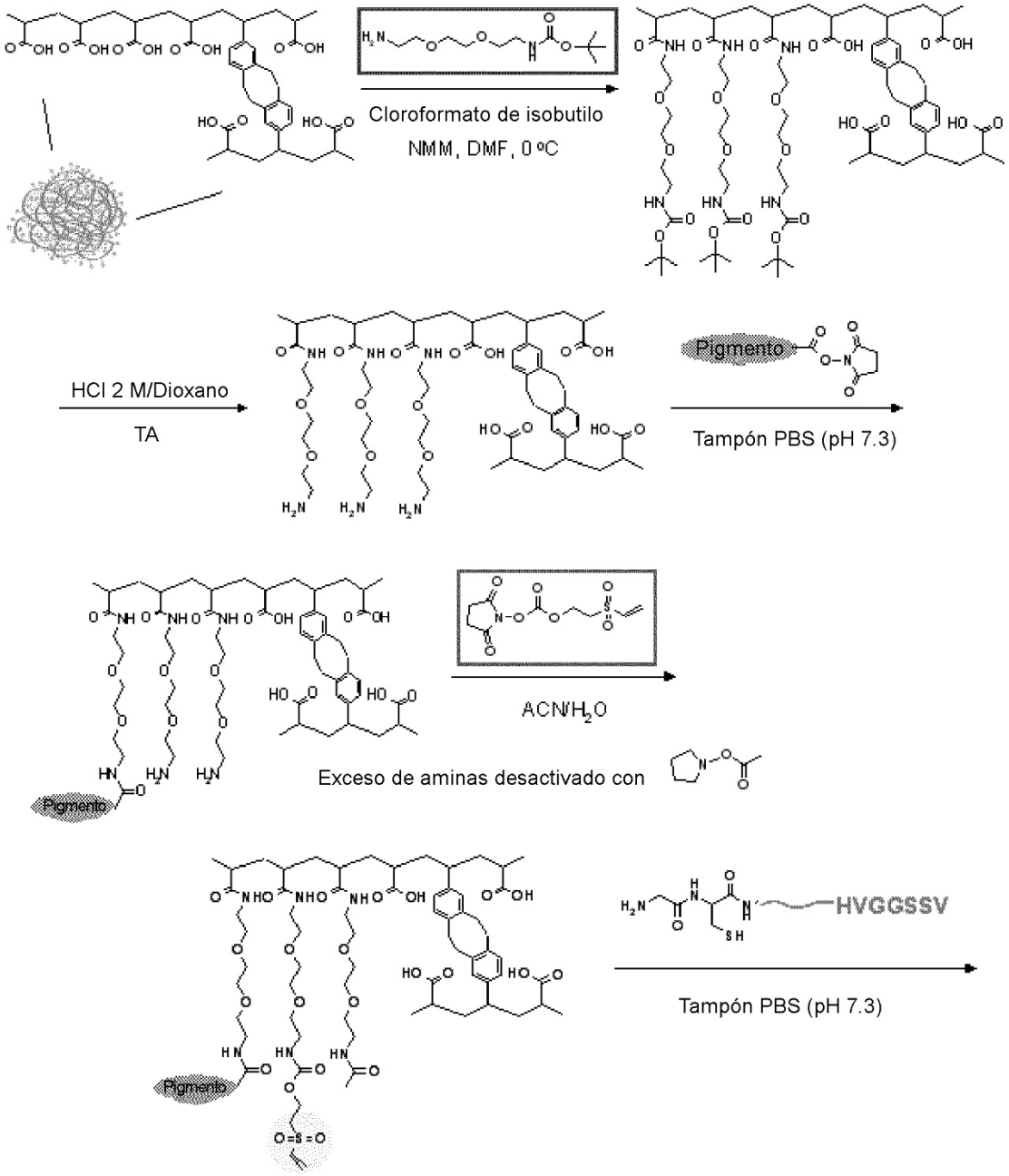
El transportador dendrítico mostrado en el esquema 8 puede funcionalizarse adicionalmente según el esquema 8c.



Esquema 8c. Modificación secuencial de nanopartícula comprimible

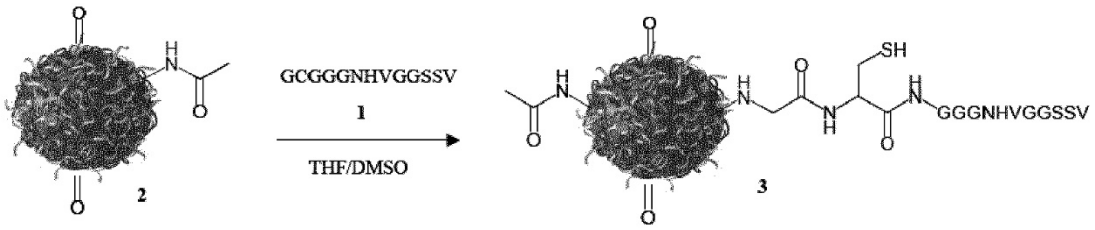
La nanopartícula de la reacción de pliegue de cadenas intramoleculares puede hacerse reaccionar con la óxido de etileno amina N-Boc disponible comercialmente. La amina puede desprotegerse mediante corte con ácido con HCl o ácido fórmico. Algunas de las aminas libres pueden marcarse con pigmento mediante reacción de éster de

NH o reacción de tioisocianuro. A continuación, puede conectarse una fracción SVEC mediante u
éster de NH. Después de la reacción se desactivan los grupos amina residuales. Los grupos tiol se unen a los grupos de vinilsulfona de SVEC. Los grupos tiol del transportador molecular también pueden unirse de la misma manera que los péptidos, tal como se muestra en el esquema 9a.



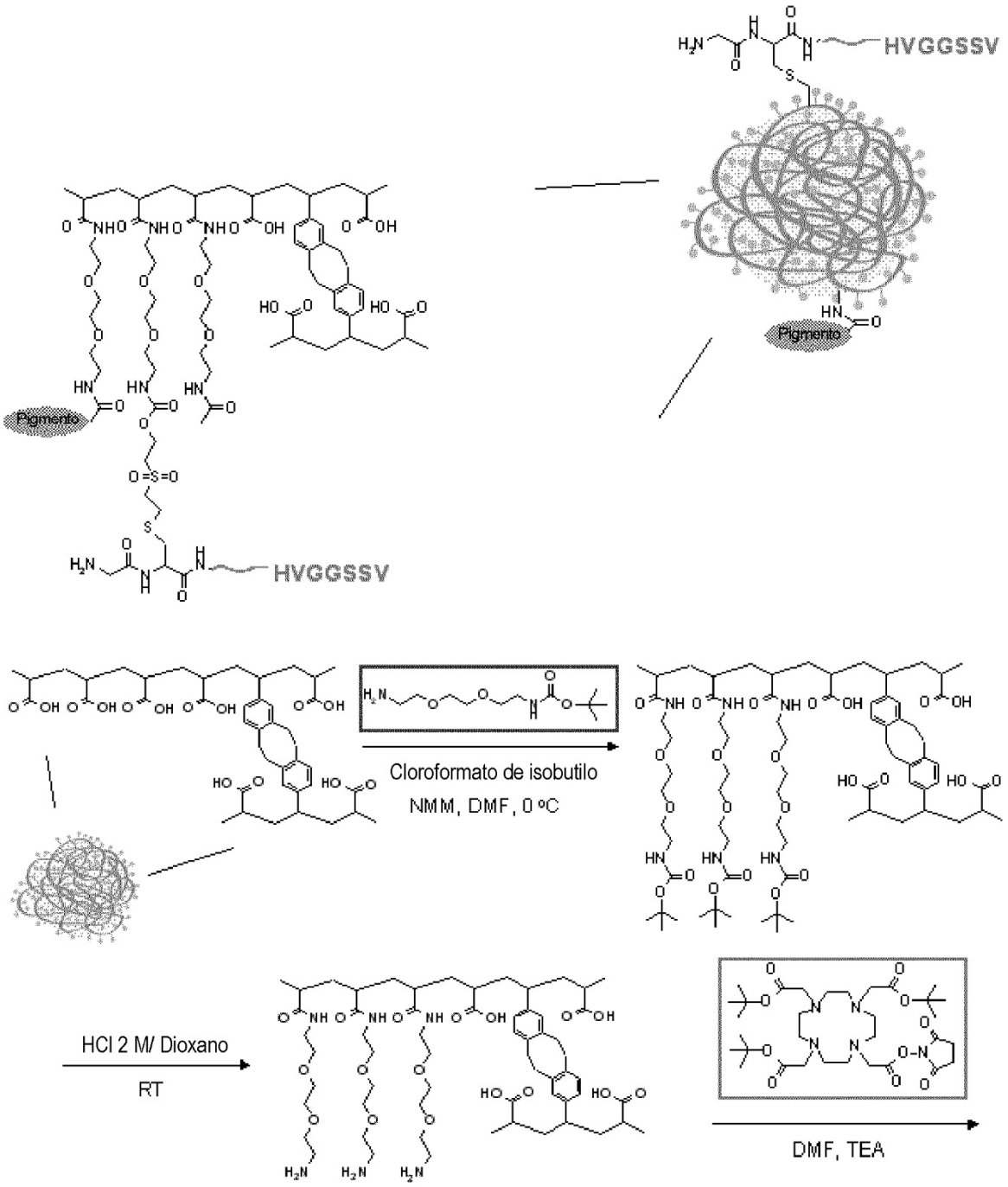
Esquema 9a. Unión del péptido de transporte dirigido al sistema de SVEC

Otro ejemplo de unión de un péptido a un núcleo de nanopartícula se muestra en el esquema 9b.

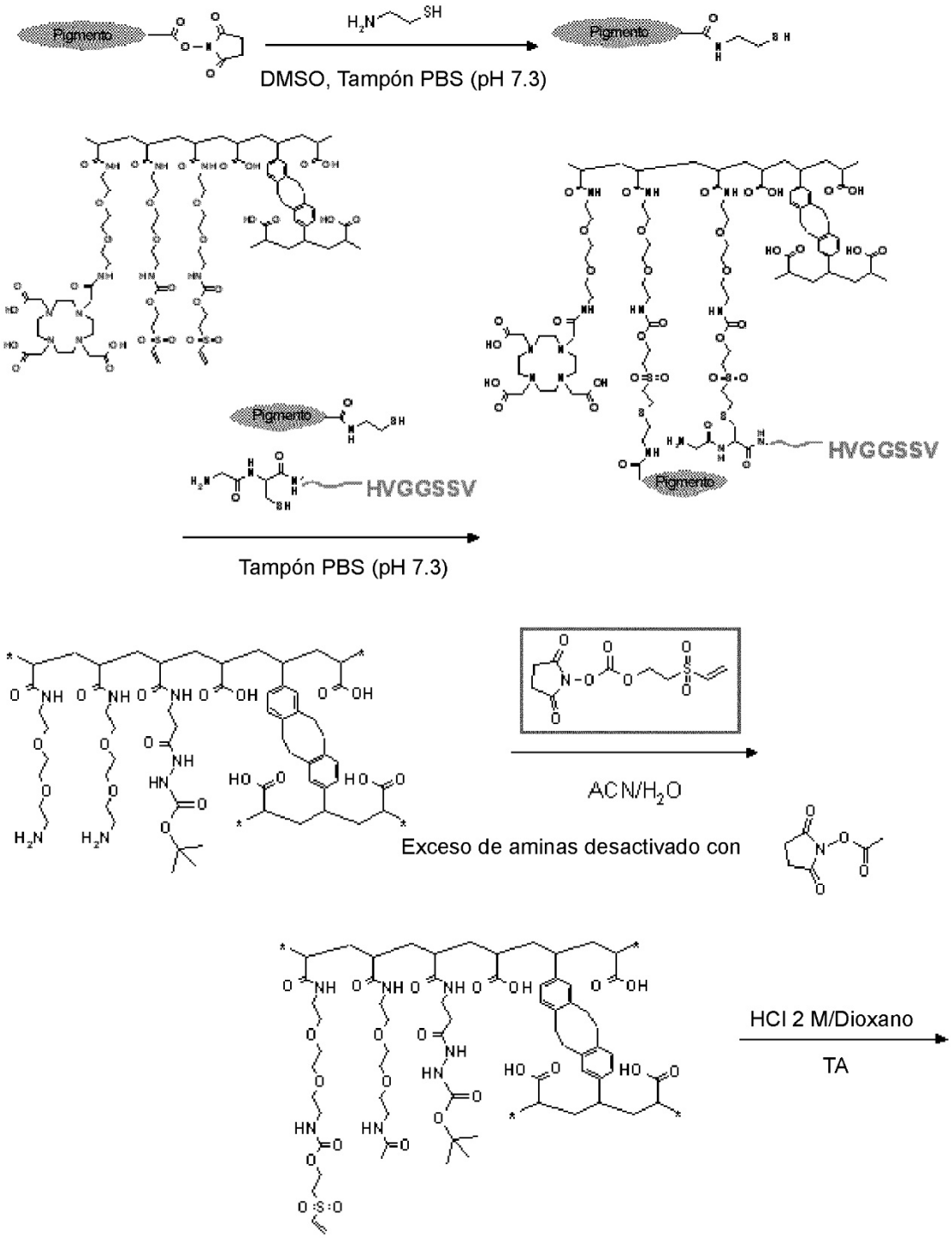


Esquema 9b. Unión del péptido de transporte dirigido a un sistema de nanopartículas.

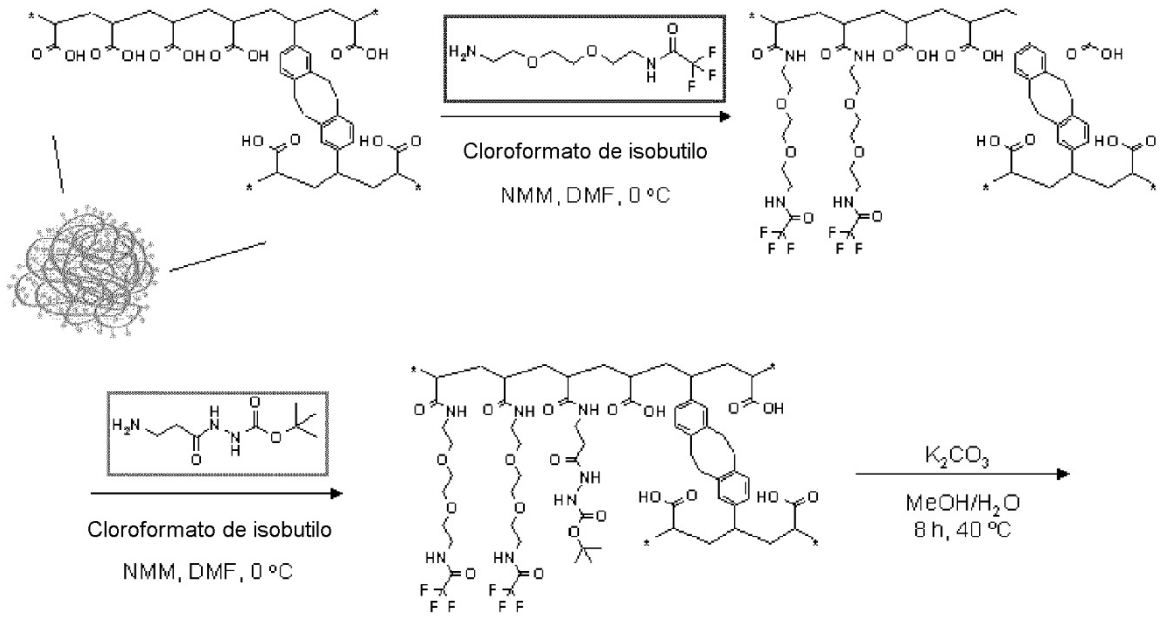
Las fracciones de obtención de imágenes (p.ej., pigmentos o fracciones DOTA) que pueden funcionar como unidades terapéuticas y de rastreo también pueden unirse mediante una funcionalidad nucleofílica, tal como se muestra posteriormente.



Esquema 10. Funcionalización de puntos cuánticos orgánicos mediante pliegue de cadenas intramoleculares

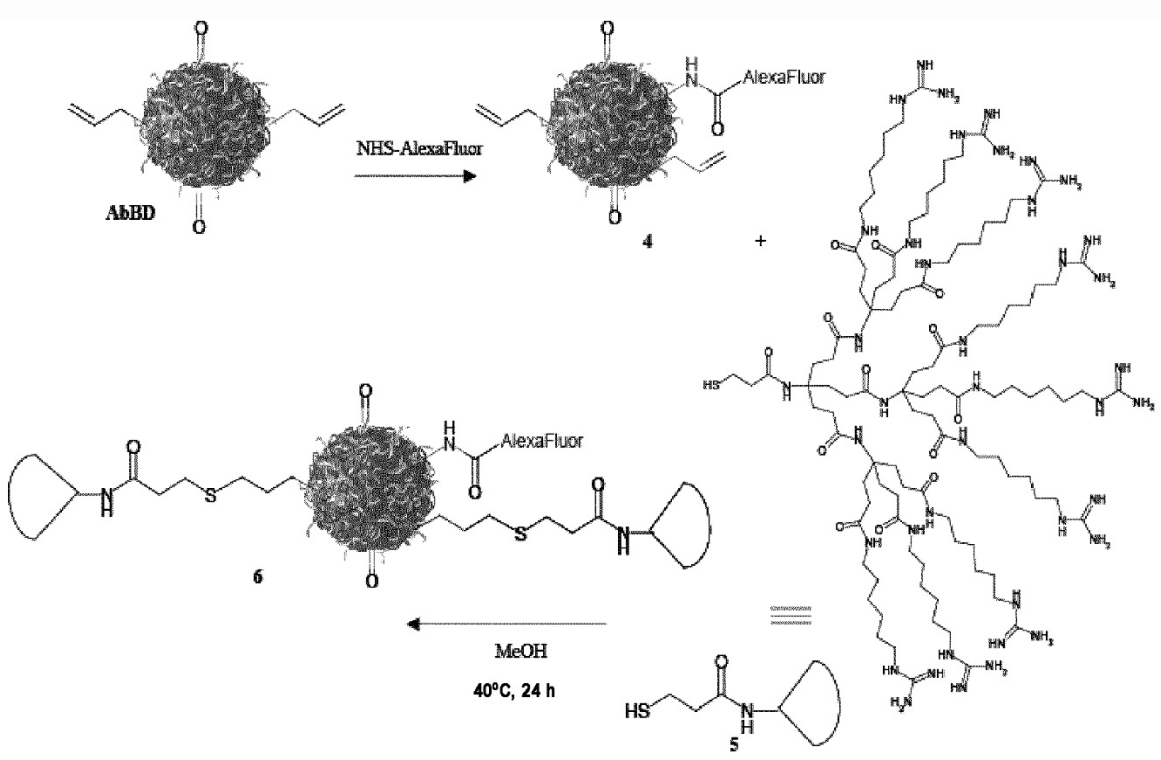


Esquema 11. Desprotección de triflato con base y unión de SVEC seguido de la desprotección del conector acilhidrazona.



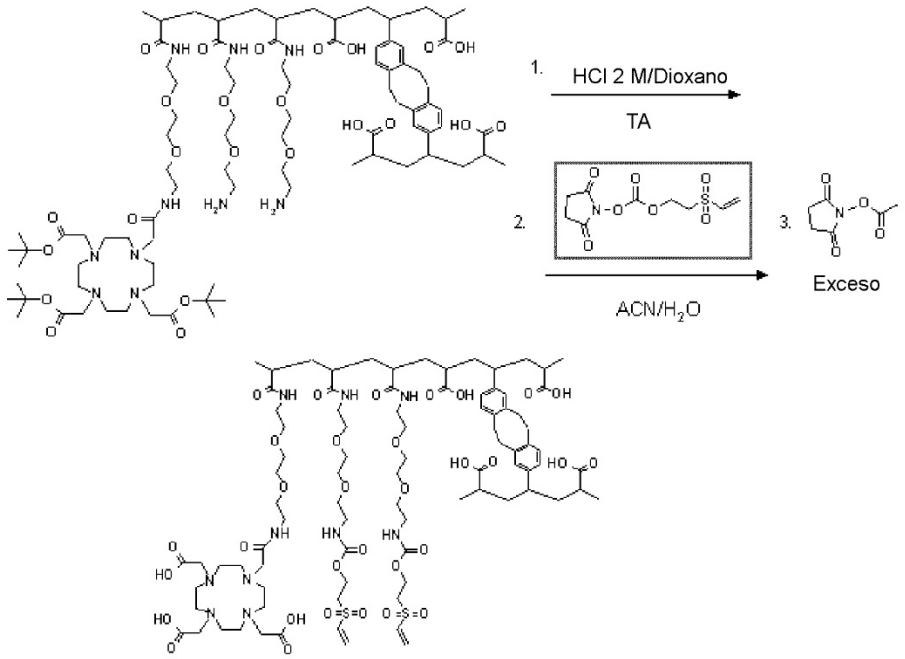
Esquema 12a. DOTA en lugar de pigmento.

Puede funcionalizarse una nanopartícula divulgada, con un pigmento para la obtención de imágenes del ojo en un sujeto. Por ejemplo, dicho método puede llevarse a cabo convenientemente mediante el esquema 12b.

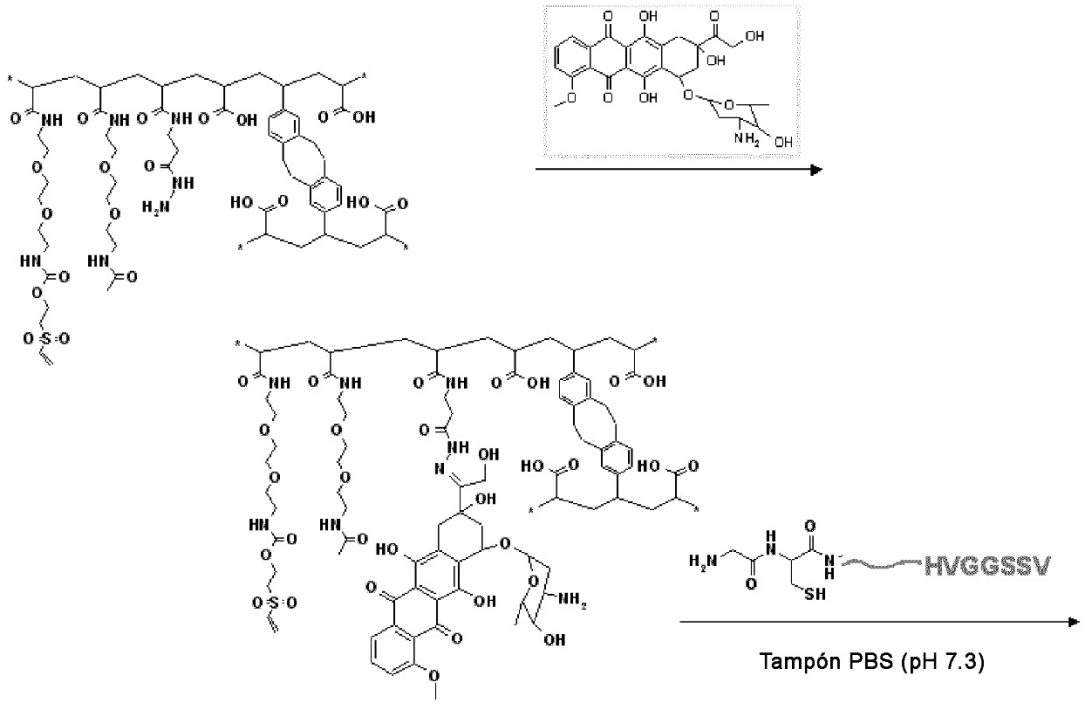


Esquema 12b. Síntesis para administración de reactivos de obtención de imágenes en el ojo para pruebas.

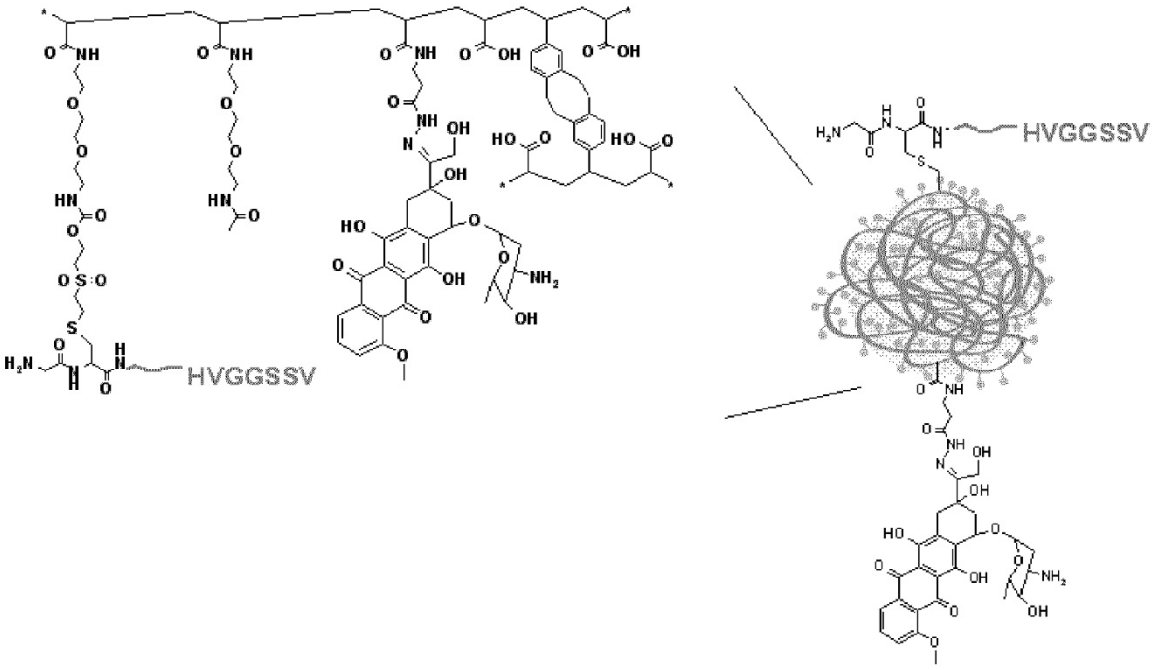
Puede utilizarse una reacción química análoga para preparar un sistema de administración de fármaco, que comprende una molécula de fármaco que se une a un conector sensible al pH e incluye un conector hidrazida y doxorrubicina. La síntesis se ilustra en los esquemas 13-15.



Esquema 13. Unión de dos tipos de β-alanil (Boc) hidrazida, y N-Tfa-etilenóxido diamina.

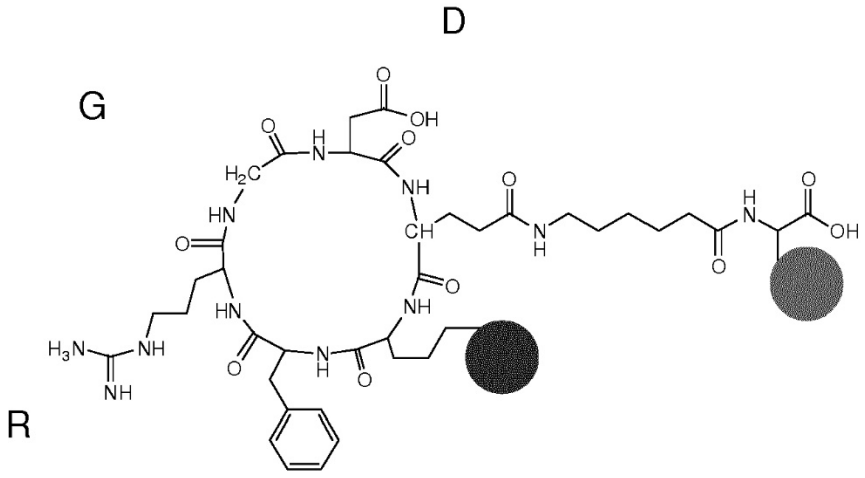


Esquema 14. Formación de conector hidrazida de doxorrubicina



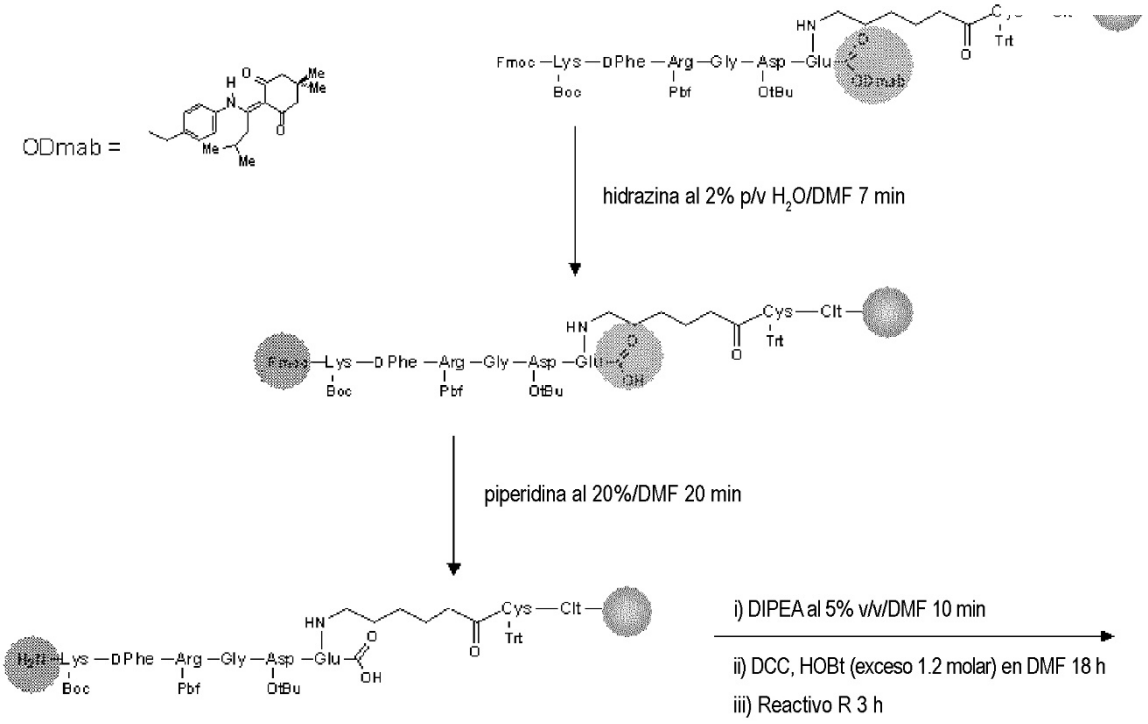
Esquema 15. Unión de unidad de transporte dirigido; también c-RGD

Se preparó un nuevo c-RGD que podía unirse a las nanopartículas y utilizarse para el transporte dirigido de los sistemas de administración dados a conocer (ver el esquema 16).



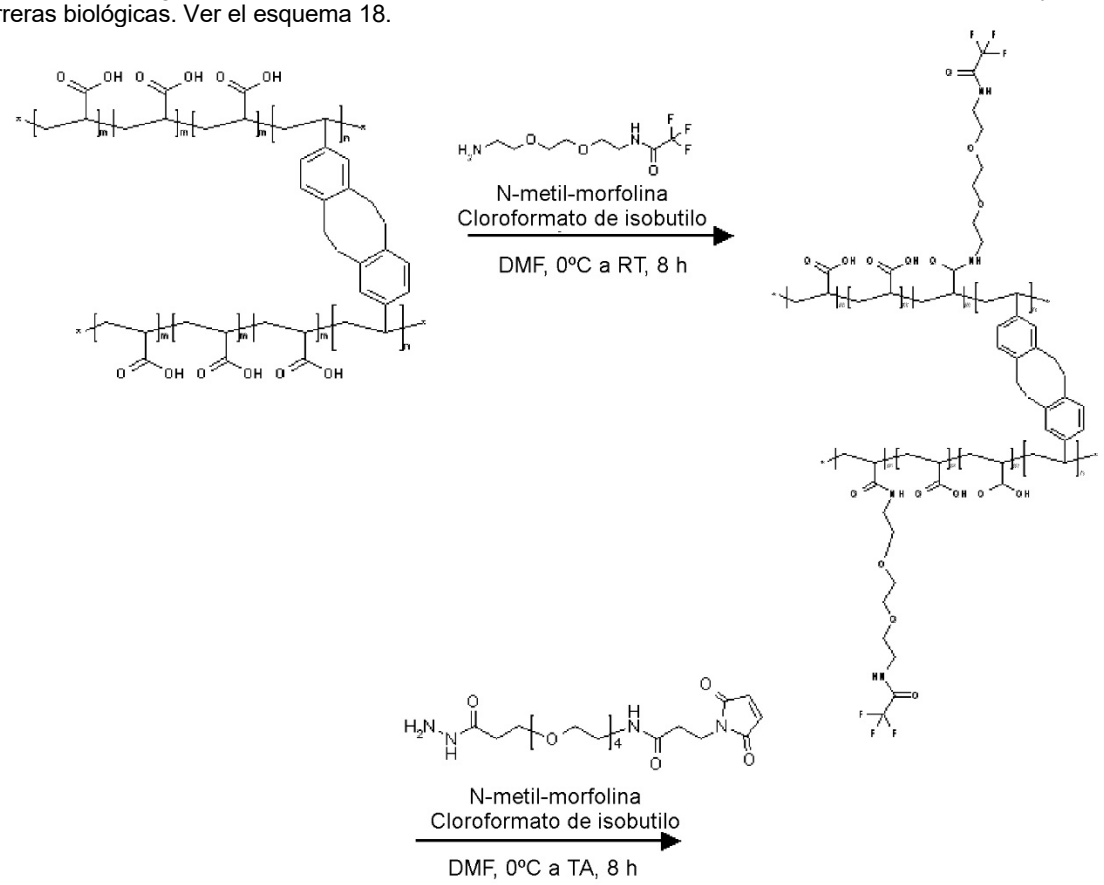
Esquema 16. c-RGD

La síntesis del c-RGD que contiene amina libre y unidad tiol para la unión a SVEC de la partícula del pliegue de cadenas intramoleculares y el SVEC o el grupo alilo de las partículas de poliéster se detalla en el esquema 17.



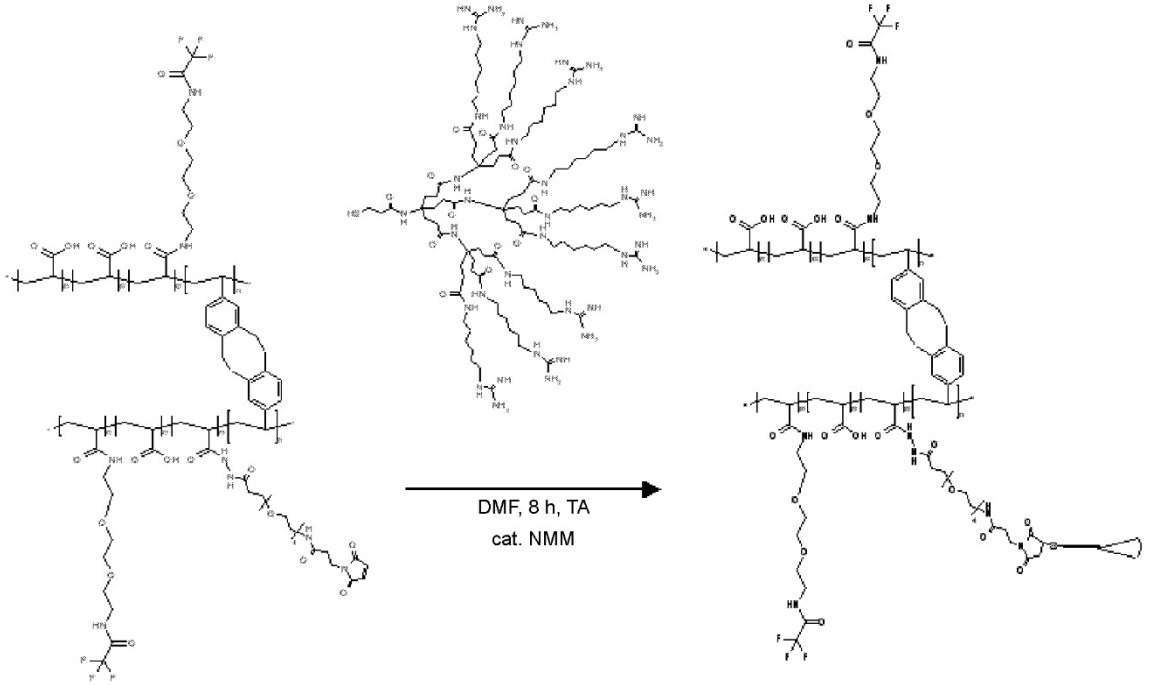
Esquema 17. Síntesis de C-RGD

La unión del transportador molecular a la maleimida de la partícula de pliegue de cadenas intramoleculares también se ha investigado para crear un sistema que transporte péptidos a una localización intracelular y a través de barreras biológicas. Ver el esquema 18.

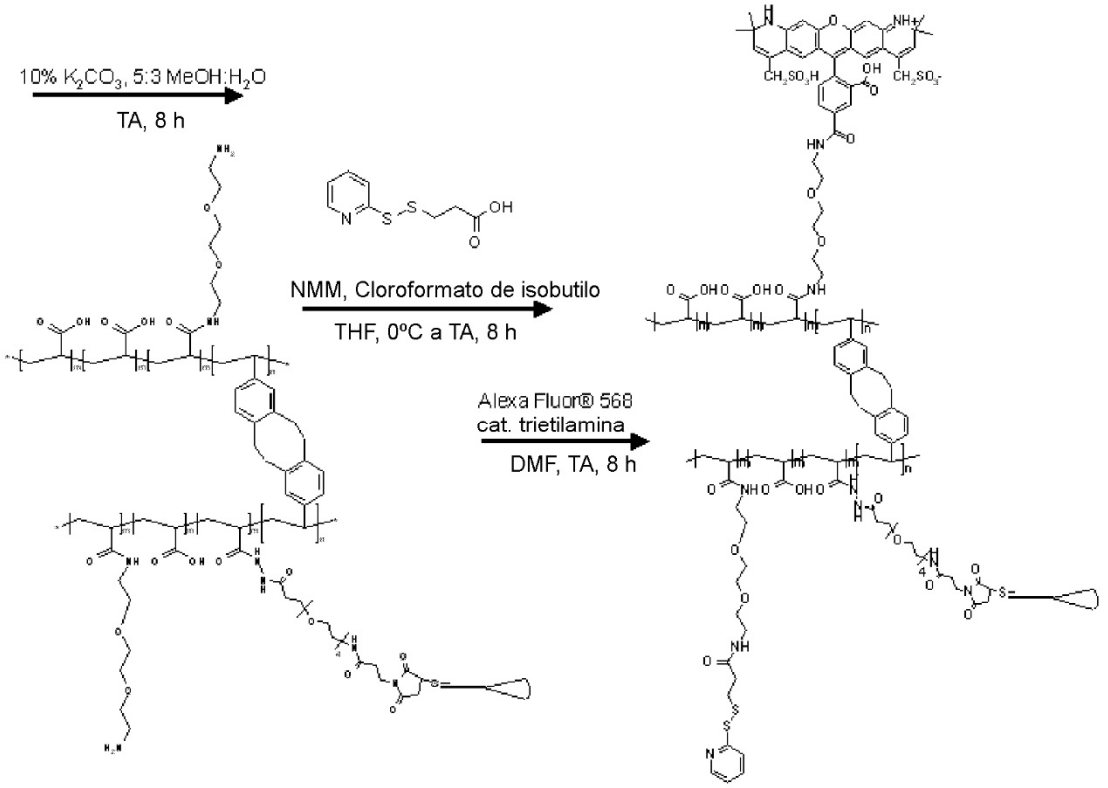


Esquema 18. Unión de conector diamina dióxido de N-Tfa-etileno e maleimida hidrazida a la nanopartícula.

También se han investigado modificaciones adicionales de los sistemas de conjugado de nanopartícula-dendrímero. Ver los esquemas 19-20. Las modificaciones dadas a conocer, así como transformaciones análogas, resultan en una colección de compuestos disponibles para la utilización en el transporte intracelular.



Esquema 19. Unión de fracciones dendríticas a puntos cuánticos orgánicos



Esquema 20. Modificación adicional de puntos cuánticos orgánicos funcionalizados con dendrímero

F. Preparación de un medicamento

Se proporciona además un método para la preparación de un medicamento, tal como un medica
administración de un agente biológicamente activo, un agente farmacéuticamente activo y/o una fraccion para la obtención de imágenes, que comprende combinar por lo menos un polímero divulgado o por lo menos una nanopartícula divulgada, con un portador farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica se refiere opcionalmente a una composición para prevenir y/o tratar trastornos oftálmicos.

G. Usos

Se proporcionan además usos de los polímeros, nanopartículas y productos dados a conocer, tales como el uso de un polímero divulgado o de una nanopartícula divulgada para administrar un agente biológicamente activo, un agente farmacéuticamente activo y/o una fracción de obtención de imágenes. Los compuestos, composiciones y conjugados dados a conocer y la síntesis práctica de los mismos proporcionan enfoques para aplicaciones en el tratamiento del cáncer y la administración de fármacos a través de barreras biológicas, tales como la córnea, tejidos, piel y la barrera hematoencefálica.

Dichos polímeros degradables encuentran aplicación en tecnologías de liberación controladas que deben penetrar en tejidos y membranas celulares. De esta manera, los conjugados de nanopartícula-dendrímero que comprenden una nanopartícula degradable divulgada y una composición de administración intracelular divulgada pueden contener y administrar terapéuticos, desde moléculas pequeñas a péptidos, proteínas y anticuerpos de mayor tamaño.

En la presente memoria se comenta la utilización de un polímero divulgado o una nanopartícula divulgada para la administración transcorneal de un agente biológicamente activo, un agente farmacéuticamente activo y/o una fracción de obtención de imágenes.

Muchas regiones del ojo se encuentran relativamente inaccesibles a agentes administrados por vía sistémica. Por ejemplo, los agentes administrados por vía oral pasan por el hígado antes de alcanzar tejidos sensibles a estrógenos. Debido a que el hígado contiene enzimas que pueden inactivar el agente; el agente que finalmente alcanza el tejido diana para el tratamiento puede resultar virtualmente ineficaz. Además, la administración sistémica presenta el riesgo de producir efectos secundarios no deseables. También puede resultar problemático administrar un agente biológicamente activo, un agente farmacéuticamente activo y/o una fracción de obtención de imágenes en el ojo mediante procedimientos invasivos, tales como la inyección. Todavía adicionalmente, el cumplimiento del paciente puede ser bajo en casos de administración invasiva.

Como resultado, la administración de fármaco tópica sigue siendo la ruta preferente de administración en el ojo. Existe una diversidad de factores que afectan a la absorción de fármacos en el ojo. Entre estos factores se incluyen: el volumen instilado del fármaco, la frecuencia de administración de fármaco instilado, la estructura e integridad de la córnea, el nivel de proteínas en las lágrimas, el nivel de enzimas en las lágrimas, el drenaje lacrimal y la tasa de renovación de las lágrimas, así como la tasa de adsorción y absorción de un fármaco por la conjuntiva, esclerótica y párpados. Un modo potencial de reducir o incluso eliminar efectos secundarios sistémicos es mejorar el transporte dirigido ocular que permitiría la utilización de dosis reducidas del agente biológicamente activo en la formación del fármaco oftálmico.

Una barrera importante a la penetración ocular de fármacos es la córnea. La córnea está compuesta de tres capas: un epitelio rico en lípidos, un soma pobre en lípidos y un endotelio rico en lípidos. Por lo tanto, un agente debe poseer un equilibrio lipofílico-hidrofílico para una adecuada penetración transcorneal y, de esta manera, biodisponibilidad ocular (Akers, H.J., "Ocular bioavailability of topically applied ophthalmic drugs," Am Pharm, NS23:33-36, 1983)

De esta manera, los compuestos dados a conocer pueden proporcionar propiedades físicoquímicas mejoradas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, una biodisponibilidad ocular favorable y una fácil penetración transcorneal.

Además, los compuestos dados a conocer pueden tratar y/o proteger frente a diversas enfermedades oculares. Es decir, los compuestos dados a conocer pueden utilizarse para diagnosticar, prevenir y/o tratar trastornos oftálmicos. Los compuestos dados a conocer preferentes pueden resultar eficaces para tratar y/o evitar enfermedades asociadas al daño intraocular que amenaza la visión debido a predisposiciones fisiopatológicas. Entre los compuestos dados a conocer preferentes se incluyen los que tratan la infección retiniana, el glaucoma y/o la degeneración macular.

H. Composiciones farmacéuticas

En la presente memoria se comentan composiciones farmacéuticas que comprenden las composiciones dadas a conocer. Es decir, puede proporcionarse una composición farmacéutica que comprende una cantidad

terapéuticamente eficaz de uno o más polímeros dados a conocer y/o uno o más productos divulgado y/o uno o más nanopartículas dadas a conocer y/o portadores farmacéuticamente aceptables para la administración en un mamífero. Opcionalmente, el polímero o polímeros dados a conocer y/o uno o más productos de un método divulgado y/o la nanopartícula o nanopartículas dadas a conocer se sustituyen adicionalmente con por lo menos un agente biológicamente activo, por lo menos un agente farmacéuticamente activo y/o por lo menos una fracción de obtención de imágenes.

Las composiciones farmacéuticas: dadas a conocer pueden comprender además otros compuestos terapéuticamente activos, los cuales habitualmente se aplican en el tratamiento de las condiciones patológicas anteriormente indicadas. Se entiende que las composiciones dadas a conocer pueden utilizarse en los métodos de utilización dados a conocer.

I. Kits

Se proporcionan además kits relacionados con las composiciones dadas a conocer, por ejemplo un kit que comprende por lo menos un polímero divulgado, por lo menos una nanopartícula divulgada o por lo menos un producto de un método divulgado. Se entiende que los kits dados a conocer pueden utilizarse en relación a los métodos de utilización dados a conocer.

Se proporcionan además micropartículas y/o redes más grandes, para la utilización como materiales para la ingeniería de tejidos y biogeles en dispositivos médicos.

Otros aspectos y realizaciones de la invención son tal como se dan a conocer en las reivindicaciones.

J. Parte experimental

Los ejemplos siguientes se proporcionan a fin de proporcionar al experto ordinario en la materia una exposición y descripción completas de cómo los compuestos, composiciones, artículos, dispositivos y/o métodos reivindicados en la presente memoria se preparan y se evalúan, y pretenden ser meramente ejemplares de la invención y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números (p.ej., cantidades, temperatura, etc.), aunque deben tomarse en consideración algunos errores y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso; la temperatura se expresa en ºC y la presión es igual o aproximadamente igual a la atmosférica.

1. Métodos de caracterización

Los espectros de RMN ^{1}H se obtuvieron de un espectrómetro de transformada de Fourier Bruker AC300, con $CDCl_3$ en TMS como el solvente. Los espectros de RMN ^{13}C se obtuvieron de un espectrómetro de transformada de Fourier Bruker AC400, con $CDCl_3$ como el solvente.

Se llevó a cabo cromatografía de permeación en gel (GPC, por sus siglas en inglés) en un cromatógrafo Waters dotado de un detector de índice de refracción Waters 2414, un detector de absorbancia de λ dual Waters 2481, una bomba de HPLC binaria Waters 1525 y cuatro columnas Waters de 5 mm (300 mm x 7.7 mm) conectadas en serie de tamaño de poro creciente (100, 1000, 100,000 y 1,000,000 Á, respectivamente). Todas las tandas se llevaron a cabo con tetrahidrofurano (THF) como el eluyente a un caudal de 1 ml/min.

Para la dispersión de luz dinámica (DLS), se utilizó un instrumento Zetasizer Nano Series con un sistema de goniómetro compacto CGS-3 de Malvern Instruments (Malvern Zetasizer Nanoseries, Malver, Reino Unido) a un ángulo fijo de 90º a 25ºC, calculando la media de tres mediciones. Las partículas se diluyeron con tolueno hasta una concentración de 5-6 mg/ml, que proporcionó el número deseado de pulsos a fin de obtener una buena relación de señal a ruido.

Se prepararon muestras para la obtención de imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) mediante la disolución de 0.5 mg de nanopartículas en 1 ml de isopropanol y 0.3 ml de acetonitrilo. Las muestras se sonicaron durante 5 min y se tiñeron con 2 gotas de ácido fosfotúngstico al 3%. Se prepararon rejillas con carbono aplicando una gota de partículas dispersadas sobre una rejilla de malla de cobre ultradelgada de tipo carbono A400 (Ted Pella, Inc., Redding, CA) y secando a temperatura ambiente. Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Philips CM20T funcionando a 200 kV en modo de campo brillante para obtener micrografías de TEM de las nanopartículas poliméricas.

Las muestras se centrifugaron a 600 rpm en una centrífuga International modelo CS de International Equipment Company (Boston, MA).

2. Materiales

Los reactivos químicos se obtuvieron de Aldrich (Milwaukee, WI), EMD Alfa-Aesar, Fisher Scientific, y Across y

se utilizaron tal como se recibieron, a menos que se indique lo contrario. La membrana de diálisis S los tubos de diálisis plegados SnakeSkin® y celulosa regenerada se adquirieron de Spectrum Laboratories Inc. y Pierce Biotechnology, respectivamente. La cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) analítica se llevó a cabo en placas Merck comerciales recubiertas con gel de sílice GF254 (0.24 mm de grosor). El gel de sílice para la cromatografía flash era Merck Kieselgel 60 (malla de 230-400, ASTM) o de 60 Å de Sorbent Technologies (40 a 63 µm, grado técnico). Se obtuvo *MAL-dPeg™$_4$-t-boc-hidrazida* de Quanta Biodesign, Ltd. (Powell, OH) y se utilizó sin modificación. El pigmento Cy3 NHS y las columnas de desalado PD-10 se recibieron de GE Healthcare (Piscataway, NJ). Las membranas de diálisis de éster de celulosa (CE, por sus siglas en inglés) Spectra/Por® Biotech (1,000 MWCO) se obtuvieron de Spectrum Laboratories, Inc. (Rancho Domínguez, CA). Los tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO de 10,000) se obtuvieron de Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL). Se determinaron los pesos moleculares absolutos con dispersión de luz estática.

3. Síntesis de A-ALIL-Δ-VALEROLACTONA (AVL) (B)

Un matraz de fondo redondo de 500 ml, dotado de barra de agitación, se selló con un septo, se purgó con nitrógeno durante 30 min y se enfrió en un baño de hielo seco/acetona. Se añadió al matraz de fondo redondo una solución de diisopropilamina de litio (2,0 M en THF/heptano/etilbenceno, 33 ml, 66 mmoles). Se añadió una solución purgada con nitrógeno de δ-valerolactona (5.43 ml, 60 mmoles) en THF (60 ml) mediante jeringa durante 1.5 h. Después de 30 min adicionales de agitación, se añadió gota a gota una solución de bromuro de alilo (6.21 ml, 72 mmoles) en hexametilfosforamida (12.51 ml, 72 mmoles) mediante jeringa durante 30 min. La mezcla de reacción se calentó hasta -40ºC utilizando un baño de hielo seco/acetona y se agitó durante 3 h. La reacción se desactivó con solución de NH_4Cl en exceso y se calentó hasta la temperatura ambiente. El producto en bruto se lavó dos veces con solución hipersalina, se secó con sulfato de magnesio anhidro y se concentró con un evaporador rotatorio. La cromatografía de columna utilizando CH_2Cl_2 proporcionó un producto amarillo viscoso. Rendimiento: 3,4262 g (41%). RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: 5.7 (m, 1H, H_2C=C*H*-), 5.08 (m, 2H, *H*$_2$C=CH-), 4.28 (m, 2H, -C(O)OC*H*$_2$-), 2.53-2.58 (m, 2H, H_2C=CHC*H*$_2$-), 2.27 (m, 1H, H_2C=CHCH$_2$C*H*-), 2.06 (m, 1H, H_2C=CHCH$_2$CHC*H*$_2$-), 1.89 (m, 2H, C(O)OCH$_2$C*H*$_2$-), 1.55 (m, 1H, H_2C=CHCH$_2$CHC*H*$_2$-); RMN ^{13}C (400MHz, $CDCl_3$, ppm) δ: 173.8 (-C(O)O-), 135.0 (H_2C=*C*H-), 117.4 (H_2C=*C*H-), 68.4 (-C(O)O*C*H$_2$-), 39.2 (H_2C=CHCH$_2$*C*H-), 35.4 (H_2C=CH*C*H$_2$-), 24.0 (-*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$-), 21.9 (-CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$-)-

4. Síntesis de copolímero POLI(VL-AVL) (AB)

Un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 50 ml, dotado de barra de agitación, se selló con dos septos y una entrada de gases. Se evacuó el matraz y se rellenó con nitrógeno tres veces. Se prepararon soluciones madre de etanol (EtOH) 1.7 M en THF y 2-etilhexanoato de estaño (II) ($Sn(Oct)_2$) 3.7x10^{-2} M en THF se prepararon en matraces purgados con N_2. Se agruparon soluciones de EtOH (0.32 ml, 5.410x10^{-1} mmoles) y $Sn(Oct)_2$ (0.30 mL, 1.12x10^{-2} mmoles) en el matraz de 50 ml purgado con nitrógeno. Tras agitar la mezcla durante 30 min, se añadió α-alil-δ-valerolactona (1.16 g, 8.32 mmoles) y δ-valerolactona (vl, 2.5 g, 24.97 mmoles). El recipiente de reacción se agitó en un baño de aceite a 105ºC durante 48 h. Se extrajo el monómero residual y catalizador mediante diálisis con membrana de diálisis Spectra/Por® (MWCO=1000) frente a CH_2Cl_2, proporcionando un polímero marrón dorado. Rendimiento: 3,2398 g (88%). M_w = 4834 Da, PDI = 1.17; RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: 5.7 (m, H_2C=C*H*-), 5.09 (m, *H*$_2$C=CH-), 4.09 (m,-C*H*$_2$-O-), 3.65 (m, CH_3C*H*$_2$O-), 2.35 (m, vl, -CH$_2$C*H*$_2$C(O)O-, avl, H_2C=CHCH$_2$C*H*-, H_2C=CHCH$_2$C*H*-), 1.68 (m, avl & vl, -CHC*H*$_2$C*H*$_2$-), 1.25 (t, C*H*$_3$CH$_2$O-); RMn ^{13}C (400MHz, $CDCl_3$, ppm) δ: 174.6 (avl, -*C*(O)-), 172.7 (vl, -C(O)-), 134.6 (H_2C=*C*H-), 116.4 (H_2C=*C*H-), 63.3, 44.3, 35.9, 33.1, 27.5, 25.9, 23.6, 20.9.

5. Síntesis de A-PROPARGIL-Δ-VALEROLACTONA (PVL) (C)

Un matraz de fondo redondo de 250 ml, dotado de barra de agitación, se selló con un septo, se purgó con nitrógeno durante 30 min y se enfrió en un baño de hielo seco/acetona. Se añadió al matraz una solución de diisopropilamina de litio (2,0 M en THF/heptano/etilbenceno, 22 ml, 44 mmoles). Se añadió una solución purgada con nitrógeno de δ-valerolactona (3.62 ml, 40 mmoles) en THF (40 ml) mediante jeringa durante 1.5 h. Después de 30 min adicionales de agitación, se añadió gota a gota una solución de bromuro de propargilo (4.34 ml, 48 mmoles) en hexametilfosforamida (8.4 ml, 48 mmoles) mediante jeringa durante 20 min. La mezcla de reacción se calentó hasta -30ºC utilizando un baño de hielo seco/acetona y se agitó durante 3 h. La reacción se desactivó con solución de NH_4Cl en exceso y se calentó hasta la temperatura ambiente. El producto en bruto se lavó dos veces con solución hipersalina, se secó con sulfato de magnesio anhidro y se concentró con un evaporador rotatorio. La cromatografía de columna utilizando CH_2Cl_2 proporcionó un producto amarillo viscoso. Rendimiento: 2,8194 g (50,6%). RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: 4.35 (m, 2H, -C(O)OC*H*$_2$-), 2.69 (m, 2H, -C(O)C*H*C*H*$_2$C≡CH), 2.53 (m, 1H - C(O)CHC*H*$_2$C≡CH), 2.29 (m, 1H, -CHC*H*$_2$CH$_2$-), 2.05 (s, 1H, *H*C≡CCH$_2$-), 1.96 (m, 2H, -CHCH$_2$C*H*$_2$-), 1.74 (m, 1H,-CHC*H*$_2$CH$_2$-); RMN ^{13}C (400MHz, $CDCl_3$, ppm) δ: 172.8, 80.8, 70.1, 68.5, 38.5, 23.8, 21.7, 20.4.

6. Síntesis de copolímero POLI(VL-AVL-PVL) (ABC)

Un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 50 ml, dotado de barra de agitación, se selló con dos septos y una

entrada de gases. Se evacuó el matraz y se rellenó con nitrógeno tres veces. Se prepararon sol
de etanol (EtOH) 1.7 M en THF y $Sn(Oct)_2$ $3.7x10^{-2}$ M en THF en matraces purgados con N_2. Se agruparon soluciones de etanol (0.21 ml, $3.69x10^{-1}$ mmoles) y $Sn(Oct)_2$ (0.20 ml, $5.41x10^{-3}$ mmoles) en el matraz de 50 ml purgado con nitrógeno. Tras agitar la mezcla durante 30 min, se añadió α-alil-δ-valerolactona (0.8 g, 5.7 mmoles), δ-valerolactona (1.26 g, 12.6 mmoles) y α-propargil-δ-valerolactona (0.63 g, 4.6 mmoles). El recipiente de reacción se agitó en un baño de aceite a 105ºC durante 48 h. Se extrajo el monómero residual y catalizador mediante diálisis con membrana de diálisis Spectra/Por® (MWCO=1000) frente a CH_2Cl_2, proporcionando un polímero marrón dorado. Rendimiento: 2,25 g (84%). M_w = 3500 Da, PDI = 1.26; RMN ^1H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: 5.71 (m, H_2C=C*H*-), 5.03 (m, *H*$_2$C=CH-), 4.08 (m, -C*H*$_2$O-), 3.65 (m, CH_3CH_2O-), 2.55 (m, pvl, -C(O)C*H*-, -CHC*H*$_2$C≡CH), 2.45 (m, -C*H*$_2$C≡CH), 2.34 (m, vl, -$CH_2CH_2C(O)O$-, avl, H_2C=CHC*H*$_2$C*H*-, H_2C=CHC*H*$_2$C*H*-), 2.02 (m, pvl, -C≡C*H*), 1.68 (m, pvl, avl & vl, -CHC*H*$_2$C*H*$_2$-), 1.259 (t, C*H*$_3$CH$_2$O-); RMN ^{13}C (400MHz, $CDCl_3$, ppm) δ: 174.6, 172.7, 133.6, 117.2, 80.7, 69.9, 63.3, 44.3, 35.9, 33.1, 27.5, 25.9, 23.6, 20.9.

7. Síntesis de 2-OXEPÁN-1,5-DIONA (OPD) (D)

Un matraz de fondo redondo de 100 ml, dotado de barra de agitación, se cargó con 1,4-ciclohexanodiona (2.0 g, 17.84 mmoles) y ácido 3-cloroperoxibenzoico (4.5 g, 26.08 mmoles). Se añadió diclorometano (22 ml) y la mezcla de reacción se agitó y se sometió a reflujo durante 3 h a 40ºC. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se secó con $MgSO_4$ anhidro. Se eliminó el solvente mediante evaporación rotatoria. El producto en bruto se lavó tres veces con éter dietílico frío (100 ml para cada lavado) y se secó al vacío a temperatura ambiente. Rendimiento: 1,4814 g (64,7%). RMN ^1H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: 4.4 (t, 2H, -C(O)OC*H*$_2$CH$_2$C(O)-), 2.84 (dd, 2H, -C*H*$_2$C(O)O-), 2.72 (m, 4H, -C*H*$_2$C(O)C*H*$_2$-); RMN ^{13}C (400MHz, $CDCl_3$, ppm) δ: 204.9 (-*C*(O)-), 173.3 (-*C*(O)O-), 63.3 (-*C*H$_2$O-), 44.7(-OCH$_2$*C*H$_2$C(O)-), 38.6 (-C(O)CH$_2$*C*H$_2$C(O)-), 27.9 (-*C*H$_2$C(O)O-).

8. Síntesis de copolímero POLI(VL-AVL-OPD) (ABD)

A un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 50 ml, dotado de barra de agitación, condensador, purga de nitrógeno y septos, 2-oxepán-1,5-diona (0.6987 g, 5.45 mmoles) y tolueno seco (4 ml). La mezcla se agitó en un baño de aceite a 70ºC para disolver el monómero. Tras la disolución, se añadieron δ-valerolactona (1.5 g, 14.98 mmoles), α-alil-δ-valerolactona (0.9546 g, 6.81 mmoles), etanol absoluto (0.0205 g, 4.4 $x10^{-1}$ mmoles) y $Sn(Oct)_2$ (0.0119 g, $2.73x10^{-2}$ mmoles) al reactor y la mezcla se calentó durante 48 h a 110ºC. Se eliminaron el monómero residual y el catalizador mediante diálisis con la membrana de diálisis Spectra/Por® (MWCO=1000) frente a CH_2Cl_2, proporcionando un polímero marrón dorado. Rendimiento: 2,6894 g (85%). M_w = 4858 Da, PDI = 1.27; RMN ^1H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: 5.72 (m, H_2C=C*H*-), 5.06 (m, *H*$_2$C=CH-), 4.34 (m, -$CH_2CH_2C(O)CH_2CH_2O$-), 4.08 (m, -C*H*$_2$O-), 3.67 (m, -OC*H*$_2$CH$_3$), 2.78 (m, opd,-OC(O)CH$_2$C*H*$_2$C(O)CH$_2$-), 2.58 (m, opd, -OC(O)CH$_2$CH$_2$C(O)C*H*$_2$-), 2.34 (m, vl, -CH$_2$C*H*$_2$C(O)O-, avl, H_2C=CHCH$_2$C*H*-, H_2C=CHCH$_2$C*H*-), 1.66 (m, avl y vl, -CHC*H*$_2$C*H*$_2$-), 1.25 (t, -CH$_2$C*H*$_3$); RMN ^{13}C (400MHz, $CDCl_3$, ppm) δ: 204.9, 175.2, 173.7, 173.2, 135.0, 117.0, 63.9, 44.8, 36.4, 33.6, 28.0, 26.3, 21.3.

9. Síntesis de copolímero POLI(VL-AVL-PVL-OPD) (ABCD)

A un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 25 ml, dotado de una barra de agitación, se añadió 2-oxepán-1,5-diona (0.2626 g, 2.05 mmoles) y el matraz se selló con dos septos y una entrada de gases. Se evacuó el matraz y se rellenó con argón tres veces. Se añadió tolueno seco (1.25 ml) y la mezcla se agitó en un baño de aceite a 70ºC para disolver el monómero. Tras la disolución, se añadieron $Sn(Oct)_2$ (0.0018 g, $4.41x10^{-3}$ mmoles en 0.15 ml de tolueno seco), etanol absoluto (12.8 µl, $2.22x10^{-1}$ mmoles), δ-valerolactona (0.62 g, 6.2 mmoles), α-alil-δ-valerolactona (0.38 g, 2.69 mmoles) y α-propargil-δ-valerolactona (0.38 g, 2.73 mmoles). La temperatura del baño de aceite se incrementó a 105ºC y la mezcla se agitó durante 50 h. Se eliminaron el monómero residual y el catalizador mediante diálisis con la membrana de diálisis Spectra/Por® (MWCO=1000) frente a CH_2Cl_2, proporcionando un polímero marrón dorado. Rendimiento: 1,31 g (80%). M_w = 3525 Da, PDI = 1.27; RMN ^1H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: 5.86 (m, H_2C=C*H*-), 5.09 (m, *H*$_2$C =CH-), 4.34 (m, opd, -CH$_2$CH$_2$C(O)CH$_2$C*H*$_2$O-), 4.08 (m, avl, pvl y vl, -C*H*$_2$O-), 3.65 (m, -OC*H*$_2$CH$_3$), 2.74 (m, opd, -OC(O)C*H*-$_2$C*H*$_2$C(O)-), 2.60 (m, opd, -CH$_2$CH$_2$C(O)C*H*$_2$CH$_2$-, pvl, -OC(O)C*H*-, -CHC*H*$_2$C≡CH), 2.50 (m, CHC*H*$_2$C≡CH), 2.34 (m, vl, -CH$_2$C*H*$_2$C(O)O-, avl, H_2C=CHCH$_2$C*H*-, H_2C=CHC*H*$_2$CH-), 2.02 (m, *H*C≡C-), 1.68 (m, pvl, avl & vl,-CHC*H*$_2$C*H*$_2$-), 1.25 (m, -CH$_2$C*H*$_3$).

10. Procedimiento general para la oxidación de copolímeros

En un matraz de fondo redondo de 200 ml, dotado de barra de agitación, se disolvió poli(vl-avl) (2.7389 g, 6.12 mmoles) en 37 ml de CH_2Cl_2. A esta solución se añadió lentamente ácido 3-cloroperoxibenzoico (2.0903 g, 12.11 mmoles). La mezcla se agitó durante 72 h a temperatura ambiente y después se concentró mediante un evaporador rotatorio. El producto en bruto se disolvió en una cantidad mínima de THF (5 ml) y se vertió en un matraz de fondo redondo que contenía 1 l de éter dietílico. La solución se mantuvo durante la noche a 0ºC y se obtuvo un sólido blanco. Se eliminó la solución mediante decantación y el sólido se secó al vacío, obteniendo poli(vl-evl). Rendimiento: 1,9467 g (71%). RMN ^1H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: El cambio significativo puede

la desaparición de los protones alílicos a 5.7 y 5.09 ppm y la aparición de pequeños picos de res
en 2.96, 2.75 y 2.47 ppm debido a la formación del anillo epóxido. Todos los demás aspectos del espectro eran similares.

11. Procedimiento general para la formación de nanopartículas

En un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 100 ml dotado de barra de agitación, condensador y septos, se añadió una solución de 2,2'-(etilén-dioxi)dietilamina (39.3 µl, $2.68x10^{-4}$ moles) en 27.6 ml de CH_2Cl_2. Se añadió gota a gota una solución de poli(vl-evl) (0.1330 g, M_w= 4834 Da, PDI=1.17) disuelta en CH_2Cl_2 (0.18 ml) mediante una bomba peristáltica a un caudal de 13 ml/min con agitación vigorosa. La mezcla se calentó bajo reflujo durante un total de 12 h. Se eliminó la diamina residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a diclorometano. RMN ^1H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: El cambio significativo fue la desaparición de los protones de epóxido en 2.96, 2.75 y 2.47 ppm y la aparición de señales en 3.5 y 2.89 ppm correspondientes a los protones vecinos de la amina secundaria del conector PEG después del entrecruzamiento. Todos los demás aspectos del espectro eran similares.

12. Determinación del contenido de amina

Las nanopartículas pueden titularse con un ácido fuerte para determinar el contenido de amina. Tal como se muestra en la tabla 2, se titularon varias muestras de nanopartículas de poli(vl-evl) (AB) con ácido perclórico para determinar los porcentajes en peso (% en peso) de amina primaria y amina secundaria en las tres muestras que se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión. Las tres muestras (mostradas en la tabla 2) tituladas presentaban las dimensiones de tamaño siguiente según la DLS: 58.06, 255.7 y 425.1 nm.

Tabla 2: correlación entre tamaño de partícula y contenido de amina

AB tamaño de nanopartícula (nm)	Amina primaria % en peso	Amina secundaria % en peso
58,06	0,008%	0,031%
255,7	0,025%	0,098%
425,1	0,055%	0,20%

13. Nanopartículas formadas mediante copolimerización

Aunque las nanopartículas se preparan típicamente con un único tipo de polímero o copolímero, también se han producido con éxito nanopartículas a partir de una mezcla de poli(vl-evl-pvl) y poli(vl-evl-opd). Se tabulan dichas nanopartículas en la tabla 3.

Tabla 3: Nanopartículas formadas de dos polímeros

Amina/1 Epóxido	Diámetro (nm) Poli(vl-evl-pvl) con poli(vl-evl-opd)
4	43,7 ± 4,50
8	94,15 ± 6,85

14. Modificación del contenido de comonómero

Las propiedades de las nanopartículas pueden ajustarse adicionalmente mediante la incorporación de diferentes porcentajes de epoxi-δ-valerolactona (evl) en el esqueleto del polímero. Los datos resumidos en la tabla 4, posteriormente, muestran las nanopartículas preparadas a partir de poli(vl-evl) lineal con 2% de evl, 7% de evl y 19% de evl. Estos datos muestran que, a medida que el % de evl se reduce hasta 2% en el polímero lineal, pueden obtenerse nanopartículas más pequeñas. A medida que el % de evl se incrementa hasta 19%, las nanopartículas resultantes son más grandes, aunque presentan una desviación pequeña en comparación con las nanopartículas más grandes preparadas a partir de poli(vl-evl) con 7% de evl.

Tabla 4: Efecto de la modificación del contenido de comonómero

Amina/1 Epóxido	Diámetro (nm) Poli(vl-evl) 2% evl	Diámetro (nm) Poli(vl-evl) 7% evl AB	Diámetro (nm) Poli(vl-evl) 19% evl
3	7.02 ± 1.05	82.1 ± 5.73	179.9 ± 18.0
4	19.04 ± 1.32	115.6 ± 25.4	225.6 ± 22.5
5	33.55 ± 1.93	255.7 ± 60.3	299.0 ± 31.2
6	48.66 ± 3.18	342.2 ± 52.2	409.1 ± 42.7
8	84.89 ± 10.47	425.1 ± 100	843.3 ± 88.0

La relación entre la estequiometría de la reacción y el tamaño de partícula para diversos contenidos de

monómero se ilustra adicionalmente en la figura 8 - figura 10.

15. Adición de etilendiamina 2-VINILSULFONIL-ETIL carbonato a nanopartículas de ABD (POLI(VL-EVL-OPD))

En un matraz de fondo redondo de 100 ml dotado de barra de agitación, se disolvieron nanopartículas ABD (0.0846 g, $2.45x10^{-4}$ mmoles) en 12.5 ml de CH_2Cl_2. A dicha solución se añadió etilendiamina 2-(vinilsulfonil)-carbonato de etilo en metanol (0.0152 g en 69 µl de metanol, $5.89x10^{-2}$ mmoles). Se disolvió cianoborohidruro sódico (0.0111 g, $1.76x10^{-1}$ mmoles) en 12.5 ml de metanol y se añadió al matraz de fondo redondo. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 6.5 con NaOH acuoso 1 M y HCl 1 M. La mezcla se agitó durante 25 h a temperatura ambiente y después se dializó con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a diclorometano/metanol 1:1. Se observó la unión con éxito del conector mediante la aparición de las señales 6.7 ppm y 6.9 ppm (RMN ^{1}H, 300 MHz $CDCl_3$/TMS) debido a los protones de vinilo del conector.

16. Unión de GV-13-ALEXAFLUOR 750 a nanopartículas ABD

En un vial pequeño dotado de una barra de agitación se disolvieron nanopartículas de conector modificado (L-ABD) (29.9 mg) en 800 µl de tampón PBS (pH 7.2) y 700 µl de dimetilformamida. A dicha solución se añadieron 251 µl de GV-13-Alexafluor (0.44 mg en 150 µl de tampón PBS y 26.5 µl de DMF) al vial mediante una micropipeta. Tras 45 min de agitación a temperatura ambiente, se añadió GV-13 (2.08 mg, $1.9x10^{-3}$ mmoles) disuelto en 200 µl de tampón PBS. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h en un vaso cubierto con aluminio. La mezcla resultante se purificó con tubos concentradores (MWCO=10,000) para eliminar el exceso de GV-13 y GV-13-Alexafluor. El producto purificado se concentró mediante evaporador rotatorio. Se observó la unión con éxito del péptido y el pigmento por la presencia de un color azul brillante debido al pigmento. La RMN ^{1}H también mostraba la presencia del péptido.

Parte general. Se obtuvieron reactivos comerciales de proveedores comerciales (Aldrich, EMD, Alfa-Aesar, Fisher Scientific y Across) y se utilizaron sin purificación adicional. Se llevó a cabo TLC analítica en placas Merck comerciales recubiertas con gel de sílice GF254 (0.24 mm de grosor) y los puntos se localizaron con luz UV (254 y 366 nm). El gel de sílice para la cromatografía flash era Merck Kieselgel 60 (malla de 230-400, ASTM) o de 60 Å de Sorbent Technologies (40 a 63 µm, grado técnico). Se obtuvo *MAL-dPeg™$_4$-t-boc-hidrazida* de Quanta Biodesign, Ltd. (Powell, OH) y se utilizó sin modificación. El pigmento Cy3 NHS y las columnas de desalado PD-10 se recibieron de GE Healthcare (Piscataway, NJ). Las membranas de diálisis de éster de celulosa (CE, por sus siglas en inglés) Spectra/Por® Biotech (1,000 MWCO) se obtuvieron de Spectrum Laboratories, Inc. (Rancho Domínguez, CA). Los tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO de 10,000) se obtuvieron de Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

Instrumentación: Las muestras se centrifugaron a 600 rpm en una centrífuga International modelo CS de International Equipment Company (Boston, MA). Se llevó a cabo cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) con un HPLC Varian Prostar. Los productos se eluyeron utilizando un gradiente de solventes (solvente A=TFA al 0.05%/H_2O; solvente B=TFA al 0.05%/CH_3CN). Se llevó a cabo resonancia magnética nuclear en espectrómetros de transformada de Fourier Bruker AC300 y AC400 utilizando solventes deuterados y el pico de solvente como referencia. Se llevó a cabo cromatografía de permeación en gel en tetrahidrofurano (THF) con el eluyente a un caudal de 1 ml/min en un cromatógrafo Waters dotado de cuatro columnas Waters de 5 mm (300 mm x 7.7 mm) conectadas en serie con tamaño de poro creciente (100, 1000, 100,000 y 1,000,000 Å respectivamente). Se utilizó un detector de absorbancia de λ dual Waters 2487 y un detector de índice de refracción 2414. Se llevó a cabo dispersión de luz dinámica en un instrumento Malvern Zetasizer Nanoseries con un sistema de goniómetro compacto CGS-3.

17. Síntesis de compuesto 1

A una solución de dimetoxietano (40 ml) se añadió $MeNO_2$ (11.37 ml, 200 mmoles) seguido de Triton B (2 ml). La mezcla se calentó a 67ºC y después se añadió acrilato de terc-butilo (91.83 ml, 620 mmoles) para mantener la temperatura a 75ºC. Al iniciarse la reducción de la temperatura, se añadió Triton B adicional (1 ml). Tras completar la adición, se calentó la solución para mantener la temperatura a 75ºC durante 2 horas. Se eliminó el solvente al vacío y el residuo se disolvió en $CHCl_3$ y la solución orgánica resultante se lavó con HCl al 10%, solución hipersalina y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La eliminación del solvente al vacío proporcionó un sólido en bruto que se purificó adicionalmente mediante recristalización a partir de EtOH, obteniendo un cristal incoloro (rendimiento de 95%). RMN ^{1}H ($CDCl_3$): δ1.44 (s, C*H*$_3$, 27*H*), 2.21 (m, C*H*$_2$, 12*H*). RMN ^{13}C ($CDCl_3$): 27.93 (CH3), 29.68 (CH2CO), 30.22 (CCH2), 81.02 (CCH3), 92.09 (*C*NH_2), 170.97 (*C*O_2).

18. Síntesis de compuesto 2

Una solución de compuesto 1 (6.0 g, 0.0135 moles) en una mezcla de etanol (140 ml) y diclorometano (20 ml) se añadió a una botella de hidrogenación de Parr. A continuación, se añadieron 4 gramos de níquel de Raney. La mezcla se hidrogenó a 50 psi y temperatura ambiente. La reacción se monitorizó mediante cromatografía de capa fina (TLC) hasta desaparecer el material de partida. El catalizador se filtró cuidadosamente a través de

Celite y se eliminó el solvente al vacío, rindiendo un sólido en bruto. El residuo se disolvió en diclc
lavó con $NaHCO_3$ saturado y agua, y después se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La eliminación del diclorometano proporcionó un sólido blanco (93%). RMN ^1H ($CDCl_3$): δ1.44 (s, C*H*$_3$, 27*H*), 1.95 (*t*, C*H*$_2$, 6*H*), 2.43 (*t*, C*H*$_2$, 6*H*); RMN ^{13}C ($CDCl_3$): 27.98 (CH3), 29.46 (CH2CO), 31.47 (CCH2), 56.99 (*C*NH$_2$), 80.96 (*C*CH$_3$), 172.30 (*C*O$_2$).

19. Síntesis de compuesto 4

A una solución de compuesto 3 (0.65 g, 2.35 mmoles) en 50 ml de THF seco, se añadieron los reactivos siguientes: 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0.96 g, 7.10 mmoles), DCC (1.46 g, 7.10 mmoles) y después 2 (3.54 g, 8.5 mmoles). La solución se agitó a temperatura ambiente y la reacción se monitorizó mediante TLC. Tras 40 horas, se filtró el precipitado blanco y la solución se concentró, rindiendo un residuo en bruto. Se purificó el producto mediante cromatografía de columna (gel de sílice, hexano:acetato de etilo=3:2), rindiendo un sólido blanco ((85%). RMN ^1H ($CDCl_3$): δ1.44 (m, C*H*$_3$, 81*H*), 1.95 (m, C*H*$_2$, 18 *H*), 2.21 (m, C*H*$_2$, 30H), 6.20 (s, N*H*, 3*H*); RMN ^{13}C ($CDCl_3$): 28.04, 29.74, 29.85, 31.28, 57.56, 80.69, 92.47, 170.46, 172.76.

20. Síntesis de compuesto 5

Una solución de compuesto 4 (1.47 g, 1 mmoles) en 15 ml de ácido fórmico se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Tras concentrar la solución, se añadió tolueno y la solución se evaporó para eliminar cualquier residuo de ácido fórmico, proporcionando un sólido blanco (100%). RMN ^1H (DMSO): δ1.81 (m, C*H*$_2$, 18 H), 2.11 (m, C*H*$_2$, 30H), 7.29 (s, N*H*, 3*H*), 12.10 (br, COO*H*); RMN ^{13}C (DMSO): 28.03, 29.03, 30.08, 56.41, 93.31, 170.43, 174.42.

21. Síntesis de compuesto 6

A una solución de compuesto 5 (2.12 g, 0,0022 moles) en DMF (30 ml), se añadió HOBt (2.68 g, 0,0198 moles) y DCC (4.09 g, 0,0198 moles). La mezcla se enfrió a 0ºC con un baño de hielo-agua. A continuación, una solución de N-Boc-etilendiamina (3.49 g, 0,0218 moles) en DMF (5 ml) se añadió gota a gota a 0ºC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. A continuación, se filtró la solución y se añadieron 200 ml de diclorometano y se lavó con HCl 1 N, $NaHCO_3$ saturado y agua. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó, rindiendo un residuo en bruto. El producto se purificó mediante cromatografía de columna (se eluyó en primer lugar con metanol al 2% en diclorometano, seguido de metanol al 6% en diclorometano, seguido de metanol al 10% en diclorometano), obteniendo un sólido blanco (51%). RMN ^1H (CD_3OD): δ 1.44 (m, C*H*$_3$, 81*H*), 1.80-2.10 (m, C*H*$_2$, 48 *H*), 3.0-3.2 (m, C*H*$_2$, 36*H*), 6.20 (m, N*H*, 3*H*), 6.46 (m, *NH,* 8*H*), 7.71(m, *NH*, 8*H*); RMN ^{13}C (CD_3OD): 28.40, 31.24, 31.44, 31.80, 32.09, 40.66, 40.97, 59.14, 80.13, 94.42, 158.48, 173.48, 175.91. Dicho sólido blanco se disolvió seguidamente en 40 ml de 1,4-dioxano. A 0ºC, se añadieron 40 ml de HCl 4 M a la solución bajo atmósfera de Ar y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La eliminación del solvente proporcionó un sólido blanco como la sal HCl desprotegida (100%). RMN ^1H (D_2O): δ 1.70-2.15 (m, C*H*$_2$, 48 H), 3.30 (m, C*H*$_2$, 18*H*), 3.36 (m, C*H*$_2$, 18*H*); RMN ^{13}C (D_2O): 27.61, 27.98, 28.86, 35.11, 37.41, 56.29, 92.01, 171.84, 174.98. 1,53 g (0,92 mmoles) de la sal HCl resultante se disolvió en 80 ml de metanol. A 0ºC, se añadieron 3.5 ml de Et_3N a la solución, seguido de la adición de N,N'-diBoc-N''-triflilguanidina (4.2 g, 10.73 mmoles). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Tras la eliminación del solvente, el residuo se disolvió en diclorometano y se lavó con agua, HCl 1 N, $NaHCO_3$ saturado y agua. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se separó al vacío. El producto residuo se purificó mediante cromatografía de columna (eluido con metanol al 2% en diclorometano, seguido de metanol al 10% en diclorometano), proporcionando un sólido blanco (90%) como compuesto 6. RMN ^1H (CD_3OD): δ 1.45 (m, C*H*$_3$, 81*H*), 1.51 (m, C*H*$_3$, 81*H*), 1.90-2.25 (m, C*H*$_2$, 48 H), 3.30-3.52 (m, C*H*$_2$, 36*H*); RMN ^{13}C (CD_3OD): 28.37, 28.67, 31.32, 31.67, 32.06, 39.74, 41.24, 59.02, 80.23, 84.35, 94.31, 153.91, 157.737, 164.38, 173.33, 175.87.

22. Síntesis de compuesto 7

A una solución de compuesto 5 (1.2, 0,001245 moles), se añadió HOBt (1.514 g, 0,0112 moles) y DCC (2.311 g, 0,0112 moles) en 20 ml de DMF. A continuación, se disolvió N-Boc-1,6-diaminohexano (2.66 g, 0,0123 moles) en 5 ml de DMF gota a gota a 0ºC. A continuación, la solución se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. Seguidamente, la solución se filtró y se añadieron 200 ml de diclorometano, y se lavó con HCl 1 N, $NaHCO_3$ saturado y agua. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó, rindiendo un residuo en bruto. El producto se purificó mediante cromatografía de columna (se eluyó en primer lugar con metanol al 2% en diclorometano, seguido de metanol al 5% en diclorometano, seguido de metanol al 10% en diclorometano), obteniendo un sólido blanco (45%). RMN ^1H (CD_3OD): δ 1.2 - 1.6 (m, C*H*$_3$, C*H*$_2$, 153*H*), 1.80-2.10 (m, C*H*$_2$, 48 *H*), 3.0-3.2 (m, C*H*$_2$, 36*H*); RMN ^{13}C (CD_3OD): 27.54, 28.85, 30.37, 30.90, 31.28, 31.60, 32.14, 40.58, 41.24, 59.13, 79.30, 94.30, 158.49, 173.50, 175.56. Dicho sólido blanco se disolvió seguidamente en 40 ml de 1,4-dioxano. A 0ºC, se añadieron 40 ml de HCl 4 M a la solución bajo atmósfera de Ar y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La eliminación del solvente proporcionó un sólido blanco como la sal HCl desprotegida (100%). RMN ^1H (D_2O): δ 1.10-1.60 (m, C*H*$_2$, 72 H), 1.7-2.2 (m, C*H*$_2$, 48H), 3.30 (m, C*H*$_2$, 18*H*), 3.36 (m, C*H*$_2$, 18*H*). 0,838 g (0,385 mmoles) de la sal HCl resultante se disolvió en 80 ml de metanol. A 0ºC, se añadieron 1.45 ml de Et_3N a la solución, seguido de la adición de N,N'-diBoc-N''-triflilguanidina (1.765 g, 4.51 mmoles). La solución se agitó a

temperatura ambiente durante 24 h. Tras la eliminación del solvente, el residuo se disolvió en diclc
lavó con agua, HCl 1 N, y agua. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se separo al vacio. El producto residuo se purificó mediante cromatografía de columna (eluido con metanol al 2% en diclorometano, seguido de metanol al 10% en diclorometano), proporcionando un sólido blanco (90%) como compuesto 7. RMN ^{1}H (CD_3OD): RMN ^{1}H de 9 (CD_3OD): δ 1.15 - 1.55 (m, 234H), 1.70-2.15 (m, C*H*$_2$, 48 H), 3.29-3.30 (m, C*H*$_2$, 36*H*); RMN ^{13}C (CD_3OD): 27.70, 27.62, 28.33, 28.67, 30.08, 30.33, 31.30, 31.60, 40.48, 40.62, 41.27, 54.5, 59.14, 80.25, 84.40, 154.22, 157.49, 164.53, 173.50, 175.53.

23. Síntesis de compuestos 8 y 9

Se disolvió el compuesto 6 (o 7, 0.10 mmoles) en 40 ml de etanol y se transfirió a una botella de hidrogenación que contenía 5 g de catalizador de níquel de Raney. La solución se hidrogenó a temperatura ambiente a 65 psi y se monitorizó mediante TLC. El catalizador se filtró a través de Celite. Se eliminó el solvente al vacío, proporcionando un sólido blanco 8 o 9 (80%). RMN ^{1}H de 8 (CD_3OD): δ 1.46 (m, C*H*$_3$, 81*H*), 1.51 (m, C*H*$_3$, 81*H*), 1.90-2.25 (m, C*H*$_2$, 48 *H*), 3.30-3.55 (m, C*H*$_2$, 36*H*); RMN ^{13}C (CD_3OD): 28.37, 28.67, 31.40, 31.76, 39.76, 41.27, 54.0, 58.86, 80.32, 84.37, 153.97, 157.81, 164.4, 175.61, 176.02. RMN ^{1}H de 9 (CD_3OD): δ 1.20 - 1.70 (m, 234H), 1.85-2.40 (m, C*H*$_2$, 48 *H*), 3.10-3.50 (m, C*H*$_2$, 36*H*); RMN ^{13}C (CD_3OD): 27.01, 27.18, 28.27, 28.53, 29.42, 29.71, 30.15, 30.88, 31.19, 40.03, 41.23, 54.3, 58.21, 79.93, 83.84, 153.62, 156.65, 163.83, 175.77.

24. Síntesis de compuesto FD-1

Se añadió FITC (0.14 g, 0.36 mmoles), disuelto en 1 ml de DMF, a una solución de compuesto 8 (0.23 g, 0.066 mmoles) en una mezcla de DMF y diclorometano. La solución se enfrió a 0ºC, a la que se añadió Et_3N (0.092 ml, 0.66 mmoles). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Tras la eliminación de DMF al vacío, el residuo se disolvió en diclorometano y se lavó con HCl 1 N y agua. La capa de diclorometano se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró, obteniendo un sólido amarillo. RMN ^{1}H (CD_3OD): δ 1.46 (m, C*H*$_3$, 81*H*), 1.51 (m, C*H*$_3$, 81*H*), 1.90-2.25 (m, C*H*$_2$, 48 *H*), 3.30-3.55 (m, C*H*$_2$, 36*H*), 6.52-6.72 (br, 4*H*), 7.15 (br, 1*H*), 7.5 (br, 2*H*), 7.72 (br, 1*H*), 8.4 (br, 1*H*). El sólido amarillo resultante (200 mg, 0.052 mmoles) se disolvió en 10 ml de 1,4-dioxano. A 0ºC, se añadieron 10 ml de HCl 4 M en dioxano a la solución bajo protección de Ar y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Tras la evaporación del solvente al vacío, se disolvió el producto en agua y se filtró el precipitado insoluble. La eliminación de agua rindió un sólido amarillo en bruto, que se purificó adicionalmente mediante RP-HPLC utilizando un gradiente de solventes (solvente A=TFA al 0.05%/H_2O; solvente B=TFA al 0.05%/CH_3CN), obteniendo el compuesto 10. RMN ^{1}H (D_2O): δ 1.85-2.30 (m, C*H*$_2$, 48 *H*), 3.10-3.30 (m, C*H*$_2$, 36*H*), 6.9 (br, 2*H*), 7.10-7.2 (m, 3*H*), 7.4 (s, 2*H*), 7.5 (br, 1*H*), 8.1 (s, 1*H*).

25. Síntesis de compuesto FD-2

Se añadió FITC (0.016 g, 0.0376 mmoles), disuelto en 1 ml de DMF, a una solución de compuesto 9 (0.050g, 0.0125 mmoles) en una mezcla de DMF y diclorometano (1:1). La solución se enfrió a 0ºC, a la que se añadió Et3N (12 µl). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Tras la eliminación de DMF al vacío, el residuo se disolvió en diclorometano y se lavó con HCl 1 N y agua. La capa de diclorometano se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró, obteniendo un sólido. Se disolvió el producto en metanol y se purificó mediante diálisis con membranas Spectro®Por Biotech RC (MWCO=3500). Tras la eliminación del metanol, se obtuvo un sólido amarillo. RMN ^{1}H (CD_3OD): δ 1.20 - 1.7 (m, C*H*$_3$, C*H*$_2$, 234*H*), 1.89-2.30 (m, C*H*$_2$, 48 *H*), 3.10-3.40 (m, C*H*$_2$, 36*H*), 6.52-6.72 (br, 4*H*), 7.15 (br, 1*H*), 7.5-7.72 (br, 3*H*), 8.1 (br, 1*H*). El sólido amarillo resultante (200 mg, 0.052 mmoles) se disolvió en 10 ml de 1,4-dioxano. A 0ºC, se añadieron 10 ml de HCl 4 M en dioxano a la solución bajo protección de Ar y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se separó el precipitado y se secó al vacío. El sólido amarillo obtenido se disolvió en agua y se liofilizó, rindiendo el compuesto 11. RMN ^{1}H (D_2O): δ 1.1 - 1.50, (m, C*H*$_2$, 72H), 1.50-2.20 (m, C*H*$_2$, 48 *H*), 3.10-3.30 (m, C*H*$_2$, 36*H*), 6.5-6.7 (br, 6*H*), 7.10 (m, 1*H*), 7.5 (br, 3H).

26. ejemplos FD-1 y FD-2

A título de ejemplos de los compuestos, se diseñaron y sintetizaron dos dendrímeros de tipo Newkome marcados fluorescentemente no peptídicos, diferenciados en un espaciador alquilo variado con fracciones terminales guanidina. La evaluación de la internalización en células de mamífero utilizando fibroblastos NIH-3T3 y células endoteliales microvasculares humanas (HMEC, por sus siglas en inglés) mostró que la longitud del espaciador en la generación de extremos de los dendrímeros puede afectar a la dirección de las moléculas de carga más exactamente en compartimientos subcelulares específicos (p.ej., núcleo o citosol). Dicha dirección puede resultar particularmente ventajosa para la administración intracelular controlada de moléculas de carga bioactivas en localizaciones diana.

Los dos conjugados ejemplares de FITC-dendrímero se encontró que eran altamente solubles en agua y se investigaron adicionalmente para su capacidad de traslocarse a través de la membrana celular. Se evaluó la internalización de FD-1 y FD-2 en células de mamífero utilizando dos líneas celulares diferentes y un método descrito anteriormente [Futaki, S.; Nakase, I.; Suzuki, T.; Youjun, Y.; Sugiura, Y. Biochemistry, 41, 7925, 2002]

con fibroblastos NIH-3T3 y HMEC (células endoteliales microvasculares humanas) y un micros
Zeiss LSM 510. La figura 12 muestra el curso temporal de incorporación de FD-1 y FD-2 en fibroblastos NIH-3T3 a 37ºC. Se observó claramente fluorescencia dentro de las células 2.5 min después de la adición de conjugados al medio, lo que es comparable a la tasa de incorporación de péptido Tat. [Futaki, S.; Nakase, I.; Suzuki, T.; Youjun, Y.; Sugiura, Y. Biochemistry 41, 7925, 2002.; Vivès, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. J. Biol. Chem. 272, 16010, 1997. Además, el grado de internalización se incrementó de una manera dependiente del tiempo de incubación y se observó que después de sólo 10 min, la intensidad de fluorescencias de las células tratadas con FD-2 era prácticamente de saturación. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia de las células tratadas con FD-1 no se aproximó a la saturación hasta puntos temporales posteriores (45 min ~ 2 h). Adicionalmente, FD-1 y FD-2 mostraron patrones diferentes de localización subcelular, ya que FD-1 aparentemente se concentraba en el núcleo, mientras que FD-2 aparentemente se concentraba en el citosol. Sin deseo de restringirse a ninguna teoría, se cree que la longitud del espaciador en la generación de extremos del dendrímero no sólo puede controlar la tasa de incorporación [Wender, P. A.; Kreider, E.; Pelkey, E. T.; Steinman, L.; Rothbard, J. B.; VanDeusen, C. L. Org. Lett. 7, 4815, 2005] sino que también regula la localización subcelular de la molécula y su carga putativa. Por ejemplo, los niveles de incorporación de FD-2 aparentemente eran generalmente más fuertes que los de FD-1 después del mismo tiempo de incubación a la misma concentración. Por lo tanto, el dendrímero con un espaciador hexilo cruza la membrana celular más rápidamente que la molécula con una cadena de etilo. Por otra parte, los patrones de localización también pueden controlarse a partir de la longitud del espaciador. FD-1 con el espaciador corto aparentemente se localiza en todas partes en la célula, aunque se encuentra altamente concentrado en el núcleo. Sin embargo, FD-2, con su espaciador más largo, se observó que residía principalmente en el citosol. Estas características de traslocación de los andamiajes dendríticos guanidinilados como portadores pueden resultar importantes para el transporte intracelular de moléculas de carga a compartimientos subcelulares específicos (p.ej., citosol o núcleo). Por ejemplo, un enfoque de traslocación que no sature el núcleo puede resultar altamente atractivo, ya que puede ser tanto menos tóxico como podría proporcionar cargas con diana citosólica con mayor precisión en el transporte, y por lo tanto, mayor eficacia. Sin restringirse a ninguna teoría en particular, se cree que los patrones de incorporación diferentes de FD-1 y FD-2 se deben a la presencia de una cadena espaciadora hexilo en FD-2 que resulta en una mayor hidrofobicidad del conjugado completo en comparación con FD-1. Adicionalmente, se llevó a cabo la incorporación de los conjugados de FD-1 y FD-2 por HMEC. La entrada de los dos conjugados en HMEC mostró un patrón de internalización similar al observado en fibroblastos.

En experimentos de control, las células tratadas con FITC libre y FITC-dendrímero guanidinilado protegido con Boc mostró una fluorescencia nula o extremadamente débil, respectivamente. Por lo tanto, el grupo guanidino desempeña un papel importante en la permeabilidad celular de estas moléculas, mientras que la longitud de la cadena espaciadora determina tanto la tasa de incorporación diferencial como los patrones de localización subcelular. Aunque el mecanismo de traslocación de Tat sigue sin entenderse, se ha demostrado que la tasa de incorporación no depende de la temperatura. [Futaki, S.; Nakase, I.; Suzuki, T.; Youjun, Y.; Sugiura, Y. Biochemistry 41, 7925, 2002.; Vivès, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. J. Biol. Chem. 272, 16010, 1997. Lo anterior indica que la endocitosis no desempeña un papel crucial en el proceso de traslocación. La evaluación del efecto de la temperatura sobre la internalización de FD-1 y FD-2 indica que los dos conjugados son capaces de introducirse en las células no sólo a 37ºC, sino también a 4ºC, incluso a una concentración de dendrímero más baja (1 µM) (ver las figuras 3 y 4, en contraste con los experimentos de control, tal como se muestran en la figura 15). No se observó ninguna reducción significativa de la intensidad de fluorescencia de las células tratadas con FD-1 o FD-2, indicando que el procedimiento de incorporación no se produce mediante endocitosis.

27. Síntesis de dendrímero B11

Un matraz de fondo redondo de tres cuellos se secó a la llama bajo argón, al que se añadió secuencialmente nitrotriácido B3 (3.192 g, 0.0115 mmoles), 1-hidrobenzotriazol (HOBt) (5.609 g, 0.0415 moles), DCC (8.560 g, 0.0415 moles) y 100 ml de THF. Tras 2 horas de activación, se añadió aminotriéster B2 (17.216 g, 0,0415 moles). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 40 h y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía flash de columna, eluyendo en primer lugar con hexano/acetato de etilo (10:1) y después con hexano/acetato de etilo (3:2), rindiendo dendrímero B11 (15.91 g, 94.1%). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.44 (m, C*H*$_3$, 81 H), 1.95 (m, C*H*$_2$, 18 H), 2.21 (m, C*H*$_2$, 30 H), 6.20 (s, N*H*, 3 H); RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 28.04, 29.74, 29.85, 31.28, 57.56, 80.69, 92.47, 170.46, 172.76.

28. Síntesis de dendrímero B12

Una solución de B11 (10.0 g, 0.0 moles) en 150 ml de etanol absoluto en presencia de 8 gramos de níquel de Raney se hidrogenó a 60 psi de hidrógeno a temperatura ambiente durante 24 h. La suspensión se filtró cuidadosamente a través de Celite y la eliminación del solvente bajo presión reducida rindió B12 (9.86 g, 98.5%). RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD): δ = 1.44 (*m*, C*H*$_3$, 81 H), 1.61 (m, C*H*$_2$, 6 H), 1.95 (m, C*H*$_2$, 12 H), 2.21 (m, C*H*$_2$, 30 H); RMN ^{13}C (400 MHz, CD_3OD): δ= 28.42, 30.24, 30.47, 32.02, 36.24, 53.53, 58.37, 81.18, 173.96, 175.39.

29. Síntesis de B25

A una solución agitada a temperatura ambiente de ácido 6-bromohexanoico (2.0 g, 0.0102 mole DMF se añadió NaN_3 (1.30 g, 0.020 moles). La mezcla de reacción se calentó y se agitó a 85ºC durante 5 h. Tras eliminar el DMF, se añadió DCM para disolver el residuo. La mezcla se lavó con HCl 0.1 N y se secó sobre $NaSO_4$ anhidro. La eliminación del solvente proporcionó un aceite en bruto que se purificó mediante cromatografía flash de columna, eluyendo en primer lugar con DCM y después con acetato de etilo/DCM (3:7), rindiendo B25 (1.67 g, 69.07%). RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD): δ = 1.38-1.49 (m, CH_2, 2H), 1.54-1.70 (m, CH_2, 4 H), 2.32 (t, CH_2, 2 H), 3.30 (t, CH_2, 2 H); RMN ^{13}C (400 MHz, MeOD): δ = 25.57, 27.32, 29.62, 34.72, 52.27, 177.38.

30. Síntesis de dendrímero B13

A una solución bajo agitación de B25 (1.29 g, 8.22 mmoles) en THF anhidro (50 ml) se añadió DCC (1.70 g, 8.22 mmoles) y HOBt (1.112 g, 8.22 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 2 h, después se añadió dendrímero B12 (9.86 g, 6.85 mmoles) y la solución resultante se agitó durante 40 h. Después de la filtración y eliminación del THF, el producto se purificó mediante cromatografía flash de columna, eluyendo con hexano/acetato de etilo (1:1), rindiendo B13 (8.50 g, 78.53%). RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD): δ = 1.44 (m, CH_3, CH_2, 83 H), 1.95 (m, CH_2, 18 H), 2.21 (m, CH_2, 32 H), 3.30 (m, CH_2, 2 H); RMN ^{13}C (400 MHz, CD_3OD): δ = 26.47, 27.47, 28.43, 29.62, 30.35, 30.61, 32.07, 32.23, 37.56, 52.28, 58.63, 58.77, 81.54, 174.21, 175.35, 175.66.

31. Síntesis de dendrímero B14

A una solución bajo agitación a 0ºC de nona-amina B5 (4.06 g, 2.43 mmoles) en metanol/acetonitrilo (25 ml/15 ml) se añadió trietilamina (6.87 g, 68.0 mmoles) y trifluoroacetato de etilo (9.32 g, 65.6 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó a 0ºC durante 1 h y después a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó el solvente al vacío y el residuo se introdujo en acetato de etilo y la solución orgánica resultante se lavó con HCl 1 N y solución hipersalina y se secó sobre $NaSO_4$ anhidro. La eliminación del solvente al vacío proporcionó un sólido en bruto que se purificó mediante cromatografía flash (gradiente de EtOAc/metanol), rindiendo un sólido (3.02 g, 56.3%). RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD): δ = 1.85-2.10 (m, CH_2, 18 H), 2.11-2.35 (m, CH_2, 30 H), 3.24-3.48 (m, CH_2, 36 H); RMN ^{13}C (400 MHz, CD_3OD): δ= 31.08, 31.26, 31.75, 32.01, 39.42, 40.42, 58.93, 94.33, 111.74, 115.54, 119.33, 123.13, 158.57, 159.06, 159.55, 160.04, 173.57, 176.14. El sólido blanco resultante (1.0 g, 0.453 mmoles) se disolvió en etanol (45 ml) y se transfirió a un recipiente de hidrogenación que contenía catalizador de níquel de Raney (5 g) y la suspensión se agitó a 80 psi de hidrógeno a 50ºC durante 48 h. Tras la filtración a través de Celite, se eliminó el solvente bajo presión reducida, proporcionando B14 en forma de un sólido blanco (0.964 g, 97.7%). RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD): δ = 1.67 (m, CH_2, 6 H), 986 (m, CH_2, 12 H), 2.188 (m, CH_2, 30 H), 3.30-3.55 (m, CH_2, 36 H); RMN ^{13}C (400 MHz, CD_3OD) δ = 31.20, 32.11, 36.17, 39.38, 40.52, 54.06, 58.80, 111.79, 115.53, 119.36, 123.10, 158.58, 159.04, 159.50, 160.1 1, 175.55, 176.24.

32. Síntesis de dendrímero B15

A una solución bajo agitación de ácido 6-heptinoico (0.3022 g, 2.40 mmoles) en THF anhidro (50 ml) se añadió DCC (0.4952 g, 2.40 mmoles) y HOBt (0.3245 g, 2.40 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 2 h, después se añadió dendrímero B14 (1.0432 g, 0.48 mmoles) y la solución resultante se agitó durante 40 h. Después de la filtración y eliminación del THF, el producto se purificó mediante cromatografía flash de columna, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo/metanol, rindiendo B15 (0.620 g, 56.57%). RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD): δ = 1.53 (*m*, CH_2, 2 H), 1.71 (m, CH_2, 3 H), 1.890-2.5 (m, CH_2, 50 H), 3.30 (m, CH_2, 36 H); RMN ^{13}C (400 MHz, CD_3OD): δ = 18.81, 26.14, 29.43, 31.27, 31.80, 37.37, 39.35, 40.43, 58.83, 59.05, 69.95, 83.4, 111.74, 115.57, 119.37, 123.13, 158.55, 159.07, 159.53, 159.99, 175.60, 176.25.

33. Síntesis de dendrímero B16

Se disolvió dendrón de azida B13 (100 mg, 0.044 mmoles) y dendrón de alquino B15 (70 mg, 0.044 mmoles) en THF/H_2O (4:1) y DIPEA (0.017 g, 0.132 mmoles, 3 equiv.) seguido de $Cu(PPh_3)_3Br$ (0.0042g, 0.0044 mmoles). La mezcla de reacción se introdujo en un reactor de microondas (Biotage) y se irradió a 120ºC durante 20 min. Tras completar la reacción, se eliminó el THF y el residuo se introdujo en DCM. Se lavó la capa orgánica con agua una vez y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. RMN ^{1}H de B16 (400 MHz, CD_3OD): δ = 1.43 (*m*, CH_3, 81 H), 1.71 (m, CH_2, 8 H), 1.890-2.5 (m, CH_2, 96 H), 2.71 (m, CH_2, 2 H), 3.30 (m, CH_2, 36 H), 4.38 (m, CH_2, 2 H), 7.75 (s, 1 H).

34. Síntesis de B17 y B18

Se agitó el “Bow-Tie” B16 en ácido fórmico durante la noche a temperatura ambiente. Tras evaporar el solvente bajo presión reducida, se añadió tolueno y se concentró al vacío para eliminar cualquier residuo de ácido fórmico, proporcionando un no ácido blanco (100%). A una solución del sólido resultante anterior en DMF, se añadió HOBt y DCC y la solución se enfrió a 0ºC, se añadió gota a gota N-Boc-etilendiamina o N-Boc-hexildiamina y la mezcla se agitó durante 48 h a temperatura ambiente, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano y la solución orgánica resultante se lavó secuencialmente con HCl 1 N, agua y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Se evaporó el solvente bajo presión reducida y el residuo en bruto se purificó mediante cromatografía flash de columna, rindiendo B17 o B18.

35. Síntesis de B19 y B20

Se añadió carbonato potásico a B17 o B18 en metanol/agua, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. El producto en bruto se purificó mediante diálisis frente a metanol con membranas de celulosa regenerada Spectra®Por Biotech (MWCO=3500) durante 24 h, proporcionando B19 o B20.

36. Síntesis de B21 Y B22

B19 o B20 anteriormente se disolvió a continuación en 1,4-dioxano y la solución se enfrió a 0ºC. Se añadió HCl 4 M en dioxano y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La eliminación del solvente bajo presión reducida proporcionó un sólido blanco. La sal HCl resultante se disolvió en metanol y la solución se enfrió a 0ºC. Se añadió Et_3N, seguido de N,N'-diBoc-N"-triflilguanidina y la mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, Tras evaporar el solvente bajo presión reducida, se disolvió el residuo en diclorometano y la solución se lavó con HCl 1 N y agua, y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras eliminar el solvente bajo presión reducida, se purificó el producto en bruto mediante diálisis frente a metanol con membranas de celulosa regenerada Spectra®Por Biotech (MWCO=3500) durante 24 h, proporcionando B21 o B22.

37. Síntesis de B23 Y B24

B21 o B22 sólido resultante se disolvió en 1,4-dioxano y la solución se enfrió a 0ºC. Se añadió HCl 4 M en dioxano y la solución se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se separó el precipitado mediante filtración y se secó, proporcionando un producto en bruto. Se redisolvió el sólido en agua y se separó el precipitado insoluble mediante filtración y el filtrado se dializó frente a agua con membranas de éster de celulosa Spectra®Por Biotech (MWCO=1000) durante 48 h y se liofilizó, rindiendo B23 o B24 soluble en agua.

38. Compuesto Q6

3-Carboxaldehídobiciclo[4,2,0]octa-1,3,5-trieno o 4-carboxaldehídobenzociclobuteno, Q6. A un matraz de 500 ml se añadieron 50 ml de THF seco, virutas de Mg (2.88 g, 120 mmoles) y 1,2-dibromoetano (4 gotas). A continuación, la mezcla se calentó bajo reflujo durante 15 min. Se añadió 4-bromobenzociclobuteno, 5,11 (20.0 g, 109 mmoles) en 25 ml de THF mediante un embudo de introducción, para formar el reactivo de Grignard. Tras la adición y enjuague del embudo de introducción con 25 ml de THF seco, la mezcla de reacción se calentó durante 45 min adicionales bajo reflujo, proporcionando una solución verde-marrón. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a 0ºC, se añadió gota a gota DMF (15 ml, 210 mmoles) a la solución y la mezcla de reacción se calentó bajo reflujo durante 15 min. La mezcla de reacción se vertió sobre 150 g de hielo, se acidificó a pH, y se neutralizó con solución de $NaHCO_3$ saturada. El producto en bruto se extrajo con acetato de etilo, la fase orgánica se filtró por Celite y la evaporación del solvente proporcionó el producto en bruto. El producto se purificó mediante cromatografía de columna utilizando éter dietílico al 10%/hexano como solventes de elución y se purificó finalmente mediante destilación de Kugelrohr (145°C, 0,5 mm), proporcionando el aldehído Q6 (11,7 g, 81,2%) en forma de un líquido incoloro; IR 3000-2800, 1690, 1598, 1216, 1067 y 827 cm^{-1}; RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.9 (s, 1H, CHO), 7.65 (dd, 1H, J = 7.4 Hz, J' = 1.2 Hz, ArH), 7.50 (s, 1H, ArH), 7.14 (dd, 1H, J =7.4 Hz, J') 1.2 Hz, ArH), 3.15 (s, 4H, CH2); RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 192.28, 153.69, 146.57, 135.4, 130.26, 122.89, 122.81, 29.97 y 29.23. Anal. Calc. para C_9H_8O; C, 81,8; H 6,10. Observado: C, 81,7; H, 5,94.

39. Compuesto Q4

3-Etenilbiciclo[4,2,0]octa-1,3,5-trieno o 4-vinilbenzociclobuteno, Q4. A un matraz de fondo redondo de 500 ml se añadió $(Ph)_3PCH_3Br$ (24.3 g, 68.1 mmoles), 110 ml de THF seco y la solución se enfrió a -78ºC, se añadió gota a gota n-BuLi (2.5 M en hexano, 26.4 ml, 66 mmoles) y la mezcla de reacción se dejó que se calentase hasta la temperatura ambiente. La solución amarillo-naranja se enfrió a -78ºC y el aldehído 6 (7.16 g, 54.2 mmoles), diluido en 34 ml de THF seco, se añadió lentamente. La mezcla se calentó hasta la temperatura ambiente y se continuó la agitación durante 2 h. La reacción se trató secuencialmente con NH_4Cl saturado y solución saturada de $NaHCO_3$, y el producto en bruto se filtró por Celite, se lavó con éter dietílico/hexano (1:1) y se evaporó a sequedad (sin calor), proporcionando el producto en bruto. La purificación adicional mediante cromatografía de columna utilizando éter dietílico al 5%/hexano como solvente de elución, siguió la destilación de Kugelrohr (75ºC, 1.0 mm), proporcionando el derivado estireno puro Q4 en forma de un líquido incoloro (5.50 g, 78%); IR 2925, 1627, 1473, 989, 901 y 829 cm^{-1}; RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.26 (d, 1H, J = 7.4 Hz, ArH), 7.20 (s, 1H, ArH), 7.04 (d, 1H, J = 7.4 Hz, ArH), 6.74 (dd, 1H, J = 17.5 Hz, J' = 10.8 Hz, CH), 5.70 (d, 1H, J = 17.5 Hz, CH_2), 5.20 (d, 1H, J = 10.8 Hz, CH2), 3.19 (s, 4H, CH_2); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl3) $ä$ 146.09, 145.75, 137.94, 136.69, 125.71, 122.58, 119.90, 112.38, 29.52 y 29.35. Anal. Calc. para $C_{10}H_{10}$; C, 92,2; H 7,80. Observado: C, 92,0; H, 8,03.

40. Copolímero aleatorio de Q4 y estireno, Q8.

El iniciador alcoxiamina, Q7 (32.5 mg, 0.1 mmoles), Q12 disuelto en estireno (10.4 g, 100 moles) y 4-vinilbenzociclobuteno, Q4 (3.25 g, 25.0 mmoles) se añadieron a una ampolla de vidrio con una barra de

agitación. Tras tres ciclos de congelación-descongelación, la ampolla se selló bajo argón y se calen
a 120ºC. El polímero resultante se disolvió en diclorometano y se purificó mediante precipitación en una mezcla 1:1 de 2-propanol/acetona, seguido de reprecipitación en metanol, proporcionando Q8 en forma de unos polvos incoloros (12.1 g, 88%), *M*w=111 000; PDI) 1.11; IR 3100-2850, 1601, 1492, 1452, 909 y 699 cm^{-1}; RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.24-6.57 (m, ArH), 3.05 (br s, CH2), 1.83-1.26 (m, CH_2, CH); RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 145.0-146.4, 1127.9, 125.5, 121.8, 42.0-44.0, 40.4 y 29.2.

41. Copolímero aleatorio de Q4 y N-BUTILACILATO, Q10.

El iniciador alcoxilamina Q7 (32.5 mg, 0.1 mmoles) se disolvió en acrilato de n-butilo (10.2 g, 72.0 mmoles) y Q4 (1.04 g, 8.0 mmoles) y se introdujo en una ampolla de vidrio con una barra de agitación. Tras tres ciclos de congelación-descongelación, se selló la ampolla bajo argón y se calentó durante 15 h a 125ºC. El polímero resultante se disolvió en diclorometano y se precipitó en MeOH/H_2O (3:1), proporcionando Q10 en forma de una goma incolora (10.2 g, 91%), *M*w=77 500; PDI) 1.12; RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.83-6.63 (m, ArH), 4.10-3.83 (m, CH2,CH), 3.05 (bs, CH2), 2.22-1.01 (m, CH2, CH3).

42. Compuesto Q12

MetII(2,2,5-trimetil-3-(benciletoxi)-4-fenil-3-azahexano)- poli(etilenglicol), Q12. Se añadió lentamente NaH (0.23 g, 6.3 mmoles) a una mezcla de monometilpoli(etilenglicol), Q14 (7.85 g, 1.57 mmoles) y 18-corona-6- (10 mg) disuelto en 10 ml de THF bajo un flujo constante de argón. Tras 15 min, la alcoxiamina sustituida con clorometilo, 13 (1.16 g, 3.14 mmoles) se añadió a la mezcla de reacción., que se calentó posteriormente bajo reflujo durante 16 h. Tras la adición de unas cuantas gotas de agua para neutralizar el NaH en exceso, la mezcla de reacción se concentró, se disolvió en diclorometano, se filtró y se evaporó a sequedad. El producto en bruto se obtuvo tras la cromatografía flash, eluyendo con diclorometano, gradualmente creciente a metanol al 10%/diclorometano, proporcionando el macroiniciador PEG, Q12, en forma de un sólido incoloro (8.03 g, 89%); IR (KBr) 3439 cm^{-1} (NH), 1693 cm^{-1} (amida). RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.4-7.1 (m, ArH), 5.10 (d, CH), 4.92 (d, CH_2OAr), 3.65 (s, OCH_2), 3.41 (d, CH), 3.28 (d, CH), 2.43 (m, CH), 1.65 (d, CH_3), 1.52 (d, CH_3), 1.40 (m, CH), 1.33 (d, CH3), 1.05 (s, *t*-Bu), 0.89 (d, CH3), 0.80 (s, *t*-Bu), 0.61 (d, CH_3) y 0.22 (d, CH_3).

43. Compuesto Q15

Polietilenglicol-*b*-(estireno-*co*-benzociclobuteno), Q15. La alcoxiamina terminada en polietilenglicol, Q12 (500 mg, 0.1 mmoles) (*M*n=5 000, PDI) 1.06) se disolvió en estireno (10.4 g, 100 moles) y 4-vinilbenzociclobuteno, Q4 (3.25 g, 25.0 mmoles) en una ampolla de vidrio con una barra de agitación. Tras tres ciclos de congelación-descongelación, se selló la ampolla bajo argón y se calentó durante 6 h a 125ºC. El polímero resultante se disolvió en diclorometano y se purificó mediante precipitación en una mezcla 1:1 de isopropanol/acetona, seguido de la reprecipitación en metanol, proporcionando Q15 en forma de unos polvos incoloros (10.7 g, 76.1%), *M*w=89 500; PDI=1.12; RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.24-6.57 (m, ArH), 3.65 (s, OCH2), 3.05 (br s, CH2), 1.83-1.26 (m, CH_2, CH).

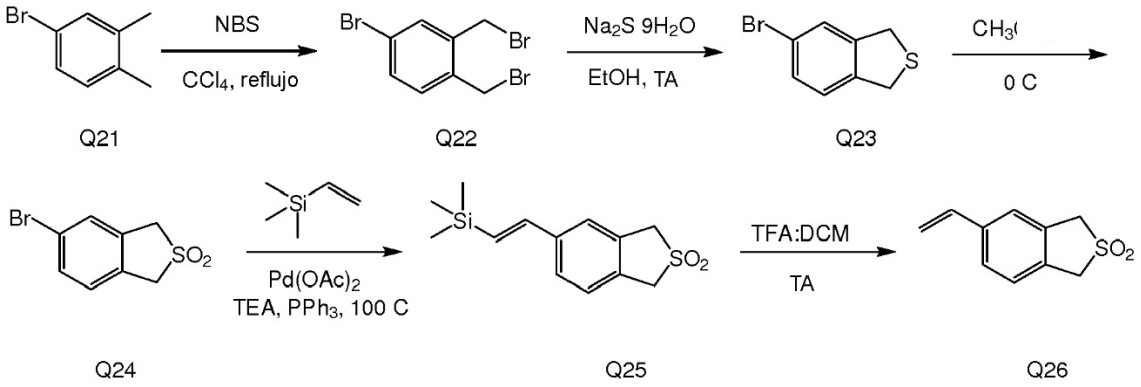
44. Procedimiento general para la formación de nanopartículas, Q9

En un matraz de tres cuellos de 500 ml dotado de un termómetro interno, condensador y septo, se calentaron 120 ml de éter bencílico a 250ºC bajo argón. Se añadió gota a gota una solución del polímero lineal funcionalizado con benzociclobuteno (BCB), Q8 (4.00 g, Mn=108000; PDI = 1.15, 7.5% molar de BCB), disuelto en éter bencílico (40 ml), mediante una bomba peristáltica a aprox. 12.8 ml/h agitando vigorosamente bajo argón. Tras la adición, la mezcla de reacción se calentó durante 1 h adicional, se destiló el solvente bajo presión reducida, y el producto en bruto restante se disolvió en diclorometano y se precipitó en metanol. Lo anterior proporcionó las nanopartículas, Q9, en forma de sólido incoloro (3.76 g, rendimiento de 94%). RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$). El cambio significativo fue la desaparición de los protones del benzociclobuteno alifático en 3.05 al formarse las nanopartículas entrecruzadas; todos los demás aspectos del espectro eran similares.

45. Compuesto Q20

Síntesis de 2,2-dióxido de 5-vinil-1,3-dihidro-benzo(c)tiofeno, Q20. Bajo las condiciones clásicas de la reacción de Heck, se transformó el 2,2-dióxido de 5-bromo-1,3-dihidro-benzo(c)tiofeno con PPh_3, $Pd(OAc)_2$, TEA, y viniltrimetilsilano a 90°C en DMF. El producto en bruto se extrajo con CH_2Cl_2 y se concentró. La desprotección en CH_2Cl_2/TFA proporcionó el producto puro tras la purificación mediante cromatografía flash (CH_2Cl_2) con elevados rendimientos.

Se prepararon los compuestos Q22 a Q26 siguiendo los procedimientos siguientes, tal como se indica esquemáticamente después.



46. Compuesto Q22

4-bromo-1,2-bis(bromometil)benceno (Q22). A un matraz de fondo redondo de 1000 ml se añadió 4-bromo-o-xileno (21) (0.0811 moles, 15.00 g), NBS (0.0426 moles, 7.580 g), 2,2'-azobis-isobutironitrilo (0.00405 moles, 0.6650 g) y 500 ml de CCl_4. A continuación, la mezcla de reacción se calentó bajo reflujo durante 1 h. Después de este tiempo, se añadió otra cantidad de NBS y AIBN y se repitió la operación cuatro veces en total. Se separó el precipitado mediante filtración de la mezcla de reacción caliente y se concentró el filtrado. El material en bruto se cristalizó a partir de hexanos, formando cristales blancos (23 g, 93%). RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.53 (d, 1H, ArH, *J*=2.0 Hz), 7.44 (dd, 1H, ArH, *J*=8.1 Hz, *J'*=2.0 Hz), 7.24 (d, 1H, ArH, *J*=8.10), 4.60 (d, 4H, C*H*$_2$, J=4.20 Hz).

47. Compuesto Q23

5-bromo-1,3-dihidro-2-benzo[c]tiofeno (Q23). A la solución bajo agitación de $Na_2S{\cdot}9H_2O$ (0.0502 mol, 12.043 g) en 800 ml de etanol se añadió gota a gota una solución de 4-bromo-1,2-bis(bromometil)benceno (0.0418 moles, 14.334 g) en 200 ml de etanol a temperatura ambiente. Tras 20 h, se filtró una mezcla de reacción blanca turbia y se concentró a un volumen de 200 ml. A continuación, se añadieron 250 ml de acetato de etilo y la solución orgánica se lavó 3x con agua (125 ml) y 1x con solución hipersalina (125 ml). La fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$ anhidro y se concentró. El producto en bruto proporcionó un aceite amarillo y se utilizó sin purificación adicional. RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38 (s, 1H, ArH) ppm 7.32 (dd, 1H, J=1.8Hz, J=8.1Hz, ArH) ppm 7.11 (d, 1H, J=8.1Hz, ArH) ppm 4.21 (dd, 1H, J=1.8Hz, J=8.5Hz).

48. Compuesto Q24

5-bromo-1,3-dihidro-2-benzo[c]tiofeno-2,2 dióxido (Q24). El 5-bromo-1,3-dihidrobenzo[c]tiofeno en bruto (Q21) de la reacción anterior, 7.815 g, se disolvieron en 5.00 ml de ácido acético glacial y se enfriaron en un baño de hielo. Dicha suspensión se añadió gota a gota a 11 ml de ácido peracético frío enfriados con un baño de hielo. Tras completar la adición, se dejó que la reacción se calentase hasta la TA y se formó un precipitado blanco durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el precipitado se lavó con etanol frío. El producto en bruto era un precipitado amarillo pálido y se utilizó sin ninguna purificación adicional. Se observó un rendimiento típico de 3.749 g para la reacción. RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) ppm 7.36 (dd, 1H, J=9.8Hz, J=92.9Hz) (m, ArH), 4.34 (d, 1H, J=13.0Hz) (d, CH_2). RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) ppm 133.604, 132.549, 130.559, 129.570, 127.999, 123.088, 57.017, 56.914.

49. Compuesto Q25

2,2-Dióxido de 5-trimetilsililvinil-1,3-dihidro-benzo[c]tiofeno (Q25). Un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 250 ml se purgó con N_2 durante 10 minutos. El compuesto Q23 (5 g, 20.2 mmoles), vinil-trimetilsilano (10.10 g, 100.77 mmoles), trietilamina (5.562 g, 54.97 mmoles), trifenilfosfina (0.433 g, 1.65 mmoles) y acetato de paladio (II) (0.185 g, 0,824 mmoles) se añadieron a continuación al matraz con 50 ml de DMF anhidro. A continuación, se burbujeó nitrógeno por la mezcla durante 10 min. Seguidamente, el matraz de fondo redondo se selló mediante un septo de goma y se cargó con N_2; la mezcla era de color amarillo-naranja. La mezcla de reacción se calentó a 100ºC y se añadió vinil trimetilsilano (5.005 g, 50.39 mmoles), trietilamina (2.781 g, 27.48 mmoles), trifenilfosfina (0.216 g, 0,824 mmoles) y acetato de paladio (II) (0.0925 g, 0.413 mmoles) adicionales a la mezcla, seguido de una purga con N_2 de la reacción y la carga del recipiente tras 1 hora. Tras llevar a cabo la reacción durante un total de 2 horas, se añadió otro equivalente de vinil-trimetilsilano (5.005 g, 50.39 mmoles), trietilamina (2.781 g, 27.48 mmoles), trifenilfosfina (0.216 g, 0.824 mmoles) y acetato de paladio (II) (0.0925 g, 0.413 mmoles) y la mezcla de reacción se purgó nuevamente y después se cargó con N_2 y se dejó que reaccionase durante un total de 18 h. Se eliminó la mezcla de reacción del baño de aceite y se dejó que se enfriase hasta la temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con cloruro de metileno, se lavó 3x con agua (500 ml), se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró, proporcionando el producto en bruto, Q25. RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.43-7.26 (m, 3H,

ArH), 6.83 (d, 1H, CH), 6.51 (d, 1H, CH), 4.37 (s, 4H, CH_2), 0.16 (s, 9H, CH_3); RMN ^{13}C (400 M
142.03, 139.20, 131.84, 131.61, 130.59, 126.95, 126.14, 123.59, 56.95, 56.86, -1.03, -1.36.

50. Compuesto Q26

2,2-Dióxido de 5-vinil-1,3-dihidro-benzo[c]tiofeno (Q26). Se preparó una solución al 60% (p) de ácido trifluoroacético en cloruro de metileno y se añadió al producto en bruto Q25. Se dejó la reacción bajo agitación durante 14 h, momento en que se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó 3x con 500 ml de agua. La fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró. A continuación, se purificó el producto en bruto mediante cromatografía de columna utilizando un sistema de gradiente de 4:1 heanos:acetato de etilo seguido de hexanos:acetato de etilo 3:2. El producto puro Q26 se aisló en forma de unos polvos amarillo pálido (0.91 g, 93.2%). RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$) ppm 7.39 (d, 1H, J=8.1Hz, ArH) ppm 7.33 (s, 1H, ArH) ppm 7.26 (d, 1H, J=8.1Hz, ArH) ppm 6.69 (dd, 1H, J=10.9Hz, J=17.6Hz, =CH) ppm 5.77 (d, 1H, J=17.6Hz, $=CH_2$) ppm 5.32 (d, 1H, J=10.9Hz, $=CH_2$) ppm 4.35 (s, 1H, CH_2); RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$): δ 138.11, 130.14, 126.47, 125.90, 123.26, 115.21, 56.63, 56.54

51. Síntesis de carboxilato de benceno diazonio

Se disolvió ácido antranílico (10.0 g, 72.9 mmoles) y una solución de ácido trifluoroacético (60.7 mg, 0.532 mmoles) en 6 ml de THF se disolvió bajo agitación en 73.1 ml de tetrahidrofurano en un vaso de plástico. La solución se enfrió a 0ºC y se añadió gota a gota nitrito de isoamilo (16.0 ml, 119.6 mmoles) durante un periodo de 1-2 minutos. Se dejó que la mezcla de reacción se calentase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 1-1.5 h. Se formó un precipitado de color rojo ladrillo y se convirtió lentamente en el producto pardo. Tras finalizarse, se recogió el producto mediante filtración por succión en un embudo de Buchner de plástico y se lavó en el embudo con tetrahidrofurano frío hasta que los restos de lavado eran incoloros. A continuación, se lavó el producto con 1,2-dicloroetano para desplazar el tetrahidrofurano. El producto húmedo con solvente se utilizó sin purificación adicional.

52. Síntesis de acetato de benzociclobutenilo

En un matraz de fondo redondo de 1000 ml, se disolvió bencenodiazonio-2-carboxilato bajo agitación en una cantidad mínima de 1,2-dicloroetano. Se añadió gota a gota acetato de vinilo (40.4 ml, 437.4 mmoles) a la solución y la reacción se calentó a 80ºC. La reacción se sometió a reflujo durante 4 h y rindió un aceite naranja que se purificó mediante cromatografía de columna, eluyendo con un sistema de solventes de diclorometano:hexanos 1:1 (0.515 g, 4.36%). RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.35-7.14 (m, 4H, ArH), 5.91 (d, 1H, J=4.4Hz, CH), 3.66 (dd, 1H, J=4.6Hz, J=14.5Hz, CH_2), 3.22 (d, 1H, J=14.5Hz, CH_2).

53. Hidrólisis de acetato de benzociclobutenilo

Una mezcla de acetato de benzociclobutenilo (0.515 g, 3.18 mmoles), Na_2CO_3 (0.337 g, 3.18 mmoles), metanol (2.79 ml) y agua (5.58 ml) se agitó vigorosamente durante la noche. La solución se extrajo con éter dietílico (3x 200 ml) y la fase orgánica se lavó con agua (3x 400 ml) y se secó con $MgSO_4$ y se concentró. El aceite naranja resultante se recristalizó a partir de pentano, rindiendo cristales blancos. RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.33-7.14 (m, 4H, ArH), 5.30 (ddd, 1H, J=1.7Hz, J=4.4Hz, J=8.8Hz, CH), 3.63 (dd, 1H, J=4.4Hz, J=14.4Hz, CH_2), 3.05 (dd, 1H, J=1.3Hz, J=14.1Hz, CH_2); RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.33-7.14 (m, 4H, ArH), 5.30 (dd, 1H, J=4.4Hz, J=6.6Hz, CH), 3.63 (dd, 1H, J=4.5Hz, J=14.3Hz, CH_2), 3.05 (d, 1H, J=14.3Hz, CH_2).

54. Unión de bromuro de 2-(BOC-AMINO)etilo a benzociclobutenol

Se introdujo hidruro sódico (143.15 mg, 3.58 mmoles) en un matraz seco que seguidamente se selló y se cargó con N_2. Se añadió al matraz una solución de benzociclobutenol (400 mg, 3,33 mmoles) en una cantidad mínima de THF y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se enfrió la solución a 0ºC y se añadió gota a gota a la reacción una solución de bromuro de 2-(boc-amino)etilo (1.0 g, 4.46 mmoles) en una cantidad mínima de THF y la solución se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Se separó el precipitado mediante filtración y el filtrado se diluyó con éter y se lavó conagua (3x 50 ml). Se secó la fase orgánica y se concentró, rindiendo un aceite naranja que se purificó mediante cromatografía de columna utilizando un sistema de solventes Hex:EtOAc 5:2 (0.44 g, 50.2%).

55. Desprotección de 2-(1,2-DIHIDROCICLOBUTABENCÉN-1-ILOXI)ETILCARBAMATO de T-BUTILO

En un matraz de fondo redondo de 200 ml, se disolvió 2-(1,2-dihidrociclobutabencén-1-iloxil)etilcarbamato de t-butilo (275.0 mg, 1.044 mmoles) en ácido fórmcico y CH_2Cl_2 y se dejó bajo agitación durante 48 h a temperatura ambiente. Tras evaporar el solvente bajo presión reducida, se añadió tolueno y se concentró para eliminar cualquier ácido fórmico residual, rindiendo un aceite verde que se purificó mediante cromatografía de columna utilizando un sistema de solventes Hex:EtOAc 5:2, rindiendo el producto (0.023 g, 13.5%).

56. Síntesis de 1,2-BIS(TRIMETILSILIL)BENCENO

Se agrupó magnesio (9.72 g, 400 mmoles), heametilfosforamida (HMPA) (80 ml, 460 mmoles), 1,2-diclorobenceno (14.76 g, 100 mmoles) y una cantidad catalítica de I_2 en un matraz de fondo redondo de 500 ml y se calentó a 70ºC bajo agitación. Se añadió gota a gota clorotrimetilsilano a la solución a 70ºC. La solución se agitó durante 30 min adicionales y después se calentó a 100ºC durante 48 h. Tras enfriar, la mezcla de reacción se vertió sobre hielo y $NaHCO_3$. El Mg y precipitado se separaron mediante filtración y el filtrado se extrajo con éter (3x 200 ml). La fase orgánica se lavó con agua (2x 400 ml) y solución hipersalina (1x 400 ml) y se secó con Na_2SO_4 y se concentró. El producto se separó mediante destilación bajo presión reducida a 128-133ºC, rindiendo un aceite amarillo pálido (12.0426 g, 54.13%). RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.85 (dd, 2H, J=3.4Hz, J=5.5Hz, ArH), 7.49 (dd, 2H, J=3.4Hz, J=5.5Hz, ArH), 0.55 (s, 18H, CH_3); RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 145.98, 135.17, 127.76, 1.96

57. Síntesis de triflato de (FENIL)[2-(TRIMETILSILIL)FENIL]YODONIO

Se disolvió diacetato de yodobenceno (9.66 g, 30 mmoles) en CH_2Cl_2 (60 ml) bajo agitación y la solución se enfrió a 0ºC. Se añadió gota a gota ácido tríflico (5.1 ml, 58 mmoles) a la solución y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h. Se añadió una solución de 1,2-bis(trimetilsilil)benceno (6.67 g, 30 mmoles) en CH_2Cl_2 (10 ml) a 0°C y la reacción se dejó bajo agitación a temperatura ambiente durante 2 h. La concentración de la mezcla de reacción proporcionó cristales que se trituraron en éter y se recolectaron mediante filtración, rindiendo cristales blancos (9.82 g, 65.14%). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.11-7.47 (m, 9H, ArH), 0.42 (s, 9H, CH_3); RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$): δ 139.0, 138.4, 133.3, 133.2, 132.4, 132.3, 132.1, 109.6, 0.1.

58. Síntesis de T-BUTIL(1-ETOXIVINILOXI)DIMETILSILANO

A una solución de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (17,34 ml, 102,14 mmoles) en THF (63,4 ml) bajo argón, BuLi 2,9 M en hexanos (34.05 ml, 98.74 mmol) se añadió gota a gota a 0°C. La reacción se agitó durante 15 min y después se enfrió a -78ºC. Se añadió t-butildimetilclorosilano (TBDMSCl) (16.94 g, 112.36 mmoles) en THF (25.4 ml) y después se añadió lentamente una solución de acetato de etilo anhidro (8.38 ml, 85.12 mmoles) en THF (57.2 ml) durante 1 h. La mezcla se agitó durante 10 min adicionales a -78ºC y después a t.a. Durante 1 h. A continuación, se diluyó la solución con hexanos (285.9 ml), se filtró a través de una almohadilla de Celite y se concentró el filtrado. La destilación bajo vacío a 42-50ºC proporcionó un aceite naranja (g, 2.0%). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.74 (q, 2H, J=7.0Hz, CH_2), 3.22 (d, 1H, J=2.0Hz, CH_2), 3.05 (d, 1H, J=2.0Hz, CH_2), 1.29 (t, 3H, J=7.1Hz, CH_3), 0.94 (s, 9H, CH_3), 0.17 (s, 6H, CH_3); RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δ 160.3, 62.4, 59.6, 24.79, 17.3, 13.5, -5.4.

59. Síntesis de T-BUTIL(1-ETOXI-1,2-DIHIDROCICLOBUTABENCÉN-1-ILOXI)DIMETILSILANO

Una solución bajo agitación de triflato de (fenil)[2-(trimetilsilil)fenil]yodonio (1.0 g, 2.0 mmoles) y t-butil(1-etoxiviniloxi)dimetilsilano (1.85 g, 9.96 mmoles) en CH_2Cl_2 (14 ml) se enfrió a 0°C. Se añadió Bu_4NF (2.39 ml) gota a gota a la solución y se dejó que la reacción llegase hasta la t.a. Tras 3 h, se añadió agua (75 ml) a la reacción y la solución se extrajo con EtOAc (3x 50 ml). Las fases orgánicas se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron, proporcionando el cicloaducto en bruto. RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 0.06 (s, 6H, CH_3), 0.89 (s, 9H, CH_3), 0.97 (s, 3H, CH_3), 3.19 (m, 2H, CH_2), 4.09 (q, 2H, J=7.1Hz, CH_2), 7.08 (t, 1H, J=7.7Hz, ArH), 7.18 (d, 1H, J=2.3Hz, ArH), 7.30 (dd, 1H, J=5.0Hz, J=8.7Hz, ArH), 7.67 (d, 1H, J=7.2Hz, ArH).

60. Síntesis de BENZOCICLOBUTENONA O CICLOBUTABENCÉN-1(2H)-ONA

A una solución de t-butil(1-etoxi-1,2-dihidrociclobutabencén-1-iloxi)dimetilsilano (0.56 g, 2.0 mmoles) en acetonitrilo (2.3 ml) se añadió solución acuosa al 48-50% de HF (0.23 ml) a 0ºC. Se dejó que la solución se calentase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 15 h. A continuación, se diluyó la reacción con agua y se lavó con éter (3x 50 ml). Los extractos orgánicos agrupados se lavaron con solución hipersalina (3x 100 ml), se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron. Lo anterior proporcionó un residuo marrón que se purificó mediante cromatografía de columna, eluyendo con hexanos/EtOAc (9:1). RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.99 (s, 2H, CH_2), 7.40-7.24 (m, 4H, ArH).

61. Síntesis de 1-BROMOBENZOCYCLOBUTENO

En un matraz de fondo redondo de 250 ml dotado de un tubo de secado y un condensador, se calentó una solución de cicloheptatrieno (30.7 g, 300 mmoles), bromoformo (25.3 g, 100 mmoles), K_2CO_3 anhidro (15.0 g, 109 mmoles) y 18-corona-6 (0.75 g) bajo agitación a 145ºC durante 9-10 h. Se dejó que la solución se enfriase y se diluyó con un volumen igual de acetona. Se añadió gel de sílice (15.0 g) a la mezcla de reacción y el residuo sólido insoluble se separó mediante filtración al vacío y la torta de filtración se lavó con acetona hasta que los residuos de lavado eran incoloros. Se concentró el filtrado y se destiló para eliminar el cicloheptatrieno residual. El residuo marrón viscoso se precipitó en éter de petróleo caliente. Tras la filtración para eliminar el precipitado, se concentró el filtrado y se destiló al vacío a través de una columna Vigreaux, proporcionando un producto ligeramente impuro. Se obtuvo 1-bromobenzociclobuteno puro en forma de un líquido amarillo pálido mediante

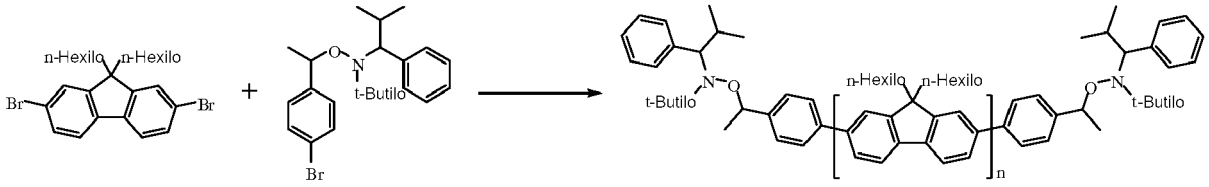
redestilación (2.95 g, 5.94%). RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.28 (m, 1H, ArH), 7.16 (d, 1H, J=7.0 (d, 1H, J=6.4Hz, ArH), 5.39 (m, 1H, CH), 3.85 (dd, 1H, J=4.4Hz, J=14.7Hz, CH_2), 3.45 (d, 1H, J=14.7Hz, CH_2).

62. Síntesis de BENZOCICLOBUTENOL

A una solución bajo agitación de óxido de mercurio (II) (591.3 mg, 2.73 mmoles) y solución acuosa al 35% de ácido tetrafluorobórico (TFBA) (999.4 mg, 5.46 mmoles) en 1,4-dioxano (10.9 ml), se añadió 1-bromobenzociclobuteno (1.0 g, 5.46 mmoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y después se trató sucesivamente con $NaHCO_3$ y KOH 3 N hasta que la solución se mantuvo básica. El óxido de mercurio (II) precipitado se separó mediante filtración y el filtrado se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 300 ml), se secó con Na_2SO_4, anhidro, se filtró y se concentró, rindiendo cristales blancos que se purificaron mediante cromatografía de columna utilizando un sistema de solventes de hexanos:EtOAc 3:2.

63. Copolímero tribloque de ESTIRENO-POLIFLUORENO-ESTIRENO

a. Síntesis de macroiniciador



Al matraz de fondo redondo de 3 cuellos, enjuagado con argón (30 min) se añadió níquel (5.080 mmoles, 1.4000 g), 2,2'-bipiridilo (5.800 mmoles, 0.9000 g), tolueno seco (10 ml), 1,5-ciclooctadieno (0.5 ml) y DMF seco (12 ml). La mezcla se calentó a 80ºC bajo argón. Tras 30 minutos, se introdujo iniciador alcoxilamina bromurada (0.7750 mmoles, 0,3134 g) y 2,7-dibromo-9,9'-di-n-hexifluoreno (2.250 mmoles, 1.1080 g) disuelto en tolueno seco (13 ml) mediante jeringa. La mezcla se agitó a 80ºC durante 24 horas en la oscuridad. Tras 24 horas, la solución caliente precipitó en 600 ml de solución de $HCl_{(conc)}$:acetona:metanol en proporción 1:1:1. El precipitado marrón oscuro resultante a continuación se filtró, se disolvió en diclorometano, se concentró al vacío y se reprecipitó con 200 ml de solución de acetona:metanol 1:1.

b. Síntesis de copolímero A-B-A con 10% de entrecruzante

Se disolvió iniciador macromolecular (M=3000, n=0.060 mmoles, 180 mg), estireno (90 eq. por cadena y 9.72 mmoles, 1.0123 g) y entrecruzante (2,2-dióxido de 5-vinil-1,3-dihidro-benzo[c]tiofeno) (10%, 1.08 mmoles, 0.2098 g) en 0.5 ml de clorobenceno en una ampolla de 10 ml. La ampolla se desgasificó, se selló y se calentó a 124ºC durante 7 a 10 horas. Después de este tiempo, el polímero se precipitó a partir de metanol. El precipitado marrón resultante se filtró, se lavó con metanol y se secó.

c. Procedimiento de pliegue de cadena intramoleculares para A-B-A

Se disolvieron 0.300 g de polímero en 50 ml de éter bencílico. La solución de polímero se añadió gota a gota, 12.4 ml/h, a éter bencílico a 260ºC bajo nitrógeno. Tras añadir todo el polímero, se enfrió la reacción y el éter bencílico se destiló de la mezcla de reacción y el residuo se precipitó a partir de metanol.

64. Síntesis de N-BOC-N-TFA-ETILENDIAMINA.

A una solución de N-Boc-etilendiamina (5.0 g, 31.2 mmoles) en 20 ml de THF. Se añadió trifluoroacetato de etilo (3.72 ml, 31.2 mmoles) gota a gota y la reacción se agitó durante la noche. La solución de reacción se concentró, rindiendo un producto cristalino blanco (8.0 g, 100%). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.44 (s, 9 H, CH_3), 3.37 (dd, 2 H, J=5.4Hz, J=10.2Hz, CH_2), 3.46 (dd, 2 H, J=5.1Hz, J=10.4Hz, CH_2), 5.01 (s, 1 H, NH), 7.85 (s, 1 H, NH); RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δ 28.2, 39.1, 42.2, 80.6, 140.6, 151.2, 157.7.

65. Desprotección de BOC EN N-BOC-N-TFA-ETILENDIAMINA.

Se disolvió N-Boc-N-Tfa-etilendiamina (8.0 g, 31.5 mmoles) en 50 ml de ácido fórmico y se agitó durante 14 h a t.a. Tras evaporar el solvente bajo presión reducida, se añadió tolueno y se concentró para eliminar cualquier ácido fórmico residual, rindiendo un aceite naranja (4.90 g, 99.7%). RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ 2.31 (s, 2 H, NH_2), 3.15 (t, 2 H, J=6.1Hz, CH_2), 3.61 (t, 2 H, J=6.1Hz, CH_2), 8.35 (s, 1 H, NH); RMN ^{13}C (400 MHz, MeOD) δ 38.5, 39.7, 113.1, 115.9, 118.8, 121.6, 159.7, 160.1.

66. Unión de N-TFA-ETILENDIAMINA.

Las nanopartículas desprotegidas (77 mg, 0.00194 mmoles) en DriSolv DMF (9.0 ml) se agitaron bajo argon a 0ºC con N-metilmorfolina (6.9 mg, 0.0680 mmoles) seguido de la adición gota a gota de cloroformato de isobutilo (10.2 mg, 0.0748 mmoles) en DMF (0.5 ml). Tras 1.5 h, se añadió gota a gota una solución de N-Tfa-etilendiamina (10.6 mg, 0.0680 mmoles). La reacción se dejó que se calentase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Tras la eliminación del DMF al vacío, se disolvió el producto en metanol y se dializó frente a metanol con tubo de diálisis plegado SnakeSkin® (MWCO=10,000).

67. Desprotección de MAL-DPEG™$_4$-T-BOC-HIDRAZIDA.

En un matraz de fondo redondo de 100 ml, se disolvió MAL-dPeg™4-t-boc-hidrazida (8.8 mg, 135.0 nmoles) en 10.0 ml de ácido fórmico y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Tras evaporar el solvente bajo presión reducida, se añadió tolueno y se concentró para eliminar cualquier ácido fórmico residual, proporcionando MAL-dPeg™4-hidrazida (58.1 mg, 100%).

68. Unión de MAL-DPEG™$_4$-HIDRAZIDA.

Las nanopartículas desprotegidas (77,5 mg, 0.00186 mmoles) en DriSolv DMF (9.0 ml) se agitaron bajo argón a 0ºC con N-metilmorfolina (1.5 mg, 0.0149 mmoles) seguido de la adición gota a gota de cloroformato de isobutilo (2.2 mg, 0.0164 mmoles) en DMF (0.1 ml). Tras 1.5 h, se añadió gota a gota una solución de MAL-dPeg™4--hidrazida (8.8 mg, mol). La reacción se dejó que se calentase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Tras la eliminación del DMF al vacío, se disolvió el producto en metanol y se dializó frente a metanol con tubo de diálisis plegado SnakeSkin® (MWCO=10,000).

69. Unión de conector disulfuro a transportador molecular de hexilo protegido con BOC

Una solución de transportador molecular protegido con Boc (500.0 mg, 0.13 mmoles), ácido 3-(piridín-2-il-disulfanil)propanoico (269.5 mg, 1.25 mmoles), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (169.0 mg, 1.25 mmoles), trietilamina (TEA) (126.7 mg, 1.25 mmoles), hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC·HCl) (240.0 mg, 1.25 mmoles) en 10 ml de DMF DriSolv se agitó durante 48 h. Se eliminó el DMF bajo vacío y el aceite marrón resultante se purificó mediante cromatografía de columna, eluyendo con un sistema de gradiente de metanol al 2-10% en diclorometano (160.5 mg, 30.6%). RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD) δ 1.33-1.47 (m, 246 H, CH_2, CH_3), 2.03 (d, 48 H, J=65.3Hz, CH_2), 3.15 (td, 30 H, J=6.3Hz, J=12.7Hz, CH_2), 3.29 (m, 45 H, CH_2), 7.42 (m, 1 H, ArH), 7.67 (d, 1 H, J=8.2Hz, ArH), 7.79 (d, 1 H, J=8.1Hz, ArH), 8.02 (s, 1 H, ArH).

70. Corte de puente disulfuro en el transportador molecular.

Una solución del transportador molecular hexilo conector disulfuro (118.2 mg, $2.82*10^{-5}$ moles) en DMF DriSolv (2.88 ml) se agitó bajo argón. Una solución de DL-ditiotreitol (339.5 mg, $2.2*10^{-3}$ moles) en DMF (71.4 ml) se añadió gota a gota al transportador y se dejó transcurrir la reacción durante 2 h a temperatura ambiente. Tras eliminar el DMF al vacío, se purificó la reacción utilizando una columna Sephadex LH-20, eluyendo con DMF y concentrando las fracciones al vacío nuevamente.

71. Unión de transportador molecular a nanopartículas.

Las nanopartículas (77.5 mg, $1.76*10^{-6}$ moles) en DMF DriSolv (ml) se agitaron bajo argón. El transportador molecular tiol libre en DMF se añadió gota a gota, seguido de la adición de una cantidad catalítica de N-metilmorfollina. Tras la eliminación del DMF al vacío, el producto se disolvió en metanol y se dializó frente a una solución de metanol:agua 1:1, finalmente dializando frente a metanol puro con tubo de diálisis plegado SnakeSkin® (MWCO=10,000).

72. Desprotección de aminas protegidas con trifluoroacetilo en partículas modificadas.

Las nanopartículas (142.0 mg, x moles) se disolvieron en una solución de K_2CO_3 al 10% de metanol:agua 5:3. Se añadió metanol según se requería para disolver por completo las partículas. La reacción se produjo durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se purificó mediante diálisis con tubo de diálisis plegado SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a una solución de metanol:agua 5:3, finalmente dializando frente a metanol puro.

73. Unión de FITC.

Las nanopartículas (30.0 mg, $4.75*10^{-7}$ moles) en DMF DriSolv (1.0 ml) se agitaron bajo argón. Se añadió gota a gota una solución de FITC (2.8 mg, $7.13*10^{-6}$ moles) en DMF DriSolv (1.0 ml) y la reacción se enfrió a 0ºC. Se añadió trietilamina (1.14 µl, $8.17*10^{-6}$ moles) a la solución y la reacción se produjo en la oscuridad, durante la noche a temperatura ambiente.

74. Adición de caperuza a aminas restantes.

Tras completar la adición de FITC a las nanopartículas, se añadió a la solución de reacción una solución de N-acetoxisuccinimida (47.1 mg, $3.00*10^{-4}$ moles) en DMF DriSolv (1.0 ml). Se dejó que se produjese la reacción durante 3 h a TA. Tras la eliminación del DMF al vacío, se disolvió el producto en metanol y se dializó frente a metanol con tubo de diálisis plegado SnakeSkin® (MWCO=10,000).

75. Desprotección de BOC en nanopartículas modificadas.

Las nanopartículas modificadas se disolvieron en 1,4-dioxano anhidro (10 ml) y se enfriaron a 0ºC. Se añadió gota a gota una solución de HCl 4 M en 1,4-dioxano (10 ml) a las nanopartículas bajo agitación y se dejó que se produjese la reacción durante la noche a temperatura ambiente. La solución de nanopartículas se diluyó a tres veces el volumen original con agua y se dializó frente a agua en tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000). Tras completar la diálisis, la solución acuosa se liofilizó, rindiendo un sólido amarillo.

76. Unión de péptido G_{13} a nanopartícula multifuncional.

Una solución de péptido G_{13} (1.2 mg, $8.22*10^{-7}$ moles) en una solución de DMF DriSolv (1.0 ml) se añadió a una solución de MFNP (1.5 mg, $2.28*10^{-8}$ moles) en DMF DriSolv (0.75 ml) y se dejó bajo agitación durante la noche. A continuación, se diluyó la reacción y se dializó frente a agua con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000). Tras completar la diálisis, la solución acuosa se liofilizó, rindiendo un sólido amarillo pálido.

77. Unión de péptido G_{IR} a nanopartícula multifuncional.

Una solución de péptido G_{iR} (1.2 mg, $8.22*10^{-7}$ moles) en una solución de DMF DriSolv (0.5 ml) se añadió a una solución de MFNP (1.5 mg, $2.28*10^{-8}$ moles) en DMF DriSolv (0.75 ml) y se dejó bajo agitación durante la noche. A continuación, se diluyó la reacción y se dializó frente a agua con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000). Tras completar la diálisis, la solución acuosa se liofilizó, rindiendo un sólido amarillo pálido.

Síntesis de copolímero poli(vl-avl-opd) (AbD). A un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 25 ml dotado de barra de agitación, entrada de gases y 2 septos de goma, se añadió 2-oxepán-1,5-diona (0.7000 g, 5.46 mmoles). El matraz de fondo redondo se purgó con argón. Tras purgar durante 30 min, se añadió tolueno seco (4 ml). La mezcla se agitó en un baño de aceite a 80ºC para disolver el monómero. Tras la disolución, a continuación se añadió al reactor $Sn(Oct)_2$ (0.011 g, $2.73x10^{-2}$ mmoles) en 0.5 ml de tolueno seco, etanol absoluto (0.020 g, 4.4 $x10^{-1}$ mmoles), α-alil-δ-valerolactona (1.15 g, 8.2 mmoles) y δ-valerolactona (1.37 g, 13.7 mmoles) y la mezcla se calentó durante 48 h a 105°C. Se eliminó el monómero residual y el catalizador mediante diálisis con membrana de diálisis Spectra/Por® (MWCO=1000) frente a CH_2Cl_2, proporcionando un polímero marrón dorado. Rendimiento: 1.7 g. M_w = 3287 Da, PDI = 1.17; RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: 5.72 (m, H_2C=C*H*-), 5.06 (m, *H*$_2$C=CH-), 4.34 (m, -$CH_2CH_2C(O)CH_2CH_2O$-), 4.08 (m, -C*H*$_2$O-), 3.67 (m, -OC*H*$_2$CH$_3$), 2.78 (m, opd, -OC(O)CH$_2$C*H*$_2$C(O)CH$_2$-), 2.58 (m, opd, -OC(O)CH$_2$CH$_2$C(O)C*H*$_2$-), 2.34 (m, vl, -CH$_2$C*H*$_2$C(O)O-, avl, H_2C=CHCH$_2$C*H*-, H_2C=CHC*H*$_2$CH-), 1.66 (m, avl y vl, -CHC*H*$_2$C*H*$_2$-), 1.25 (t, -CH$_2$C*H*$_3$); RMN ^{13}C (400MHz, $CDCl_3$, ppm) δ: 204.9, 175.2, 173.7, 173.2, 135.0, 117.0, 63.9, 44.8, 36.4, 33.6, 28.0, 26.3, 21.3. (10.39% avl, 7.97% evl, 6.42% opd y 75.21% vl).

78. Síntesis de POLI(VL-EVL-AVL-OPD) (ABBD).

En un matraz de fondo redondo de 200 ml dotado de barra de agitación se disolvió poli(vl-avl-opd) (1.7 g, 1.56 mmoles) en 30 ml de CH_2Cl_2. A esta solución se añadió lentamente ácido 3-cloroperoxibenzoico (0.2210 g, 1.28 mmoles). La mezcla se agitó durante 72 h a temperatura ambiente y después se concentró mediante un evaporador rotatorio. El producto en bruto se disolvió en una cantidad mínima de THF (5 ml) y se vertió en un matraz de fondo redondo que contenía 1 l de éter dietílico. La solución se mantuvo durante la noche a 0ºC y se obtuvo un sólido blanco. Se eliminó la solución mediante decantación y el sólido se secó al vacío, obteniendo poli(avl-evl-vl-opd). Rendimiento: 1,2 g (71%). RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: 5.72 (m, H_2C=C*H*-), 5.06 (m, *H*$_2$C=CH-), 4.34 (m, -$CH_2CH_2C(O)CH_2CH_2O$-), 4.08 (m, -C*H*$_2$O-), 3.67 (m, - OC*H*$_2$CH$_3$), 2.96 (m, protón de epóxido), 2.78 (m,evl protón de epóxido, opd, -OC(O)CH$_2$C*H*$_2$C(O)CH$_2$-), 2.58 (m, opd, - OC(O)CH$_2$CH$_2$C(O)C*H*$_2$-), 2.47 (protón de epóxido), 2.34 (m, vl, -CH$_2$C*H*$_2$C(O)O-, avl, H_2C=CHCH$_2$C*H*-, H_2C=CHC*H*$_2$CH-), 1.66 (m, avl y vl, -CHC*H*$_2$C*H*$_2$-), 1.25 (t,-CH$_2$C*H*$_3$).

79. Formación de nanopartículas a partir de POLI(VL-EVL-AVL-OPD).

En un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 250 ml dotado de barra de agitación, condensador y septos, se calentó una solución de 2,2'-(etilendioxi)dietilamina (26.4 µl, 0.18 mmoles) en 55.6 ml de CH_2Cl_2. Se añadió gota a gota una solución de poli(avl-evl-vl-opd) (0.2500 g, M_w=3287 Da, PDI=1.17) disuelta en CH_2Cl_2 (0.36 ml) mediante una bomba peristáltica a un caudal de 13 ml/min bajo agitación vigorosa. La mezcla de reacción se calentó durante 12 h. Se eliminó la diamina residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a diclorometano. RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: El cambio significativo fue la desaparición de los protones de epóxido en 2.96, 2.75 y 2.47 ppm y la aparición de señales en 3.5 y 2.89 ppm

correspondientes a los protones vecinos de la amina secundaria del conector PEG entrecruzamiento. Todos los demás aspectos del espectro eran similares. Para demostrar la reactividad de los grupos alilo con tioles, en una reacción modelo se añadió benil-mercaptano a los grupos alilo. Los presentes inventores encontraron una elevada reactividad sin utilizar ningún otro reactivo. También añadieron el transportador molecular de la misma manera.

80. Unión de BENCIL-MERCAPTANO a nanopartículas de POLI(VL-EVL-AVL-OPD) (procedimiento general para unir compuestos funcionalizados con TIOL, incluyendo “transportadores moleculares” y péptidos).

En un vial dotado de una barra de agitación, se disolvieron nanopartículas de poli(avl-evl-vl-opd) (0.030 g, 0.0268 mmoles) y bencil-mercaptano (9.48 mg, 0.0764 mmoles) en 0.6 ml de tolueno. La mezcla de reacción se calentó durante 72 h a 30ºC. El tolueno restante se eliminó al vacío y se eliminó el bencil-mercaptano residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a diclorometano. RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: El cambio significativo era la desaparición de los protones de alilo en 5.72 y 5.06 ppm y la aparición de señales en 3.52 ppm y 7.30 ppm correspondientes a los protones del metileno y el benceno, respectivamente, del bencil-mercaptano unido. Todos los demás aspectos del espectro eran similares.

81. Unión de N-BOC-ETILENDIAMINA A 2-VINILSULFONILETIL-CARBONATO de succcinimidilo (SVEC).

A una solución de SVEC (1.03 g, 3.72 mmoles) en acetonitrilo (50 ml), se añadió N-Boc-etilendiamina (0.77 ml, 4.86 mmoles) y agua (50 ml). Se añadió bicarbonato sódico (0.4066 g, 4.84 mmoles) y la reacción se agitó durante 4 h a temperatura ambiente. Se eliminó el acetonitrilo al vacío y la fase acuosa restante se diluyó con solución hipersalina (45 ml). La fase acuosa se extrajo tres veces con diclorometano (90 ml). Se agruparon las fases orgánicas, se lavaron con solución hipersalina, se secaron con $MgSO_4$ y se concentraron al vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía flash (eluyente: acetato de etilo), proporcionando un sólido blanco con un rendimiento de 90%. RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: 6.6 (m, H_2C=C*H*-), 6.4 & 6.17 (m, *H*$_2$C=CH-), 4.43 (t, -CH_2C*H*$_2$OC(O)-), 3.3 (t, -C*H*$_2CH_2$ OC(O)-), 3.24 (m, -NHC*H*$_2$C*H*$_2$NHC(O)-), 1.41 (s,-NHC(O)OC(C*H*$_3$)$_3$).

82. Unión de conector sulfonilo a nanopartículas de POLI(VL-EVL-OPD).

En un matraz de fondo redondo de 100 ml dotado de barra de agitación, se disolvieron nanopartículas de poli(vl-evl-op) (ABD) (84.6 mg, 2.45x10^{-7} mmoles) en 12.5 ml de CH_2Cl_2. A esta solución se añadió conector sulfonilo (69 µl de conector 0.85 M en metanol, 5.89x10^{-5} moles), $NaCNBH_3$ (0.0111g en 0.1 ml metanol, 1.77x10^{-4} moles) y metanol (12.4 ml). Se ajustó el pH a 6.5 utilizando solución acuosa de ácido clorhídrico 0.1 M y solución acuosa de hidróxido sódico 0.1 M. La mezcla de reacción se agitó durante 25 horas a temperatura ambiente y se purificó mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a diclorometano/metanol 1:1. RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: El cambio significativo fue la aparición de los picos siguientes: 6.8 (m, CH_2=C*H*-), 6.5 & 6.3 (m, C*H*$_2$=CH-), 4.5 (m, CH_2=$CHSO_2CH_2C$*H*$_2$-), 3.3 (m, -NHC*H*$_2$C*H*$_2$NH-), 3.1 (m, CH_2=$CHSO_2C$*H*$_2CH_2$-). Todos los demás aspectos del espectro eran similares.

83. Procedimiento general para la unión de PÉPTIDO-ALEXA FLUOR® 750 a nanopartículas conjugadas con conector

En un vial pequeño dotado de barra de agitación, se añadió péptido (33 µl de 0.013 mg/ml de péptido en tampón fosfato - pH 7.2) y Alexa Fluor® 750 (26.5 µL de Alexa Fluor® 20 mg/mL en dimetilformamida). La reacción se agitó durante 24 h envuelto en papel de aluminio. En un vial pequeño, se disolvieron nanopartículas de poli(vl-evl-opd) (ABD) (29.9 mg) en 800 µl de tampón fosfato (pH=7.2) y 700 µl de dimetilformamida. A la solución de péptido-Alexa Fluor® se añadieron 251 µl de nanopartículas disueltas. Tras agitar durante 45 min a temperatura ambiente, se añadió péptido adicional (2 mg, 1.84x10^{-6} moles). La mezcla de reacción se purificó utilizando tubos concentradores con un corte de peso molecular de 10,000 Da.

84. Unión de ALEXA FLUOR® 750 a nanopartículas de POLI(VL-EVL-OPD).

En un matraz de fondo redondo de 25 ml, se disolvieron nanopartículas de poli(vl-evl-opd) (63.55 mg, 1.92x10^{-7} moles) en 6.4 ml de tetrahidrofurano. El matraz de fondo redondo se selló con un septo de goma y se purgó con argón. A la solución purgada se añadió Alexa Fluor® 750 (5 mg en 0.5 ml de dimetilformamida anhidra). La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Tras 24 h, se añadió N-acetoxi-succinimida (50 mg, 0.3 mmoles) para desactivar las aminas no reaccionadas restantes. RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: El cambio significativo fue la aparición de los picos siguientes: 7.12, 5.6, 5.5, 5.1, 3.81, 1.90 ppm. La estructura de Alexa Fluor® 750 no es conocida públicamente. Todos los demás aspectos del espectro eran similares.

85. Aminación reductora general para la unión de péptidos a nanopartículas conjugadas con ALEXA FLUOR®

En un vial pequeño dotado de barra de agitación se disolvió péptido (2.6 mg, 2.4x10^{-6} moles) en 2 ml de

tetrahidrofurano. A esta solución se añadieron nanopartículas conjugadas con pigmento (0.09 moles, en 0.5 ml de tetrahidrofurano) y $NaCNBH_3$ (2.23 µl de $NaCNBH_3$ 1.0 M en tetrahidrofurano). La mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a tetrahidrofurano. RMN ^1H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: El cambio significativo fue la aparición de los picos siguientes: 5.2, 5, 4.8, 2.6, 2.45, 2.0, 1.22 and 0.89 ppm.

86. Unión de N-(BOC)-2,2(ETILENDIOXI)DIETILAMINA.

Un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 50 ml se secó a la llama bajo argón. Las nanopartículas desprotegidas (27.6 mg, 0.79 µmoles) se disolvieron en DMF DriSolv y se transfirieron al matraz sellado, que seguidamente se selló a 0ºC mediante un baño de hielo. Se añadió N-metilmorfolina (6.37 mg, 0.063 mmoles) seguido de cloroformato de isobutilo (9.46 mg, 0,0693 mmoles) a la solución enfriada y se dejó que se activase durante 1.5 h. A continuación, se añadió N-(boc)-2,2(etilendioxi)dietilamina (15.6 mg, 0.063 mmoles), se retiró el baño de hielo y se dejó la reacción bajo agitación durante la noche. La reacción se concentró al vacío, se disolvió el residuo en MeOH, se transfirió a tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) y se dializó frente a MeOH.

87. Desprotección de nanopartículas que contienen N-(BOC)-2,2(ETILENDIOXI)DIETILAMINA.

Las nanopartículas se disolvieron en HCl 2 M/dioxano (15 ml). Se dejó la reacción bajo agitación durante la noche. La reacción se disolvió en $MeOH/H_2O$ y se transfirió a tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) y se dializó frente a $MeOH/H_2O$.

88. Unión de ALEXA FLUOR 750®.

Se purgó tampón de PBS (pH 7.3) con argón durante 1 h. Se añadió Alexa Fluor® 750 (3 mg, 2.3 µmoles) en 0.3 ml de DMF a una solución de nanopartículas desprotegidas (15.8 mg) en tampón de PBS (1.2 ml) y se dejaron bajo agitación durante 24 h. La reacción se diluyó con H_2O, se transfirió a tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) y se dializaron frente a H_2O.

89. Unión de SVEC.

Las nanopartículas se disolvieron en 4 ml de H_2O, seguido de la adición de bicarbonato sódico (2.7 mg, 0,0318 mmoles). A continuación, se añadió SVEC en 1 ml de ACN, seguido de 3 ml adicionales de ACN. Se dejó que se produjese la reacción durante 2 h, momento en que se añadió acetoxisuccinimida (127 mg, 0.79 mmoles) con el fin de desactivar cualesquiera aminas restantes. Se dejó que se produjese dicha reacción durante 2 h. Se diluyó la reacción con H_2O y se transfirió a tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) y se dializó frente a H_2O (pH 4.5).

90. Unión de péptido de transporte dirigido.

Las nanopartículas modificadas (2 mg) se disolvieron en 0.2 ml de tampón de PBS (pH 7.3) y a lo anterior, se añadió una solución de GCGGGNHVGGSSV (11.4 mg, 0.0105 mmoles) en 0.4 ml de tampón PBS (pH 7.3). Se dejó que se produjese dicha reacción durante 24 h. Se diluyó la reacción con H_2O y se transfirió a tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) y se dializó frente a H_2O.

91. Unión de péptido de control.

Las nanopartículas modificadas (2 mg) se disolvieron en 0.2 ml de tampón de PBS (pH 7.3) y a lo anterior, se añadió una solución de GCGGGSGVSGHNG (11.0 mg, 0.0105 mmoles) en 0.4 ml de tampón PBS (pH 7.3). Se dejó que se produjese dicha reacción durante 24 h. Se diluyó la reacción con H_2O y se transfirió a tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) y se dializó frente a H_2O.

92. Unión de N-(BOC)-2,2(ETILENDIOXI)DIETILAMINA.

Un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 50 ml se secó a la llama bajo argón. Las nanopartículas desprotegidas (27.6 mg, 0.79 µmoles) se disolvieron en DMF DriSolv y se transfirieron al matraz sellado, que seguidamente se selló a 0ºC mediante un baño de hielo. Se añadió N-metilmorfolina (6.37 mg, 0.063 mmoles) seguido de cloroformato de isobutilo (9.46 mg, 0,0693 mmoles) a la solución enfriada y se dejó que se activase durante 1.5 h. A continuación, se añadió N-(boc)-2,2(etilendioxi)dietilamina (15.6 mg, 0.063 mmoles), se retiró el baño de hielo y se dejó la reacción bajo agitación durante la noche. La reacción se concentró al vacío, se disolvió el residuo en MeOH, se transfirió a tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) y se dializó frente a MeOH.

93. Desprotección de nanopartículas que contienen N-(BOC)-2,2(ETILENDIOXI)DIETILAMINA.

Las nanopartículas se disolvieron en HCl 2 M/dioxano (15 ml). Se dejó la reacción bajo agitacion durante la noche. La reacción se disolvió en MeOH/H_2O y se transfirió a tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) y se dializó frente a MeOH/H_2O.

94. Unión de acetato de 1,4,7,10-TETRAAZACICLODODECANO-1,4,7-TRIS(ACETATO DE T-BUTILO)-10-SUCCINIMIDILO (DOTA).

Las nanopartículas se disolvieron en DMF, seguido de la adición de trietilamina (TEA). A dicha solución se añadió DOTA y se dejó la reacción bajo agitación durante la noche. La reacción se concentró al vacío, se disolvió el residuo en MeOH/H_2O, se transfirió a tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) y se dializó frente a MeOH/H_2O.

95. Desprotección de nanopartículas que contienen dota protegido con T-BUTILO.

Las nanopartículas se disolvieron en HCl 2 M/dioxano (15 ml). Se dejó la reacción bajo agitación durante la noche. La reacción se disolvió en MeOH/H_2O y se transfirió a tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) y se dializó frente a MeOH/H_2O.

96. Unión de SVEC.

Las nanopartículas se disolvieron en H_2O, seguido de la adición de bicarbonato sódico. A continuación, se añadió SVEC en ACN, seguido de ACN adicional. Se dejó que se produjese la reacción durante 2 h, momento en que se añadió acetoxisuccinimida con el fin de desactivar cualesquiera aminas restantes. Se dejó que se produjese dicha reacción durante 2 h. Se diluyó la reacción con H_2O y se transfirió a tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) y se dializó frente a H_2O (pH 4.5).

97. Modificación de ALEXA FLUOR 750®.

Se disolvió Alexa Fluor 750® (1.43 mg, 1.1 µmoles) en 143 µl de DMSO y se añadió a cisteamina (0.077 mg, 1.0 µmol) en 30.9 µl de tampón de PBS (pH 7.5). Se dejó que se produjese la reacción durante la noche.

98. Unión simultánea de ALEXA FLUOR 750® modificado y péptido.

Las nanopartículas modificadas se disolvieron en tampón de PBS (pH 7.3), que había sido purgado con argón durante 20 min. A continuación, se añadió Alexa Fluor 750® modificado y un equivalente de GCGGGNHVGGSSV y se dejó que reaccionasen durante 2 h. A continuación, se añadieron 4 equivalentes adicionales y la reacción se agitó durante la noche. La solución se diluyó en H_2O y se transfirió a tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) y se dializó frente a H_2O.

99. Síntesis de RGD LINEAL.

Se llevó a cabo una síntesis en fase sólida de Fmoc típica para sintetizar el péptido lineal. Se utilizó una resina de 2-clorotritilo precargada con cisteínas. Como reactivo de acoplamiento se utilizó HOBt: HBTU: DIPEA (1:1:2) en DMF y se acoplaron doblemente aminoácidos. Se utilizó piperidina al 20% (v/v) en DMF para desproteger el Fmoc. Se acopló un espaciador amino-hexilo a las cistinas en la resina, seguido de ácido glutámico, ácido aspártico, glicina, arginina, fenilalanina y finalmente, lisina.

100. Ciclización de RGD.

El péptido se ciclizó mediante la utilización de un grupo ODmab, que permite la desprotección selectiva de la cadena lateral de ácido carboxílico del ácido glutámico, que seguidamente puede acoplarse con el extremo N-terminal. Se desprotegió el ODmab utilizando hidrazina al 2% v/v-H_2O/DMF añadido a la resina y se dejó que reaccionase durante 7 min. A continuación, se lavó con 20 ml de DMF, seguido de 10 ml de una solución de DIPEA/DMF al 5% v/v, que se dejó bajo agitación durante 10 min. Se consiguió la activación de carboxi mediante la utilización de DCC (44.6 mg, mmoles) y HOBt (29.2 mg, mmoles) a 10 ml de DMF y después se añadió a la resina y se dejaron bajo agitación durante 18 h.

Se utilizó reactivo R para desproteger todos los grupos laterales y se escindió el péptido cíclico de la resina. Se preparó reactivo R mediante la combinación de 5.4 ml de TFA, 0.3 ml de tioanisol, 0.18 ml de anisol y 0.12 ml de etanoditiol. Lo anterior se dejó reaccionar durante 3 h, momento en el que se separó la resina mediante filtración. Se enfrió el sobrenadante a 0ºC y se precipitó el péptido utilizando éter dietílico frío. Se recogió mediante centrifugación y después se lavó tres veces utilizando éter dietílico. Se disolvió el pellet en 0.6 ml de H_2O y 0.4 ml de ACN con TFA al 0.3% y se purificó mediante HPLC.

101. Síntesis de N-BOC-N-TFA-ETILENDIAMINA.

A una solución de N-boc-etilendiamina (5.0 g, 31.2 mmoles) en 20 ml de THF. Se añadió THF trifluoroacetato de etilo (3.72 ml, 31.2 mmoles) gota a gota y la reacción se agitó durante la noche. La solución de reacción se concentró, rindiendo un producto cristalino blanco (8.0 g, 100%). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.44 (s, 9 H, CH_3), 3.37 (dd, 2 H, J=5.4Hz, J=10.2Hz, CH_2), 3.46 (dd, 2 H, J=5.1Hz, J=10.4Hz, CH_2), 5.01 (s, 1 H, NH), 7.85 (s, 1 H, NH); RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) δ 28.2, 39.1, 42.2, 80.6, 140.6, 151.2, 157.7.

102. Desprotección de BOC EN N-BOC-N-TFA-ETILENDIAMINA.

Se disolvió N-Boc-N-Tfa-etilendiamina (8.0 g, 31.5 mmoles) en 50 ml de ácido fórmico y se agitó durante 14 h a temperatura ambiente. Tras evaporar el solvente bajo presión reducida, se añadió tolueno y se concentró para eliminar cualquier ácido fórmico residual, rindiendo un aceite naranja (4.90 g, 99.7%). RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ 2.31 (s, 2 H, NH_2), 3.15 (t, 2 H, J=6.1Hz, CH_2), 3.61 (t, 2 H, J=6.1Hz, CH_2), 8.35 (s, 1 H, NH); RMN ^{13}C (400 MHz, MeOD) δ 38.5, 39.7, 113.1, 115.9, 118.8, 121.6, 159.7, 160.1.

103. Unión de N-TFA-ETILENDIAMINA.

Las nanopartículas desprotegidas (162,3 mg, 4.58 μmoles) en DMF DriSolv (10.0 ml) se agitaron bajo argón a 0ºC con N-metilmorfolina (47.8 mg, 472.6 μmoles) seguido de la adición gota a gota de cloroformato de isobutilo (71.0 mg, 519.8 μmoles) en DMF DriSolv (0.75 ml). Tras 1.5 h, una solución de N-TfA-etilendiamina (73.8 mg, 472.6 μmoles) en DMF DriSolv (2.5 ml) gota a gota. La reacción se dejó que se calentase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Tras la eliminación del DMF al vacío, se disolvió el producto en metanol y se dializó frente a metanol con tubo de diálisis plegado SnakeSkin® (MWCO=10,000). RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ 7.61-6.45 (br m, aromático del entrecruzante), 3.15-3.00 (br m, N-Tfa-etilendiamina), 3.00-2.69 (br m, esqueleto y N-Tfa-etilendiamina), 2.69-1.34 (br m, esqueleto).

104. Desprotección de MAL-DPEG™$_4$-T-BOC-HIDRAZIDA.

En un matraz de fondo redondo de 100 ml, se disolvió MAL-dPeg™4-t-boc-hidrazida (127.1 mg, 239.5 μmoles) en 80.0 ml de ácido fórmico y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Tras evaporar el solvente bajo presión reducida, se añadió tolueno y se concentró para eliminar cualquier ácido fórmico residual, proporcionando MAL-dPeg™4-hidrazida (103.1 mg, 100%).

105. Unión de MAL-DPEG™$_4$-HIDRAZIDA.

Las nanopartículas desprotegidas (141,1 mg, 3.13 μmoles) en DMF DriSolv (10.0 ml) se agitaron bajo argón a 0ºC con N-metilmorfolina (17.1 mg, 169.1 μmoles) seguido de la adición gota a gota de cloroformato de isobutilo (25.4 mg, 86.0 μmoles) en DMF DriSolv (0.7 ml). Tras 1.5 h, se añadió gota a gota una solución de MAL-dPeg™$_4$--hidrazida (103.1 mg, 239.5 μmoles). La reacción se dejó que se calentase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Tras la eliminación del DMF al vacío, se disolvió el producto en metanol y se dializó frente a metanol con tubo de diálisis plegado SnakeSkin® (MWCO=10,000). RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ 7.67-6.47 (br m, aromático del entrecruzante y conector maleimida), 3.89-3.48 (br t, conector maleimida), 3.21-3.02 (br m, N-Tfa-etilendiamina), 3.02-2.69 (br m, esqueleto y N-Tfa-etilendiamina), 2.69-1.01 (br m, esqueleto).

106. Hidrogenación de G1.

Una solución de G1 (8.36 g, 5.69 mmoles) en etanol (214 ml) en una botella de hidrogenación de Parr con níquel de Raney (3.49 g) se agitó a 65 psi durante 3 días a temperatura ambiente. Se añadió otro 1 g de níquel de Raney a la reacción y se agitó nuevamente a 65 psi durante 3 días a temperatura ambiente. La reacción se filtró a través de Celite y se eliminó el solvente bajo presión reducida, proporcionando el producto en bruto. Se disolvió el residuo en acetato de etilo y después se lavó con solución saturada de bicarbonato sódico (2x 100 ml) y solución hipersalina (2x 100 ml) y después se secó la capa orgánica sobre sulfato sódico anhidro. Se filtró la solución y se concentró bajo presión reducida, rindiendo amina G1 (8.19 g, 93.7%).

107. Unión de PDPOH A G1.

Se agitó PDPOH (91.46 mg, 4.25 mmoles) en THF seco (100 ml) bajo argón a temperatura ambiente con 1-hidrobenzotriazol (HOBt) (68.90 mg, 5.10 mmoles) y DCC (1.05 g, 5.10 mmoles). Tras 1 h, se añadió amina G1 (7.34 g, 5.10 mmoles) a la solución y se produjo la reacción durante 48 h, después de las cuales, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El material en bruto se purificó mediante cromatografía flash de columna, eluyendo con hexanos:acetato de etilo 10:1, incrementando a acetato de etilo al 100%, proporcionando SS-G1 blanco (4.67 g, 67.1%).

108. Desprotección de SSG1 mediante ácido fórmico.

Se disolvió SSG1 (4.67 g, 2.85 mmoles) bajo agitación en ácido fórmico (100 ml) y se produjc temperatura ambiente durante la noche. Tras completarse, se eliminó el ácido fórmico azeotrópıcamente con tolueno bajo presión reducida, rindiendo el producto (3.29 g, 100.0%).

109. Unión de N-BOC-1,6-DIAMINOHEXANO A SSG1.

Se agitó SSG1OH (3.29 g, 2.91 mmoles) en THF anhidro (100 ml) bajo argón a temperatura ambiente con HOBt (4.23 g, 31.25 mmoles) y DCC (6.45 g, 31.25 mmoles). Tras una hora, se añadió N-boc-1,6-diaminohexano (6.76 g, 31.25 mmoles) a la solución y se produjo la reacción durante 48 h a temperatura ambiente. Tras completarla, la solución de reacción se filtró para eliminar la sal DCC y se concentró el filtrado y se purificó mediante cromatografía flash de columna, eluyendo con metanol al 1% en diclorometano, creciendo gradualmente a metanol al 10% en diclorometano, rindiendo un sólido blanco (4.42 g, 52.0%).

El sólido resultante se disolvió en 1,4-dioxano (20 ml), la solución se enfrió a 0ºC y se añadió HCl 4 M en 1,4-dioxano (20 ml) y la reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. La eliminación del solvente bajo presión proporcionó un sólido blanco (3.55 g, 100.0%).

110. Unión de reactivo de GOODMAN a SSG1LL.

La sal HCl de SSG1LL resultante (3.55 g, 1.51 moles) se disolvió en metanol (50 ml) y la solución se enfrió a 0ºC. Se añadió trietilamina (TEA) (3.41 ml, 24.56 mmoles), seguido de N,N'-diboc-N''-triflilguanidina (6.94 g, 17.74 mmoles) y la reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. Tras la eliminación del solvente bajo presión reducida, el producto en bruto se purificó mediante cromatografía flash de columna, eluyendo con metanol al 1% en diclorometano y creciendo gradualmente a metanol al 10% en diclorometano, rindiendo un sólido blanco (838.2 mg, 13.13%). RMN ^{1}H (300 MHz, MeOD) δ 1.33-1.47 (m, 246 H, CH_2, CH_3), 2.03 (d, 48 H, J=65.3Hz, CH_2), 3.15 (td, 30 H, J=6.3Hz, J=12.7Hz, CH_2), 3.29 (m, 45 H, CH_2), 7.42 (m, 1 H, ArH), 7.67 (d, 1 H, J=8.2Hz, ArH), 7.79 (d, 1 H, J=8.1Hz, ArH), 8.02 (s, 1 H, ArH).

111. Corte de puente disulfuro en el transportador molecular.

El transportador molecular de hexilo conector disulfuro (257.8 mg, 61.41 µmoles) en DMF DriSolv (5 ml) se agitó bajo argón y se añadió gota a gota una solución de DL-ditiotreitol (740.0 mg, 4.80 mmoles) en DMF (5 ml) y la reacción se produjo durante 2 h a temperatura ambiente. Tras eliminar el DMF al vacío, se purificó la reacción utilizando una columna Sephadex LH-20, eluyendo con DMF y concentrando las fracciones al vacío nuevamente, rindiendo el producto (251.0 mg, 100%).

112. Unión de transportador molecular a nanopartículas.

Las nanopartículas (147.4 mg, 3.07 µmoles) en DMF DriSolv (10.0 ml) se agitaron bajo argón y el transportador molecular hexilo tiol libre (251.0 mg, 61.41 µmoles) en DMF DriSolv (10.0 ml) se añadió gota a gota, seguido de la adición de una cantidad catalítica de N-metilmorfolina. Tras la eliminación del DMF al vacío, el producto se disolvió en metanol y se dializó frente a una solución de metanol:agua 1:1, finalmente dializando frente a metanol puro con tubo de diálisis plegado SnakeSkin® (MWCO=10,000). RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ 7.55-6.21 (br m, aromático del entrecruzante), 3.85-3.49 (br t, conector maleimida), 3.22-3.00 (br m, N-Tfa-etilendiamina y transportador molecular), 3.00-2.70 (br m, esqueleto, N-Tfa-etilendiamina y transportador molecular), 2.70-1.00 (br m, esqueleto y transportador molecular).

113. Desprotección de aminas protegidas con trifluoroacetilo sobre partículas modificadas.

Las nanopartículas (142.0 mg, 1.54 µmoles) se disolvieron en metanol (5.0 ml) y se añadió una solución al 10% de K_2CO_3 de metanol:agua 5:3 (13.0 ml) a la solución y se dejó que se produjese la reacción durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se purificó mediante diálisis con tubo de diálisis plegado SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a una solución de metanol:agua 5:3, finalmente dializando frente a metanol puro y dializando después frente a solución de metanol:THF 1.1, dializando finalmente frente a THF puro. RMN 1H (400 MHz, THF d8) δ 8.26-6.53 (br m, aromático del entrecruzante), 3.94-3.52 (br m, conector maleimida), 3.28-3.12 (br t, etilendiamina y transportador molecular), 3.12-2.68 (br m, esqueleto, etilendiamina y transportador molecular), 2.68-1.05 (br m, esqueleto y transportador molecular).

114. Unión de nanopartículas con ácido 3-(PIRIDÍN-2-IL DISULFANIL)PROPANOICO

Una solución de ácido 3-(piridín-2-il-disulfanil)propanoico (16.8 mg, 77.9 µmoles) en THF anhidro (2.5 ml) se agitó bajo argón a 0ºC con N-metilmorfolina (7.88 mg, 77.9 µmoles) seguido de la adición gota a gota de cloroformato de isobutilo (11.7 mg, 85.7 µmoles). Tras 1.5 h, se añadió gota a gota una solución de las nanopartículas desprotegidas (111.0 mg, 1.30 µmoles) en THF anhidro (35.0 ml). Se dejó que la reacción se calentase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 24 h. La reacción se diluyó y se purificó mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a metanol, dializando finalmente

frente a solución de THF:MeOH 3:1. RMN ^{1}H (400 MHz, THF d_8) δ 7.58-6.22 (br m, entrecruzamiento y conector disulfuro), 3.87-3.67 (br m, conector maleimida), 3.24-3.16 (br m, conector disulfuro), 3.15-3.04 (br m, diamina y transportador molecular), 2.93-2.83 (br m, diamina y transportador molecular), 2.78-2.62 (br m, conector disulfuro), 2.62-1.06 (br m, esqueleto).

115. Unión de ALEXA FLUOR® 568.

A una solución de nanopartículas multifuncionales (10.0 mg, 106.0 nmoles) en DMF DriSolv (3.0 ml), se añadió una solución de Alexa Fluor® 568 (3.78 mg, 4.77 μmoles) en DMSO anhidro (377.7 μl) y trietilamina (50.0 μl, 358.7 μmoles) a la solución y se dejó que se produjese la reacción en la oscuridad durante 24 h a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con THF y se purificó mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a H_2O al 1% en THF, dializando finalmente frente a THF puro.

116. Adición de caperuza a las aminas restantes.

Tras completar la adición de Alexa Fluor 568 a las nanopartículas, se añadió una solución de N-acetoxisuccinimida (47.1 mg, 299.5 μmoles) en DMF DriSolv (1.0 ml) a la solución de reacción. Se dejó que se produjese la reacción durante 3 h a TA. Tras la eliminación del DMF al vacío, se disolvió el producto en metanol y se dializó frente a metanol con tubo de diálisis plegado SnakeSkin® (MWCO=10,000). RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ 1.29-2.43 (br m, esqueleto y transportador molecular), 2.59-2.83 (br m, conector disulfuro), 2.84-2.95 (br m, conector disulfuro), 2.98-3.02 (br m, conector disulfuro), 3.04-3.09 (br m, conector disulfuro), 3.16 (br t, diamina y transportador molecular), 3.67 (br t, conector maleimida), 6.53-7.98 (br m, aromático del entrecruzamiento, conector disulfuro y FITC).

117. Desprotección de Boc de nanopartículas modificadas.

Las nanopartículas modificadas (30.0 mg, 434.0 nmoles) se disolvieron en 1,4-dioxano anhidro (10 ml) y se enfriaron a 0ºC. Se añadió gota a gota una solución de HCl 4 M en 1,4-dioxano (10 ml) a las nanopartículas bajo agitación y se dejó que se produjese la reacción durante la noche a temperatura ambiente. La solución de nanopartículas se diluyó a tres veces el volumen original con agua y se dializó frente a agua en tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000). Tras completar la diálisis, la solución acuosa se liofilizó, rindiendo un sólido amarillo. RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ 1.18-2.37 (br m, esqueleto y transportador molecular), 2.71-2.79 (br m, conector disulfuro), 2.81-2.86 (br m, conector disulfuro), 2.89-2.93 (br m, conector disulfuro), 2.94-2.99 (br m, conector disulfuro), 3.12 (br t, diamina y transportador molecular), 3.69 (br t, conector maleimida), 6.53-8.41 (br m, aromático del entrecruzamiento, conector disulfuro y FITC).

118. Síntesis de copolímero POLI(VL-AVL) (AB).

Un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 50 ml, dotado de barra de agitación, se selló con dos septos y una entrada de gases. Se evacuó el matraz y se rellenó con nitrógeno tres veces. Se prepararon soluciones madre de etanol (EtOH) 1.7 M en THF y 2-etilhexanoato de estaño (II) ($Sn(Oct)_2$) $3.7x10^{-2}$ M en THF se prepararon en matraces purgados con N_2. Se agruparon soluciones de EtOH (0.32 ml, $5.41x10^{-1}$ mmoles) y $Sn(Oct)_2$ (0.30 mL, $1.12x10^{-2}$ mmoles) en el matraz de 50 ml purgado con nitrógeno. Tras agitar la mezcla durante 30 min, se añadió α-alil-δ-valerolactona (1.16 g, 8.32 mmoles) y δ-valerolactona (vl, 2.50 g, 24.97 mmoles). El recipiente de reacción se agitó a 105ºC durante 48 h. Se eliminó el monómero residual y el catalizador mediante diálisis con membrana de diálisis Spectra/Por® (MWCO=1000) frente a CH_2Cl_2, proporcionando un polímero marrón dorado. Rendimiento: 3,24 g (88%). M_w = 3042Da, PDI = 1.18; RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: 5.7 (m, H_2C=C*H*-), 5.09 (m, *H*$_2$C=CH-), 4.09 (m,-C*H*$_2$-O-), 3.65 (m, CH_3CH_2O-), 2.35 (m, vl, -CH_2CH_2C(O)O-, avl, H_2C=CHCH_2C*H*-, H_2C=CHC*H*$_2$CH-), 1.68 (m, avl y vl, -CHC*H*$_2$CH$_2$-), 1.25 (t, C*H*$_3$CH$_2$O-); RMN ^{13}C (400MHz, $CDCl_3$, ppm) δ: 174.6 (avl, -*C*(O)-), 172.7 (vl, -C(O)-), 134.6 (H_2C=*C*H-), 116.4 (H_2*C*=CH-), 63.3, 44.3, 35.9, 33.1, 27.5, 25.9, 23.6, 20.9.

119. Formación de nanopartículas a partir de AB.

Una solución de Ab (0.0804 g, M_w= 3042 Da, PDI=1.18) disuelta en CH_2Cl_2 (0.18 ml) se añadió a una solución de 3,6-dioxa-1,8-octaneditiol (30.0 μl, 0.18 mmoles) en CH_2Cl_2 (28.4 ml) a 44 °C. La mezcla de reacción se calentó durante 12 h. Se eliminó el ditiol residual con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a diclorometano. Rendimiento: 0.078 g. RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS) δ: El cambio significativo fue la reducción de los protones de alilo en 5.06 y 5.77 ppm y la aparición de señales en 3.65 y 2.71 ppm correspondientes a los protones vecinos de los tioles del conector PEG después del entrecruzamiento. Todos los demás aspectos del espectro eran similares a los de Ab. La reacción también puede llevarse a cabo con fotoiniciadores a TA en solventes orgánicos. Los tamaños de partícula de las partículas resultantes corresponden a los producidos en procedimientos de epóxido/amina análogos.

Al incrementar los tiempos de reacción de aproximadamente 24 h a aproximadamente 48 h, los tamaños de partícula se incrementaron debido al consumo total de fracciones alilo. Se encontró que la reacción a temperatura ambiente era suficiente. La adición de iniciadores radicales u otros fotoiniciadores no incrementaba

significativamente la calidad de las partículas.

120. Síntesis en un solo reactor de nanopartículas a partir de POLI(VL-EVL-AVL-OPD) (ABBD).

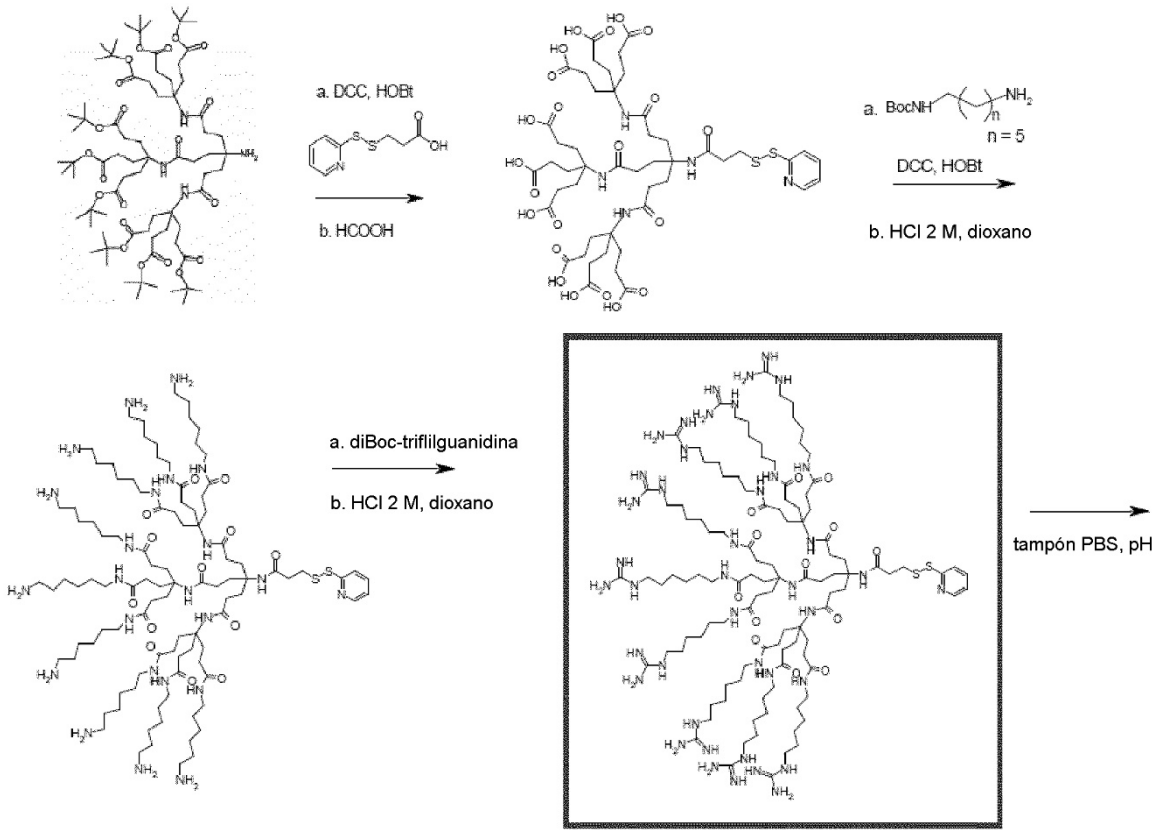
En un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 25 ml dotado de barra de agitación y septos, se añadió 2,2'-(etilendioxi)dietilamina (18.3 µl, $1.25x10^{-4}$ moles), 17.1 ml de CH_2Cl_2 y una solución de poli(vl-evl Una solución de poli(vl-evl-avl-opd), ABbD, (0.0781 g, M_w=3500 Da, PDI=1.29). La mezcla se calentó a 44ºC durante 12 h. Se eliminó la diamina residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a diclorometano. RMN ^1H (300MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: El cambio significativo fue la desaparición de los protones de epóxido en 2.94, 2.75 y 2.47 ppm y la aparición de señales en 3.64 y 2.97 ppm correspondientes a los protones vecinos de la amina secundaria del conector PEG después del entrecruzamiento. Todos los demás aspectos del espectro eran similares. El análisis de TEM de las nanopartículas resultantes se muestra en la figura 52. La distribución de los tamaños de partícula, con una polidispersidad inusualmente estrecha, de las nanopartículas resultantes se muestra en la figura 53. Para incrementar los tamaños de las partículas, los tiempos de reacción pueden incrementarse de aproximadamente 24 h a aproximadamente 48 h.

121. Protocolo del experimento de incorporación.

Se evaluó la incorporación de las nanopartículas multifuncionales fluorescentes, de las partículas de control negativo, y de FD-1 y FD-2 por células de mamífero, utilizando células HeLa, células de cáncer, cultivadas en micropillo de 14 mm de diámetro no recubiertos, placas MatTek nº 1.5 y un microscopio confocal Zeiss LSM 510 META. Se cultivaron células HeLa en medio de Eagle modificado por Dulbecco-bajo en glucosa (DMEM) (Sigma Aldrich) complementado con suero de feto bovino al 10% (v/v) (Gibco) y antibiótico-antimicótico al 1% (v/v) (Gibco). Las células se trataron con las nanopartículas multifuncionales, partículas de control negativo, FD-1 o FD-2 durante una hora, se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato libre de Ca2+/Mg2+ con EDTA (PBS), se fijaron con paraformaldehído al 3.3% a temperatura ambiente durante 10 minutos y se analizaron mediante microscopía confocal.

122. Transportador molecular bioconjugado.

Para preparar un transportador molecular conjugado con anticuerpo ejemplar, se preparó un dendrímero G1-Newkome que contenía nueve funcionalidades terminales t-butilo y un grupo de amina primaria en el punto focal, utilizando los métodos dados a conocer (figura 54). La funcionalidad amina se hizo reaccionar con ácido 3-(2-piridinilditio)propanoico mediante reacciones de acoplamiento de aminas con DCC/HOBt para formar un dendrímero protegido con un núcleo reactivo. Los grupos éster de t-butilo en la periferia del andamiaje dendrítico se desprotegieron con ácido fórmico, proporcionando grupos ácido carboxílico libres que se acoplaron con N-Boc-1,6-diaminohexano. Tras la desprotección de los grupos protectores Boc con HCl 2 M en dioxano, se transformaron las aminas libres en grupos guanidina con N,N-diBoc-N-triflilguanidina y la posterior desprotección de los grupos Boc utilizando HCl 2 M en dioxano proporcionó el compuesto deseado (Esquema 21).



Esquema 21. Síntesis de precursor de bioconjugado de dendrímero

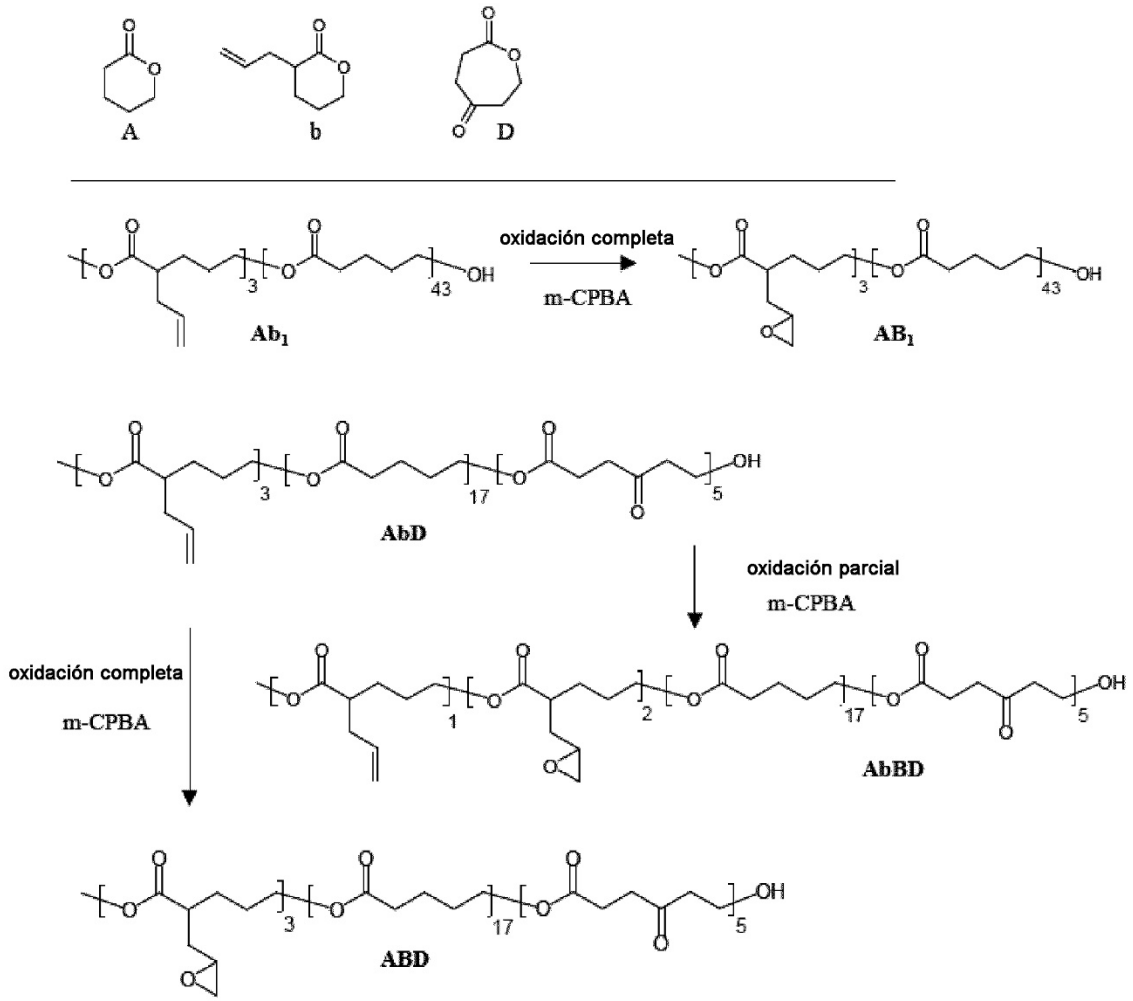
Se diseñó el compuesto final para localizarse en el citoplasma de las células, ya que un espaciador alquilo hexilo integrado se encuentra presente en la periferia del andamiaje dendrímero que se ha encontrado anteriormente que es una característica para la especificidad de su localización subcelular. Además, el conector piridinilditio en el punto focal permite el intercambio con grupos sulfhidrilo para formar bioconjugados que se conectan mediante un enlace disulfuro, proporcionando un conector escindible reductor que puede mantener la actividad de la biomolécula en las células. El conjugado de IgG-transportador molecular (IgGMT) se formó mediante una reacción suave de anticuerpo IgG marcado con Alexa Fluor® 568 en tampón de PBS a TA con el dendrímero (figura 54). Se unieron cinco dendrímeros transportadores a la estructura de IgG que presenta un peso molecular de 148 kDa. Se dializó el conjugado frente a tampón PBS para eliminar cualesquiera dendrones no reaccionados y se seleccionó que la concentración en los tubos de diálisis fuese de 1 mg ml^{-1} IgGMT, que permitió la utilización de la solución directamente para los experimentos de incorporación y neutralización.

En primer lugar, se sometió a ensayo la eficiencia de incorporación del conjugado IgGMT en células epiteliales humanas (HEp-2). Se incubaron las células cultivadas hasta una confluencia de 60%, con IgGMT inicialmente durante 10 min, después durante 30 min, 1, 2 y 6 h. Se estudió la eficiencia de incorporación con microscopia confocal y pudo observarse incorporación del bioconjugado tan pronto como a los 10 min. Los puntos temporales posteriores mostraron un incremento de la fluorescencia roja del conjugado IgGMT, progresando a partir de la membrana superficial de la célula hasta localizarse intracelularmente en la zona perinuclear en los puntos temporales de 2 y 6 h. Al contrario que la afinidad e incorporación del bioconjugado IgGMT, La IgG no modificada marcada con Alexa Fluor® 568 no entraba en la célula en todos los puntos temporales investigados (figura 55). Tras confirmar la incorporación en células HEp-2 sin evidencia de daños celulares, se examinó la actividad del conjugado expresada en células infectadas por VSR que expresaban proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés), como resultado de la infección por VSR. En primer lugar, se infectaron células HEp-2 durante 24 h con VSR-GFP recombinante, se lavaron y se dejaron bajo incubación durante 48 h adicionales. A continuación, se obtuvieron imágenes de las células mediante microscopía confocal tras un total de 72 h después de la infección inicial (figura 56). Se observó la formación típica de sincitios, una combinación y fusión de células infectadas, junto con la expresión de proteína fluorescente verde (GFP). Para estudiar el efecto de neutralización de IgGMT, se incubaron las células HEp-2 infectadas durante 24 h con VSR-GFP durante 30 min con una solución de IgGMT en tampón PBS, se lavó y se obtuvieron imágenes 48 h después (figura 56a y b). Mediante microscopia confocal se observó una reducción significativa de la fluorescencia verde GFP (a) y una fluorescencia roja fuerte del conjugado IgGMT marcado con Alexa Fluor® 568 (b). Las imágenes fusionadas de (a) y (b) combinadas con el contraste de interferencia diferencial (DIC, por sus siglas en inglés) también

proporcionó evidencia de células más sanas con una formación de sincitios significativamente i
células infectadas no tratadas en el mismo periodo de tiempo (figura 56c). Este resultado ilustra ıa reduccıon significativa de GFP en las células tratadas en contraste con las células no tratadas observadas en un tiempo de incubación total de 72 h después de la infección por VSR durante 24 h. Aparte de la presencia de células neutralizadas que mostraban únicamente fluorescencia roja del conjugado, también se observaron células que mostraban la coexistencia de VSR-GFP y la fluorescencia roja de IgGMT, que aparecían en el centro de las células (figuras 56 y 57, fusión a+b). La obtención de imágenes directamente después de la incubación durante 30 min de las células infectadas por VSR con IgGMT, mostró que la fluorescencia verde se localizaba intracelularmente, mientras que se observó la fluorescencia roja sobre las membranas superficiales de las células (figura 57, fusión a+b). Estas imágenes documentan la elevada afinidad del conjugado para la superficie de las células directamente después del periodo de incubación, seguido de la incorporación en las células HEp-2 después de un tiempo de incubación adicional de 48 h. Investigaciones paralelas de los títulos de VSR del sobrenadante mostraron una reducción significativa, de 80-90%, de la replicación vírica en comparación con las células no expuestas al conjugado IgGMT. Sin restringirse a ninguna teoría en particular, la administración intracelular de anticuerpo IgG dirigida a la proteína superficial inhibe la formación sincitial mediada por la proteína F y presenta un efecto sobre la producción de virus totales al añadirlo 24 h después del inicio de la infección por VSR.

123. Nanopartículas de poliéster adaptadas.

En el presente ejemplo, se prepararon nanopartículas de poliéster de dimensiones nanoscópicas controladas mediante un procedimiento en un solo reactor que contenía grupos amina, ceto y alilo, y se adaptó a la conjugación de bloques constructivos bioactivos, tales como un transportador molecular dendrítico para facilitar la incorporación celular, o péptidos y pigmentos para llevar a cabo el transporte dirigido y la obtención de imágenes. En varios ejemplos de síntesis de bioconjugados, se demuestra la versatilidad y estrategias de unión ortogonal que implican reacciones de tiol-eno de alto rendimiento bajo condiciones suaves y reacciones de aminación reductora, que evitan la integración del conector y las rutas post-modificación multietapa. Se prepararon varios precursores de nanopartículas lineales según el esquema 22.



Esquema 22. Precursor lineal.

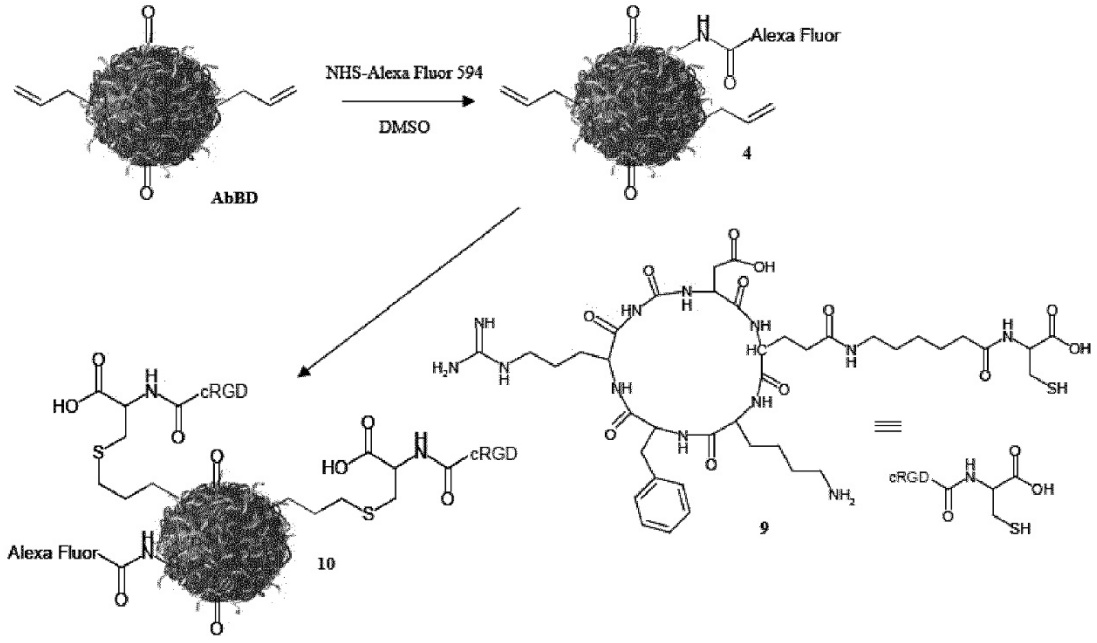
Tras el pliegue de los precursores lineales anteriormente indicados utilizando métodos dados a conocer, la nanopartícula puede funcionalizarse con una fracción deseada. En contraste con las estrategias informadas que forman enlaces amidas con andamiajes poliéster utilizando la activación de EDC, que típicamente no presentan rendimientos muy altos y requieren un gran exceso de péptidos caros, en el presente ejemplo, el extremo N-terminal de la unidad de transporte dirigido (p.ej., un péptido) se hizo reaccionar con el grupo ceto y se integró en el esqueleto polimérico de la partícula de poliéster desarrollada. En una reacción modelo, se ha demostrado la aminación reductora con éxito de N-Boc-etilendiamina con grupos ceto de la partícula y se han aplicado estas condiciones de reacción para someter a ensayo la adición de unidades peptídicas. En el presente ejemplo, se sometió a ensayo la secuencia del péptido de transporte dirigido GCGGGNHVGGSSV y se seleccionó para la reacción con la nanopartícula ABD, con la dimensión nanoscópica de 118 nm preparada a partir del polímero precursor lineal ABD con 1.5 equivalentes de unidades de entrecruzamiento 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) bajo las condiciones indicadas anteriormente (Esquema 22). Los grupos amina de la nanopartícula en primer lugar recibieron una caperuza de N-acetoxisuccinimida y la nanopartícula modificada y el péptido se solubilizaron en tetrahidrofurano con $NaCNBH_3$ como reactivo reductor.

Tras la purificación mediante diálisis, las partículas modificadas, 3, se caracterizaron mediante RMN ^1H y DLS. El incremento del diámetro hidrodinámico de118 ± 10 nm a 120 ± 10 nm indicó la adición de péptidos al esqueleto poliéster e investigaciones adicionales mediante RMN ^1H mostraron la conjugación de péptidos con los picos de resonancia característicos en 4.39 y 7.42 ppm. Con el análisis adicional de dispersión de luz estática (SLS, por sus siglas en inglés), los presentes inventores pudieron determinar la cantidad de péptido unida a la nanopartícula, que se estimó que era de entre 36 y 40 péptidos unidos por partícula

Este resultado confirma la eficiencia de las reacciones de aminación reductora con el extremo N-terminal de las unidades peptídicas seleccionadas. Sin embargo, las unidades de transporte dirigido que contienen más de un grupo amino proporcionan productos de conjugación mixtos y necesita desarrollarse una estrategia alternativa. Por este motivo, los presentes inventores querían encontrar reacciones de tipo tiol-eno que se realizasen entre

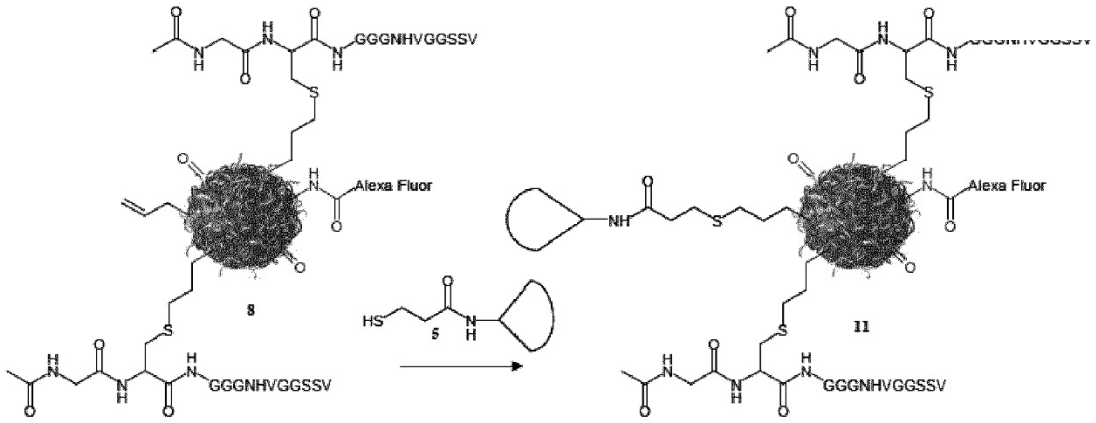
las unidades de cisteína, integradas en la secuencia próximas al extremo N-terminal, y doble encontramos en grupos maleimida, vinilsulfona o alilo. Para integrar la pareja de reacción para las unidades que contienen tiol/cisteína, tales como péptidos u oligonucleótidos, en las nanopartículas, se sintetizó un conector adecuado que se uniese a la nanopartícula preparada o se encontró un método que evitase la conjugación de una molécula conectora a fin de facilitar la unión de entidades que contuviesen tiol. Por lo tanto, se estudió la integración de grupos alilo en el esqueleto poliéster como unidades funcionales colgantes que ya se encontrarían presentes en el precursor poliéster lineal antes de la formación de la nanopartícula. Los grupos alilo disponibles que parte de la α-alil-δ-valerolactona de los precursores poliésteres lineales se oxidaron y se convirtieron completamente en grupos epóxido para proporcionar unidades que se entrecruzasen con la diamina. Sin embargo, con la oxidación parcial del grupo alilo, pudieron conseguirse precursores poliéster lineales que contenían unidades epóxido y los grupos alilo restantes. En la etapa siguiente, un poliéster AbD lineal que se oxidó parcialmente para comprender 16% de unidades alilo y 11% de unidades epóxido se entrecruzó con 1.5 equivalentes de diamina, utilizando el nuevo procedimiento de reacción en un solo reactor para examinar la compatibilidad de los grupos alilo con las condiciones de formación de nanopartículas. La investigación de las partículas resultantes con DLS mostró que los diámetros hidrodinámicos corresponden al tamaño y solubilidad de las partículas que no contienen ningún grupo alilo. Los picos de resonancia de alilo todavía se encontraban presentes en los espectros de RMN ^{1}H de las partículas y se encontró que eran análogos a las resonancias de las funcionalidades alilo en el precursor lineal.

Tras unir una sonda fluorescente, se unió un péptido cíclico divulgado, tal como se muestra en el esquema 23.



Esquema 23. Unión de c-RGD

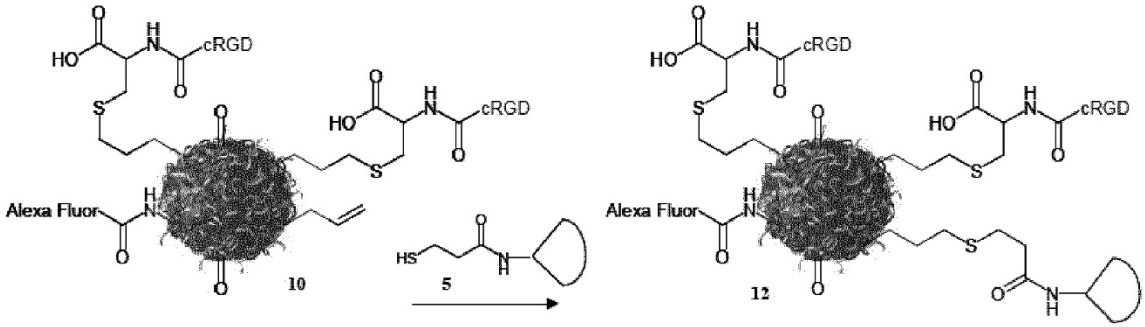
En la etapa siguiente, se sintetizó un andamiaje de nanopartículas combinado peptídico-dendrítico según el esquema 24.



Esquema 24. Combinación de andamiaje dendrítico y peptídico

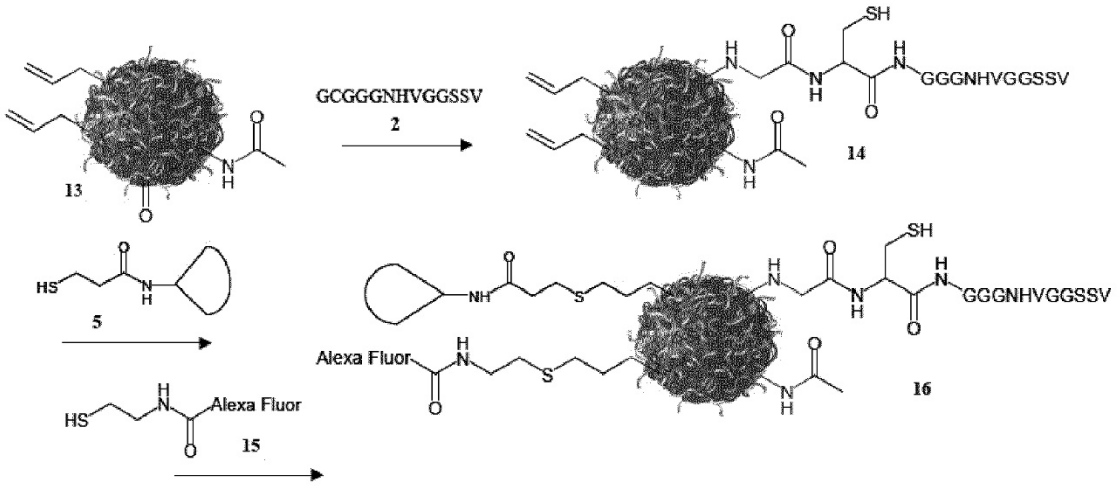
Para el primer enfoque, péptidos lineales GCGGGNHVGGSSV con la unidad de reconocimiento HVGGSSV con aminas protegidas después de la adición de caperuza de N-acetoxisuccinimida, se conjugaron con la funcionalidad alilo de una nanopartícula ABbD de 126.6 nm mediante el tiol de la unidad cisteína tal como se ha comentado anteriormente. En una reacción a continuación, se introdujo el reactivo de obtención de imágenes Alexa Fluor®594 para marcar aproximadamente 20 de las unidades amina incorporadas de la nanopartícula. En una reacción de tiol-eno secuencial, se consiguió la conjugación de 30 moléculas transportadoras dendríticas (Esquema 7), tal como se confirmó mediante espectroscopía de RMN ^{1}H. La conjugación secuencial de los compuestos bioactivos puede seguirse con una superposición de los espectros de RMN ^{1}H que muestra la adición de, en primer lugar, el péptido y los grupos alilo restantes de la nanopartícula, y los picos característicos de la molécula de transportador molecular en 2.0 y 3.2 ppm.

Se modificó la secuencia de reacción para obtener un producto bioconjugado similar que sólo se diferenciaba por la unidad de transporte dirigido peptídica. No se añadieron caperuzas a los grupos amina de la unidad c-RGD para evitar la inactivación de la unidad de reconocimiento de argininas. Por lo tanto, la estrategia de conjugación incluía que los grupos amina de la nanopartícula en primer lugar se marcaban con el pigmento NHS Alexa Fluor, seguido de la reacción de tiol-eno con la unidad de transporte dirigido, tal como se muestra en el esquema 6. En la última etapa, al igual que en la reacción anterior, se añadió la unidad de transportador dendrítico en una reacción secuencial de tiol-eno (Esquema 25).



Esquema 25. Síntesis de NP-P-TM-pigmento, ABbD-NP-594-cRGD-TM (12), utilizando química de tiol-eno

En una tercera y última secuencia de reacción, los presentes inventores pudieron demostraron la versatilidad de las unidades funcionales proporcionadas de la nanopartícula y llevaron a cabo un enfoque de conjugación ortogonal. Se añadieron caperuzas de N-acetoxisuccinimida a los grupos amina libres de la nanopartícula con la reacción de aminación reductora siguiente entre el grupo ceto del esqueleto poliéster y el extremo N-terminal del péptido de transporte dirigido no modificado HVGGSSV. Tras completar la reacción de aminación reductora de la misma manera que se ha indicado para el compuesto 3, una reacción de tioleno entre los grupos alilo de las nanopartículas y el grupo tiol del transportador molecular pudo conseguir la unión de 30 unidades según el análisis de espectroscopía de RMN ^{1}H. La caracterización final adicional de las partículas modificadas mediante dispersión de luz estática (SLS) del número de péptidos conjugados pudo determinar la adición de 36 péptidos a la partícula. En la última etapa, el pigmento éster de NHS Alexa Fluor se modificó con tioetilamina (Esquema 26) para marcar exclusivamente la partícula mediante una reacción de tiol-eno para obtener imágenes del sistema *in vitro*. El pigmento Alexa Fluor 594 demostró ser estable bajo dichas condiciones, proporcionando otro ejemplo de la versatilidad química del sistema.



Esquema 26. Síntesis de conjugado NP-P-TM-pigmento, ABbD-NP-594-TM utilizando aminación reductora y química de tiol-eno

Tabla 6. Resumen de conjugados de nanopartículas con definición del tipo de partícula según el precursor polimérico lineal[a] y péptido de transporte dirigido conectado[b]: 'c' para el extremo N-terminal con caperuza del péptido con unidad de reconocimiento HVGGSSV mediante N-acetoxisuccinimida y 'c' para RGD cíclico. c El transportador molecular dendrítico se abrevia como MT y el nombre del compuesto se proporciona en el orden de unión d.

Tipo de partícula[a]	Péptidos de transporte dirigido[b]	Pigmento Alexa Fluor®	Transportador molecular dendrítico[c]	Nombre de compuesto[d]	Clase de compuesto
ABD	HVGGSSV	-	-	ABD-NP-HVGGSSV (3)	NP-P
ABbD	HVGGSSV	-	-	ABbD-NP-HVGGSSV (14)	NP-P
ABbD	cHVGGSSV	594	-	ABbD-NP-cHVGGSSV-594 (8)	NP-P-pigmento
ABbD	cRGD	594	-	ABbD-NP-594-cRGD (10)	NP-P-pigmento
ABbD	-	594	TM	ABbD-NP-594-TM (6)	NP-TM-pigmento
ABbD	cHVGGSSV	594	TM	ABbD-NP-cHVGGSSV-594-TM(11)	NP-P-TM-pigmento
ABbD	cRGD	594	TM	ABbD-NP-594-cRGD-TM (12)	NP-P-TM-pigmento
ABbD	HVGGSSV	594	TM	ABbD-NP-594-TM (16)	NP-P-TM-pigmento

A continuación, se proporcionan los procedimientos experimentales relevantes al ejemplo 123.

Síntesis de copolímero poli(vl-avl-opd) (AbD). A un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 25 ml dotado de barra de agitación, entrada de gases y 2 septos de goma, se añadió 2-oxepán-1,5-diona (0.70 g, 5.46 mmoles). El matraz de fondo redondo se purgó con argón. Tras purgar durante 30 min, se añadió tolueno seco (4 ml). La mezcla se agitó en un baño de aceite a 80ºC para disolver el monómero. Tras la disolución, $Sn(Oct)_2$ (11.1 mg, 27.3 µmoles) en 0.5 ml de tolueno seco, a continuación se añadió al reactor etanol absoluto (20.5 mg, 440 µmoles), α-alil-δ-valerolactona (1.15 g, 8.19 mmoles) y δ-valerolactona (1.37 g, 13.7 mmoles) y la mezcla se calentó durante 48 h a 105°C. Se extrajo el monómero residual y el catalizador mediante diálisis con membrana de diálisis Spectra/Por® (MWCO=1000) frente a CH_2Cl_2, proporcionando un polímero marrón dorado. Rendimiento: 2,70 g (85%). Mw=3287 Da, PDI=1.17; RMN ^{1}H (300MHz, CDCl3/TMS, ppm) δ: 5.72 (m, H2C=CH-), 5.06 (m, H2C=CH-), 4.34 (m, -CH2CH2C(O)CH2CH2O-), 4.08 (m, -CH2O-), 3.67 (m, - OCH2CH3), 2.78 (m, opd, -OC(O)CH2CH2C(O)CH2-), 2.58 (m, opd, -OC(O)CH2CH2C(O)CH2-), 2.34 (m, vl, - CH2CH2C(O)O-, avl, H2C=CHCH2CH-, H2C=CHCH2CH-), 1.66 (m, avl y vl, -CHCH2CH2-), 1.25 (t, - CH2CH3); RMN ^{13}C (400MHz, CDCl3, ppm) δ: 204.9, 175.2, 173.7, 173.2, 135.0, 117.0, 63.9, 44.8, 36.4, 33.6, 28.0, 26.3, 21.3.

Síntesis de poli(vl-evl-opd) (ABD). A una solución de AbD (2.70 g, 4.67 mmoles) en CH_2Cl_2 (37
ácido 3-cloroperoxibenzoico (1.46 g, 8.48 mmoles). La mezcla se agitó durante 72 h a temperatura ambiente y después se concentró mediante un evaporador rotatorio. El producto en bruto se disolvió en una cantidad mínima de tetrahidrofurano (THF) (5 ml) y se vertió en un matraz de fondo redondo que contenía 1 l de éter dietílico. La solución se mantuvo durante la noche a 0ºC y se obtuvo un sólido blanco. Se eliminó la solución mediante decantación y el sólido se secó al vacío, obteniendo ABD. Rendimiento: 1,95 g (72 %). Mw=3392 Da, PDI=1.19. RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS) δ: El cambio significativo puede la desaparición de los protones alílicos a 5.74 y 5.09 ppm y la aparición de pequeños picos de resonancia ancha en 2.94, 2.75 y 2.47 ppm debido a la formación del anillo epóxido. Todos los demás aspectos del espectro eran similares.

Formación de nanopartículas a partir de poli(vl-evl-opd) (ABD). Se añadió gota a gota una solución de ABD (0.11 g, Mw=3392 Da, PDI=1.19) disuelta en CH_2Cl_2 (0.26 ml), utilizando una bomba peristáltica a 13 ml/min bajo agitación vigorosa a una solución de 2,2'-(etilendioxi)dietilamina (76.4 µl, 0,52 µmoles) en CH_2Cl_2 (40.3 ml) a 44ºC. La mezcla se calentó durante 12 h. Se eliminó la diamina residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a diclorometano. Rendimiento: 0,17 g (91%). DLS: DH=118.3 ± 9.6 nm. SLS: Mw=323,000. RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS) δ: El cambio significativo fue la desaparición de los protones de epóxido en 2.94, 2.75 y 2.47 ppm y la aparición de señales en 3.54 y 2.97 ppm correspondientes a los protones vecinos de la amina secundaria del conector PEG después del entrecruzamiento. Todos los demás aspectos del espectro eran similares.

Nanopartículas ABD conjugadas con N-Boc-etilendiamina (NBED). A una solución de nanopartículas ABD 820 mg, 0.06 µmoles) en THF (2 ml), se añadió N-acetoxisuccinimida (0.02 g, 0.13 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h. Se eliminó N-acetoxisuccinimida residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a THF. Tras concentrar y secar el producto, se disolvieron las nanopartículas (18 mg, 0,05 µmoles) en una mezcla de CH_2Cl_2 y CH_3OH (1:1 v/v, 2 ml). A dicha solución, se añadió N-Boc-etilendiamina (4.6 µl de NBED 1.59 M en CH_3OH) y $NaCNBH_3$ (21.8 µL de $NaCNBH_3$ 1.0 M en THF). La mezcla de reacción se agitó durante 12 h a temperatura ambiente y después se purificó mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a CH_2Cl_2/CH_3OH 1:1. Rendimiento: 18 mg (88%). DLS: DH=119.5 ± 10.3 nm; partícula original, DH=118.3 ± 9.6 nm. RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS) δ: El cambio significativo fue la aparición del pico en 1.43 ppm debido al grupo protector Boc. Todos los demás aspectos del espectro son similares a los de las nanopartículas ABD.

Procedimientos generales para la síntesis de péptido HVGGSSV (1). Se sintetizó el péptido HVGGSSV mediante síntesis peptídica en fase sólida utilizando una reacción química de Fmoc estándar en un sintetizador de péptidos modelo 90 (Advanced ChemTech). Procedimiento general: Unión de aminoácidos N-Fmoc a la resina. Tras el hinchado con diclorometano (20 ml) durante 20 min, la resina H-val-2-Cl-Trt (0.20 g, 1.03 mmoles/g, 0.21 mmoles de aminoácidos superficiales) se trató con una solución de aminoácidos protegidos con Fmoc (4.4 equiv., 0.9 mmoles) en dimetilformamida (DMF) (9 ml). Los aminoácidos se unieron a la resina utilizando doble acoplamiento con una solución (9 ml) que consistía en monohidrato de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0.9 mmoles, 0.14 g), hexafluorofosfato de o-(benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio) (0.9 mmoles, 0.34 g), N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA) (1.8 mmoles, 0,31 ml) en 9 ml de DMF. La mezcla de reacción se agitó durante 60 min y se lavó con DMF (4x10 ml), metanol (4x10 ml) y DMF (4x10 ml). El final del acoplamiento se controló mediante la prueba de ninhidrina. Se utilizó solución de piperidina al 20% (v/v) en DMF para desproteger los grupos Fmoc. Se unieron los aminoácidos a la resina en la secuencia siguiente: Ser, Ser, Gly, Gly, Val, His, Asn, Gly, Gly, Gly, Cys y Gly.

Procedimiento general: escisión respecto de la resina. La resina se trató con reactivo R, una solución de TFA, tioanisol, anisol y etanoditiol (90:5:3:2, 6 ml) durante 4 h. Tras la separación de la resina mediante filtración, se concentró el filtrado para precipitar el péptido con éter dietílico frío. Se purificaron péptidos en bruto mediante RP-HPLC y se liofilizaron. Se confirmó la identidad del péptido mediante MALDI-MS (m/z: 1087.1).

Nanopartículas ABD conjugadas con HVGGSSV (3). A una solución de nanopartículas ABD (20 mg, 0.06 µmoles) en THF (2 ml), se añadió N-acetoxisuccinimida (3 mg, 18,1 µmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h. Se eliminó la N-acetoxisuccinimida residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a THF/CH_3OH 1:1, proporcionando nanopartículas ABD con caperuza de amina, 2. A una solución de 2 (0.0174 g, 0,05 µmoles en 3 ml de THF), se añadió 1 (3.5 mg, 3.18 µmoles) disuelto en DMSO (2 ml) y $NaCNBH_3$ (6.36 µl, $NaCNBH_3$ 1,0 M en THF). La mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a THF/CH_3CN 1:1. Rendimiento: 19 mg (88%) DLS: DH=120.5 ± 10.2 nm; partícula original, DH=118.3 ± 9.6 nm. SLS: Mw = 362,000; partícula original, Mw=323,000. RMN ^{1}H (600MHz, $(CD_3)_2SO$) δ: El cambio significativo fue la aparición de los picos siguientes: 8.26-7.87, 7.42, 6.90, 4.39 y 4.25 ppm debido a la unión del péptido. Todos los demás aspectos del espectro son similares a los de las nanopartículas ABD.

Síntesis de poli(vl-evl-avl-opd) (ABbD). A una solución de AbD (1.70 g, 1.56 mmoles) en CH_2Cl_2 (30 ml), se añadió ácido 3-cloroperoxibenzoico (0.22 g, 1.28 mmoles). La mezcla se agitó durante 72 h a temperatura

ambiente y después se concentró mediante un evaporador rotatorio. El producto en bruto se d
cantidad mínima de THF (5 ml) y se vertió en un matraz de fondo redondo que contenía 1 l de éter dietílico. La solución se mantuvo durante la noche a 0ºC y se obtuvo un sólido blanco. Se eliminó la solución mediante decantación y el sólido se secó al vacío, obteniendo ABbD. Rendimiento: 1,2 g (71%). Mw=3356 Da, PDI=1.18. RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$/TMS, ppm) δ: 5.72 (m, H2C=CH-), 5.06 (m, H2C=CH-), 4.34 (m, -CH2CH2C(O)CH2CH2O-), 4.08 (m, -CH2O-), 3.67 (m, -OCH2CH3), 2.96 (m, protón de epóxido), 2.78 (m,evl protón de epóxido, opd, -OC(O)CH2CH2C(O)CH2-), 2.58 (m, opd, -OC(O)CH2CH2C(O)CH2-), 2.47 (protón de epóxido), 2.34 (m, vl, -CH2CH2C(O)O-, avl, H2C=CHCH2CH-, H2C=CHCH2CH-), 1.66 (m, avl y vl, -CHCH2CH2-), 1.25 (t, -CH2CH3).

Formación de nanopartículas a partir de ABbD. Se añadió gota a gota una solución de ABbD (0.21 g, Mw=3356 Da, PDI=1.18) disuelta en CH_2Cl_2 (0.39 ml), utilizando una bomba peristáltica a 13 ml/min bajo agitación vigorosa a una solución de 2,2'-(etilendioxi)dietilamina (42.6 µl, 0,29 µmoles) en CH_2Cl_2 (60 ml) a 44ºC. La mezcla se calentó durante 12 h. Se eliminó la diamina residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a diclorometano. Rendimiento: 0,24 g (96%). DLS: DH=123.4 ± 9.22 nm. SLS: Mw=345,000. RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS) δ: El cambio significativo fue la desaparición de los protones de epóxido en 2.96, 2.75 y 2.47 ppm y la aparición de señales en 3.56 y 2.98 ppm correspondientes a los protones vecinos de la amina secundaria del conector PEG después del entrecruzamiento. Todos los demás aspectos del espectro eran similares a los de ABbD.

Síntesis en un solo reactor de nanopartículas a partir de ABbD. A una solución de 2,2' (etilendioxi)dietilamina (26.2 µl, 0.18 mmoles) en CH_2Cl_2 (34.6 ml), se añadió una solución de ABbD (0.13 g, Mw= 3356 Da, PDI=1.18) en CH_2Cl_2 (0.24 ml). La mezcla se calentó a 44ºC durante 12 h. Se eliminó la diamina residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a CH_2Cl_2. Rendimiento: 0,15 g (94%). DLS: DH=126.6 ± 9.3 nm. SLS: Mw=350,000. RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS) δ: El cambio significativo fue la desaparición de los protones de epóxido en 2.94, 2.75 y 2.47 ppm y la aparición de señales en 3.54 y 2.97 ppm correspondientes a los protones vecinos de la amina secundaria del conector PEG después del entrecruzamiento. Todos los demás aspectos del espectro eran similares a los de ABbD.

Procedimiento general para la unión de bencil-mercaptán a nanopartículas de ABbD. A una solución de nanopartículas de ABbD (15 mg, 0.04 µmoles) en tolueno (0.5 ml), se añadió bencil-mercaptano (3.5 µl, 29 µmoles). La mezcla de reacción se calentó durante 72 h a 35ºC. El tolueno restante se eliminó al vacío y se eliminó el bencil-mercaptano residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a CH_2Cl_2. RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$/TMS) δ: El cambio significativo fue la reducción de los protones de alilo en 5.72 y 5.06 ppm y la aparición de señales en 3.73 ppm y 7.30 ppm, correspondientes a los protones del metileno y del benceno, respectivamente, del bencil-mercaptano unido. Todos los demás aspectos del espectro eran similares a los de las nanopartículas ABbD.

Desprotección del transportador molecular (TM) (5) (contribución de Sharon Hamilton). A una solución de LL-TM (15 mg, 4.56 µmoles) en CH_3OH (0.4 ml), se añadió una solución de D,L-ditiotreitol en CH_3OH (0.2 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se eliminó el ditiotreitol residual mediante purificación con Sephadex LH-20. El producto se unión inmediatamente a nanopartículas de ABbD.

Reacción modelo de unión de TM a nanopartículas de ABbD. A una solución de nanopartículas de ABbD (15 mg, 0.04 µmoles) en CH_3OH (0.2 ml), se añadió 5 (11 mg, 3.35 µmoles) en CH_3OH (0.4 ml). La mezcla de reacción se calentó durante 72 h a 37ºC. Se eliminó el 5 residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a metanol. Rendimiento: 31,3 mg (89%). DLS: DH=128.9 ± 10.2 nm; partícula original, DH=126.6 ± 9.3 nm. RMN ^{1}H (300MHz, CD3OD) δ: el cambio significativo fue la reducción de los protones de alilo en 5.72 y 5.06 ppm y la aparición de señales en 2.20-1.98 (CH2), 1.57 (CH2) y 1.39 (CH2) ppm debido al esqueleto dendrítico del TM. Todos los demás aspectos del espectro eran similares a los de las nanopartículas ABbD.

Nanopartículas ABbD conjugados con Alexa Fluor® 594 (4). A una solución de nanopartículas ABbD (0.021 g, 0.06 µmoles) en THF seco (1.5 ml), se añadió Alexa Fluor® 594 (0.14 ml de 10 mg/ml de Alexa Fluor® 594 en DMF, 1.7 µmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Se eliminó el Alexa Fluor® 594 residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a CH_3OH. Rendimiento: 15,2 mg (88%). RMN ^{1}H (300MHz, CD_3OD) δ: El cambio significativo fue la aparición de los picos siguientes debido a Alexa Fluor® 594: 7.14-7.20, 6.78, 5.48, 4.48, 3.62, 3.43 y 1.24 ppm. RMN ^{1}H (600MHz, $(CD_3)_2SO$) δ: El cambio significativo fue la aparición de los picos siguientes debido a Alexa Fluor® 594: 7.52, 7.47, 7.08, 5.32, 4.44, 4.35, 3.58, 3.16, 2.03 y 1.25 ppm. Todos los demás aspectos del espectro eran similares a los de las nanopartículas ABbD.

Unión de MT a nanopartículas ABbD conjugadas con Alexa Fluor® 594, NP-594-MT (6). A una solución de 4 (8 mg, 0.89 µmoles) en CH_3OH (0.2 ml), se añadió 5 (7,5 mg, 2.27 µmoles) en CH_3OH (0.4 ml). La mezcla de reacción se calentó durante 72 h a 37ºC. Se eliminó el 5 residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a CH_3OH. Rendimiento: 10,0 mg (91%). DLS: DH=129.4 ± 9.8 nm; partícula

original, DH=126.6 ± 9.3 nm. RMN ^{1}H (300MHz, CD_3OD) δ: El cambio significativo fue la rec protones de alilo en 5.72 y 5.06 ppm y la aparición de señales en 2.20-1.98 (CH2), 1.57 (CH2) y 1.39 (CH2) ppm debido al esqueleto dendrítico del TM. Todos los demás aspectos del espectro eran similares a los de 4.

Péptido HVGGSSV conjugado con N-acetoxisuccinimida, cHVGGSSV (7). A una solución de 1 (29.4 mg, $2.7x10^{-5}$ moles) disuelta en CH_3CN (3 ml), se añadió N-acetoxisuccinimida (0.42 g, $2.7x10^{-3}$ moles). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras la eliminación del solvente bajo presión reducida, el producto en bruto se purificó mediante RP-HPLC. MALDI-MS: m/z = (M+H+) 1174.2.

Nanopartículas ABbD-Alexa Fluor® 594 conjugadas con HVGGSSV con caperuza, NP-cHVGGSSV-594. A una solución de nanopartículas ABbD (0.021 g, 0.06 μmoles) en dimetilsulfóxido (0.7 ml), se añadió 7 (6.4 mg, 5.46 μmoles). La mezcla de reacción se calentó durante 72 h a 33ºC. A esta solución se añadió Alexa Fluor® 594 (0.14 mL de 10 mg/ml de Alexa Fluor® 594 en DMF, 1.7 μmoles). Se eliminó el Alexa Fluor® 594 residual y el péptido mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a CH_3OH/CH_3CN 1:1. Rendimiento: 20,1 mg (80%). DLS: DH=128.9 ± 10.9 nm; partícula original, DH=126.6 ± 9.3 nm. RMN ^{1}H (600MHz, $(CD_3)_2SO$) δ: El cambio significativo fue la reducción de los protones de alilo en 5.72 y 4.97 ppm y la aparición de los grupos siguientes de señales significativas: 8.21, 7.83, 4.55, 3.73 y 0.80 ppm debido al péptido y 7.25, 7.16, 6.53, 5.32, 4.44, 4.37 y 1.25 ppm debido a Alexa Fluor® 594. Todos los demás aspectos del espectro eran similares a los de las nanopartículas ABbD.

Unión de MT a nanopartículas ABbD-Alexa Fluor® 594 conjugadas con cHVGGSSV, NP-cHVGGSSV-594-MT A una solución de 8 (6 mg, 0.02 μmoles) en DMSO (0.1 ml), se añadió 5 (2 mg, 0.88 μmoles) en CH_3OH (0.3 ml). La mezcla de reacción se calentó durante 48 h a 33°C. Se eliminó el 5 residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a CH_3OH/CH_3CN 1:1. Rendimiento: 7,4 mg (93%). DLS: DH=130.7 ± 9.4 nm; partícula original, DH=126.6 ± 9.3 nm. RMN ^{1}H (600MHz, $(CD_3)_2SO$) δ: El cambio significativo fue la reducción de los protones de alilo en 5.72 y 4.97 ppm y la aparición de señales en 3.06 (CH2), 2.96 (CH2), 1.97 (CH2), 1.77 (CH2), 1.41 (CH2) y 1.35 (CH2) ppm debido al esqueleto dendrítico del TM. Todos los demás aspectos del espectro eran similares a los de 8.

Síntesis de RGD cíclico, cRGD (9). Se sintetizó el péptido RGD mediante síntesis peptídica en fase sólida utilizando una reacción química de Fmoc estándar en un sintetizador de péptidos Modelo 90 (Advanced ChemTech).

Síntesis de RGD lineal. Tras el hinchado con diclorometano (20 ml), se desprotegió la resina Fmoc-Cys-2-Cl-Trt (0.20 g, 0.9 mmoles/g, 0.18 mmoles de aminoácidos superficiales) con piperidina al 20% (v/v) en solución de DMF y se trató con una solución de aminoácidos protegidos con Fmoc (4.4 equiv., 0.9 mmoles) en dimetilformamida (DMF) (9 ml). Los aminoácidos se unieron a la resina utilizando doble acoplamiento con una solución (9 ml) que consistía en monohidrato de N-hidroxibenzotriazol (0.9 mmoles, 0.14 g), hexafluorofosfato de o-(benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio) (0.9 mmoles, 0.34 g), N,N'-diisopropiletilamina (1.8 mmoles, 0,31 ml) en 9 ml de DMF. La mezcla de reacción se agitó durante 60 min y se lavó con DMF (4x10 ml), metanol (4x10 ml) y DMF (4x10 ml). Se utilizó solución de piperidina al 20% (v/v) en DMF para desproteger los grupos Fmoc. Se acopló un espaciador amino-hexilo a las cistinas en la resina, seguido de ácido glutámico, ácido aspártico, glicina, arginina, fenilalanina y finalmente, lisina.

Ciclización de RGD. El péptido se ciclizó mediante la utilización de un grupo ODmab, que permite la desprotección selectiva de la cadena lateral de ácido carboxílico del ácido glutámico, que seguidamente puede acoplarse con el extremo N-terminal. Se desprotegió ODmab utilizando monohidrato de hidrazina al 2% v/v/DMF añadido a la resina y se agitó durante 7 min. A continuación, se lavó con 20 ml de DMF, seguido de 10 ml de una solución de DIPEA/DMF al 5% v/v que se dejó bajo agitación durante 10 min. Se consiguió la activación de carboxi mediante la utilización de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (44.6 mg, 0.22 mmoles) e hidroxibenzotriazol (HOBt) (29.2 mg, 0.22 mmoles) que se añadió a 10 ml de DMF y después se añadió a la resina y se dejó bajo agitación durante 18 h.

Procedimiento general: escisión respecto de la resina. La resina se trató con reactivo R, una solución de TFA, tioanisol, anisol y etanoditiol (90:5:3:2, 6 ml) durante 3 h. Tras la separación de la resina mediante filtración, se concentró el filtrado para precipitar el péptido con éter dietílico frío. El péptido en bruto se recogió mediante centrifugación, se purificó mediante RP-HPLC y se liofilizó. Se confirmó la identidad del péptido mediante MALDI-MS (m/z: 945).

Unión de cRGD a nanopartículas ABbD conjugadas con Alexa Fluor® 594, NP-594-cRGD (10). A una solución de nanopartículas ABbD (23.0 mg, 0.07 μmoles) en THF (2.3 ml), se añadió Alexa Fluor® 594 (0.15 ml de 10 mg/ml de Alexa Fluor® 594 en DMF, 1.83 μmoles). Tras agitar la mezcla de reacción durante 24 h a temperatura ambiente, se eliminó el solvente mediante evaporador rotatorio. A las nanopartículas conjugadas con Alexa Fluor® 594, se añadió metanol (0.35 ml) y 9 (5.7 mg, 6.0 μmoles) disuelto en DMSO (0.35 ml). La mezcla de reacción se calentó durante 72 h a 33°C. Se eliminó el Alexa Fluor® 594 y péptido residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a CH_3OH/CH_3CN 1:1. Rendimiento:

22,0 mg (81%). DLS: DH=129.8 ± 9.6 nm; partícula original, DH=126.6 ± 9.3 nm. RMN ^{1}H (600MHz
El cambio significativo fue la reducción de los protones de alilo en 5.72 y 4.97 ppm y la aparición de los grupos siguientes de señales significativas: 7.37, 4.79, 2.23 y 1.66 ppm debido a cRGD, y 7.25, 6.55, 5.31, 4.44 y 1.23 ppm debido al Alexa Fluor® 594. Todos los demás aspectos del espectro eran similares a los de las nanopartículas ABbD.

Unión de MT a nanopartículas ABbD-Alexa Fluor® 594 conjugadas con cRGD, NP-594-cRGD-MT (12). A una solución de 10 (7,8 mg, 0.02 μmoles) en DMSO (0.1 ml), se añadió 5 (1,4 mg, 0.67 μmoles) en CH_3OH (0.3 ml). La mezcla de reacción se calentó durante 48 h a 33°C. Se eliminó el 5 residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a CH_3OH/CH_3CN 1:1. Rendimiento: 7,6 mg (83%). DLS: DH=131.9 ± 10.6 nm; partícula original, DH=126.6 ± 9.3 nm. RMN ^{1}H (600MHz, $(CD_3)_2SO$) δ: El cambio significativo fue la reducción de los protones de alilo en 5.72 y 4.97 ppm y la aparición de señales en 3.04 (CH2), 2.98 (CH2), 1.98 (CH2), 1.75 (CH2), 1.41 (CH2) y 1.35 (CH2) ppm debido al esqueleto dendrítico del TM. Todos los demás aspectos del espectro eran similares a los de 11.

Nanopartículas ABbD conjugadas con HVGGSSV, NP-HVGGSSV (14). A una solución de nanopartículas ABbD (50.0 mg, 0.14 μmoles) en THF (2 ml), se añadió N-acetoxisuccinimida (7 mg, 44.5 μmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h. Se eliminó la N-acetoxisuccinimida residual mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a THF/CH_3OH 1:1, proporcionando nanopartículas ABbD con caperuza de amina, 13. A una solución de 13 (50.0 mg, 0,14 μmoles en 3 ml de THF), se añadió 1 (9.3 mg, 8.57 μmoles) disuelto en DMSO (2 ml) y $NaCNBH_3$ (17.1 μl, $NaCNBH_3$ 1,0 M en THF). La mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a THF/CH_3CN 1:1. Rendimiento: 43,2 mg (83%). DLS: DH=129.7 ± 9.5 nm; partícula original, DH=126.6 ± 9.3 nm. SLS: Mw = 391,000; partícula original, Mw=350,000. RMN 1H (600MHz, (CD3)2SO, ppm) δ: El cambio significativo fue la aparición de los picos siguientes: 8.21, 7.85, 4.55, 3.73 y 0.80 ppm debido al péptido. Todos los demás aspectos del espectro eran similares a los de las nanopartículas ABbD.

Alexa Fluor® 594 tiolado (15). A una solución de Alexa Fluor® 594 (0.2 ml de 10 mg/ml de Alexa Fluor® 594 en DMF, 2.4 μmoles), se añadió cysteamina (68.4 μl de 2.5 mg/ml de cisteamina en DMSO, 2.2 μmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. El producto se unión inmediatamente a 14.

Unión de TM a nanopartículas ABbD-Alexa Fluor® 594 conjugadas con HVGGSSV, NPHVGGSSV- 594-TM (16). A una solución de 14 (16 mg, 0.04 μmoles) en DMSO (0.2 ml), se añadió 15 (2 mg, 1.95 μmoles) en DMSO (0.2 ml) y 5 (2.7 mg, 1.2 μmoles) en CH_3OH (0.4 ml). La mezcla de reacción se calentó durante 48 h a 33ºC. Se eliminó el 5 y 15 residuales mediante diálisis con tubos de diálisis plegados SnakeSkin® (MWCO=10,000) frente a CH_3OH. Rendimiento: 18,5 mg (86%). DLS: DH=132.1 ± 9.3 nm; partícula original, DH=126.6 ± 9.3 nm. RMN ^{1}H (600MHz, $(CD_3)_2SO$) δ: El cambio significativo fue la reducción de los protones de alilo en 5.72 y 4.97 ppm y la aparición de los grupos siguientes de señales significativas: 3.08, 2.99, 1.97, 1.79, 1.43 y 1.34 ppm debido al esqueleto dendrítico del TM, y 7.27, 7.07, 6.53, 5.32, 4.46, 4.37 y 1.24 ppm debido a Alexa Fluor® 594. Todos los demás aspectos del espectro eran similares a los de 14.

124. Encapsulado de PACLITAXEL en nanopartículas de POLI8VL-EVL-AVL-OPD) (ABBD).

A un vaso de 150 ml que contenía D-α-tocoferol succinato de polietilenglicol 1000 (0.39 g) disuelto en agua de cultivo celular de Lonza (78 ml), se añadió lentamente bajo agitación vigorosa poli(vl-evl-avl-opd), ABbD, nanopartículas (0.17 g) y paclitaxel (34.0 mg) disueltos en dimetil sulfóxido (0.75 ml). La solución se dividió en dos tubos de centrífuga de 50 ml. Las nanopartículas cargadas con paclitaxel se purificaron mediante la aplicación de dos ciclos de centrifugación (8000 rpm durante 1 h) y la reconstitución con agua de cultivo celular. A continuación, se liofilizó la suspensión de nanopartículas. La proporción de carga de paclitaxel para el encapsulado se determinó mediante NanoDrop UV/Vis y se encontró que era de 11.34%.

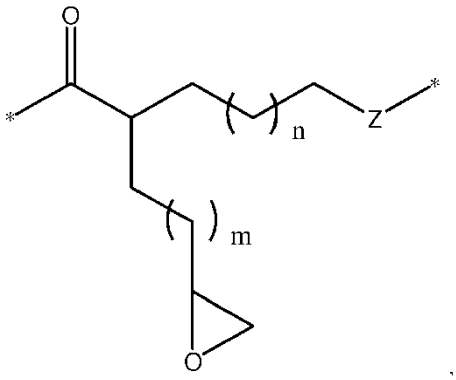
125. Administración *in vivo* de bioconjugado de nanopartículas.

Se sacrificaron cinco ratas Sprague-Dawley adultas mediante inhalación letal de CO_2. En el momento de la eutanasia, se trataron ocho ojos de cuatro ratas con una solución de conjugado de nanopartículas $2x10^{-2}$ M en una proporción molar de 5:1 (pigmento:transportador) hasta 15 minutos; una rata sirvió de control de no tratamiento. Se dejó caer la solución con una micropipeta sobre la córnea y se instilaron múltiples gotas en serie para mantener un menisco de lágrima sobre la córnea. Las ratas se mantuvieron en la oscuridad en una sala fría durante dos horas después del tratamiento y se sometieron a enucleación del globo con el muñón del nervio óptico unido. Se introdujeron los globos oculares con nervios ópticos unidos en paraformaldehído al 4% hasta la inclusión en parafina. Los bloques de parafina se cortaron en secciones de 4 μm y se tiñeron con pigmento DAPI tradicional. Los portaobjetos se visualizaron a una magnificación de 40x utilizando un microscopio de fluorescencia digital Olympus Provis AX70 con interfaz digital con una cámara CCD semienfriada para visualizar el transportador marcado con Alexa Fluor 594. Se restó la autofluorescencia de fondo y se mantuvo constante la configuración para los ojos de control y los ojos tratados. Para someter a ensayo y obtener imagen de la región

ocular deseada, se midieron imágenes de la misma localización bajo la longitud de onda del DAPI y
con la cámara montada en el microscopio (ver la figura 60 A-D).

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de una nanopartícula degradable, que comprende la etapa de hacer reaccionar un polímero que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta la estructura representada por una fórmula (I):



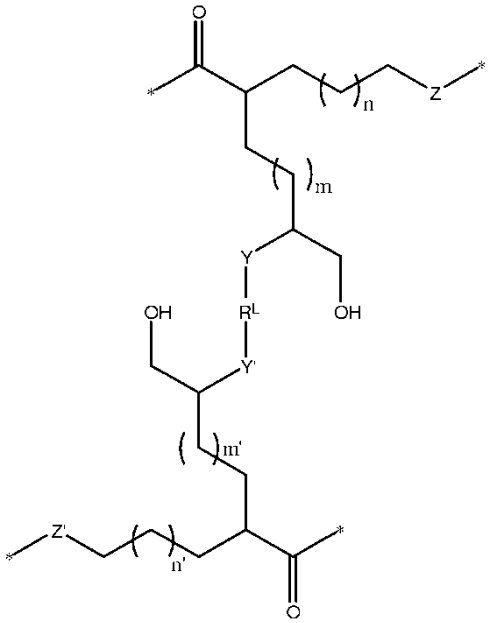
(I)

en la que Z es O, S o NR, en la que R es H, alquilo o arilo, y

en la que m y n son, independientemente, números enteros no negativos,

con un dinucleófilo que presenta una estructura X-R^L-X', en la que X y X' son, independientemente, OH, SH, NH_2 o NHR, en la que R es H, alquilo o arilo, y en la que R^L se selecciona de entre entre alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, alcoxileno sustituido o no sustituido, y ésteres sustituidos o no sustituidos,

produciendo de esta manera una nanopartícula degradable que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida o no sustituida representada por una fórmula:



en la que m y m' son independientemente números enteros comprendidos entre 0 y 6,

en la que n y n' son independientemente números enteros comprendidos entre 0 y 2,

en la que Z y Z' son independientemente O o NR, en la que R es H o alquilo C1 a C6,

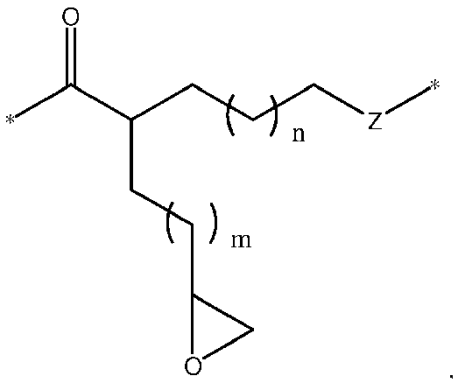
en la que Y e Y' son, independientemente, O, S o NR, en la que R es H o alquilo C1 a C6 alquilo, y

en la que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido o no sustituido, y alcoxileno sustituido o no

sustituido, y

en la que la nanopartícula presenta un tamaño de partícula comprendido entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 850 nm.

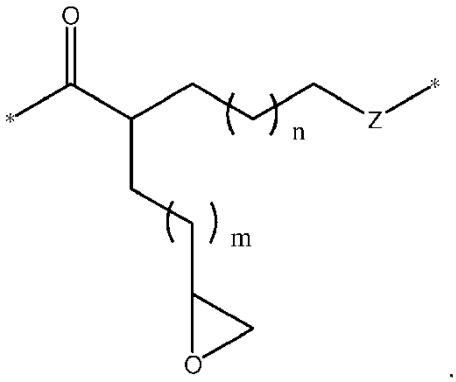
2. Método según la reivindicación 1, en el que la reacción es la adición del polímero que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta la estructura representada por la fórmula (I):



en la que Z es O o NR, en la que R es H o alquilo C1 a C6, en la que m es un número entero comprendido entre 0 y 6, y en la que n es un número entero entre 0 y 2,

a una solución de 1 a 10 equivalentes molares de un dinucleófilo, fracción nucleofílica:funcionalidad epóxido, que presenta una estructura X-R^L-X', en la que X y X' son independientemente OH, SH, NH_2 o NHR, en la que R es H o alquilo C1 a C6, y en la que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido o no sustituido y alcoxileno sustituido o no sustituido.

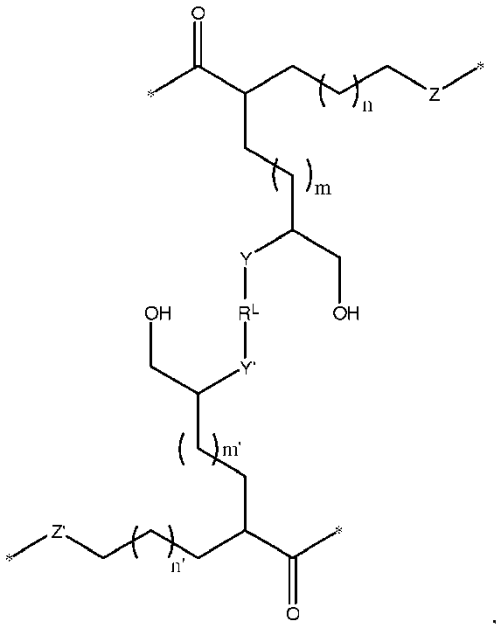
3. Método según la reivindicación 2, en el que la reacción es poner en contacto el polímero que comprende dicho por lo menos un residuo monómero que presenta la estructura representada por la fórmula (I):



en la que Z es O o NR, en la que R es H o alquilo C1 a C6, en la que m es un número entero comprendido entre 0 y 6, y en la que n es un número entero comprendido entre 0 y 2,

con una solución de un equivalente molar del dinucleófilo.

4. Nanopartícula degradable que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta una estructura sustituida o no sustituida representada por una fórmula:



en la que m y m' son independientemente números enteros comprendidos entre 0 y 6,

en la que n y n' son independientemente números enteros comprendidos entre 0 y 2,

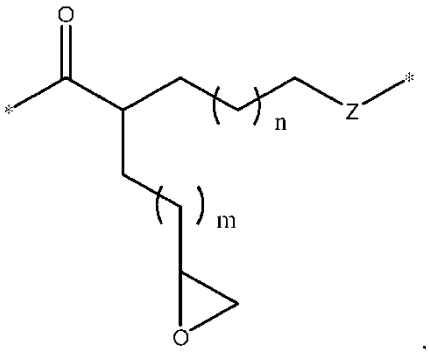
en la que Z y Z' son independientemente O o NR, en la que R es H o alquilo C1 a C6,

en la que Y e Y' son independientemente O, S o NR, en la que R es H o alquilo C1 a C6, y

en la que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido o no sustituido y alcoxileno sustituido o no sustituido, y

en la que la nanopartícula presenta un tamaño de partícula comprendido entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 850 nm; estando la nanopartícula degradable formada a partir de:

a) un polímero que comprende por lo menos un residuo monómero que presenta la estructura representada por una fórmula (I):



(I)

en la que Z es O, S o NR, en la que R es H, alquilo o arilo, y

en la que m y n son independientemente números enteros no negativos, y

b) por lo menos un dinucleófilo que presenta una estructura X-R^L-X', en la que X y X' son independientemente -OH, -SH, -NH_2 o -NHR, en la que R es H, alquilo o arilo, y en la que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, alcoxileno sustituido o no sustituido y ésteres sustituidos o no sustituidos,

5. Nanopartícula degradable según la reivindicación 4, en la que Z es O o NR, en la que m es un número entero comprendido entre 0 y 6; en la que n es un número entero comprendido entre 0 y 2; R es H o alquilo C1 a C6; y

en la que R^L se selecciona de entre alquilo sustituido o no sustituido y alcoxileno sustituido o no nanopartícula degradable está formada a partir de una solución de 1 a 10 equivalentes molares de un dinucleófilo, fracción nucleofílica:funcionalidad epóxido, que presenta una estructura X-R^L-X'.

6. Método según la reivindicación 1 o la nanopartícula degradable según la reivindicación 4, en el que, con respecto a la fórmula (I),

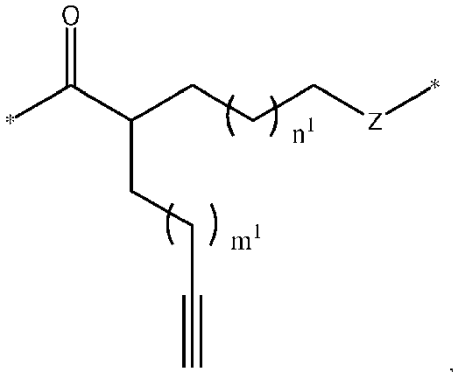
Z es O o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6,

m es un número entero comprendido entre 0 y 6,

n es un número entero comprendido entre 0 y 2, y dicho por lo menos un monómero comprende menos de 10% en peso de dicho por lo menos un residuo monómero de halógeno seleccionado de entre cloro, bromo y yodo,

y el polímero comprende además uno o más de entre:

a. un residuo monómero funcionalizado con propargilo que presenta una estructura sustituida o no sustituida representada por una fórmula (II):



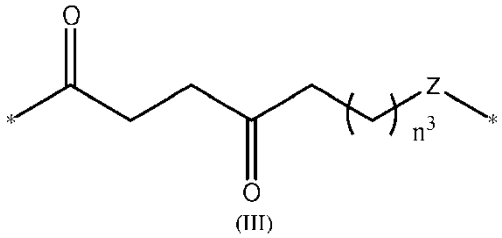
(II)

en la que Z es O o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6,

en el que m^1 es un número entero comprendido entre 0 y 6, y

en el que n^1 es un número entero comprendido entre 0 y 2, y

b. un residuo monómero funcionalizado con ceto que presenta una estructura sustituida o no sustituida representada por una fórmula (III):

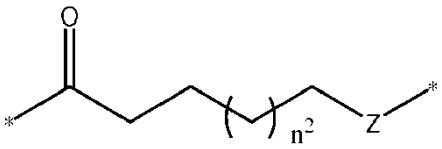


(III)

en la que Z es O o NR, en la que R es H o alquilo C1 a C6, y

en la que n^3 es un número entero comprendido entre 0 y 2.

7. Método o nanopartícula degradable según la reivindicación 6, en el que el polímero comprende asimismo un residuo monómero que presenta una estructura sustituida o no sustituida representada por una fórmula (XI):



(XI)

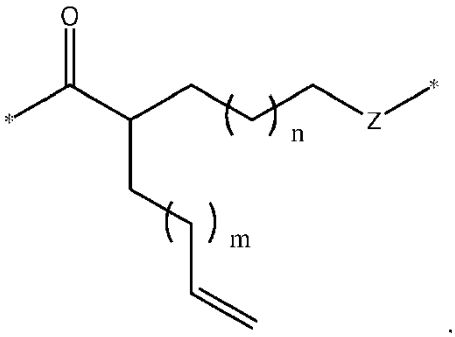
en la que Z es O o NR, en la que R es H o alquilo C1 a C6, y

en la que n^2 es un número entero comprendido entre 0 y 2.

8. Método según la reivindicación 1, que comprende asimismo preparar el polímero mediante un método que comprende las etapas siguientes:

i. copolimerizar una mezcla de dos o más de entre:

a. un monómero funcionalizado con alqueno que proporciona un residuo que presenta una estructura sustituida o no sustituida representada mediante una fórmula (VI):



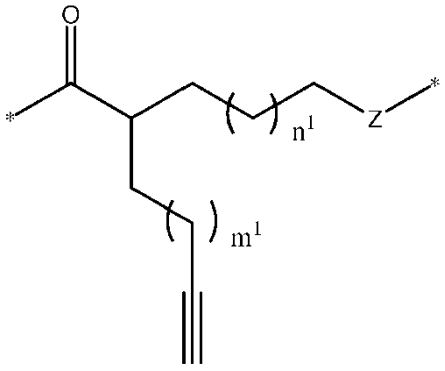
(VI)

en la que Z es O o NR, en la que R es H o alquilo C1 a C6,

en la que m es un número entero comprendido entre 0 y 6, y

en la que n es un número entero comprendido entre 0 y 2; y por lo menos uno de entre:

b. un monómero funcionalizado con propargilo que proporciona un residuo que presenta una estructura sustituida o no sustituida representada por una fórmula (II):



(II)

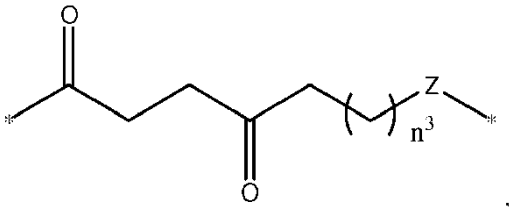
en la que Z es O o NR, en la que R es H o alquilo C1 a C6,

en la que m^1 es un número entero comprendido entre 0 y 6, y

en la que n^1 es un número entero comprendido entre 0 y 2, y

c. un monómero funcionalizado con ceto que proporciona un residuo que presenta una estructura

sustituida o no sustituida representada por una fórmula (III):

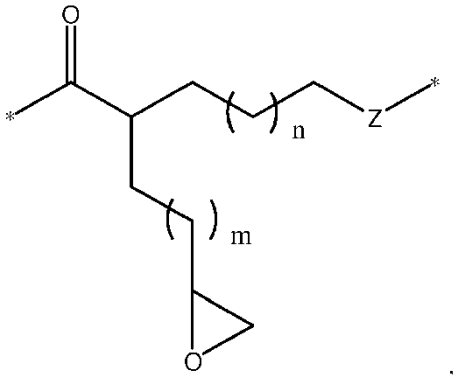


(III)

en la que Z es O o NR, en la que R es H o alquilo C1 a C6, y

en la que n^3 es un número entero comprendido entre 0 y 2, y

ii. oxidar el residuo monómero funcionalizado con alqueno del polímero para proporcionar un residuo monómero funcionalizado con epóxido que presenta una estructura sustituida o no sustituida representada por una fórmula (I):

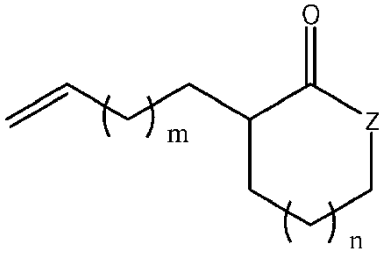


(I)

en la que Z, m y n son tal como se ha definido anteriormente, y

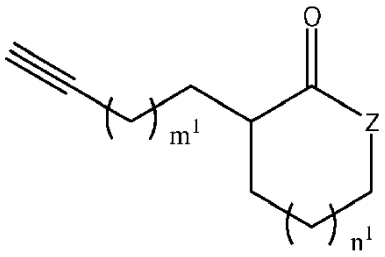
iii. que comprende asimismo una etapa de funcionalización del polímero.

9. Método según la reivindicación 8, en el que el monómero funcionalizado con alqueno está presente y tiene una estructura sustituida o no sustituida representada por una fórmula:



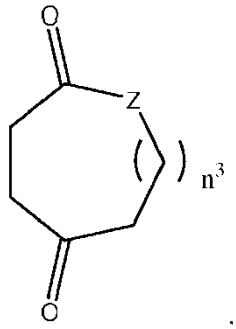
en la que Z, m y n son tal como se define en la reivindicación 8, preferentemente en la que m es 0, n es 1 y Z es O.

10. Método según la reivindicación 8, en el que el monómero funcionalizado con propargilo está presente y tiene una estructura sustituida o no sustituida representada por una fórmula:



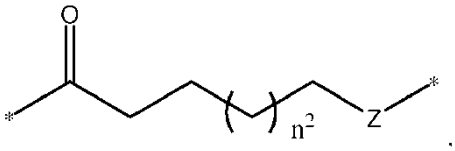
en la que Z, m^1, and n^1 son tal como se define en la reivindicación 8, preferentemente en la que m^1 es 0, n^1 es 1, y Z es O.

11. Método según la reivindicación 8, en el que el monómero funcionalizado con ceto está presente y tiene una estructura sustituida o no sustituida representada por una fórmula:



en la que Z y n^3 son tal como se define en la reivindicación 8, preferentemente en la que n^3 es 1 y Z es O.

12. Método según la reivindicación 8, en el que la mezcla comprende asimismo por lo menos un monómero que proporciona un residuo que presenta una estructura sustituida o no sustituida representada mediante una fórmula (XI):

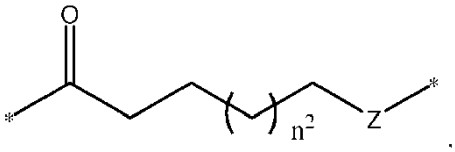


(XI)

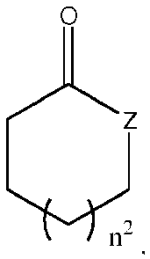
en la que Z es O o NR, en el que R es H o alquilo C1 a C6, y

en la que n^2 es un número entero comprendido entre 0 y 2.

13. Método según la reivindicación 12, en el que dicho por lo menos un monómero que proporciona un residuo que presenta una estructura sustituida o no sustituida representada por una fórmula (XI):



presenta una estructura sustituida o no sustituida representada por una fórmula:



en la que n^2 y Z son tal como se define en la reivindicación 12, preferentemente en la que n^2 es 1 y Z es O.

14. Nanopartícula degradable según la reivindicación 5, formada a partir de una solución de 10 equivalentes molares de un dinucleófilo, fracción nucleofílica:funcionalidad epóxido, que presenta una estructura $X\text{-}R^L\text{-}X'$.

15. Método según la reivindicación 8, en el que la funcionalización comprende la etapa siguiente:

a) hacer reaccionar:

un residuo monómero funcionalizado con epóxido que presenta una estructura sustituida o no sustituida representada por una fórmula (I) tal como se define en la reivindicación 8,

con un nucleófilo que presenta una estructura representada por una fórmula $X\text{-}R^1$, en la que X es OH, SH, NH_2 o NHR, en la que R es H o alquilo C1 a C6, y en la que R^1 es un radical orgánico sustituido o no sustituido que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono, o

b) hacer reaccionar:

un residuo monómero funcionalizado con propargilo que presenta una estructura sustituida o no sustituida representada por una fórmula (II) tal como se define en la reivindicación 8.

con una azida que presenta la estructura representada por una fórmula $N_3\text{-}R^1$, en la que R^1 es un radical orgánico sustituido o no sustituido que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono, o

c) hacer reaccionar:

un monómero funcionalizado con ceto que proporciona un residuo que presenta una estructura sustituida o no sustituida representada por una fórmula (III) tal como se define en la reivindicación 8 con

una amina que presenta la estructura representada por una fórmula:

$$H_2N\text{-}R^1,$$

en la que R^1 es un radical orgánico sustituido o no sustituido que comprende entre 1 y 24 átomos de carbono, y posteriormente

reducir la imina resultante.

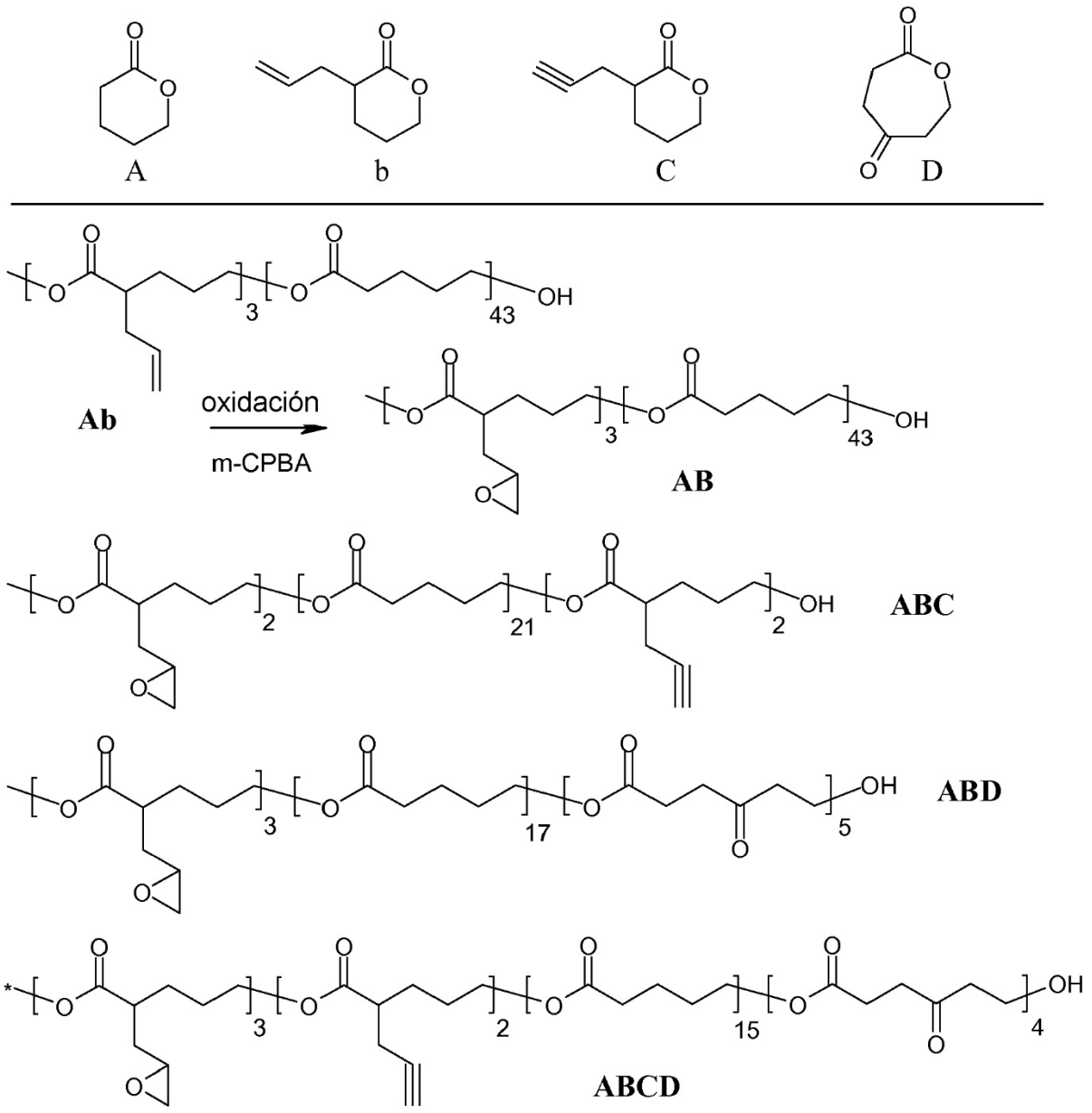


FIGURA 1

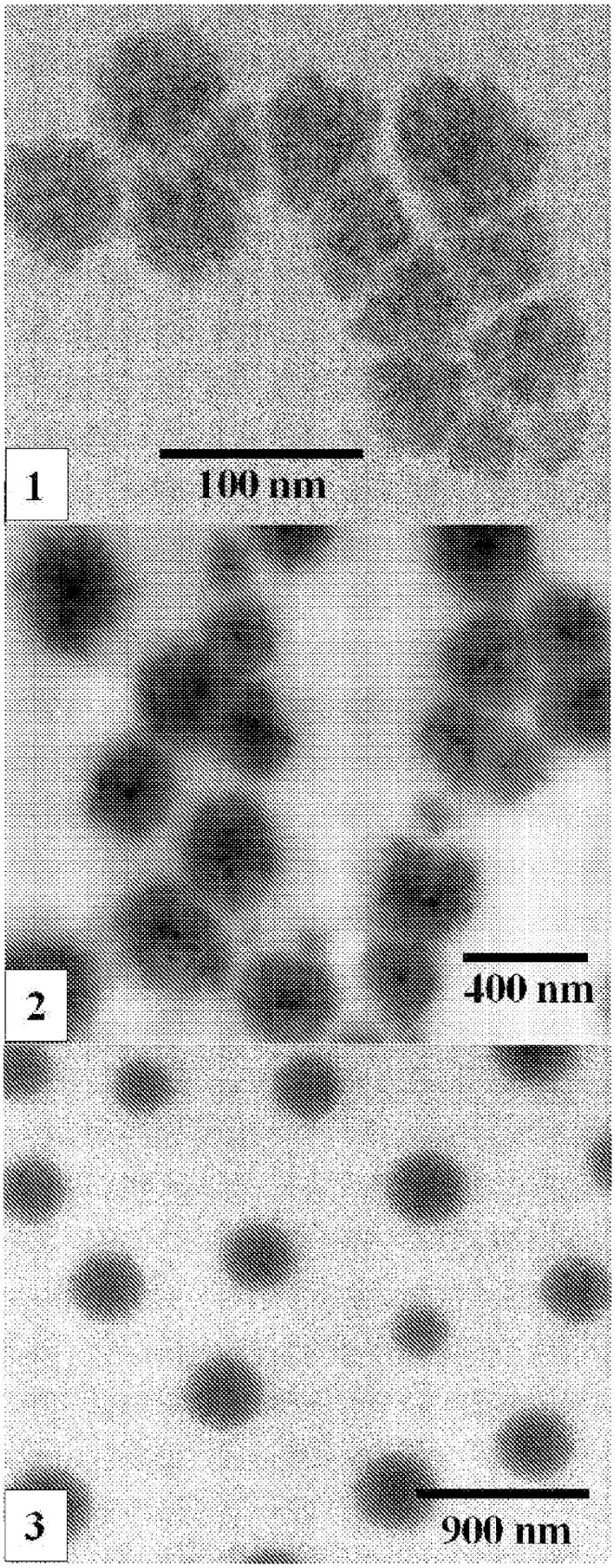


FIGURA 2

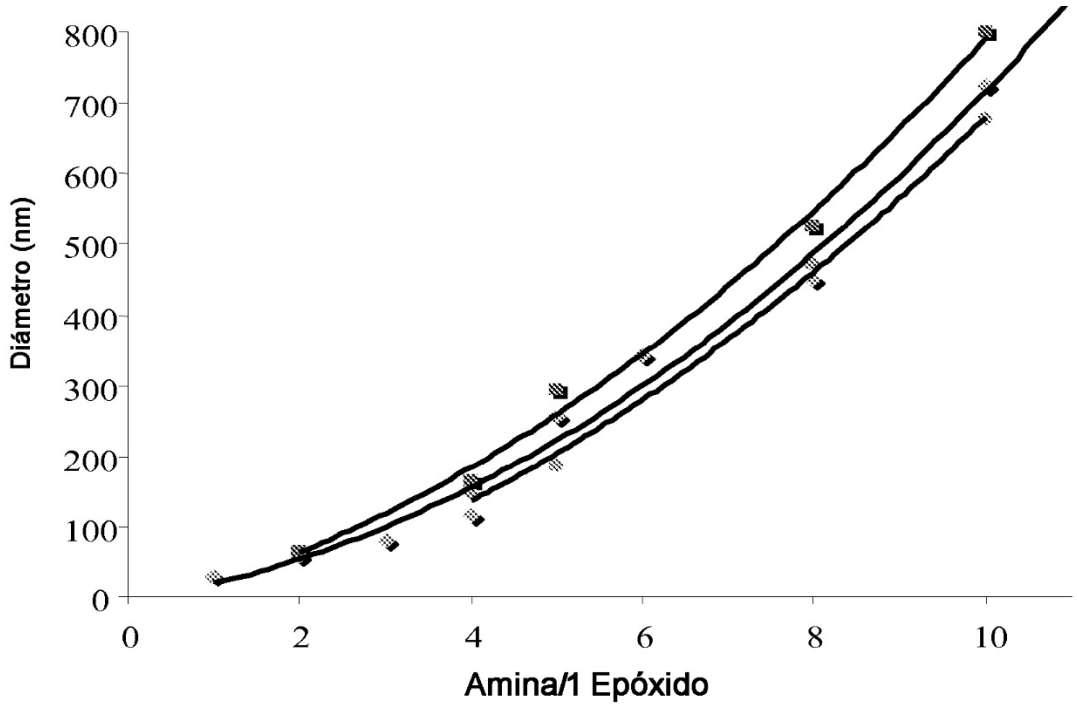


FIGURA 3

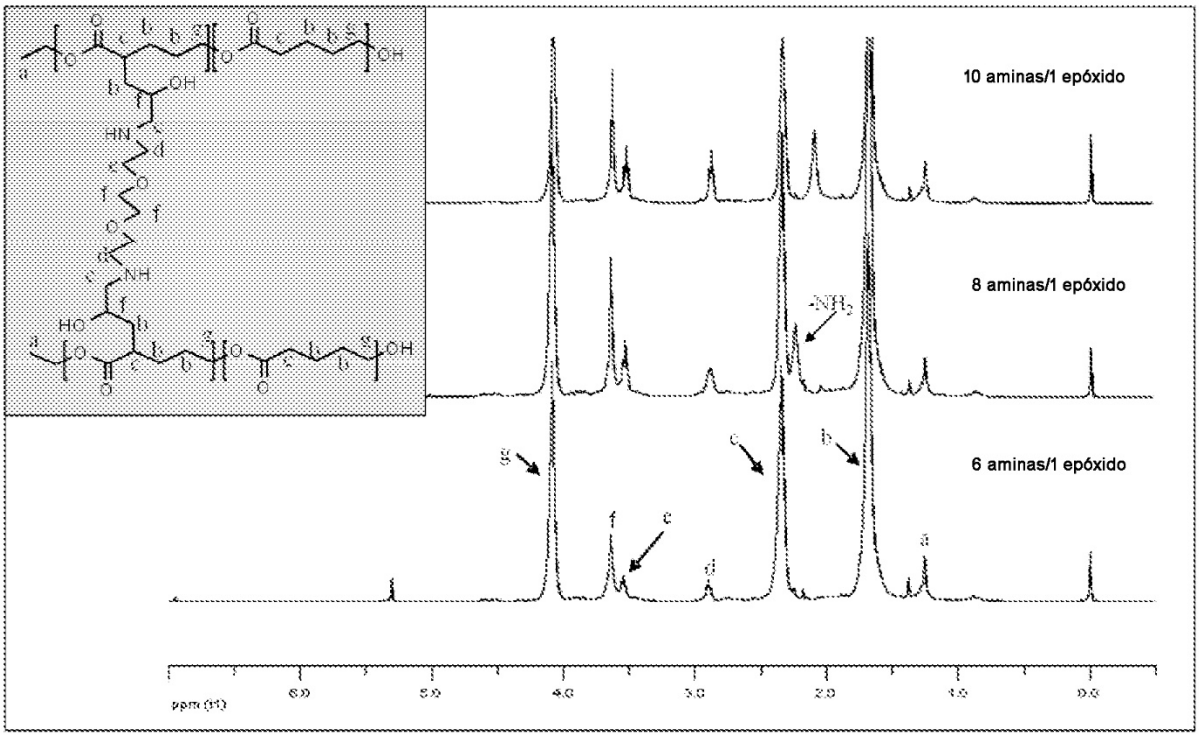


FIGURA 4

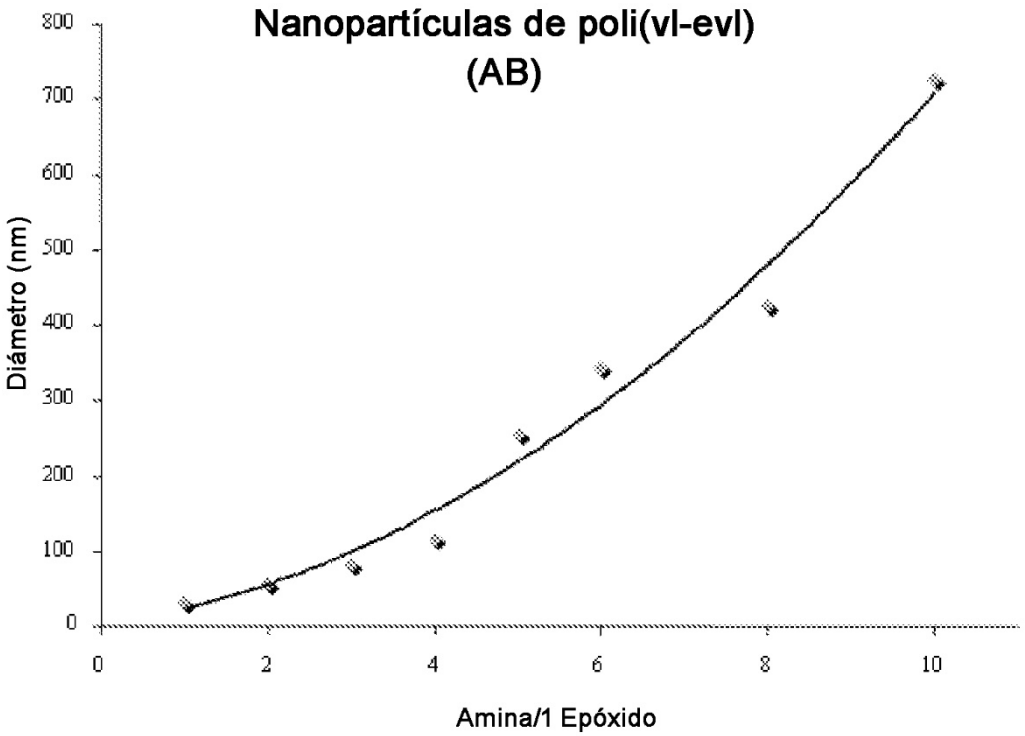


FIGURA 5

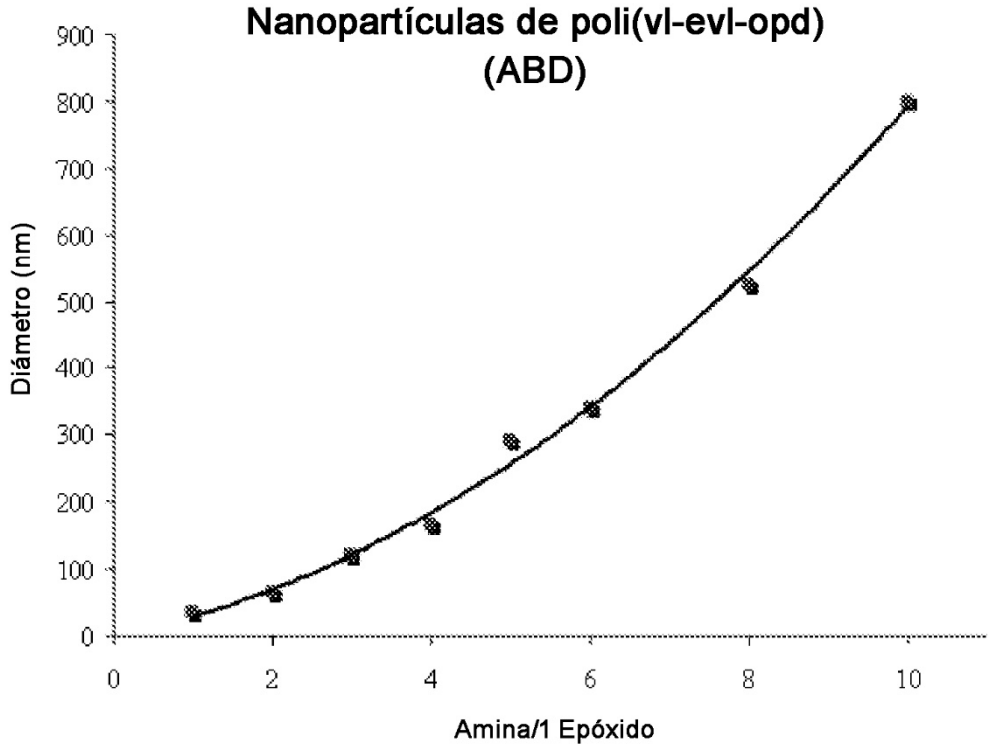


FIGURA 6

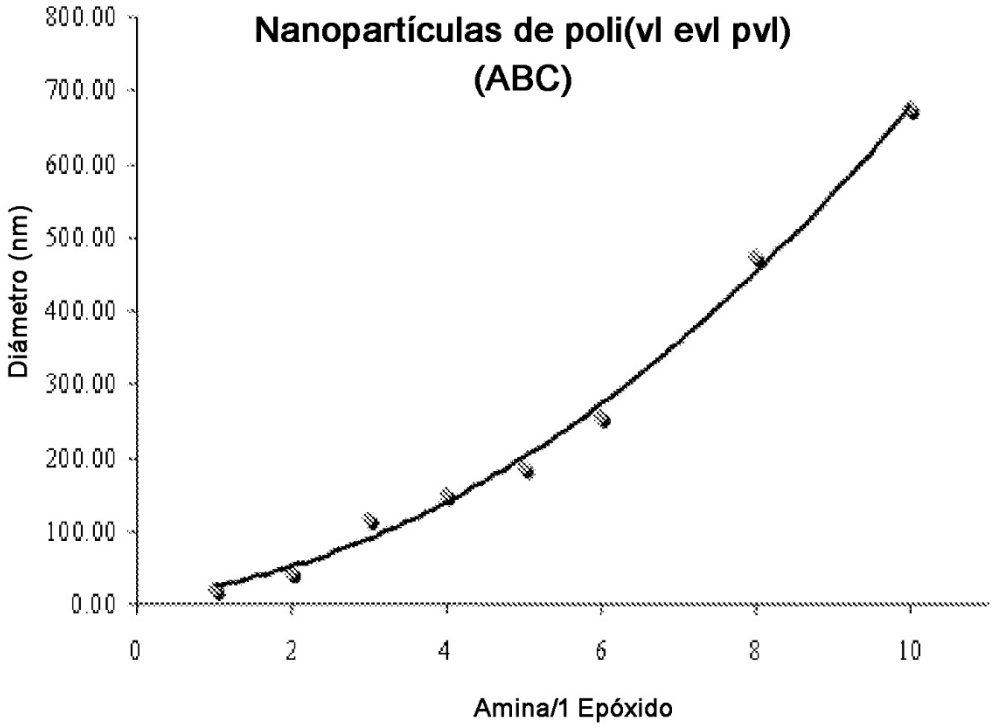


FIGURA 7

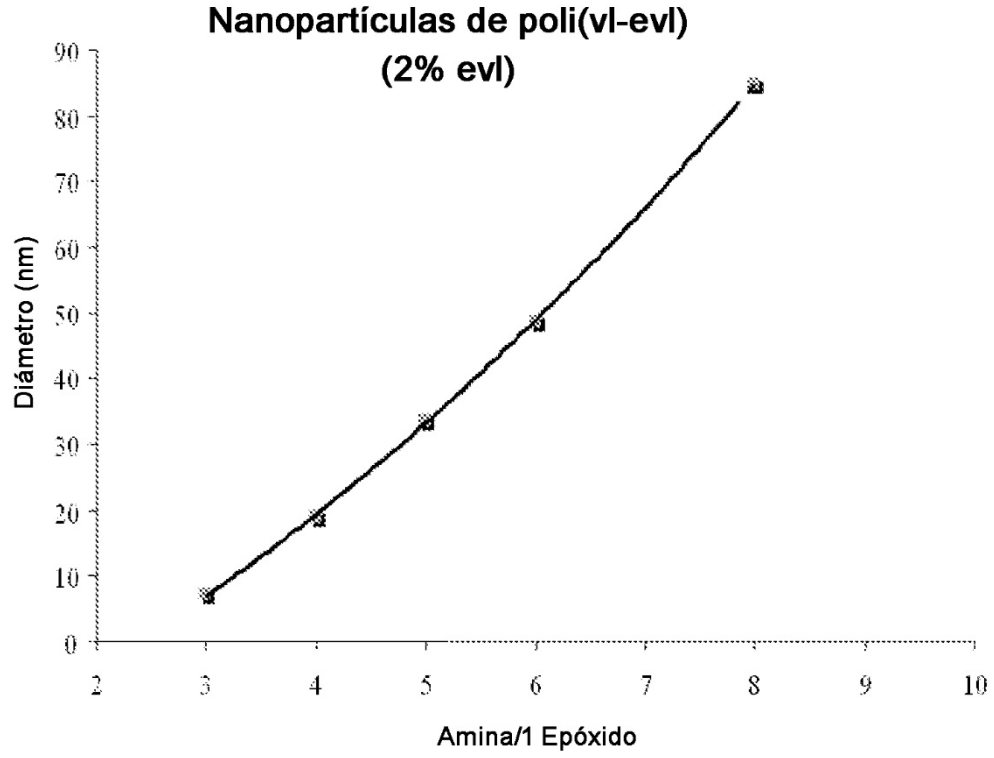


FIGURA 8

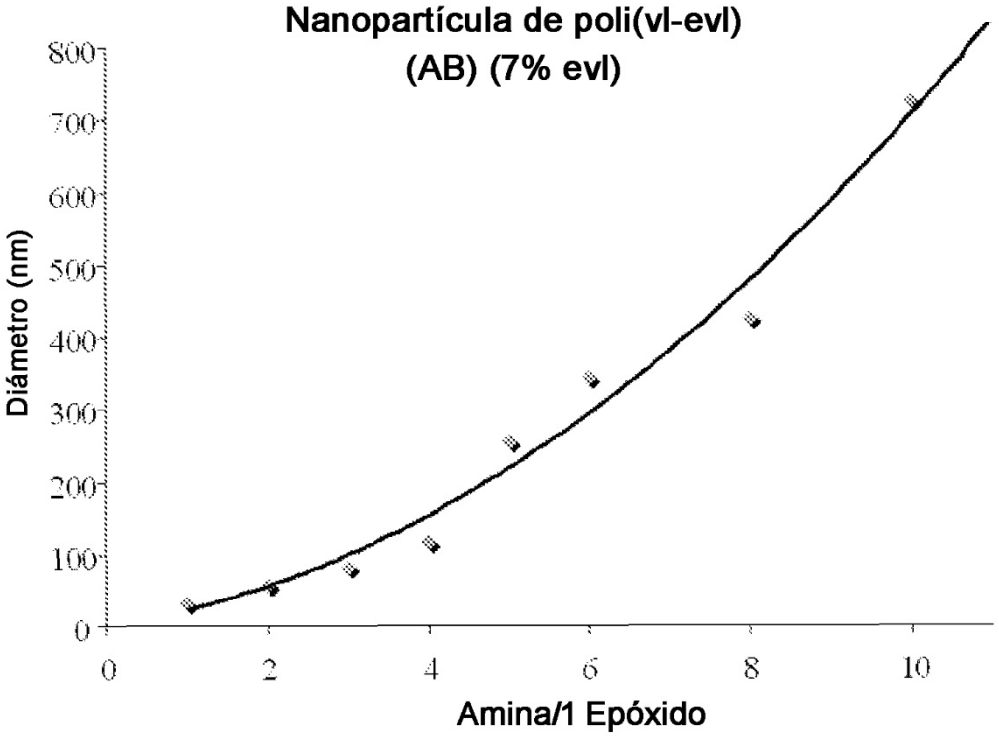


FIGURA 9

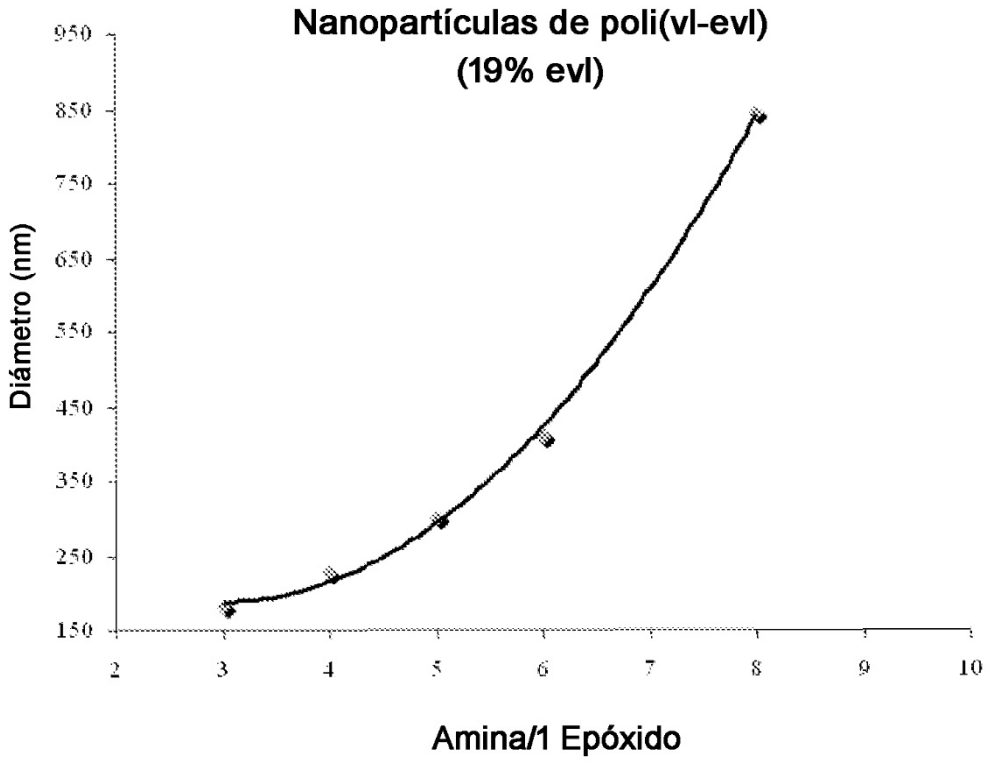


FIGURA 10

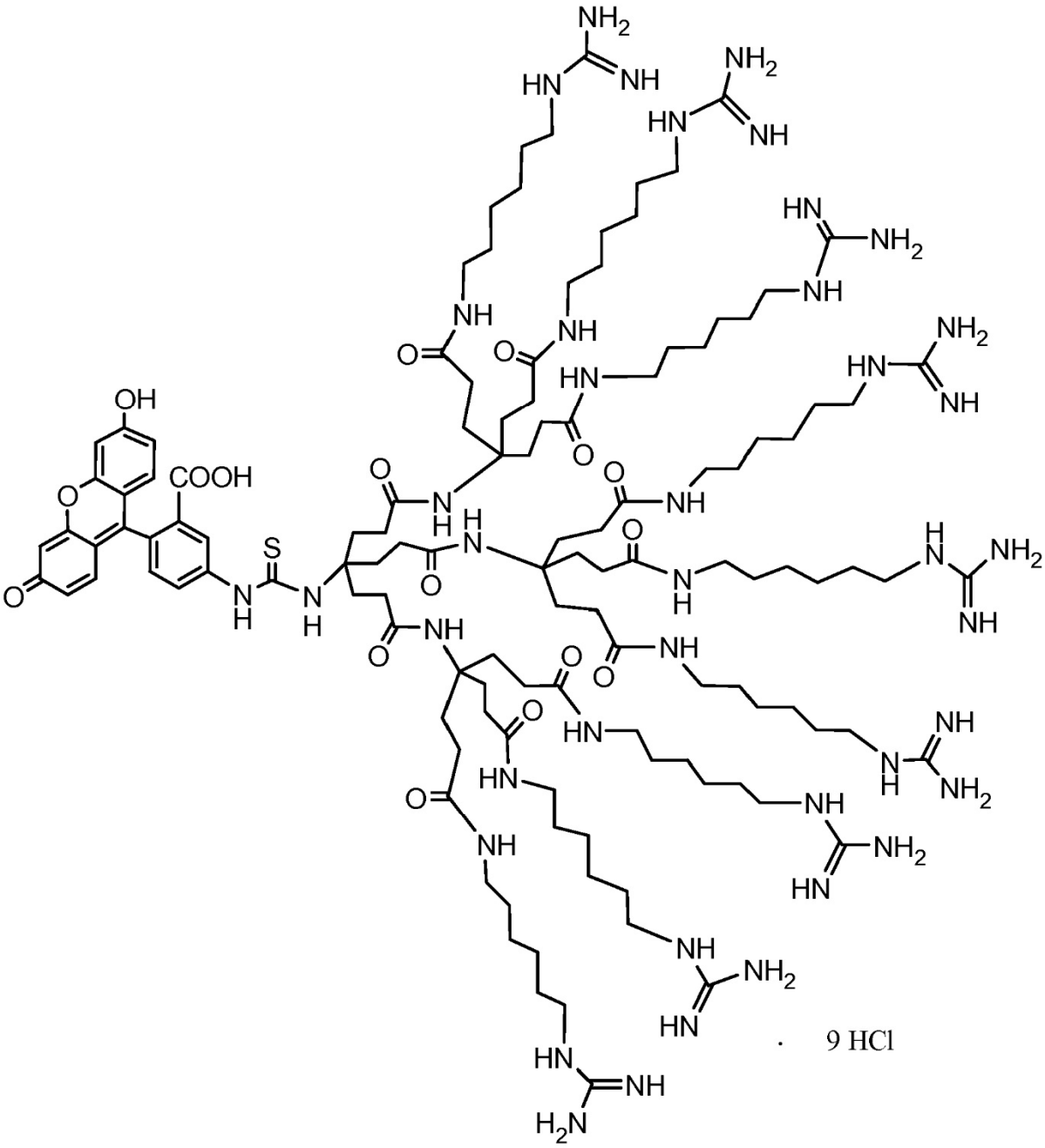

NH2
HN
NH
NH2
HN
NH
HN
NH2
NH
NH
NH
O
O
HN
NH2
HN
NH
NH2
HN
NH
OH
COOH
O
O
O
N
H
O
NH
O
O
S
N
H
N
H
H
N
O
N
H
H
N
NH2
NH
O
NH
O
O
NH
O
HN
NH
N
H
NH2
O
HN
NH
NH2
O
NH
HN
NH
NH2
HN
NH
NH2
HN
HN
NH
H2N
· 9 HCl

FIGURA 11

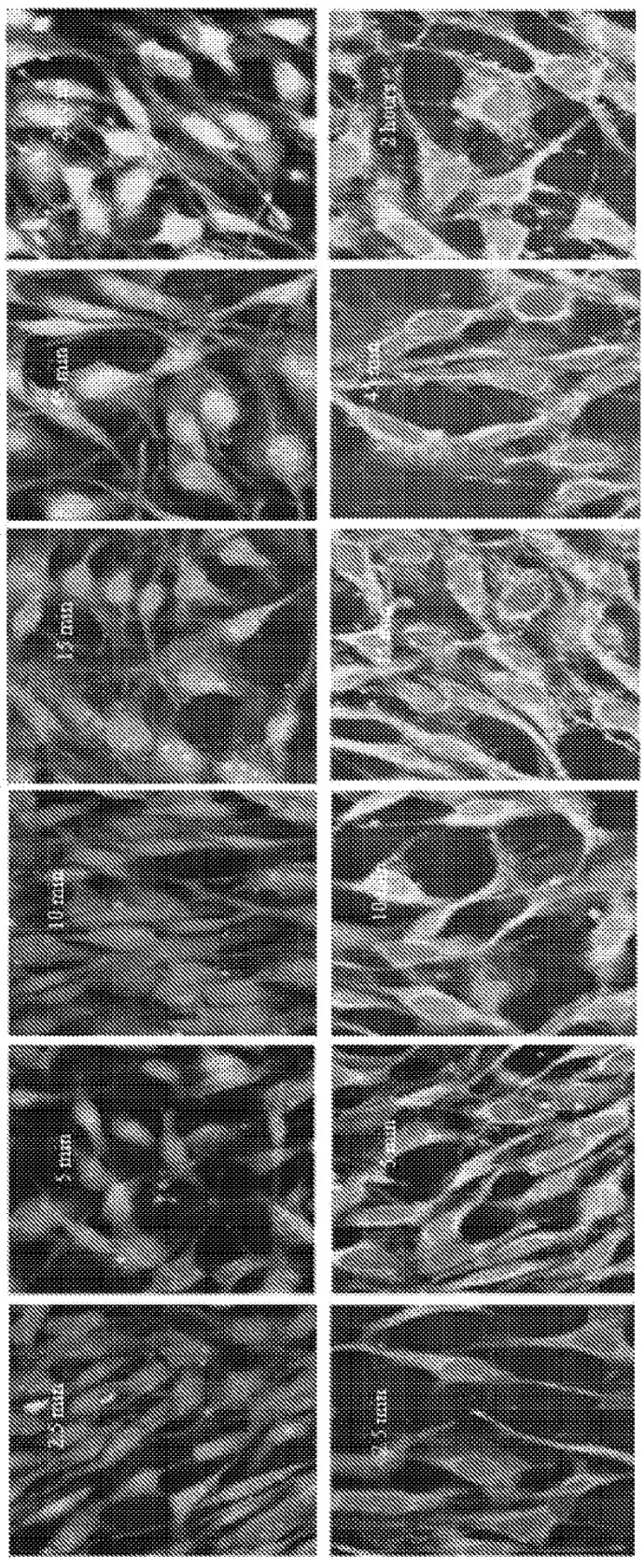


FIGURA 12

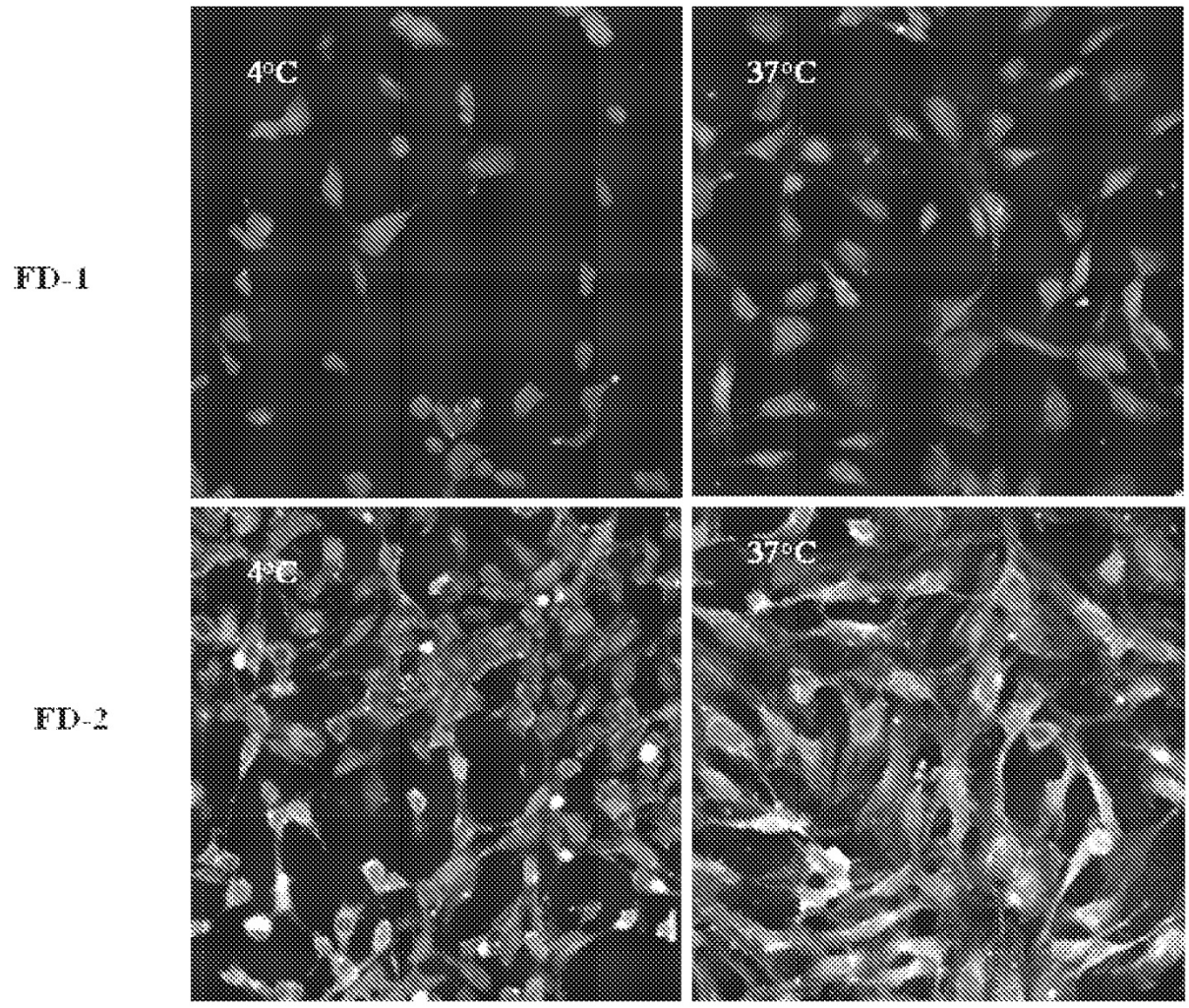


FIGURA 13

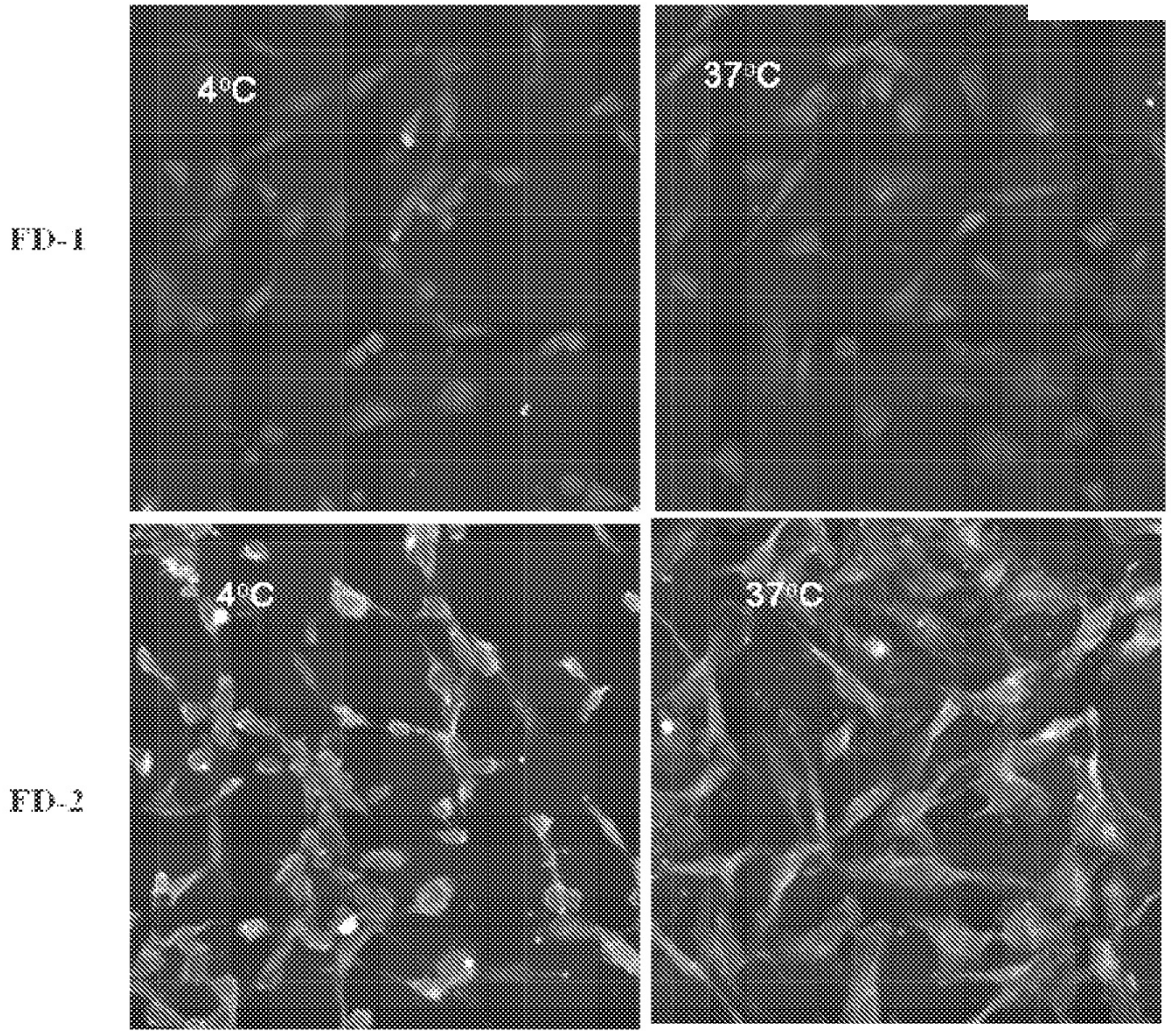


FIGURA 14

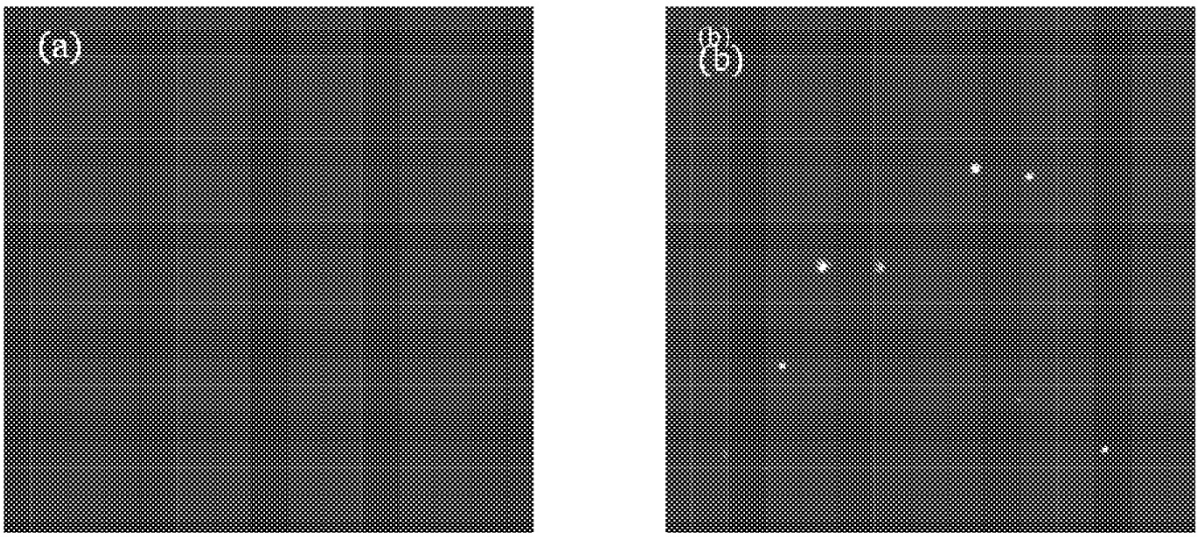
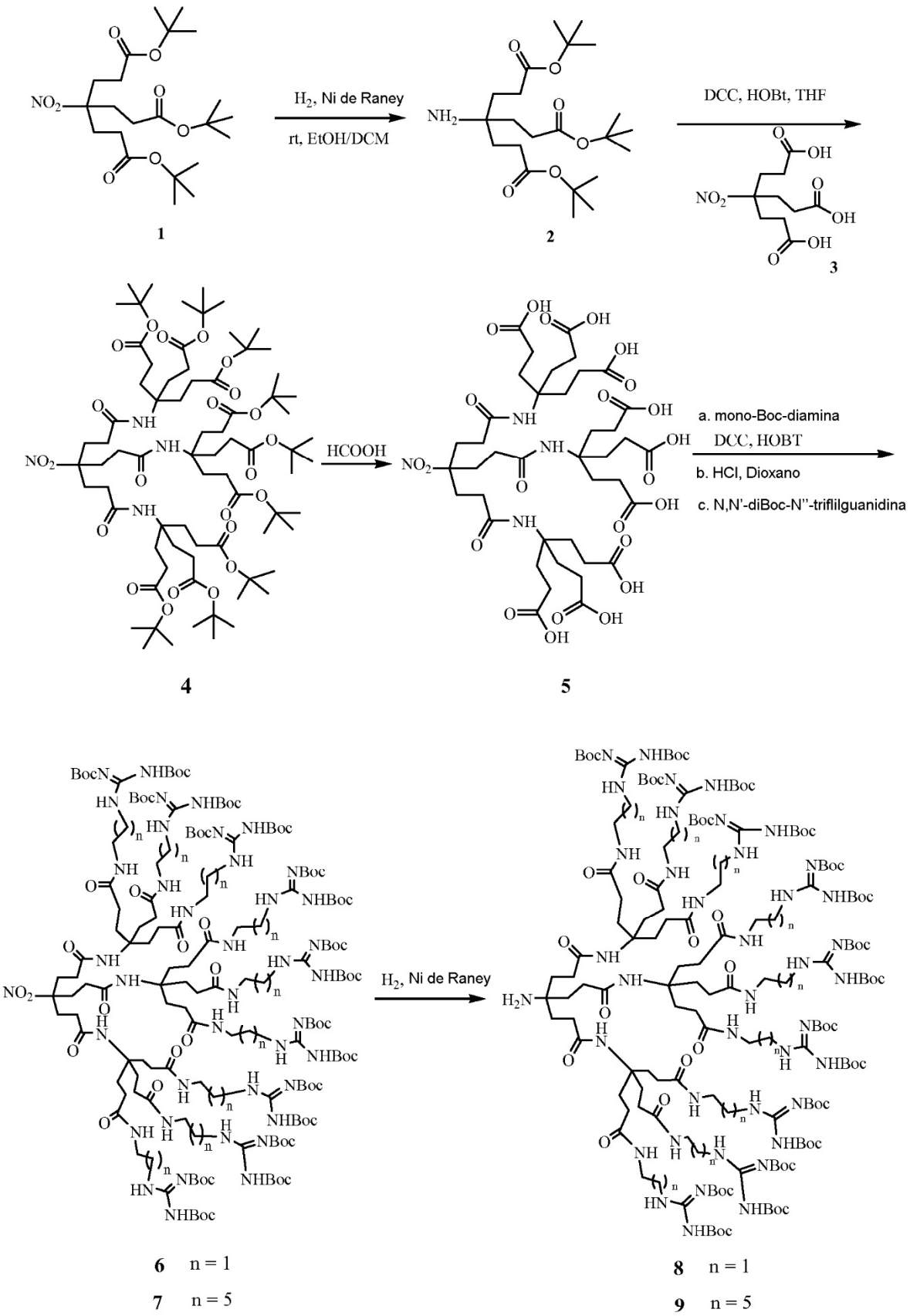


FIGURA 15



1 **2** **3**

4 **5**

6 n = 1

7 n = 5

8 n = 1

9 n = 5

FIGURA 16A

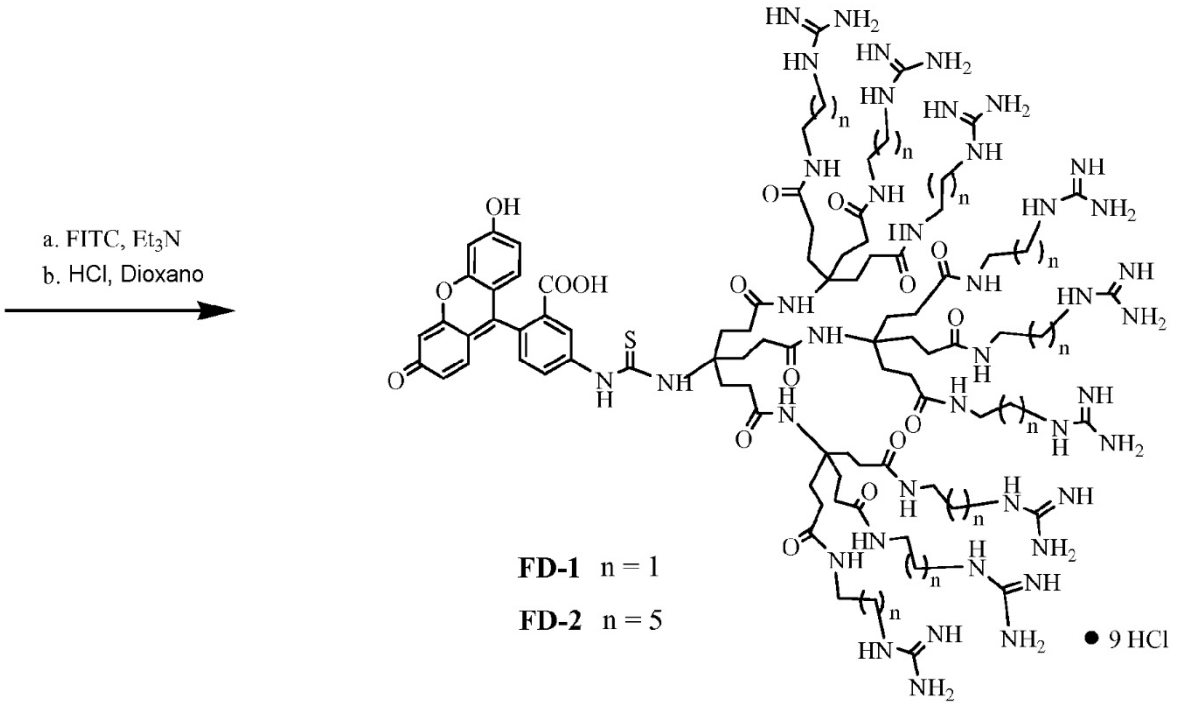


FIGURA 16B

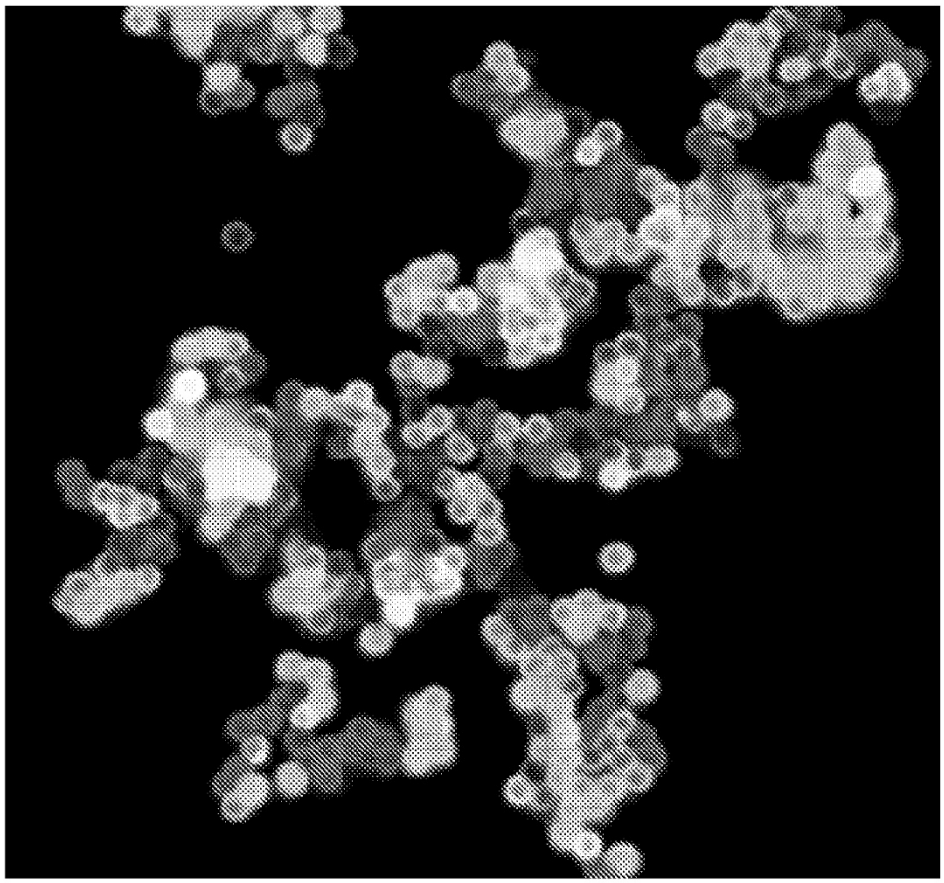


FIGURA 17

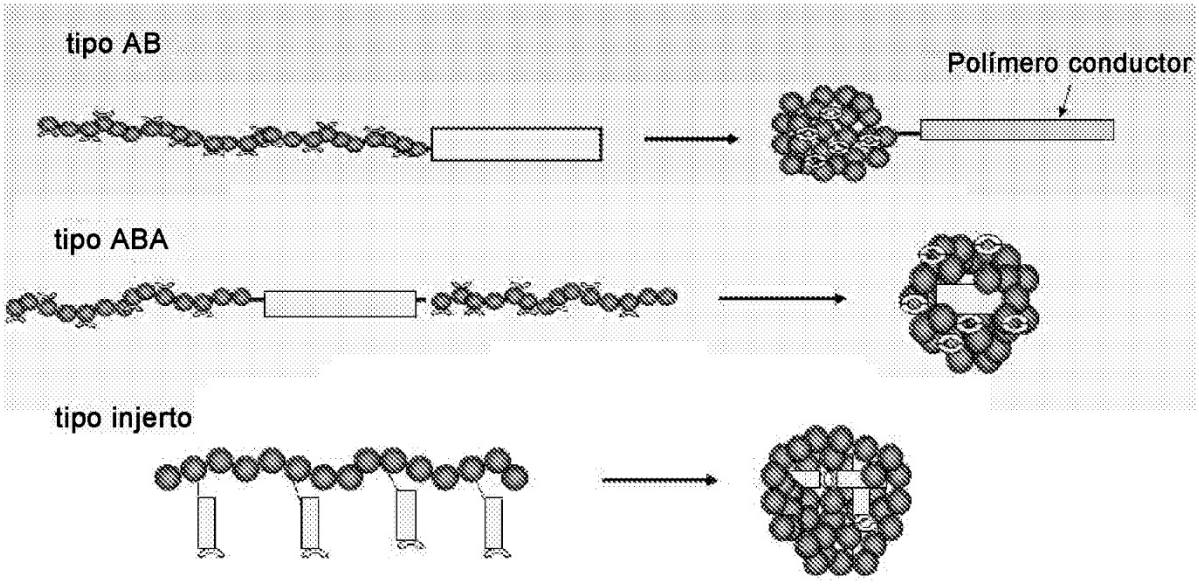


FIGURA 18

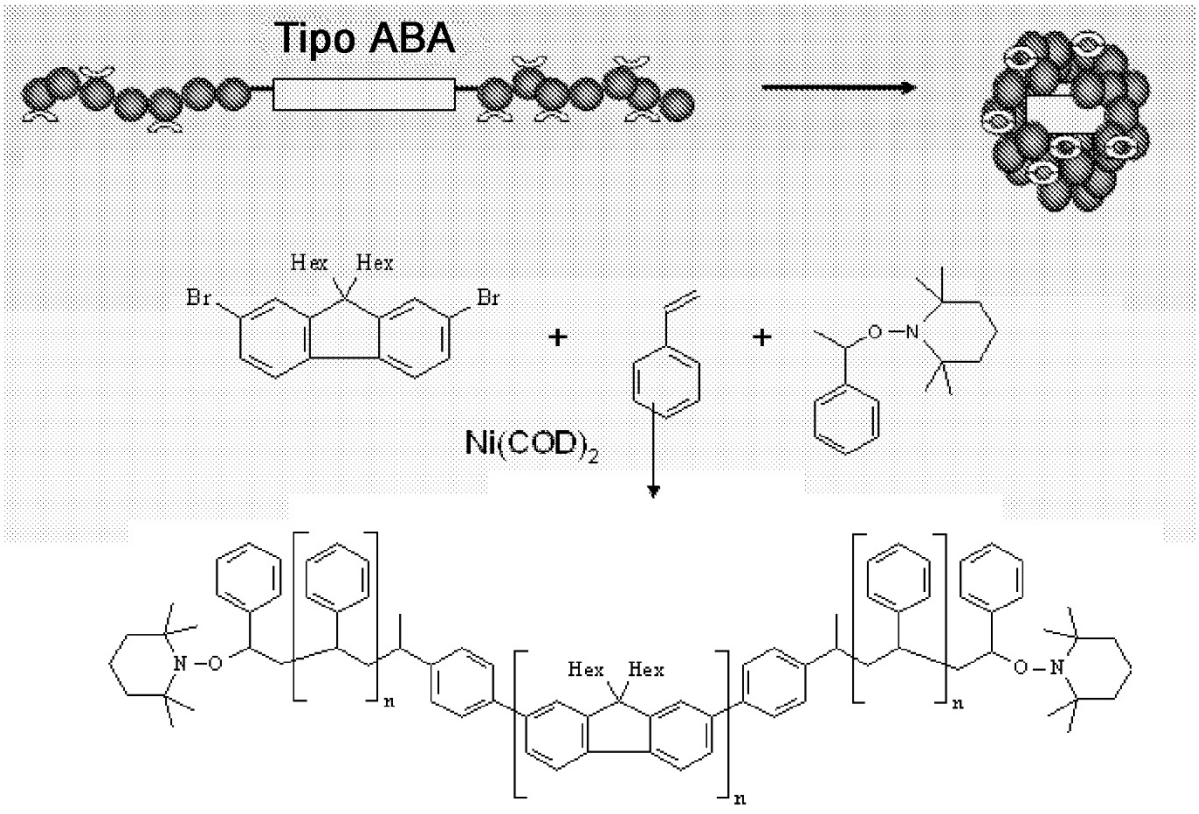


FIGURA 19

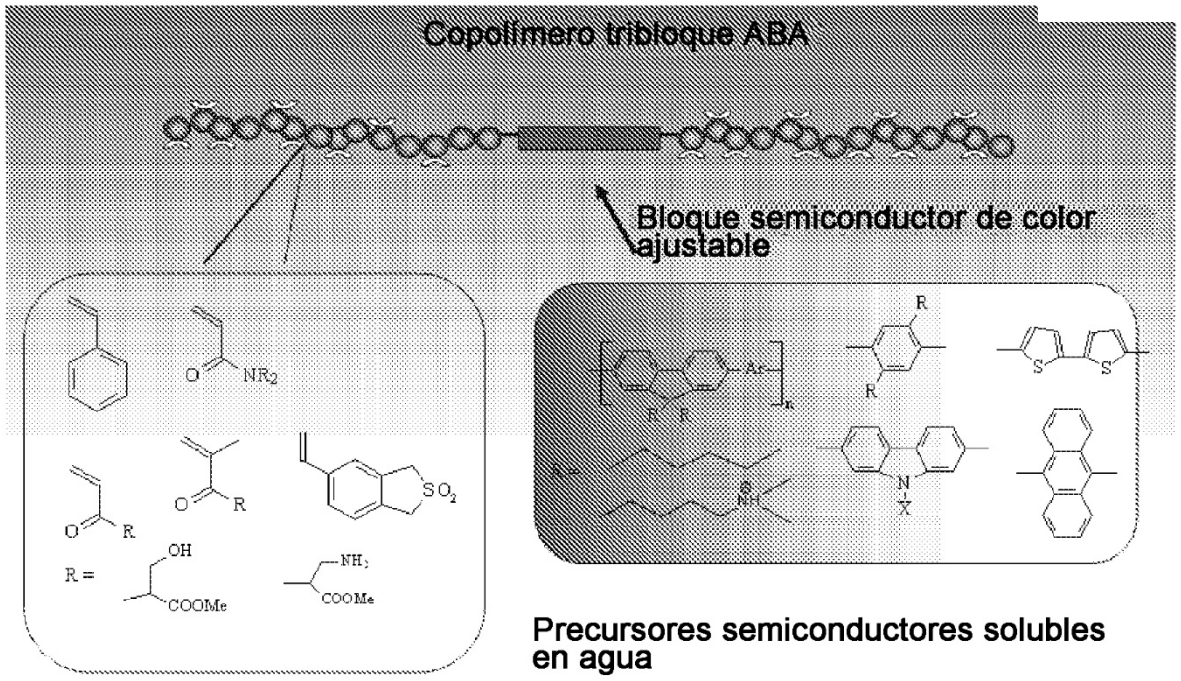


FIGURA 20

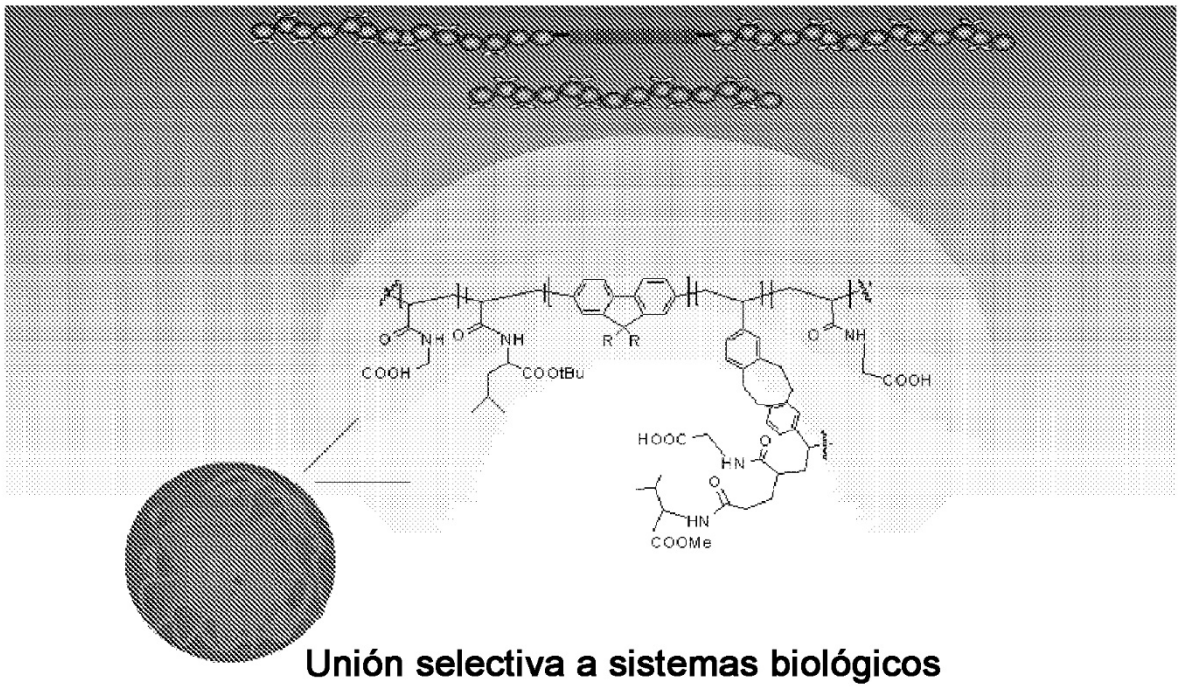


FIGURA 21

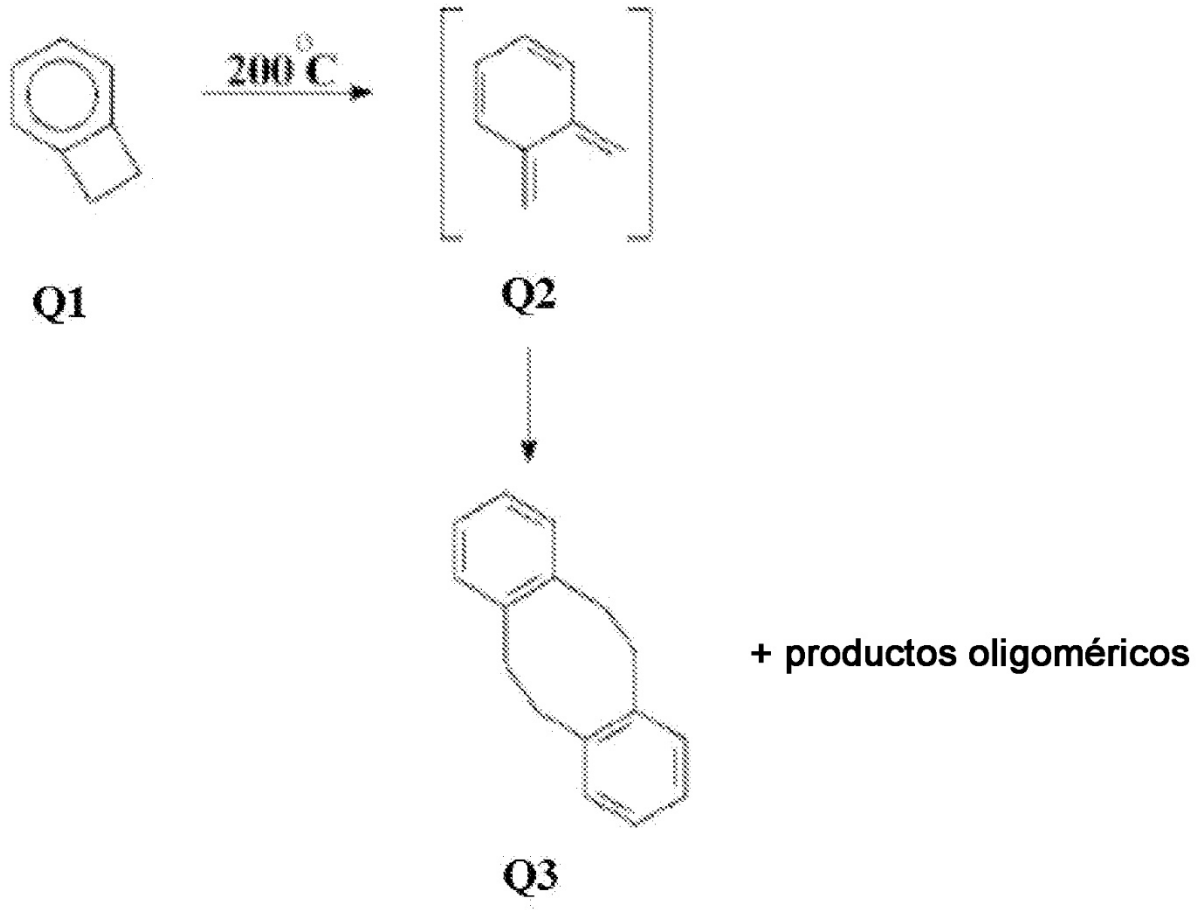


FIGURA 22

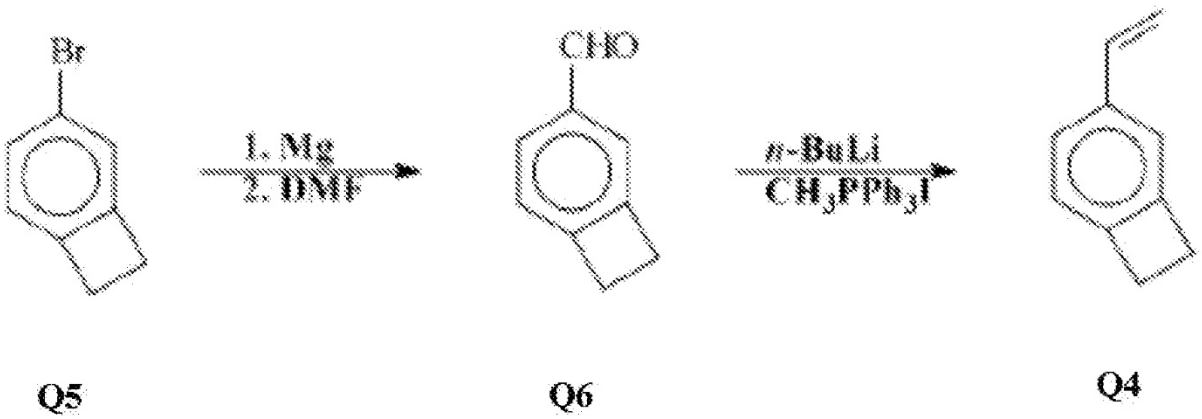


FIGURA 23

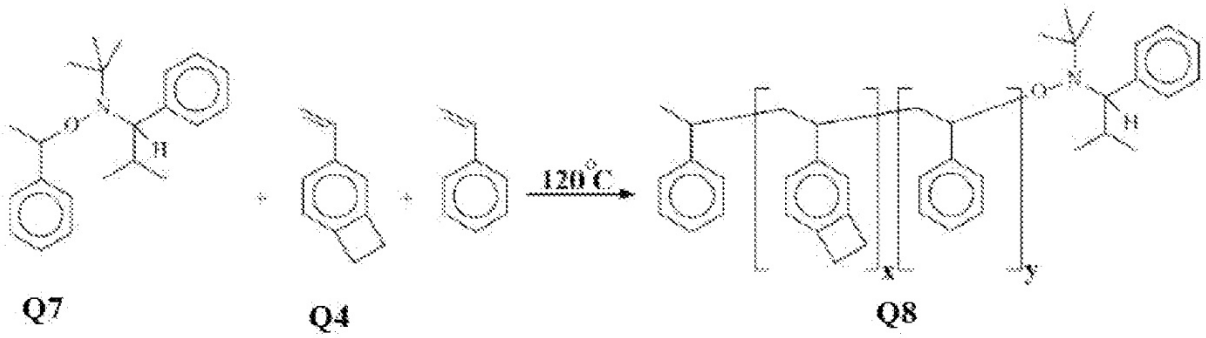


FIGURA 24

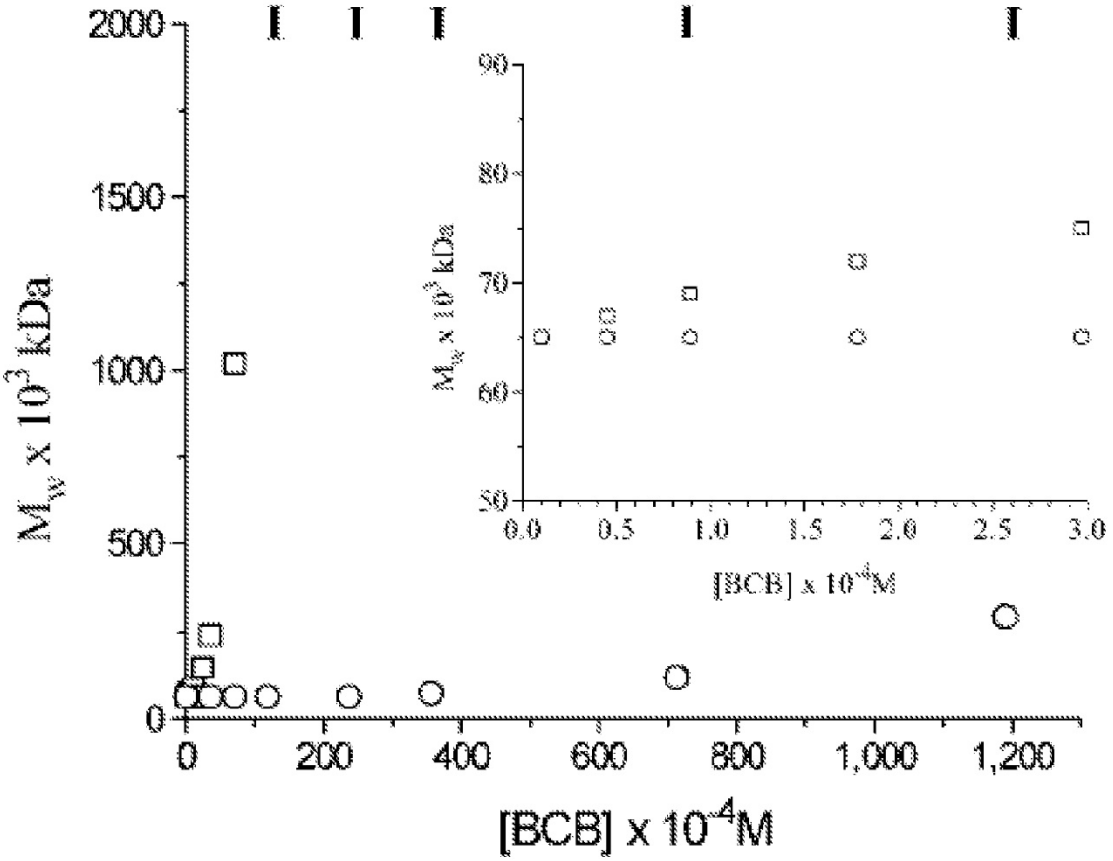


FIGURA 25

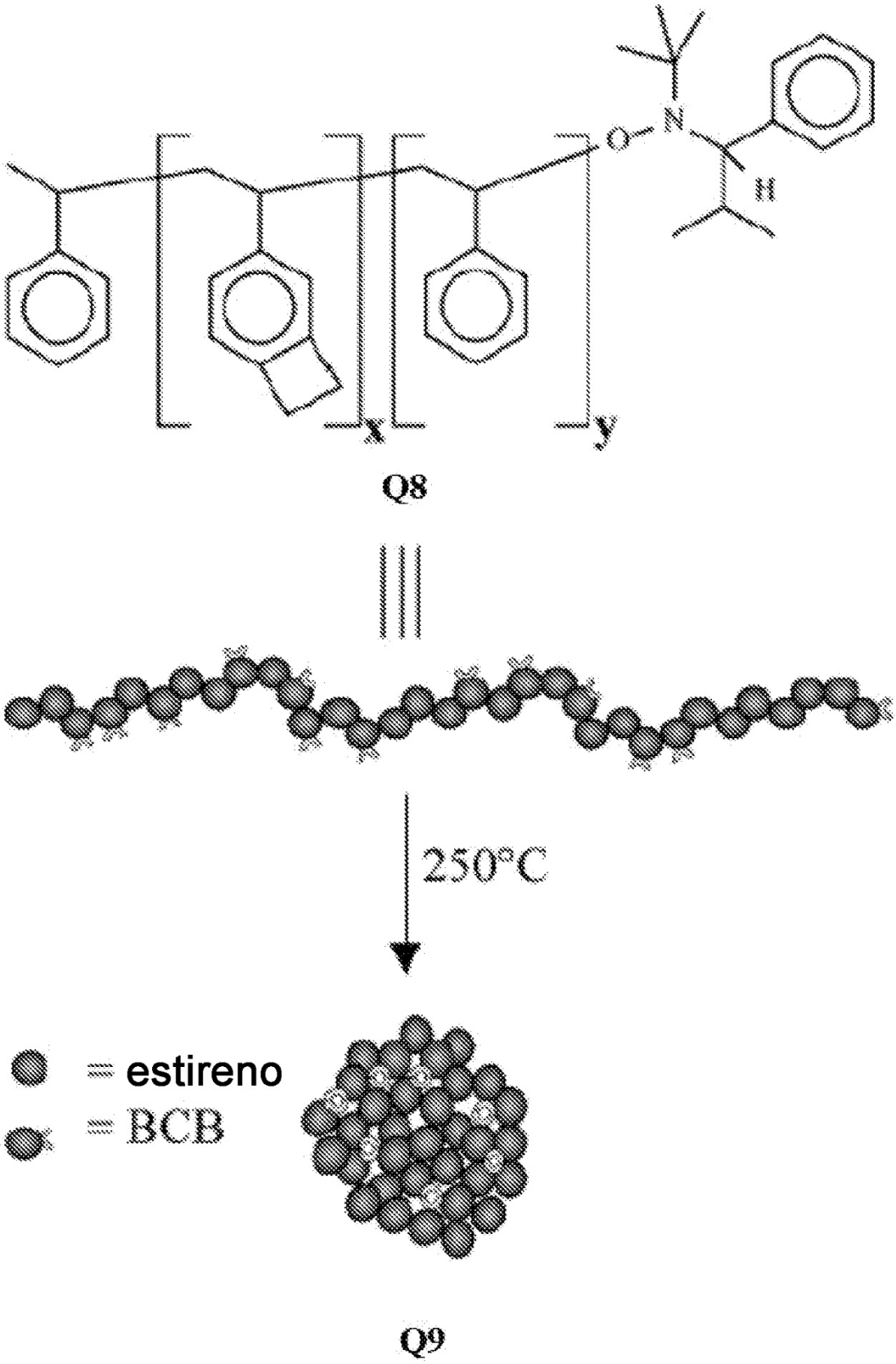


FIGURA 26

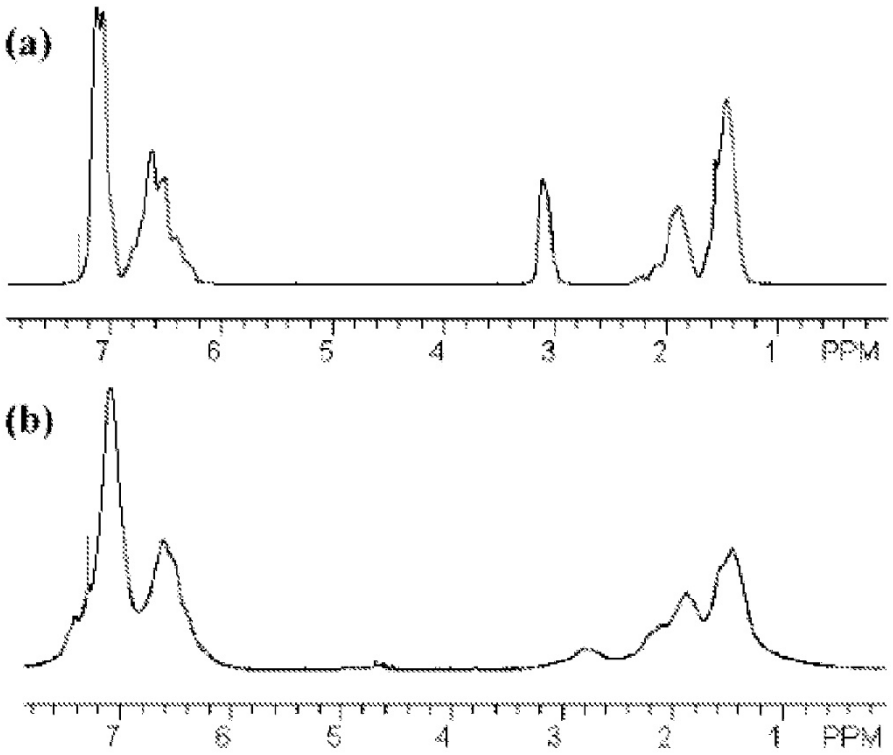


FIGURA 27

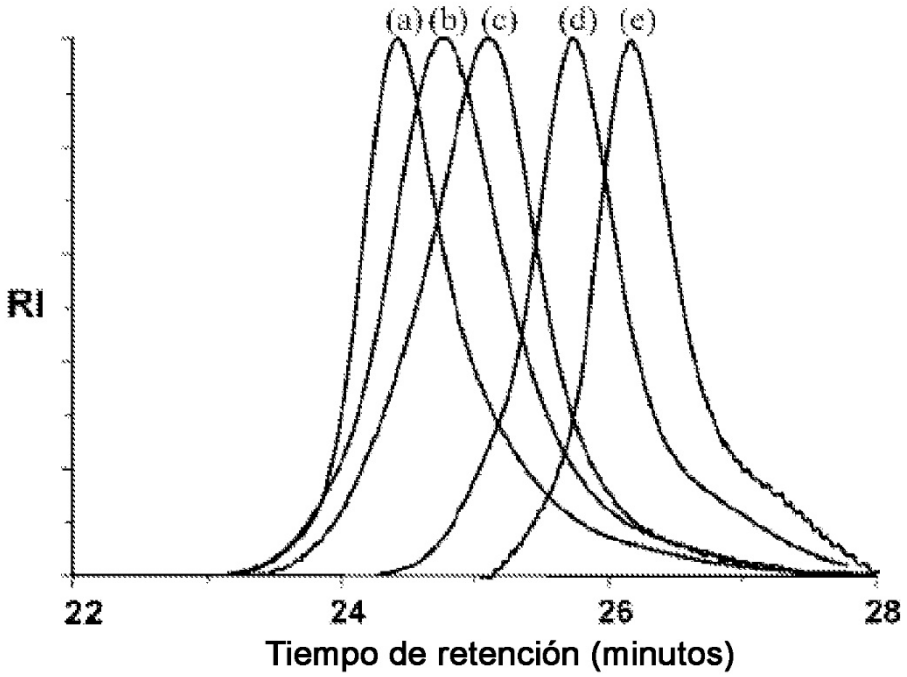


FIGURA 28

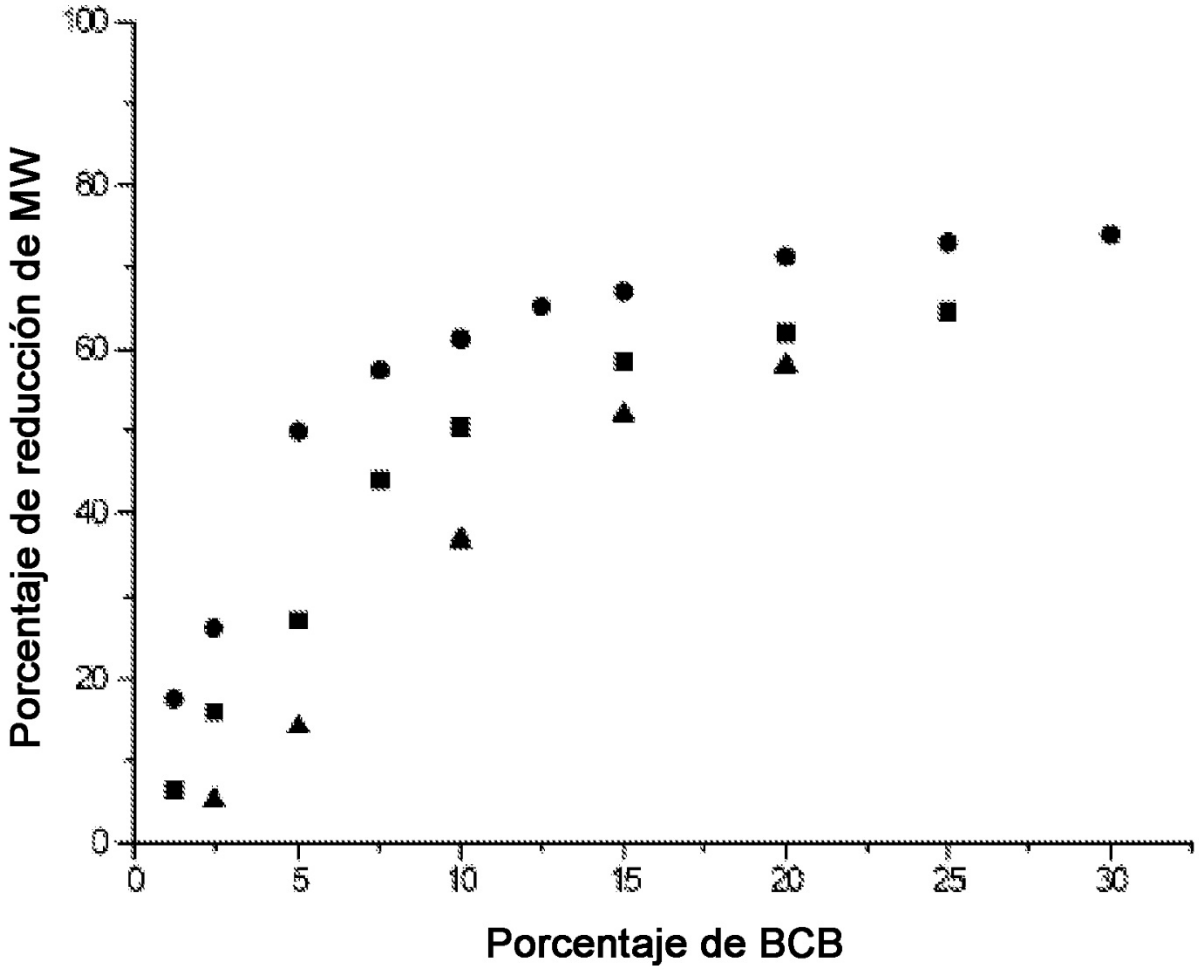

Porcentaje de reducción de MW
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
Porcentaje de BCB

FIGURA 29

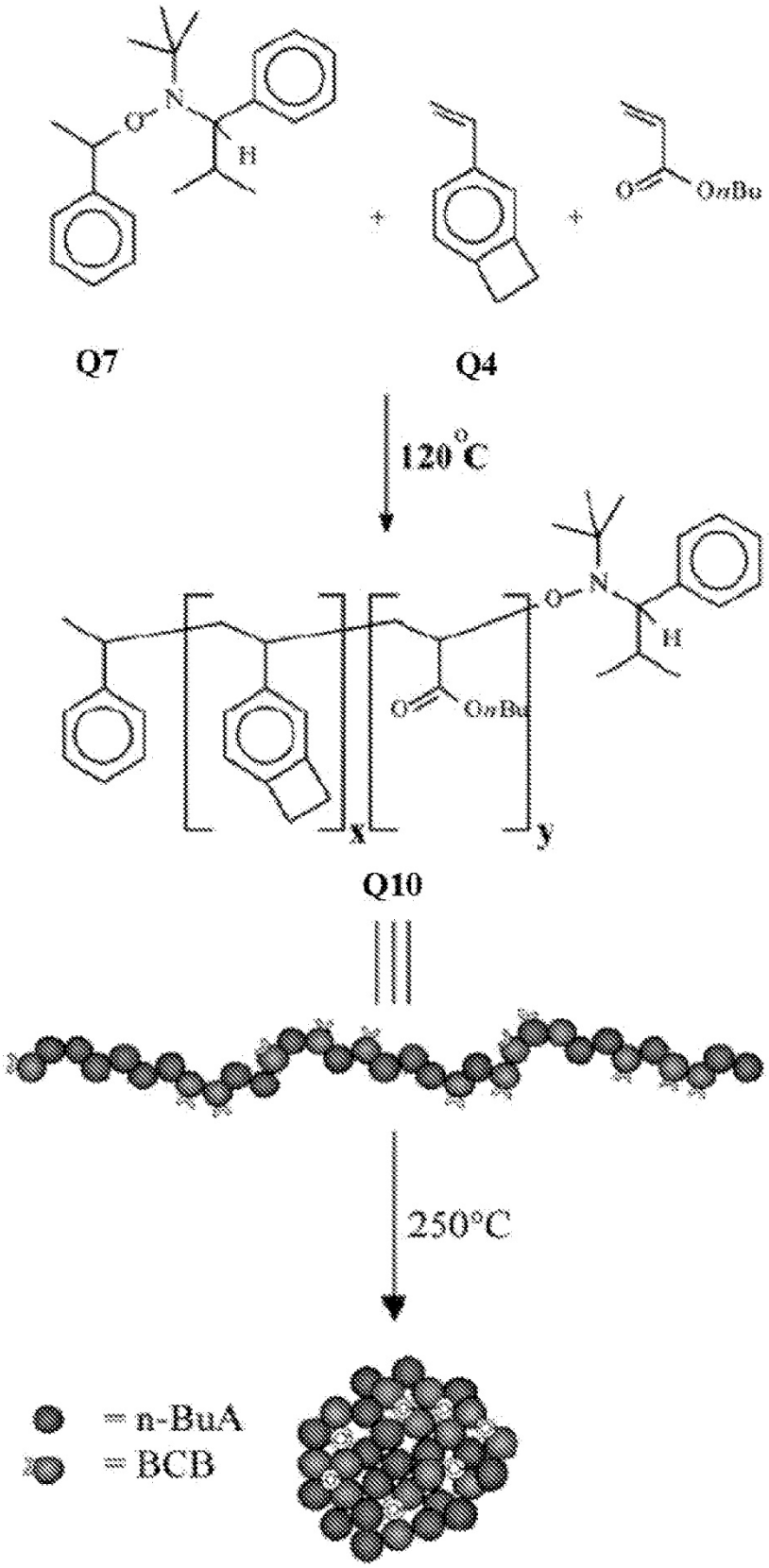


FIGURA 30

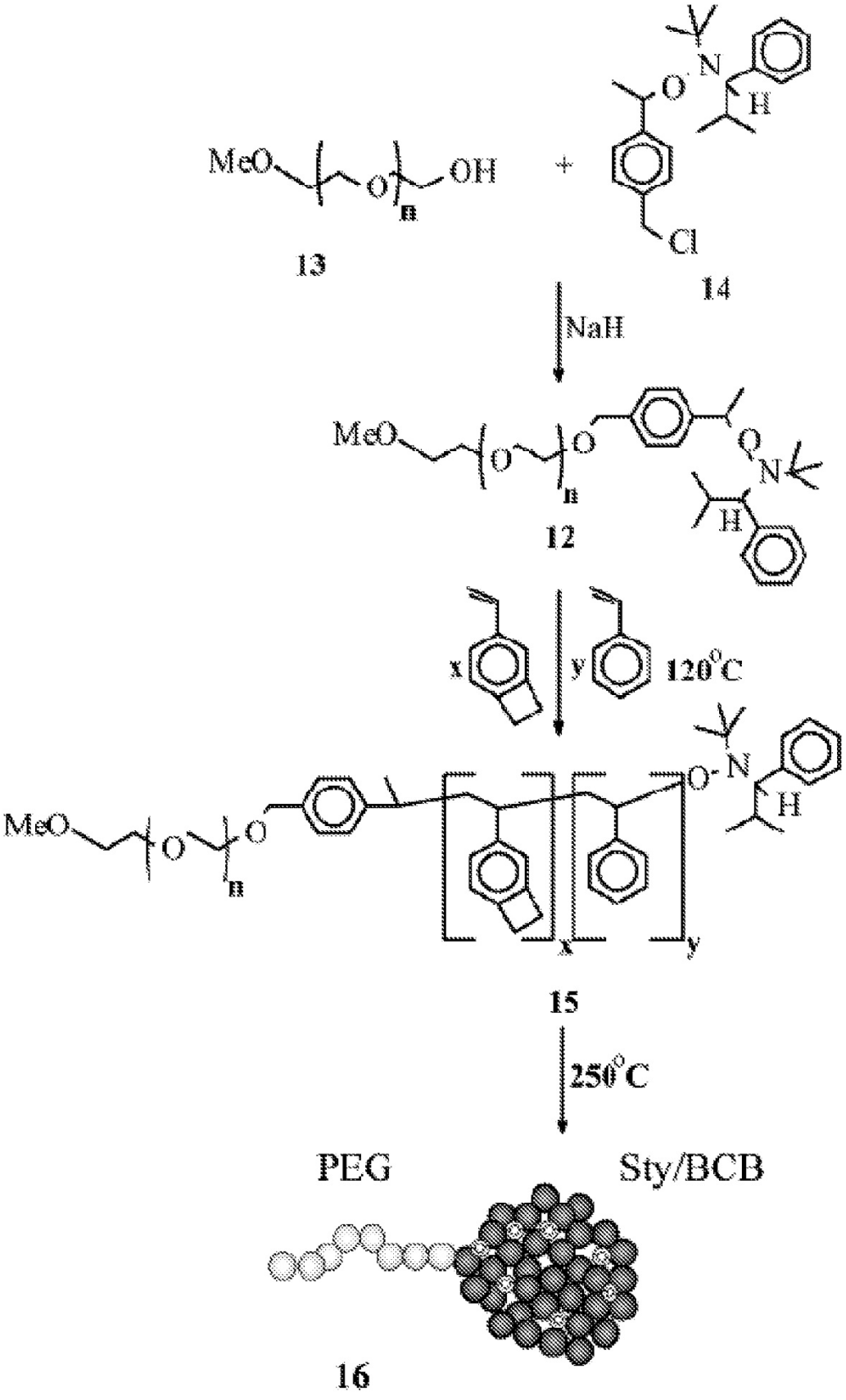


FIGURA 31

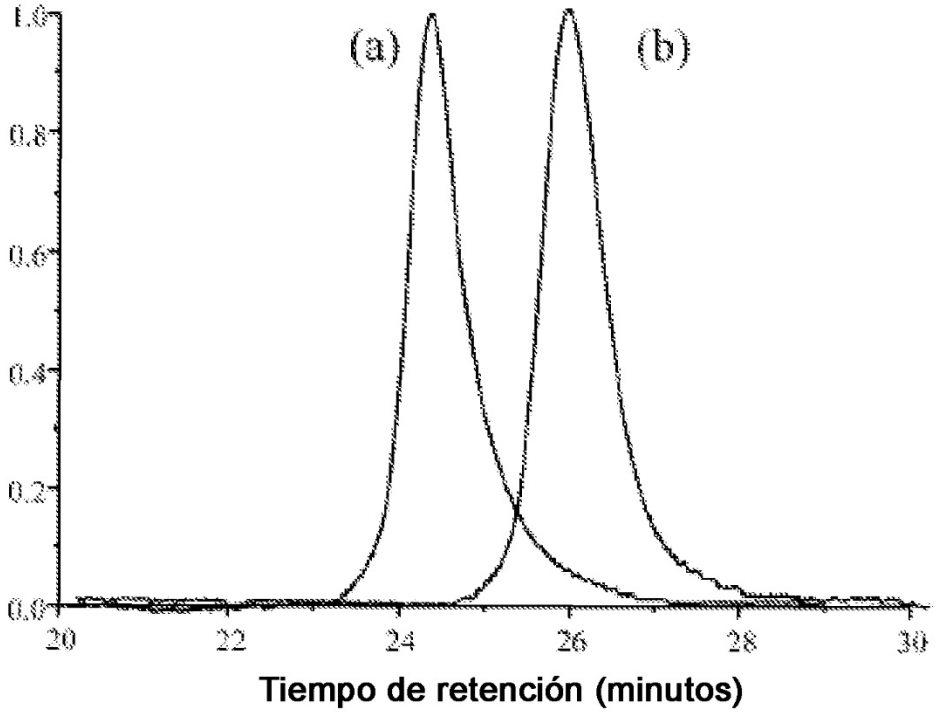


FIGURA 32

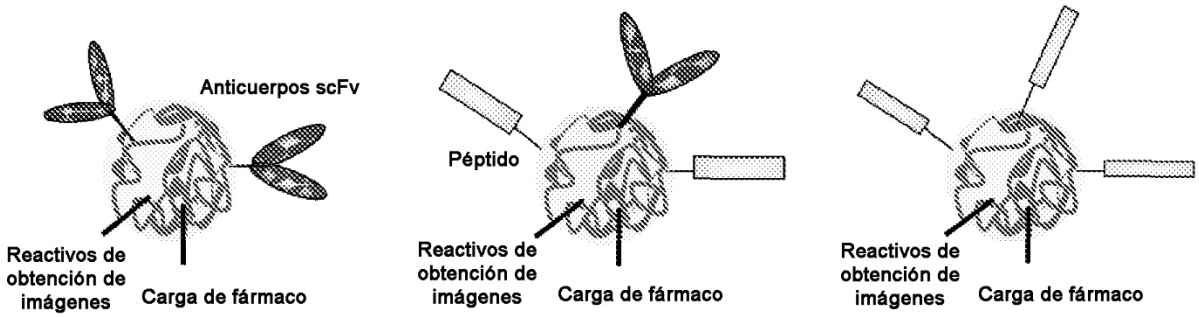


FIGURA 33

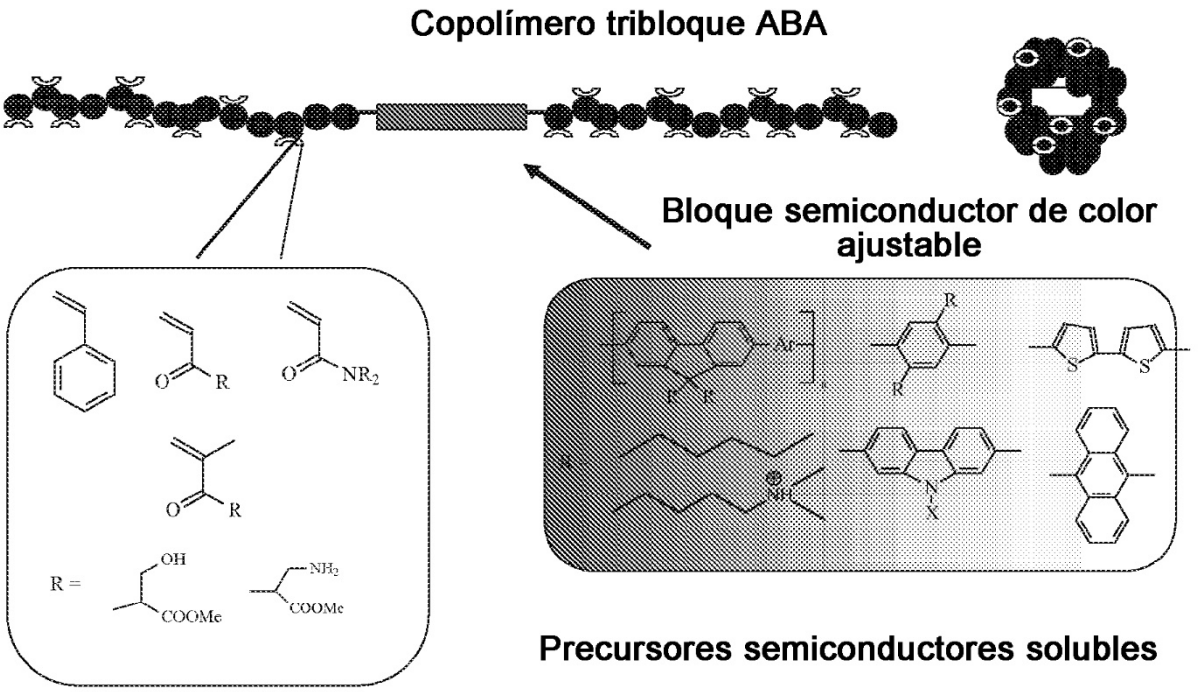


FIGURA 34

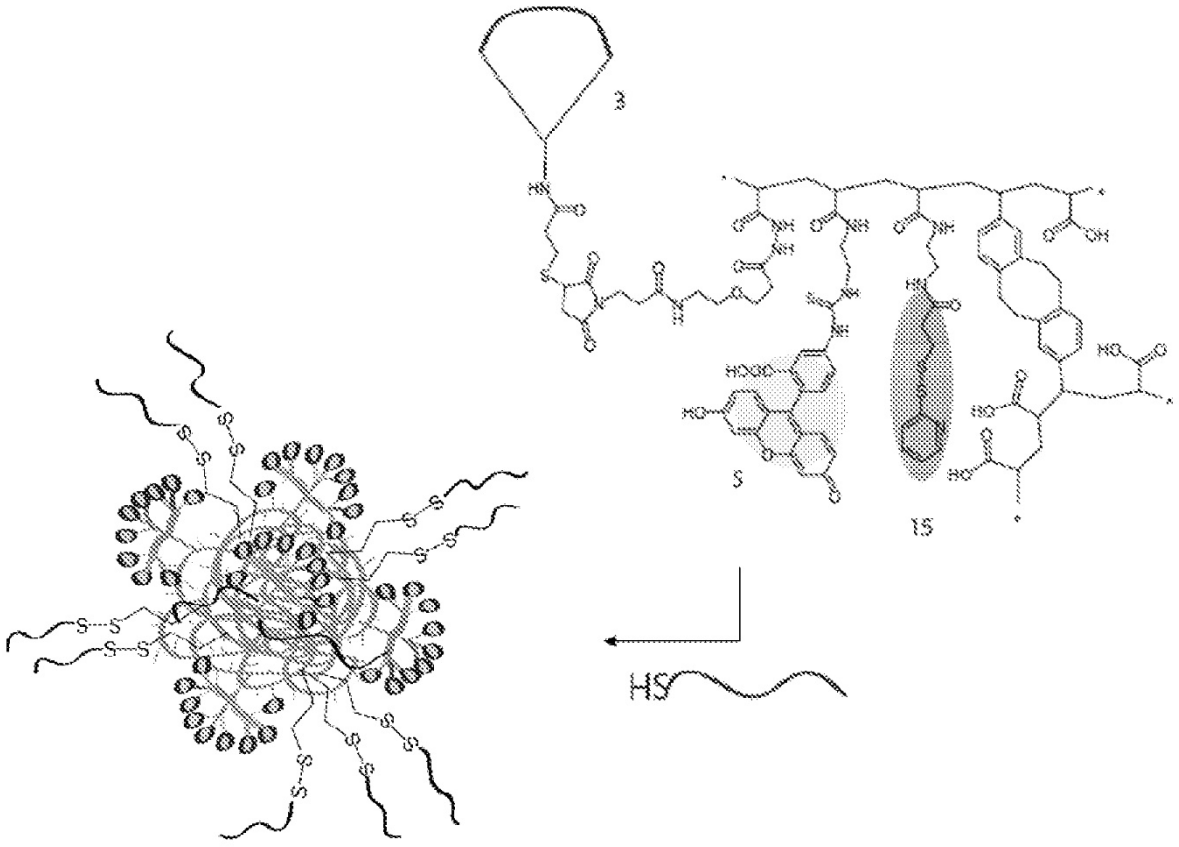


FIGURA 35

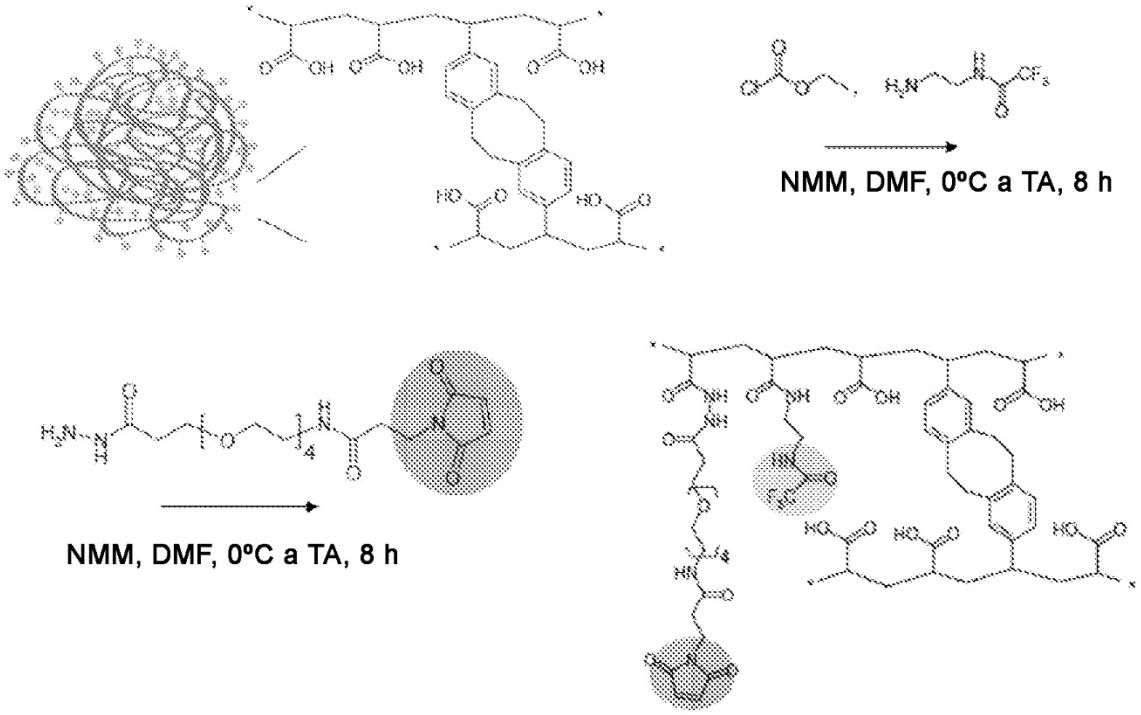


FIGURA 36

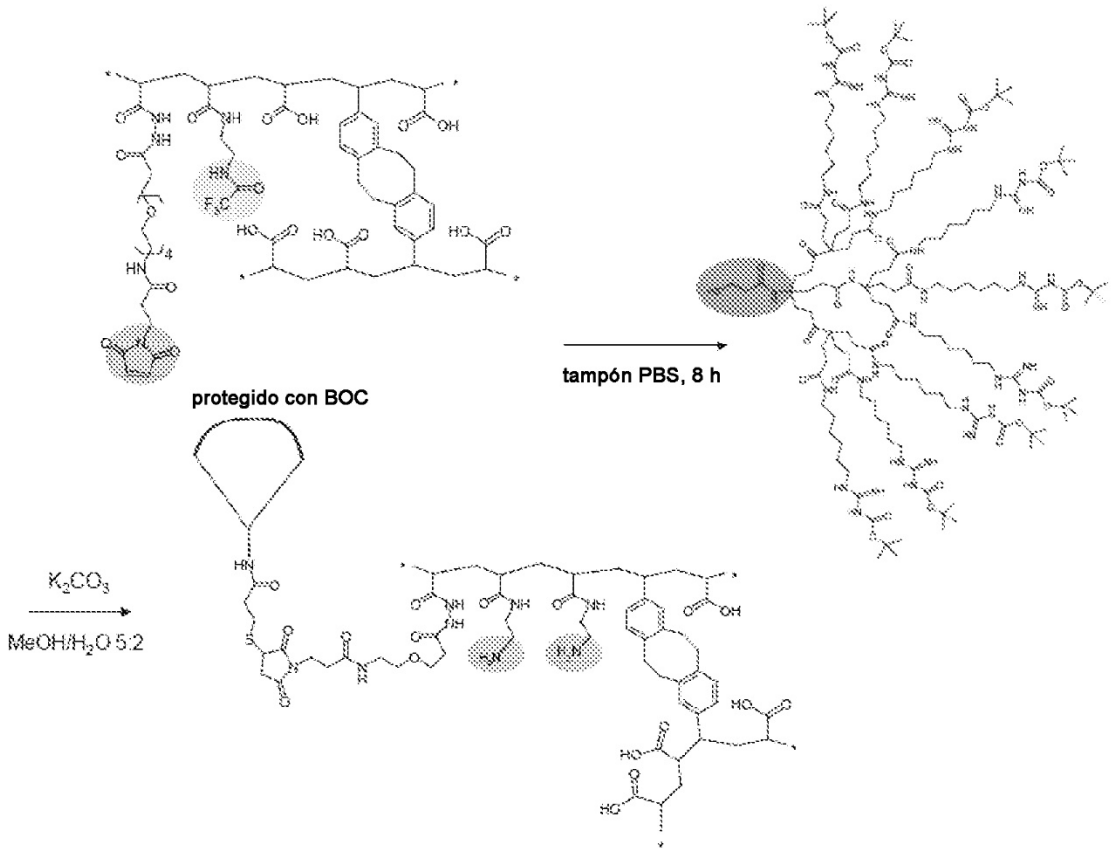


FIGURA 37

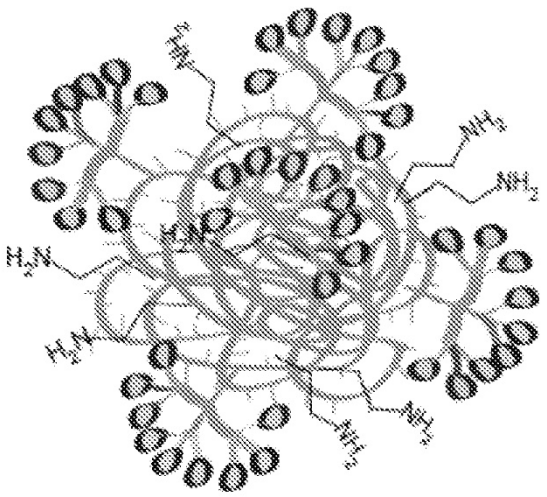


FIGURA 38

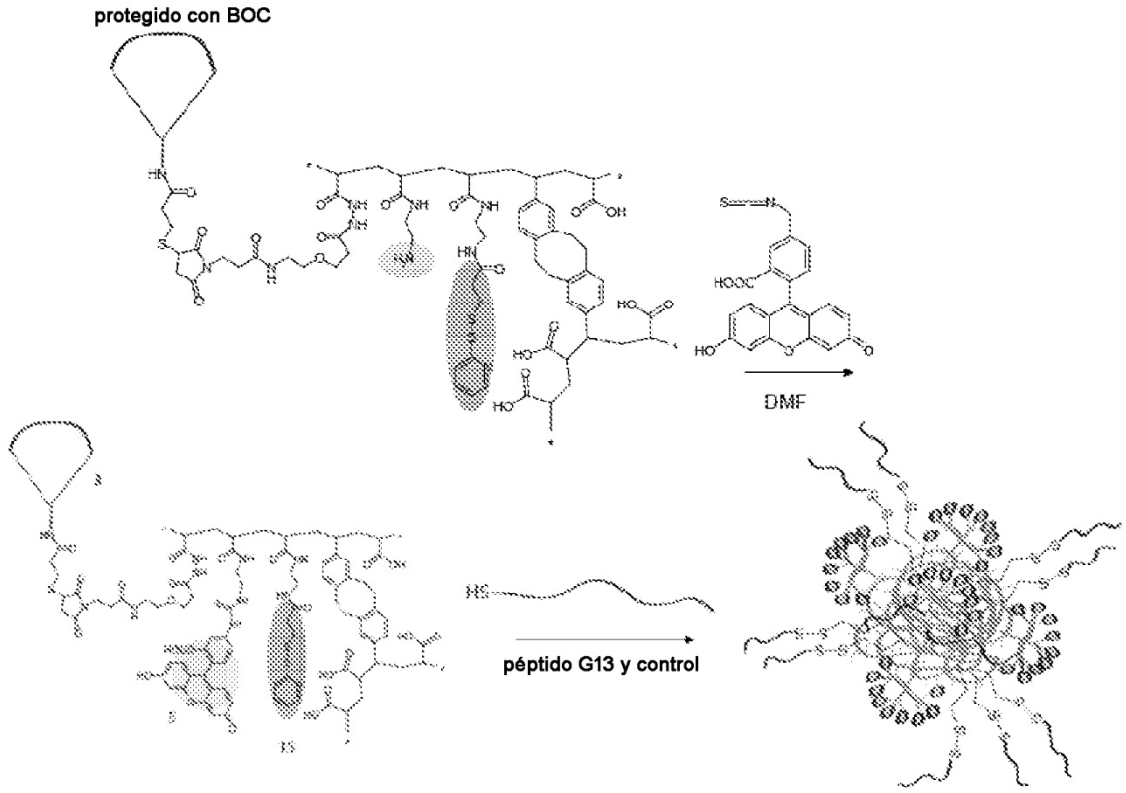


FIGURA 39

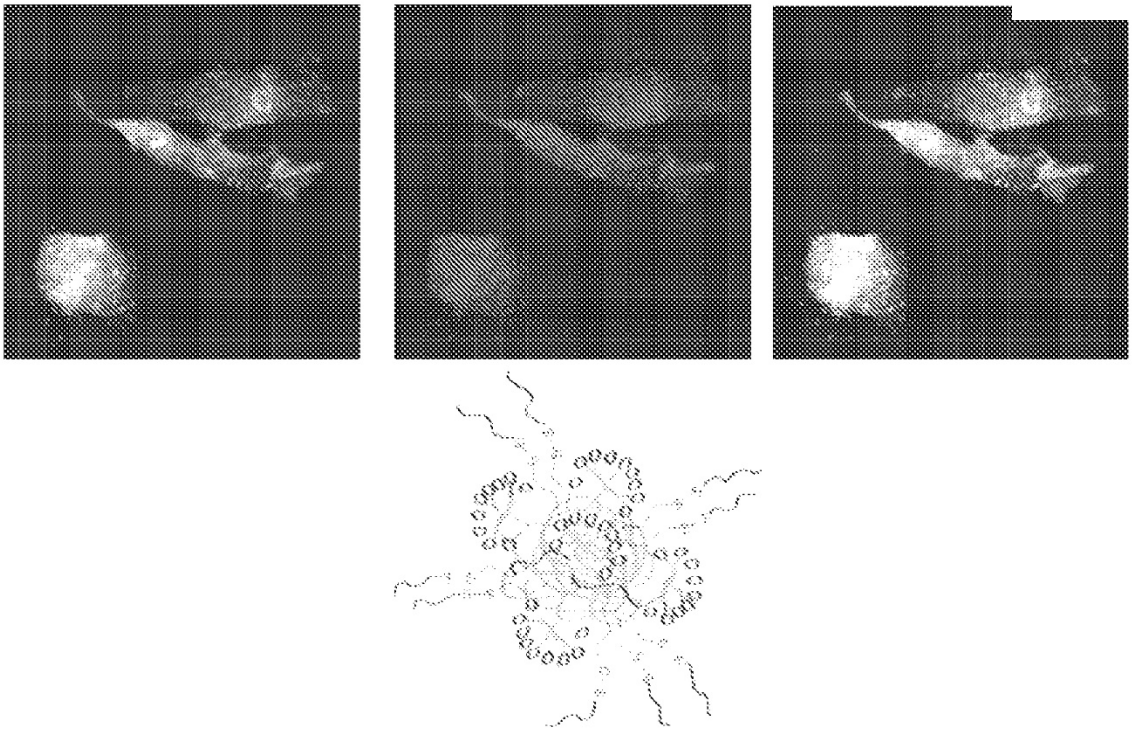
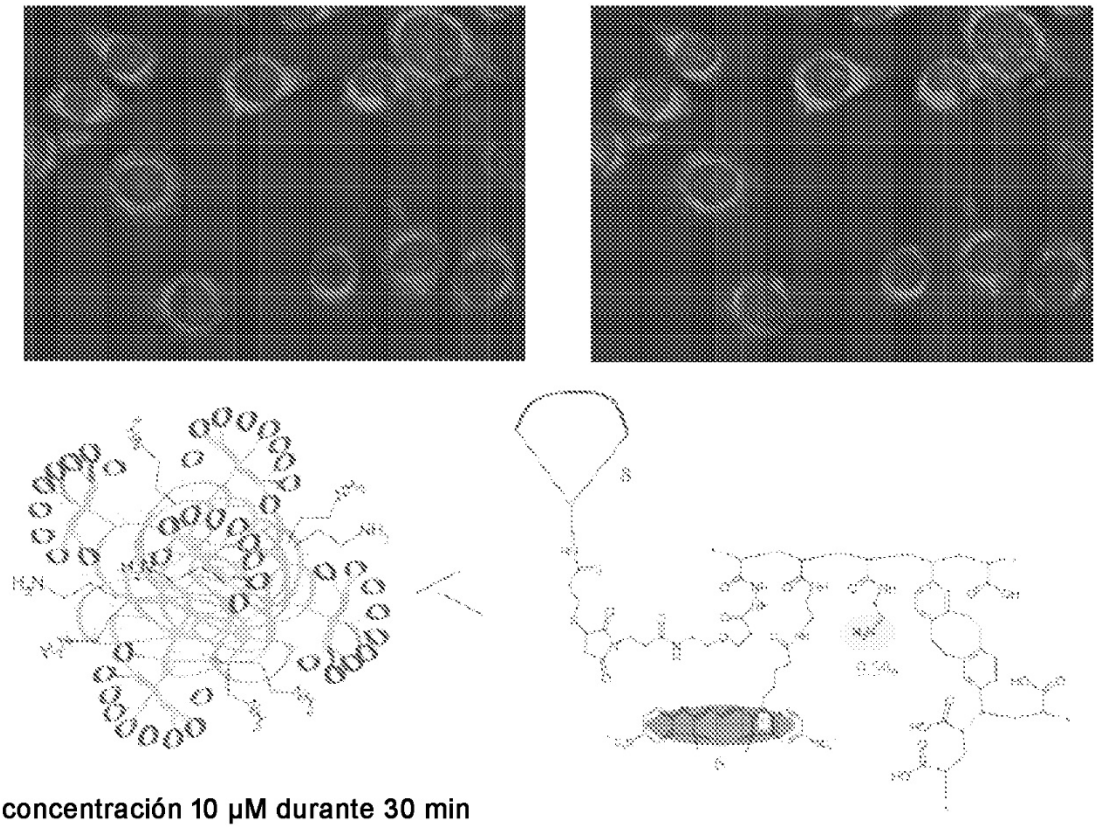
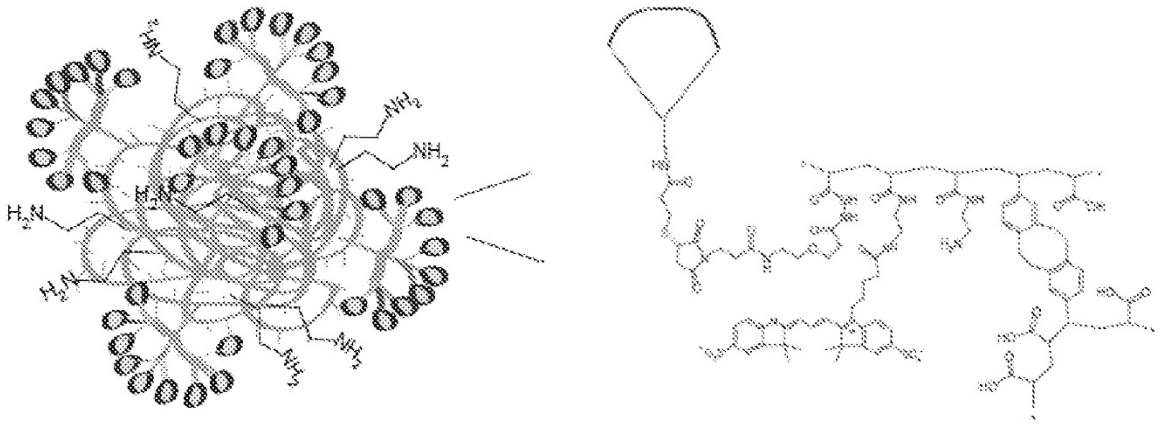


FIGURA 40



concentración 10 µM durante 30 min

FIGURA 41



	% NH_2	% Conector Maleimida	Transportador molecular FD-2	Pigmento Cy3
NP 1	26.9	0	———	———
NP 2	30.1	0	———	———
NP 3	9.7	0	———	———
NP 4	3.3	12	10	3
NP 5	18.7	19.5	8	9
NP 6	9.5	9.7	8	6

FIGURA 42

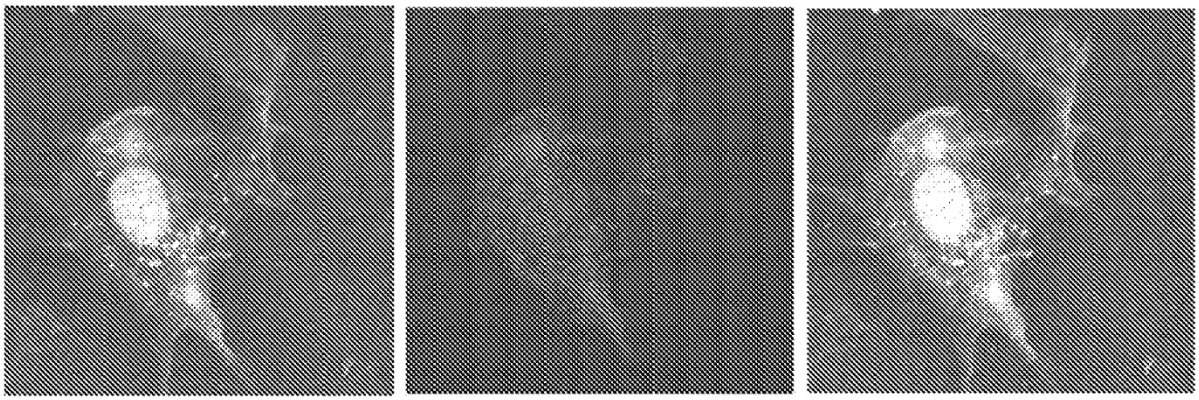


FIGURA 43

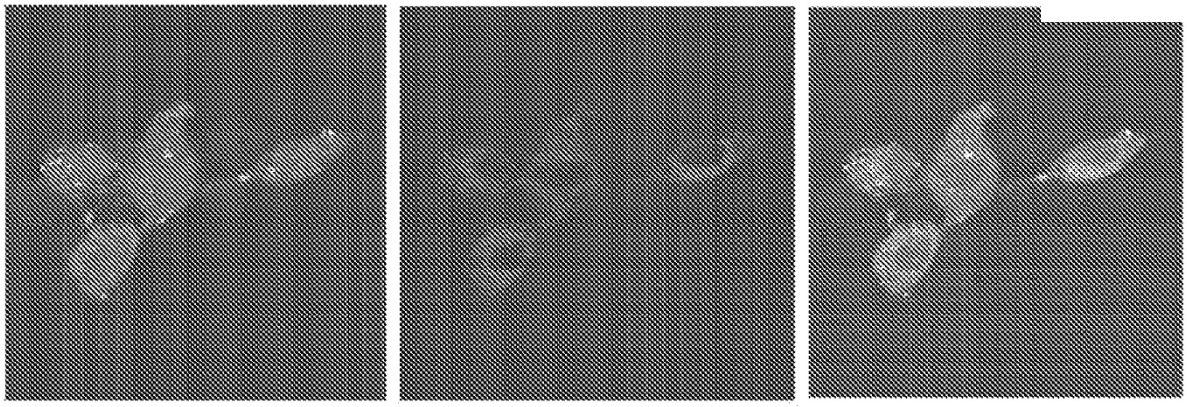
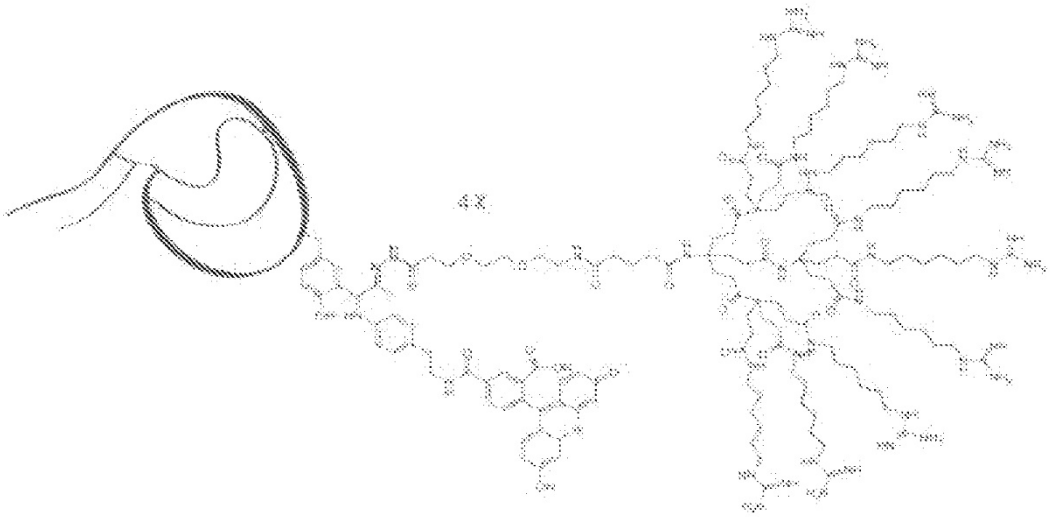


FIGURA 44



Conjugado de aprotinina-Fluoróforo-Transportador

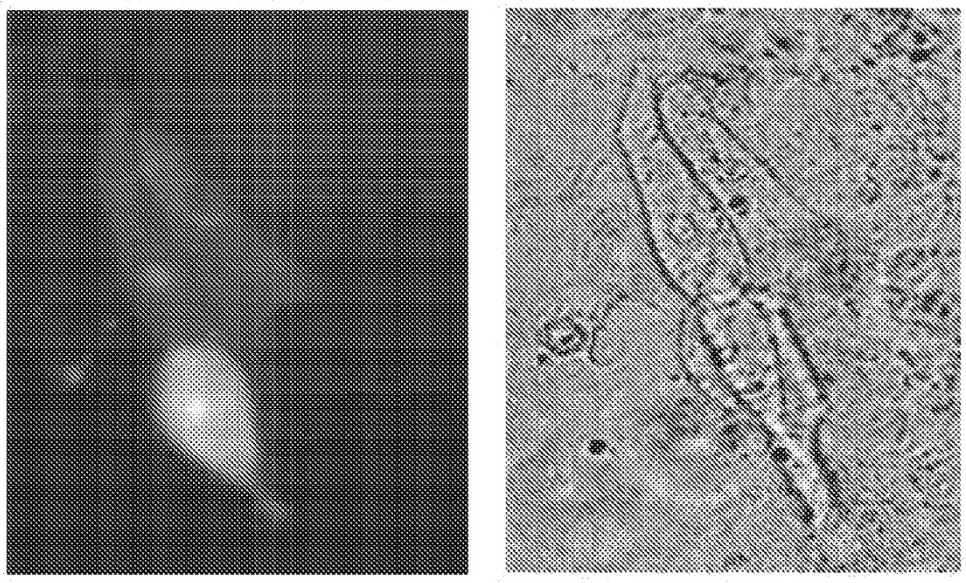


FIGURA 45

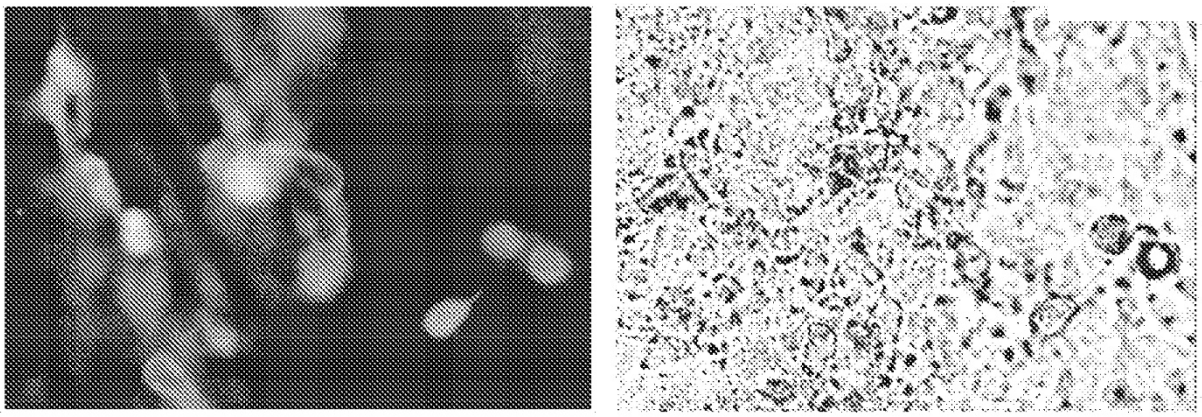


FIGURA 46

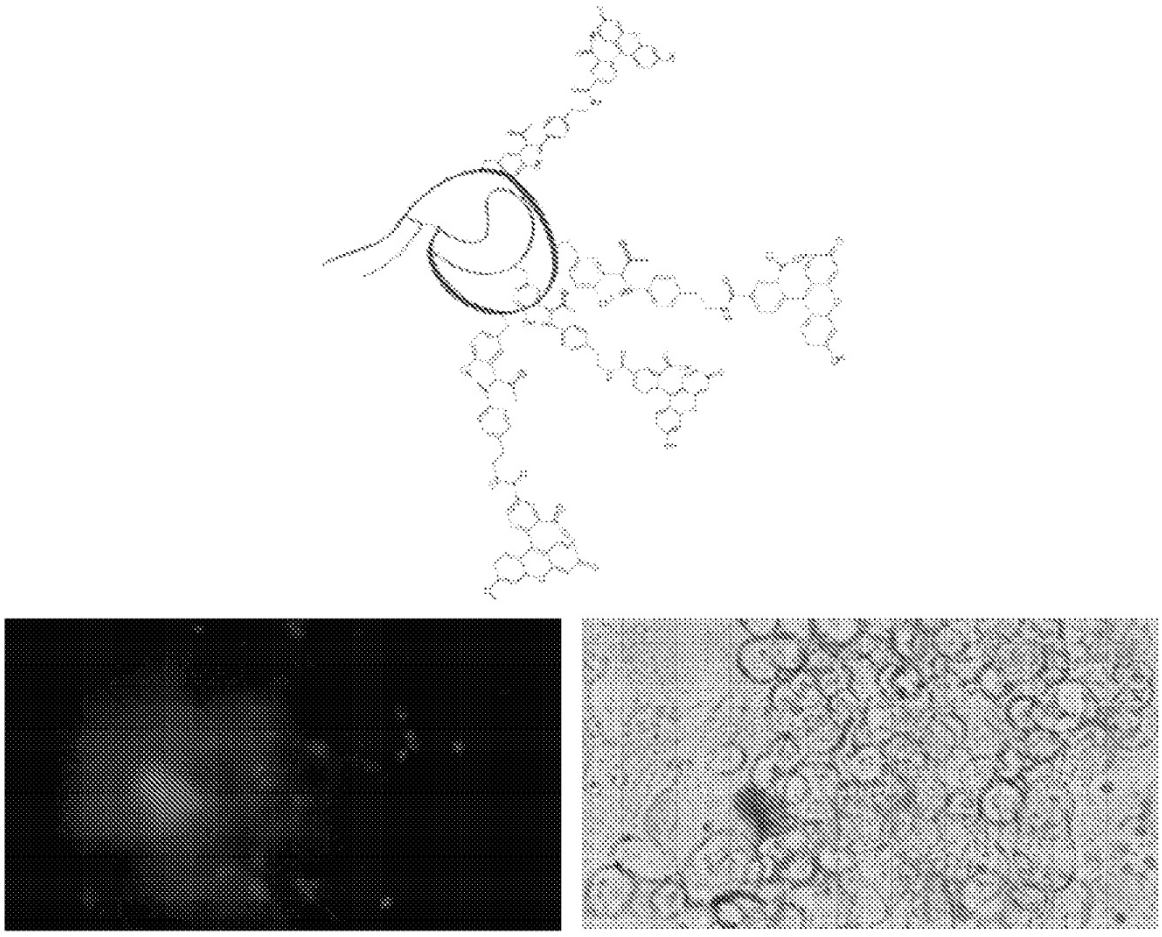


FIGURA 47

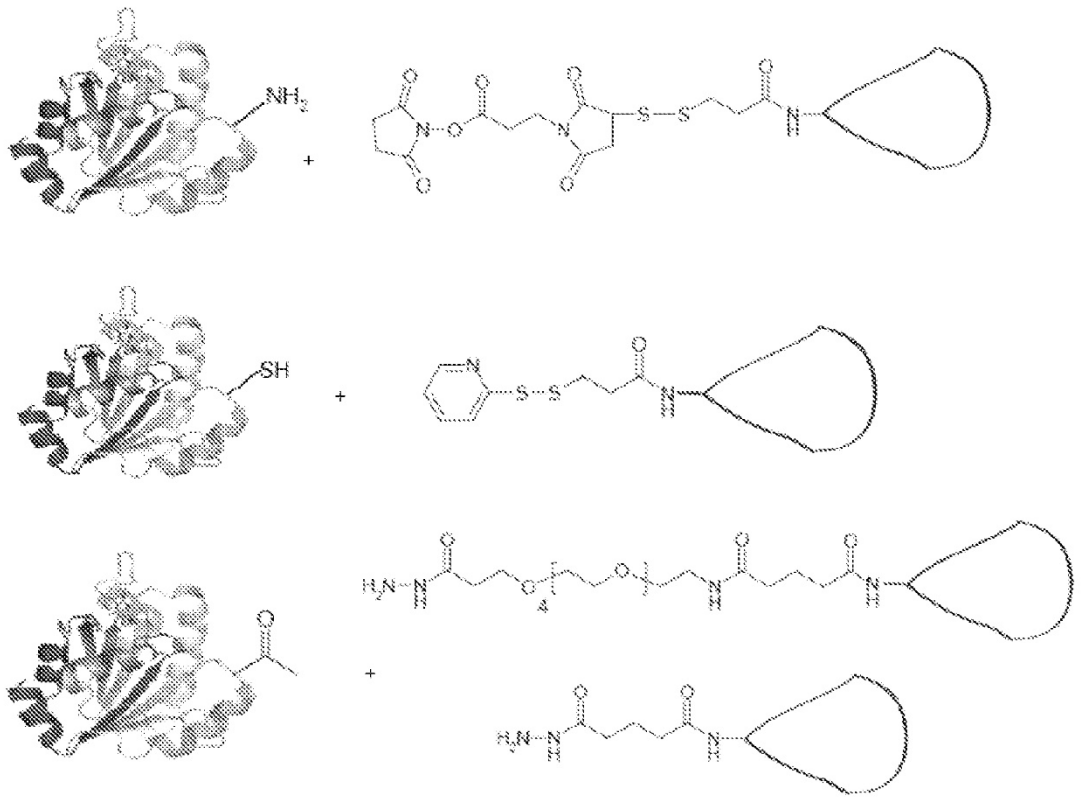


FIGURA 48

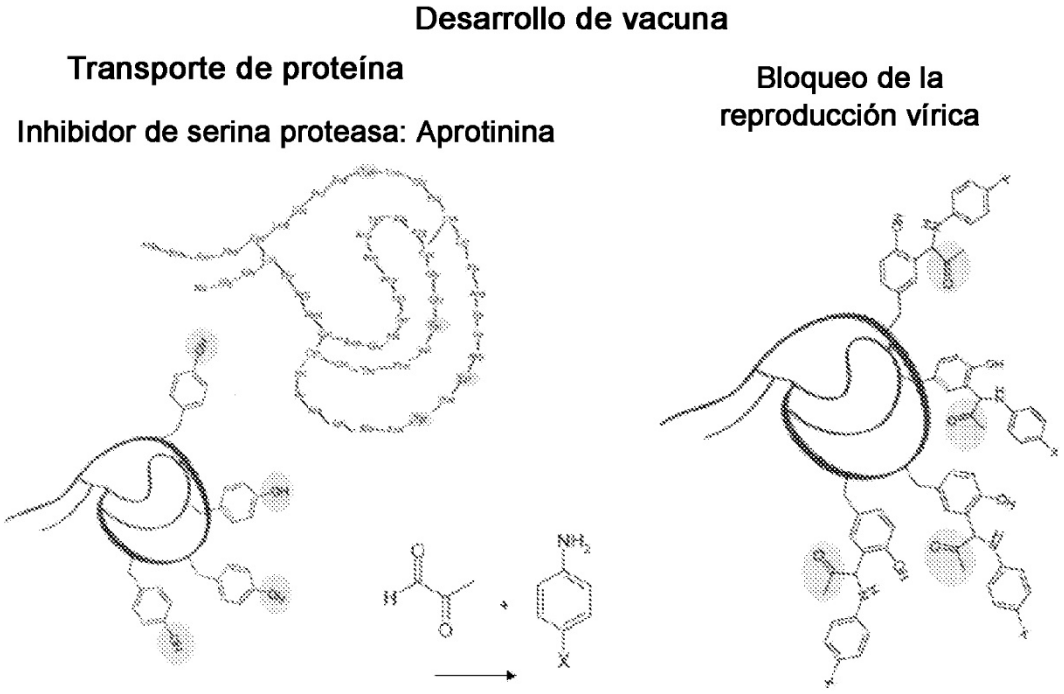


FIGURA 49

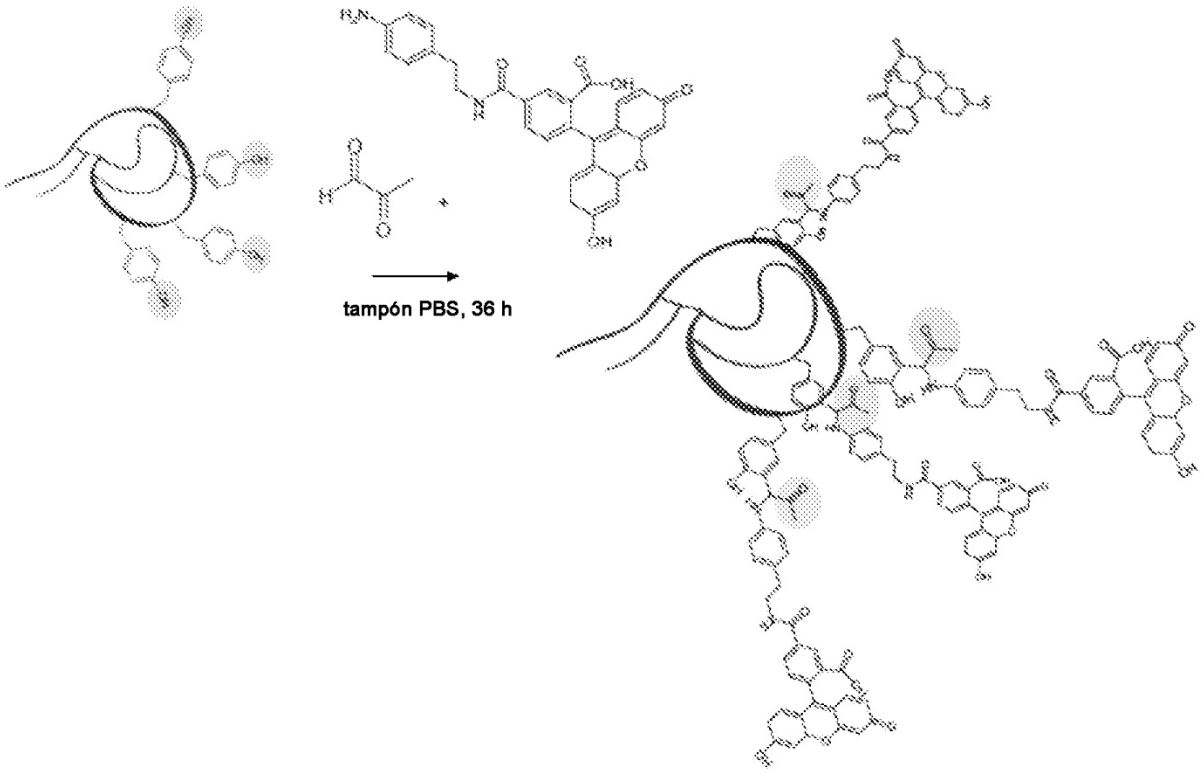


FIGURA 50

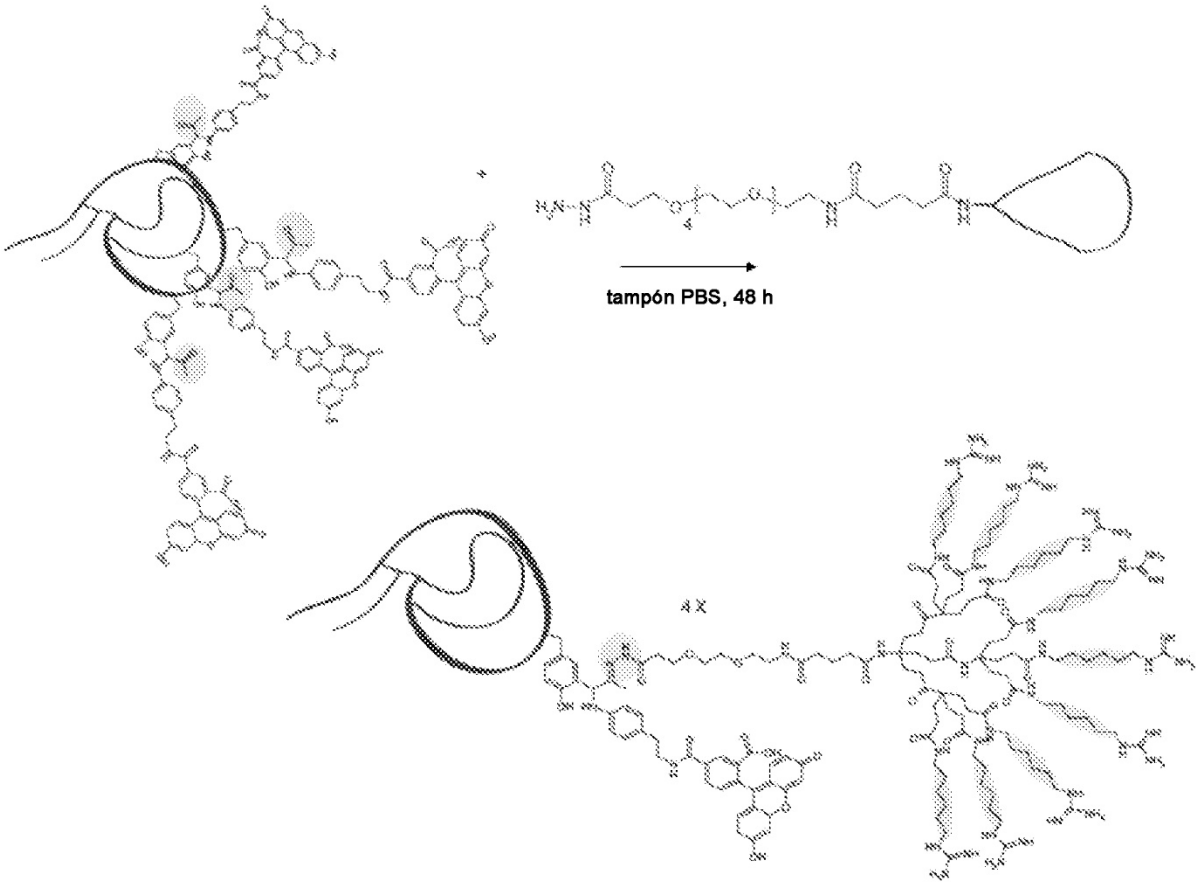


FIGURA 51

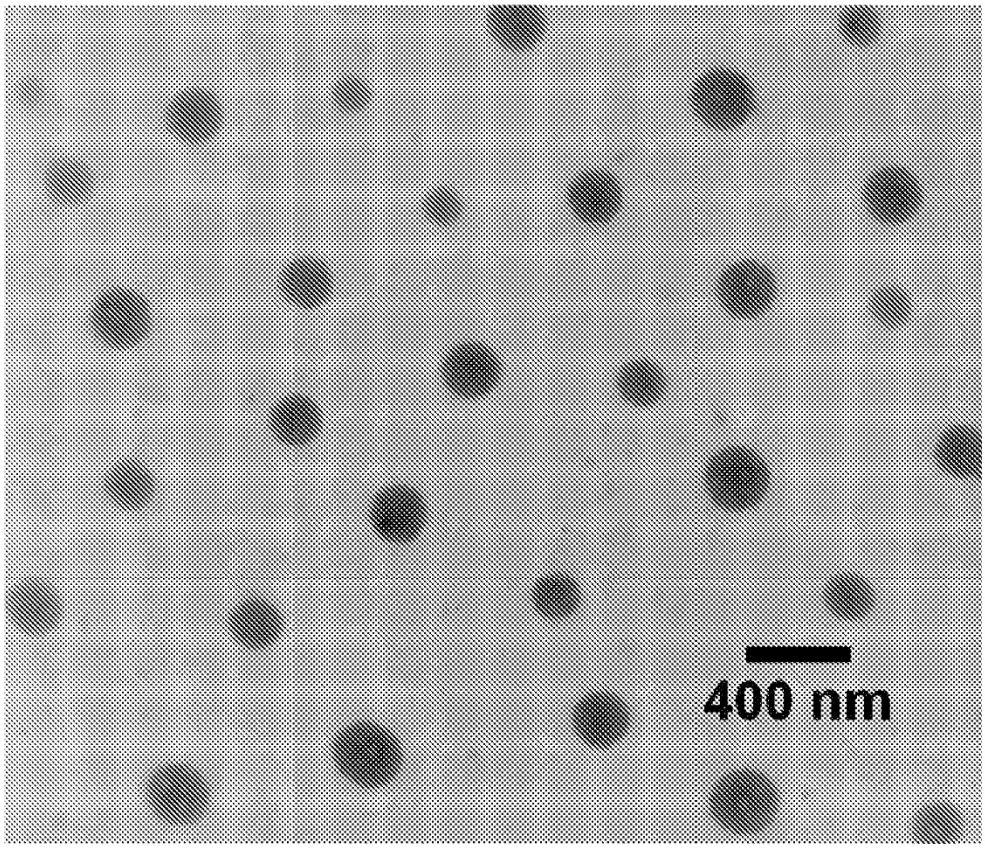


FIGURA 52

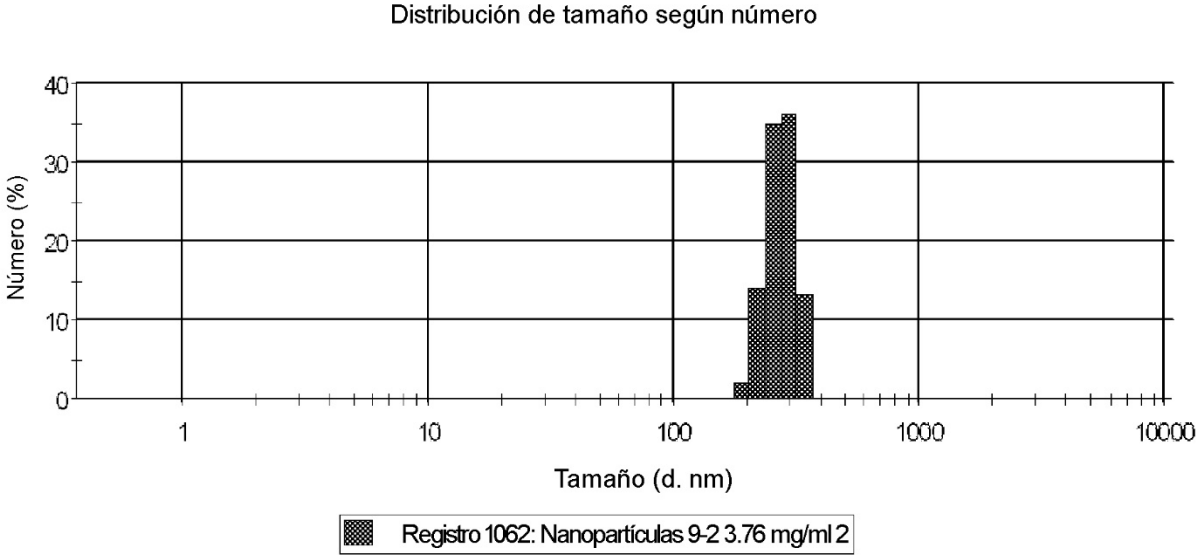


FIGURA 53

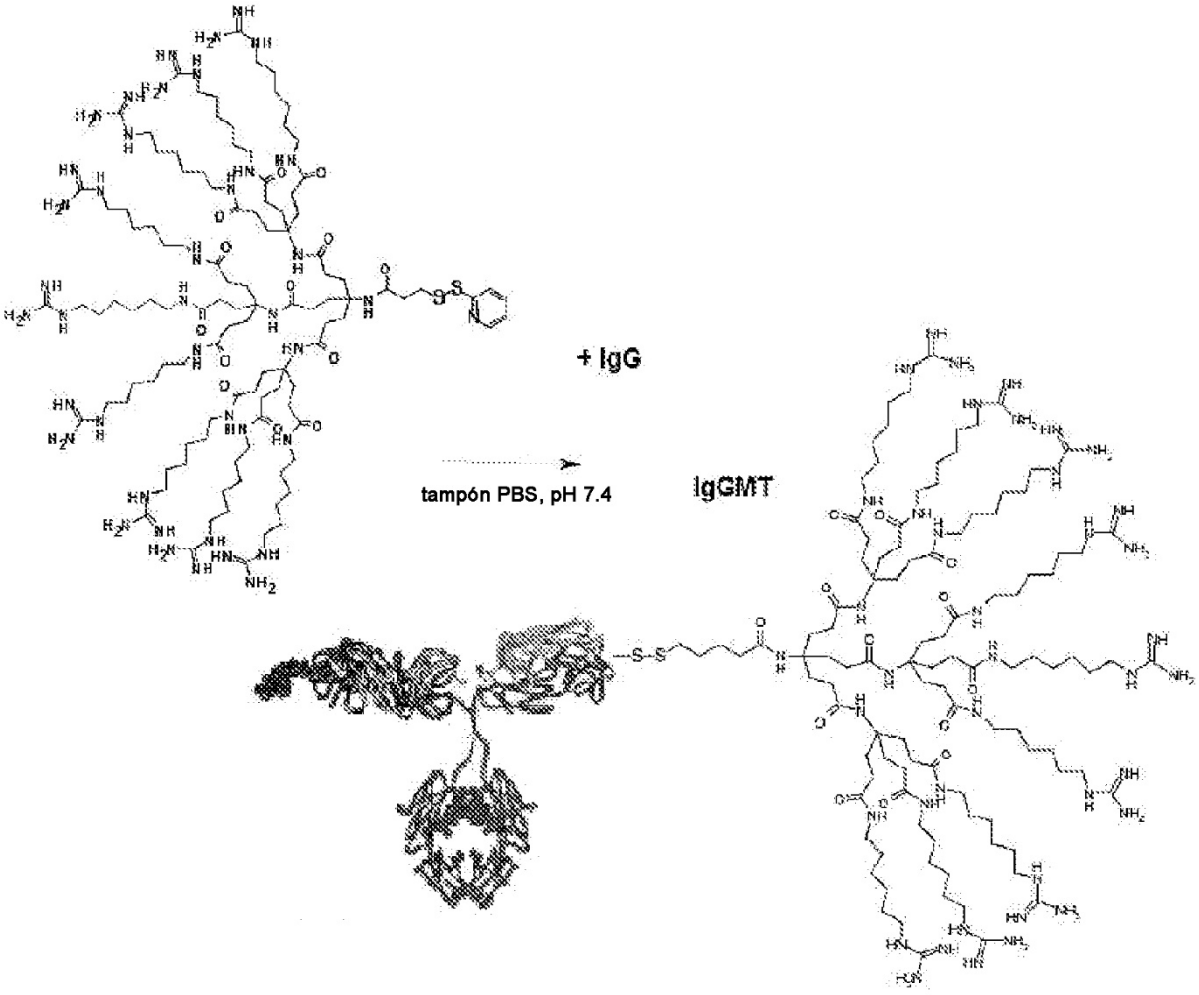


FIGURA 54

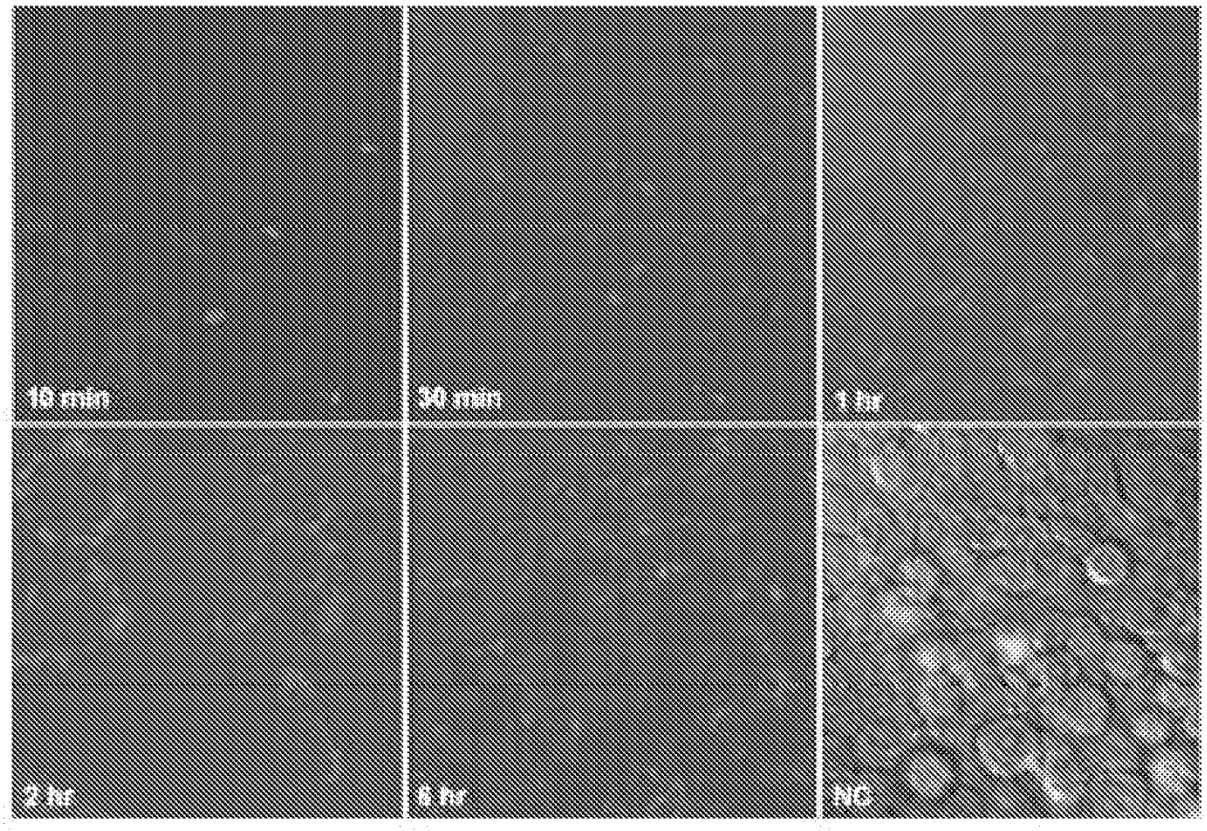


FIGURA 55

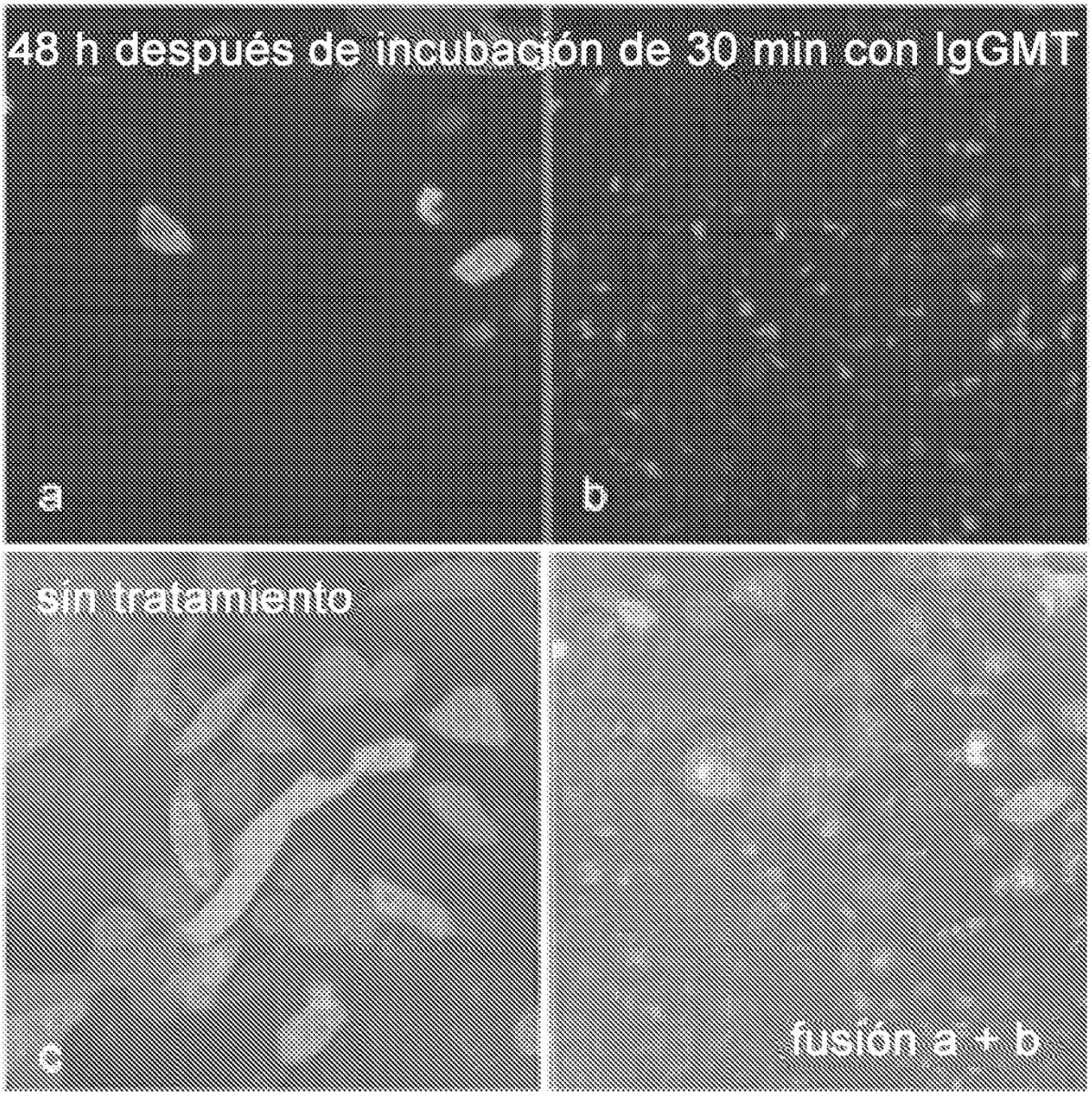

48 h después de incubación de 30 min con IgGMT
a
b
Sin tratamiento
c
fusión a + b

FIGURA 56

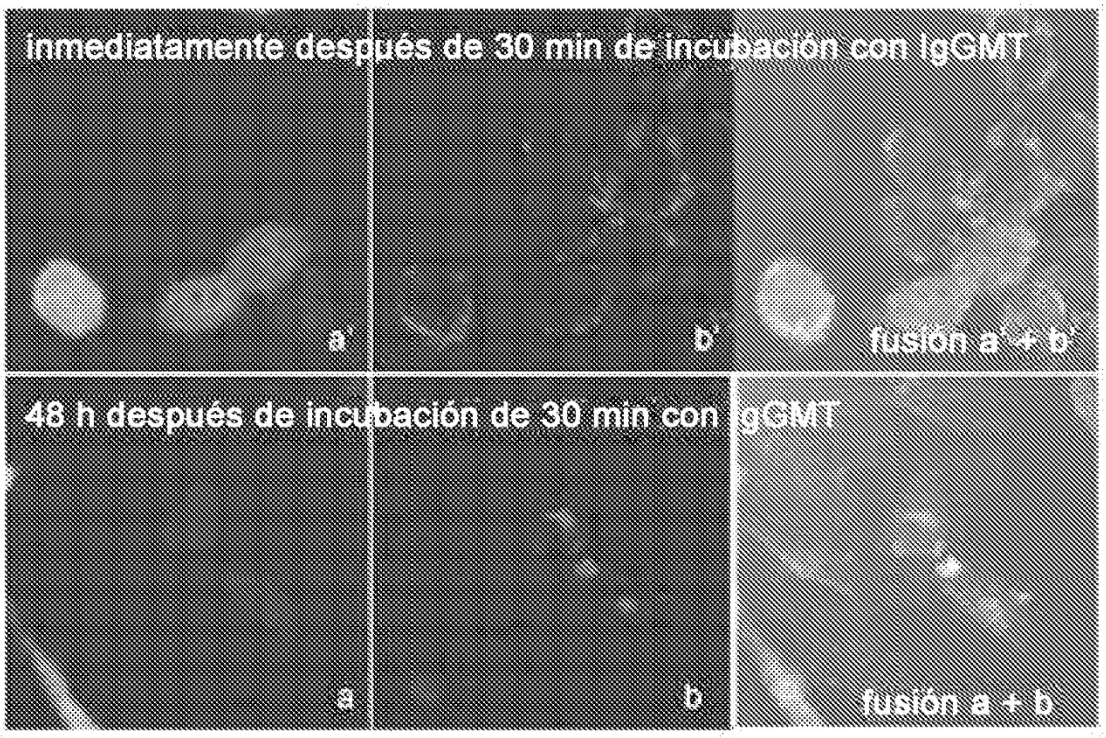


FIGURA 57

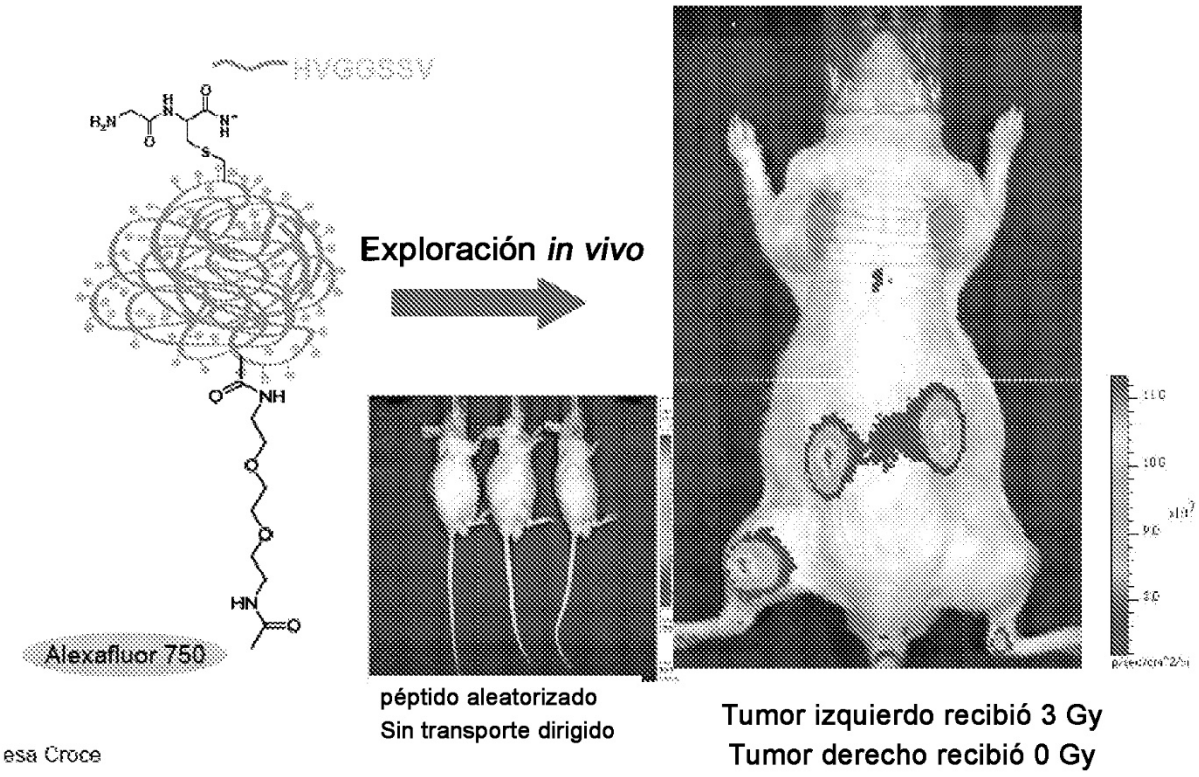


FIGURA 58

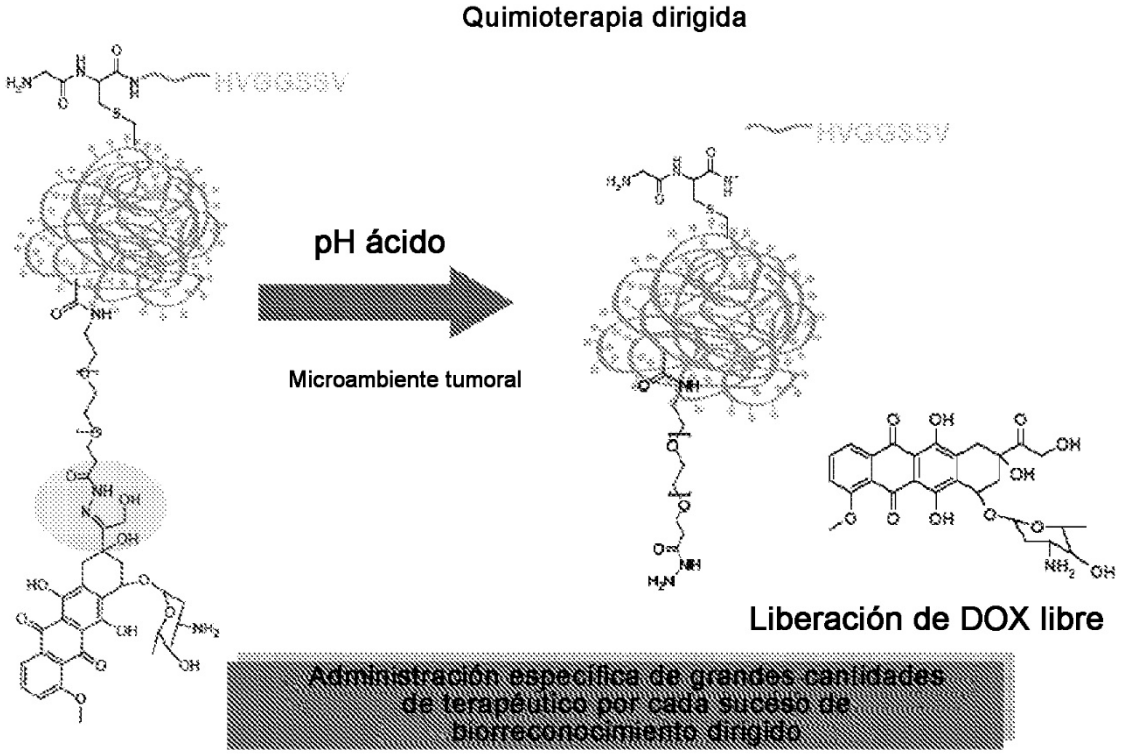


FIGURA 59

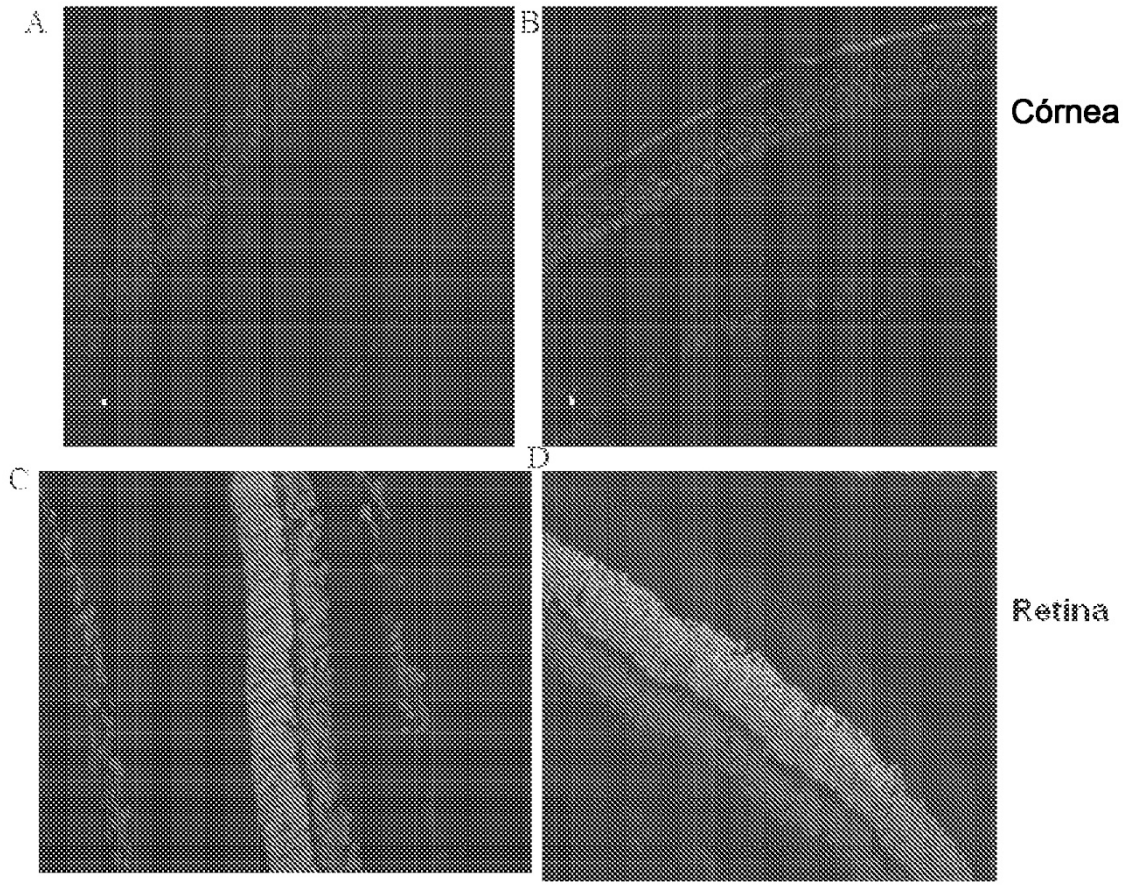


FIGURA 60