

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 682 762**

(51) Int. Cl.:

A61K 41/00 (2006.01)
A61K 47/61 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2013 PCT/EP2013/059968**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13189663**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2013 E 13725109 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2849791**

(54) Título: **Conjugado de un fotosensibilizador y quitosano y usos del mismo**

(30) Prioridad:

15.05.2012 GB 201208548

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.09.2018

(73) Titular/es:

**PCI BIOTECH AS (100.0%)
Ullernchausseen 64
0379 Oslo, NO**

(72) Inventor/es:

**BERG, KRISTIAN;
HØGSET, ANDERS;
MÅSSON, MÁR y
Gaware, VIVEK S.**

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 682 762 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugado de un fotosensibilizador y quitosano y usos del mismo

- 5 La presente invención se refiere a nuevos conjugados a base de quitosano, por ejemplo, nanovehículos, que comprenden un derivado del polímero biocompatible quitosano conjugado con un agente fotosensibilizador, y usos del mismo en la internalización fotoquímica (PCI) y la terapia fotodinámica (PDT). La invención también se refiere a los nuevos conjugados de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades, particularmente cáncer, y con fines de vacunación.
- 10 Los nanomateriales tienen propiedades fisicoquímicas especiales que incluyen un tamaño pequeño y una gran relación de área superficial-masa y alta actividad en comparación con los materiales a granel de la misma composición. Estas propiedades únicas pueden mejorar y superar algunas de las limitaciones que se encuentran en la medicina tradicional. La aplicación de nanomateriales brinda la oportunidad de modificar propiedades tales como la solubilidad, la difusividad, la semivida en la circulación sanguínea, las características de liberación del fármaco y la inmunogenicidad. En las últimas dos décadas, se han desarrollado varios agentes a base de nanopartículas para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico para el tratamiento de enfermedades.
- 15
- 20 El uso de nanomateriales puede proporcionar vías de administración más eficaces y más convenientes, menor toxicidad, efectos secundarios minimizados, biodisponibilidad aumentada y ciclo de vida prolongado del producto en el sistema. Como sistemas de administración de fármacos, las nanopartículas o los nanovehículos pueden proporcionar una administración dirigida y una liberación controlada. Además, pueden usarse con fines de diagnóstico. Pueden, por ejemplo, permitir la detección de células precancerosas, fragmentos de virus y marcadores de enfermedad que no pueden detectarse mediante enfoques tradicionales establecidos.
- 25
- 30 Actualmente, los polímeros naturales y sintéticos junto con los liposomas son las principales plataformas de nanopartículas que se encuentran en la bibliografía (Peer et al., 2007, Natl., 2(12), pág. 751-760). Otras plataformas populares incluyen dendrímeros, nanoemulsiones de aceite, nanopartículas de sílice mesoporosas y nanopartículas de óxido de hierro. El documento WO 2008/130181 divulga un fotosensibilizador basado en conjugados de derivados poliméricos biocompatibles-fotosensibilizador para terapia fotodinámica, en el que los derivados poliméricos biocompatibles comprenden quitosano o glicolquitosano.
- 35
- 40 Los nuevos conjugados de la presente invención, que pueden ser nanovehículos, comprenden derivados del polímero biocompatible quitosano, que se deriva de quitina. La quitina (poli (β -(1→4)-N-acetyl-D-glucosamina)) es un polisacárido de origen natural y el material de soporte de insectos y crustáceos. La quitina es el segundo polisacárido más abundante de forma natural en la tierra después de la celulosa. Generalmente se deriva de fuentes tales como las células de cangrejo y camarones. Estructuralmente, la quitina es similar a la celulosa pero tiene un grupo acetamida en lugar de un grupo hidroxilo en la posición C2 del esqueleto del polímero.
- 45
- 50 El quitosano es el derivado más importante de la quitina, normalmente producido mediante la eliminación de los grupos acetilo por métodos alcalinos. Si bien la mayoría de los polímeros de origen natural son de naturaleza neutra o ácida, el quitosano es un polisacárido altamente básico. El átomo de nitrógeno en la posición C2 proporciona una oportunidad para modificar el polímero mediante estrategias sintéticas para adaptar la molécula hacia ciertas propiedades deseables, por ejemplo, una solubilidad aumentada y propiedades biológicas mejoradas.
- 55
- 60 El polímero de quitosano consiste en unidades de D-glucosamina unida a β -(1→4) con diversos grados de desacetilación (DD), en donde los grupos acetilo restantes se distribuyen en bloques o aleatoriamente a lo largo de la cadena polimérica lineal. El quitosano es soluble en ácidos diluidos, tal como el ácido acético debido a la carga positiva del grupo amino en condiciones ácidas. Aunque la DD puede ser muy variable, casi nunca es del 100 %. No se ha definido la nomenclatura distintiva de la quitina frente al quitosano con respecto a la DD, pero la DD para el quitosano puede variar del 40-100 %. Los pesos moleculares pueden ser de hasta 2000 kDa, pero los inferiores a 50 kDa a veces se consideran oligoquitosanos.
- 65
- Se ha prestado atención a la quitina y el quitosano en las últimas décadas con respecto a su potencial de aplicación en medicina. Se han diseñado y sintetizado diversos derivados de quitosano para mejorar la solubilidad y mejorar aún más sus propiedades físicas, químicas y biológicas.
- Además del derivado de quitosano, los conjugados de la presente invención también comprenden un agente fotosensibilizador, que está conjugado con el quitosano. Por lo tanto, los conjugados tienen un uso particular en métodos que implican fotosensibilización.
- La fotosensibilización es un proceso de transferencia de la energía de la luz absorbida. Despues de la absorción, la energía se transfiere a los reactantes (elegidos). Los fotosensibilizadores son compuestos que son capaces de traducir la energía de la luz en reacciones químicas de tipo II. Los productos finales altamente reactivos de estos procesos dan como resultado toxicidad citovascular y vascular.

Los fotosensibilizadores pueden ejercer sus efectos por una variedad de mecanismos, directa o indirectamente. Por lo tanto, por ejemplo, ciertos fotosensibilizadores se vuelven directamente tóxicos cuando se activan por la luz, mientras que otros actúan para generar especies tóxicas, por ejemplo, agentes oxidantes tales como oxígeno singlete u otros radicales libres derivados de oxígeno, que son extremadamente destructivos para el material celular y biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Hay muchos agentes fotosensibilizadores conocidos, incluyendo porfirinas, ftalocianinas, purpurinas, clorinas, benzoporfirinas, bases lisosomotrópicas débiles, naftalocianinas, tintes catiónicos y tetraciclinas o derivados de los mismos (Berg *et al.*, (1997), *J. Photochemistry and Photobiology*, 65, 403-409). Otros agentes fotosensibilizadores incluyen texafirinas, feofóbidos, porfisenos, bacterioclorinas, cetoclorinas, derivados de hematoporfirina y fotosensibilizadores endógenos inducidos por ácido 5-aminolevulínico. Como se analiza a continuación, en las moléculas a base de quitosano de la presente invención, se emplean porfirinas y clorinas, particularmente tetrafenilporfirina (TPP) y tetrafenilclorina (TPC).

Las porfirinas son los agentes fotosensibilizadores más extensamente estudiados. Su estructura molecular incluye cuatro anillos de pirrol unidos mediante puentes de metino. Son compuestos naturales que a menudo son capaces de formar complejos metálicos. Por ejemplo, en el caso de la proteína de transporte de oxígeno hemoglobina, se introduce un átomo de hierro en el núcleo de porfirina del hemo B.

Las clorinas son anillos aromáticos heterocíclicos grandes que consisten, en el núcleo, en tres pirroles y una pirrolina acoplados a través de cuatro enlaces metino. A diferencia de la porfirina, por lo tanto, una clorina es en gran parte aromática, pero no aromática a través de toda la circunferencia del anillo.

Se usan agentes fotosensibilizadores en métodos de terapia fotodinámica (PDT) y de internalización fotoquímica (PCI). La PDT es un proceso de dos pasos que implica la administración de un fotosensibilizador por vía sistemática o tópica, seguido de iluminación ligera de una longitud de onda apropiada. Para que se produzcan efectos citotóxicos, el oxígeno molecular también debe estar presente. Cuando estos tres factores se combinan con éxito (es decir, fotosensibilizador, luz y oxígeno), se produce una reacción fotodinámica. La reacción fotodinámica conduce a la generación de especies citotóxicas, que causan muerte celular y daño tisular.

La PDT se usa para el tratamiento de, por ejemplo, cáncer. Los intermedios radicales de las reacciones fotodinámicas se eliminan por el oxígeno en los tejidos biológicos para producir especies reactivas de oxígeno (ROS) tal como oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). $^1\text{O}_2$ es una forma de oxígeno de vida corta con un alto potencial citotóxico. Por lo tanto, se puede lograr el tratamiento citotóxico altamente selectivo en el que se evitan en gran medida los efectos secundarios sistémicos.

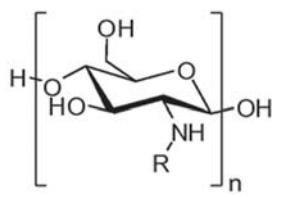
La PCI se basa en el mismo principio que la PDT, pero produce menos ROS (por ejemplo, usando dosis de luz más bajas) para inducir la liberación de fármacos atrapados y macromoléculas de endosomas en el citosol sin una muerte celular significativa debido a ROS. En la PCI, la excitación lumínica conduce a un daño mediado por ROS selectivamente de las membranas lisosómicas y/o endosómicas y la liberación de fármacos hidrófilos atrapados y macromoléculas. De este modo, las moléculas en endocitosis pueden liberarse para alcanzar su diana de acción antes de degradarse en los lisosomas.

Se ha demostrado que la PCI mejora la actividad biológica de una gran diversidad de macromoléculas y otras moléculas que no penetran fácilmente a través de la membrana plasmática, incluyendo proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo I, inmunotoxinas, agentes quimioterapéuticos tales como bleomicina (Blenoxane®) y doxorubicina, plásmidos codificantes de genes y oligonucleótidos. Se ha encontrado que induce citotoxicidad en capas de tejido más profundas que la PDT correspondiente. Debido a la combinación de terapias dirigidas con la administración citosólica activada por luz inducida por fotosensibilizadores que se acumulan preferentemente en tumores sólidos, la PCI puede ser altamente específica y esto también contribuye a una mayor eficacia antitumoral.

Uno de los problemas comunes asociados con la PDT en la aplicación clínica es la fotosensibilidad de la piel y la biodistribución desfavorable del fotosensibilizador. Se han introducido nanovehículos tales como dendrímeros, liposomas y micelas poliméricas como un enfoque para reducir los efectos secundarios y mejorar la farmacocinética en la PDT.

Sigue existiendo la necesidad de nanovehículos mejorados y agentes fotosensibilizadores para su uso en métodos de PCI y PDT. La presente invención aborda esta necesidad. Los presentes inventores han desarrollado nuevos compuestos, que se basan en un conjugado de un fotosensibilizador y quitosano. Las nuevas moléculas tienen una eficacia sorprendentemente alta en los métodos de PCI, como se ilustra en los siguientes Ejemplos que demuestran una eficacia sorprendentemente buena tanto *in vitro* como *in vivo*.

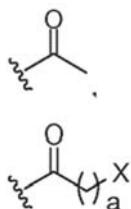
Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto, por ejemplo, un nanovehículo, que comprende un conjugado de un fotosensibilizador y quitosano, en el que dicho compuesto es un compuesto de Fórmula (I):



(1)

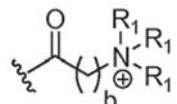
en la que

- 5 n es un número entero superior o igual a 10,
R aparece n veces en dicho compuesto y
en el 0,1 %-99,9 % de dichos grupos Rn totales, cada R es un grupo A seleccionado de:
H,



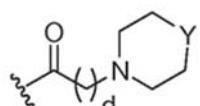
10

en la que a es 1, 2, 3, 4 o 5; y X es Br, Cl u OH;



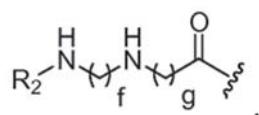
15

en la que cada R₁, que pueden ser iguales o diferentes, se selecciona de H, CH₃ y -(CH₂)_c-CH₃; b es 1, 2, 3, 4 o 5; y c es 0, 1, 2, 3, 4 o 5 (en el que el contraión puede ser, por ejemplo, Cl⁻);



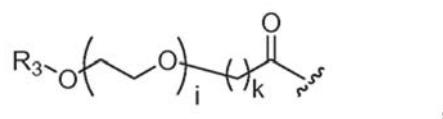
20

en la que Y es O; S; SO_2 ; -NCH₃; o -N(CH₂)_eCH₃; d = 1, 2, 3, 4 o 5; y e = 1, 2, 3, 4 o 5;

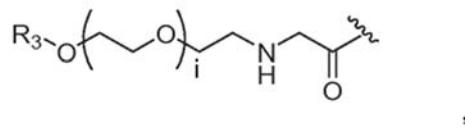


25

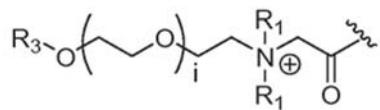
en la que R₂ es -(CH₂)_h-CH₃ o -CO-(CH₂)_h-CH₃; f es 1, 2, 3, 4 o 5; g es 1, 2, 3, 4 o 5; y h es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;



en la que R_3 es $-(CH_2)_j-CH_3$, i es un número entero de 1 a 200, preferiblemente de 1-50 o 1-10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, o al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o 200; j es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y k es 1, 2, 3, 4 o 5;

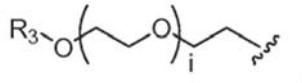


en la que R_3 es $-(CH_2)_j-CH_3$, i es un número entero como se ha definido anteriormente; y j es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;



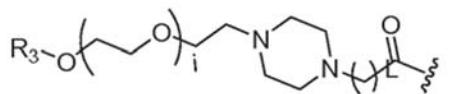
,

5 en la que R_3 es $-(CH_2)_j-CH_3$, i es un número entero como se ha definido anteriormente; j es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R_1 , que pueden ser iguales o diferentes, se selecciona de H, CH_3 y $-(CH_2)_c-CH_3$; y c es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;



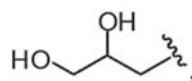
,

10 en la que $R_3=-(CH_2)_j-CH_3$, i es un número entero como se ha definido anteriormente; y j es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

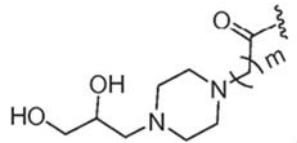


,

15 en la que $R_3=-(CH_2)_j-CH_3$, i es un número entero como se ha definido anteriormente; L es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; y j es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;



20 y

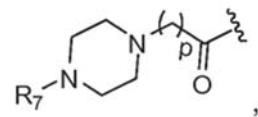
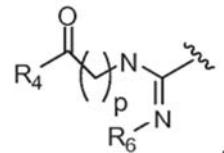
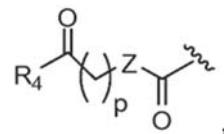
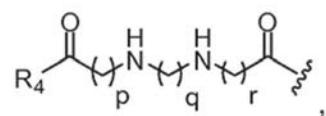
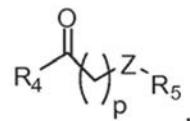
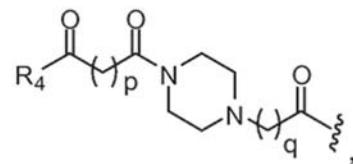
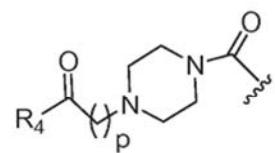
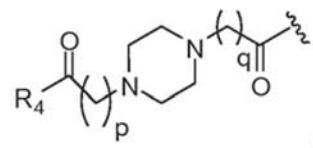
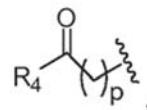
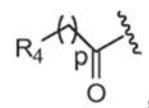


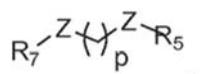
,

en la que m es 1, 2, 3, 4 o 5;

en la que cada grupo R puede ser igual o diferente; y

25 en el 0,1 %-99,9 % de dichos grupos R_n totales, cada R es un grupo B seleccionado de:



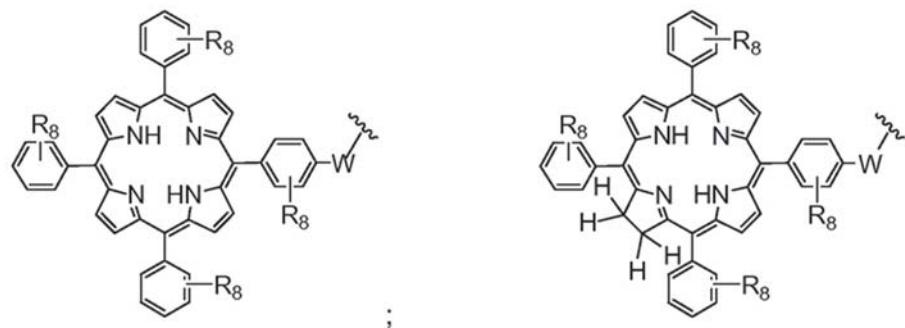


en la que

p es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; q es 1, 2, 3, 4 o 5; y

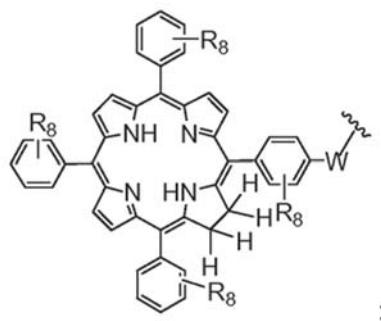
r es 1, 2, 3, 4 o 5; R₄ es un grupo seleccionado de:

5

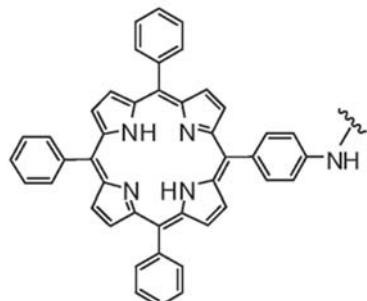


10

y

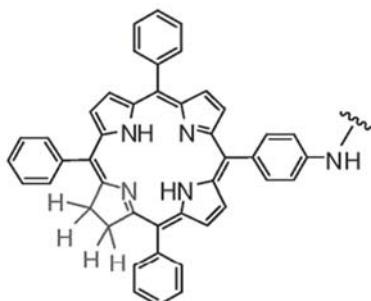


(preferiblemente R₄ se selecciona de:

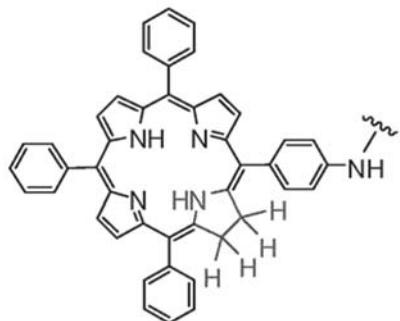
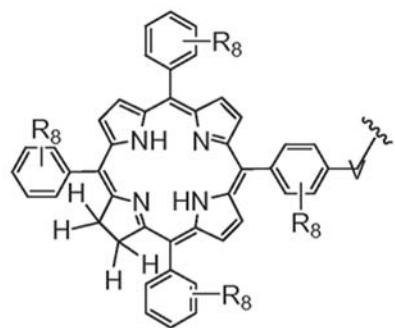
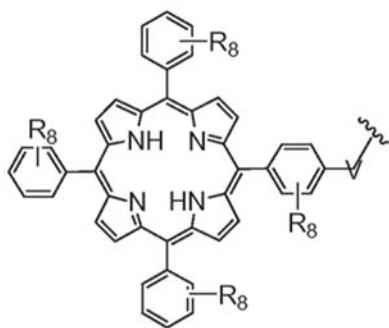


15

TPPa

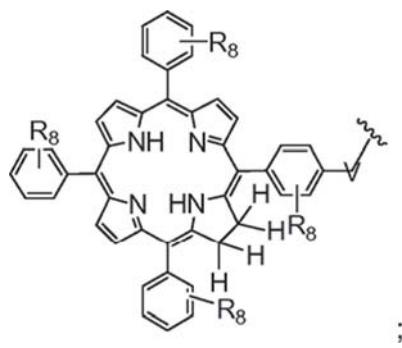
TPCa₁

y

TPCa₂);W es un grupo seleccionado de O, S, NH o N(CH₃);R₅ es un grupo seleccionado de: -(CH₂)_s-CO-; -(CH₂)_s-Z-(CH₂)_t-CO- y -(CH₂)_s- Z-(CH₂)_t-Z-CO-; en las que s es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; t es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;Z es NH, O, S, o SO₂;R₆ es un grupo seleccionado de -CN y CH₃;R₇ es un grupo seleccionado de:

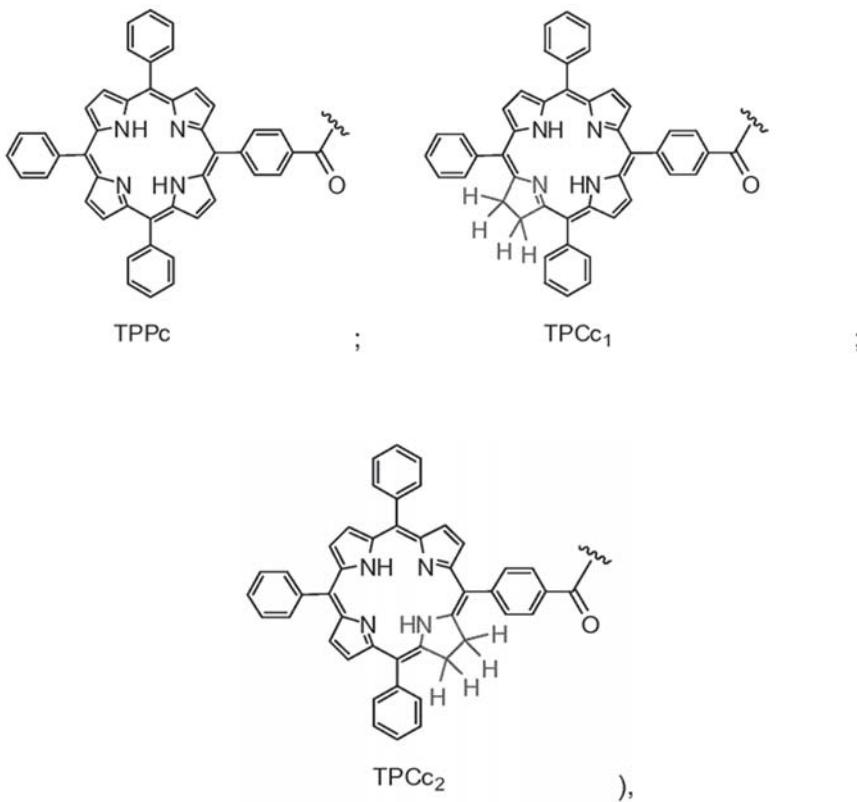
10

y



15

V es un grupo seleccionado de CO, SO₂, PO, PO₂H o CH₂;
(preferiblemente R₇ se selecciona de:



y

5 R₈ es un grupo (sustituido en la posición o, m o p), que puede ser igual o diferente, seleccionado de H, -OH, -OCH₃, -CH₃, -COCH₃, C(CH₃)₄, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂ y -NCOCH₃ (en la que preferiblemente cada R₈ es H o al menos un R₈ no es H);

10 en la que cada grupo R puede ser igual o diferente.

El polímero de quitosano tiene al menos 10 unidades (n = 10). Sin embargo, preferiblemente n es al menos 10, 20, 50, 100, 500, 1000, por ejemplo, de 10 a 100 o de 10 a 50.

15 Como se ha mencionado anteriormente, los fotosensibilizadores empleados en los conjugados son derivados de porfirina y clorina, en particular TPP_a, TPC_{a1}, TPC_{a2}, TPP_c, TPC_{c1} y TPC_{c2}. Preferiblemente, dicho derivado de fotosensibilizador R₄ o R₇ es TPC_{a1}, TPC_{a2}, TPC_{c1} o TPC_c, especialmente, preferiblemente TPC_{a1} o TPC_{a2}.

20 El derivado de quitosano del conjugado puede tener diversos grados de sustitución (DS) con los grupos R anteriores. Por ejemplo, cuando están presentes, uno o más de los grupos R descritos anteriormente pueden comprender menos del 1 %, preferiblemente del 0,1 al 1,0 %, o más del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o del 99,9 % de las sustituciones de quitosano.

25 Como se ha señalado anteriormente, los grupos R del grupo A y del grupo B proporcionan cada uno el 0,1 %-99,9 % (preferiblemente del 0,5 al 99,5 %) de los grupos Rn totales. Preferiblemente, el grupo A proporciona al menos el 50 %, preferiblemente al menos el 60, 70, 80, 90 o el 95 % de los grupos Rn totales. Especial y preferiblemente, el grupo A proporciona entre el 50 y el 95 %, por ejemplo, el 70 y el 95 % de los grupos Rn totales. Preferiblemente, el grupo B proporciona menos del 50 %, por ejemplo, menos del 40, 30, 20, 10 o del 5 % de los grupos Rn totales. Especial y preferiblemente, el grupo B proporciona entre el 5 y el 30 %, por ejemplo, el 10-25 % de los grupos Rn totales.

30 Los grupos R del grupo A (o los grupos R del grupo B) pueden ser iguales o diferentes. En aspectos preferidos en los que están presentes diferentes grupos, por ejemplo, en los grupos R del grupo A, la proporción de cada grupo puede variar. Por ejemplo, un grupo R puede estar presente en un intervalo, por ejemplo, del 75 al 95 % (de los grupos Rn totales) como un componente principal, mientras que el otro grupo R puede estar presente en un intervalo, por ejemplo, del 0,1 al 10 % (de los grupos Rn totales) como componente secundario. Sin embargo, como alternativa, el componente principal puede estar presente en niveles inferiores (por ejemplo, del 50 al 90 %) y el componente secundario puede estar presente a niveles superiores (por ejemplo, del 0,1 al 50 %). Preferiblemente, cuando los grupos R de A que están presentes reflejan la acetilación de la molécula de quitosano, es decir, R es



está presente en <1 % de los grupos Rn totales. Este grupo R tiende a reflejar el grado de acetilación (DA) de las moléculas de quitosano de partida usadas para la generación de compuestos de la invención y, por lo tanto, su prevalencia puede variar. Preferiblemente, proporciona <60 % de los grupos Rn totales, preferiblemente menos del 30 % o del 20 %, por ejemplo, entre el 0,1 y el 30 % de los grupos Rn totales.

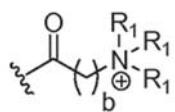
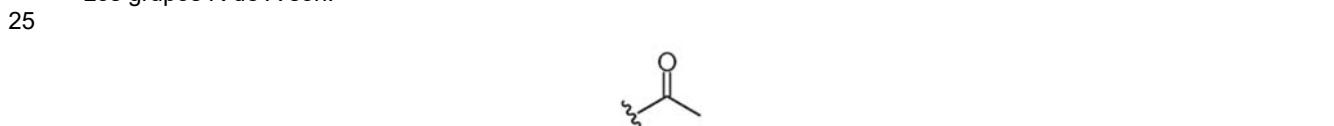
Como se apreciará, el % total proporcionado por todos los grupos R de los grupos A y B es del 100 % y la selección dentro de los intervalos anteriores se realiza en consecuencia.

Se observará que dependiendo del método de síntesis utilizado, algunas impurezas o productos alternativos pueden estar presentes a bajos niveles, por ejemplo, pueden permanecer en el producto final cantidades traza de otros grupos R o grupos protectores residuales (por ejemplo, TBDMS). Sin embargo, dichos componentes o compuestos traza, si están presentes, están presentes en <1 % del total (preferiblemente <0,1 %) y no afectan a la funcionalidad.

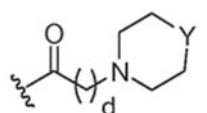
Los compuestos o composiciones que incluyen dichos componentes o compuestos traza están dentro del alcance de la invención.

En los aspectos preferidos descritos en el presente documento, se proporciona el % del grupo R seleccionado como una proporción de los grupos Rn totales. En tales casos, se prefiere un intervalo del % (por ejemplo, para reflejar la variación en la fabricación). Preferiblemente, el intervalo es del 5 %, es decir, cuando se hace referencia al 90 % de grupos R de A que tienen una cierta estructura, esto se extiende a compuestos del 85 al 95 % de ese grupo R de A, y así sucesivamente.

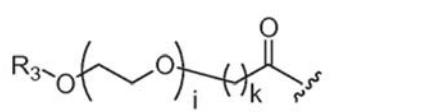
Los grupos R de A son:



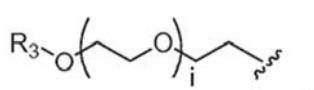
en los que preferiblemente cada R₁ es CH₃ y b es 1;



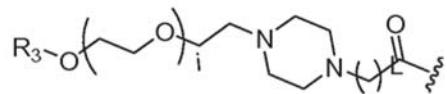
en los que preferiblemente Y es -NCH₃ y d es 1;



en los que preferiblemente j es 0 o 1; i es 3 o 6 y k es 1;

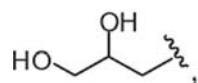


en los que preferiblemente j es 1 e i es 2;

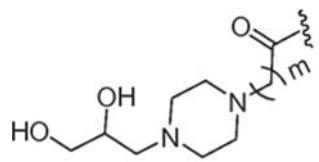


en los que preferiblemente j es 0 o 1 e i es 2, 4 o 5 (por ejemplo, 2 o 4) y L es 1;

5



y



10

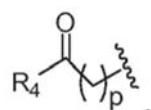
en los que preferiblemente m es 1.

15 Preferiblemente, los grupos R anteriores están presentes como componentes principales (es decir, más del 75 % de los grupos Rn totales (como se ha analizado anteriormente) o componentes secundarios (es decir, menos del 10 % de los grupos Rn totales) (como se ha analizado anteriormente)). Preferiblemente, el grupo



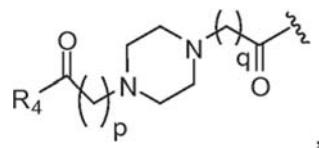
20 está presente solamente como un componente secundario.

Los grupos R de B preferidos son:

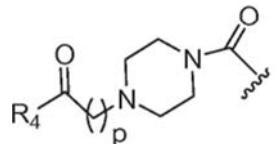


25

en los que preferiblemente p es 1;

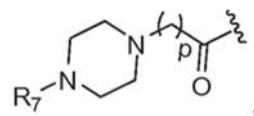


30 en los que preferiblemente p es 1 y q es 1;



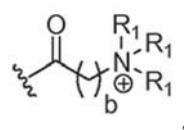
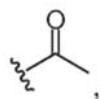
35

en los que preferiblemente p es 1; y



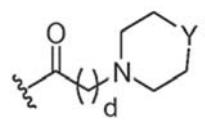
en los que preferiblemente p es 1.

- 5 Los grupos R de A especialmente preferidos son:



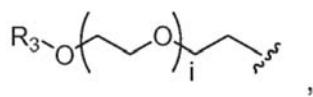
en los que preferiblemente cada R_1 es CH_3 y b es 1;

10

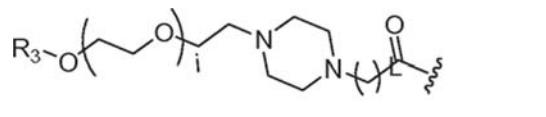


en los que preferiblemente Y es $-\text{NCH}_3$ y d es 1;

15

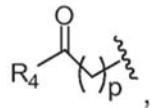


en los que preferiblemente j es 1 e i es 2; y



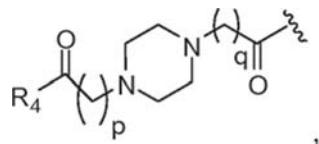
20

en los que preferiblemente j es 0 o 1 e i es 2, 4 o 5 (por ejemplo, 2 o 4) y L es 1. Los grupos R de B especialmente preferidos son:



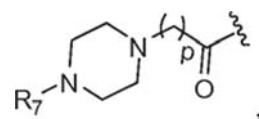
25

en los que preferiblemente p es 1;



30

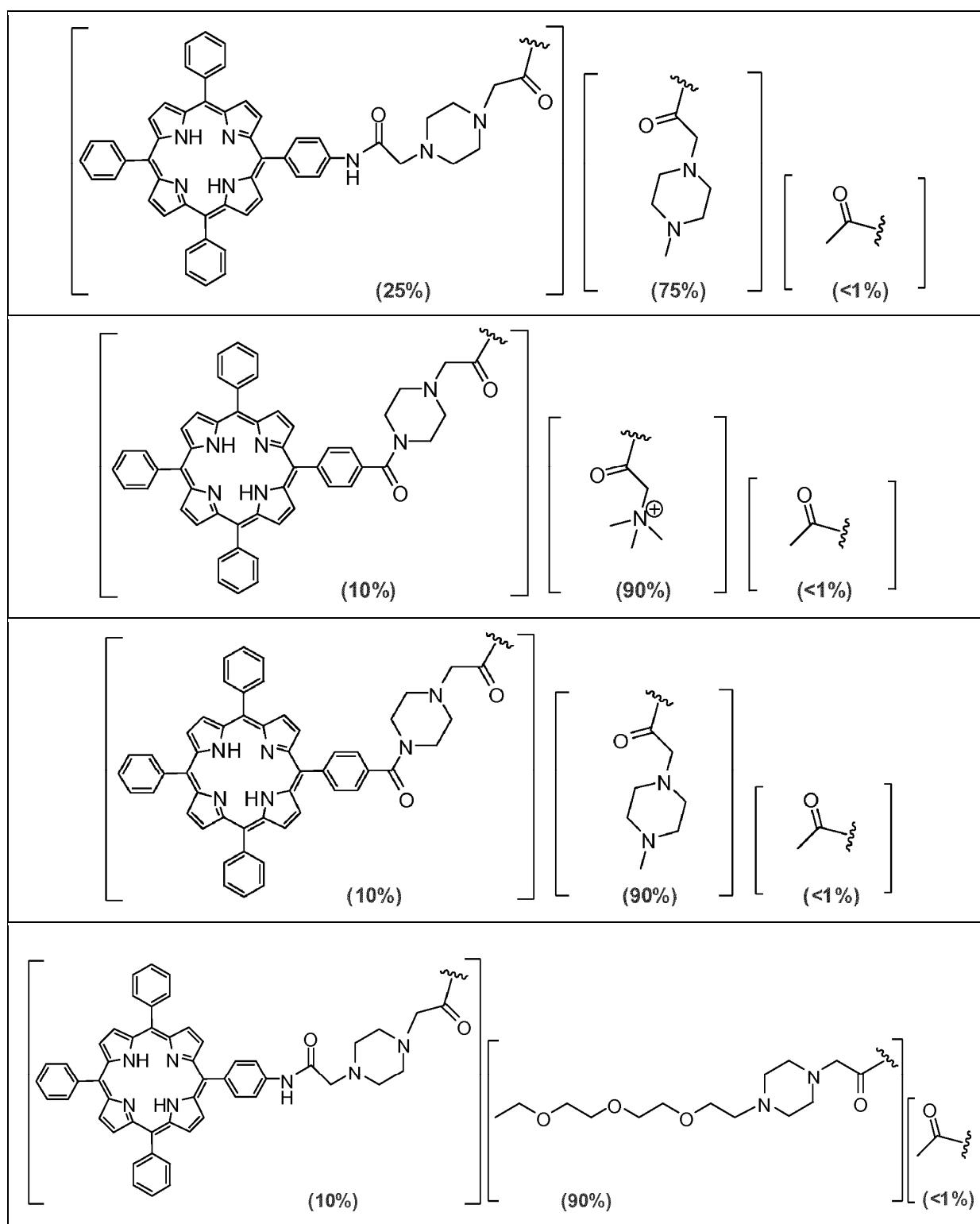
en los que preferiblemente p es 1 y q es 1; y

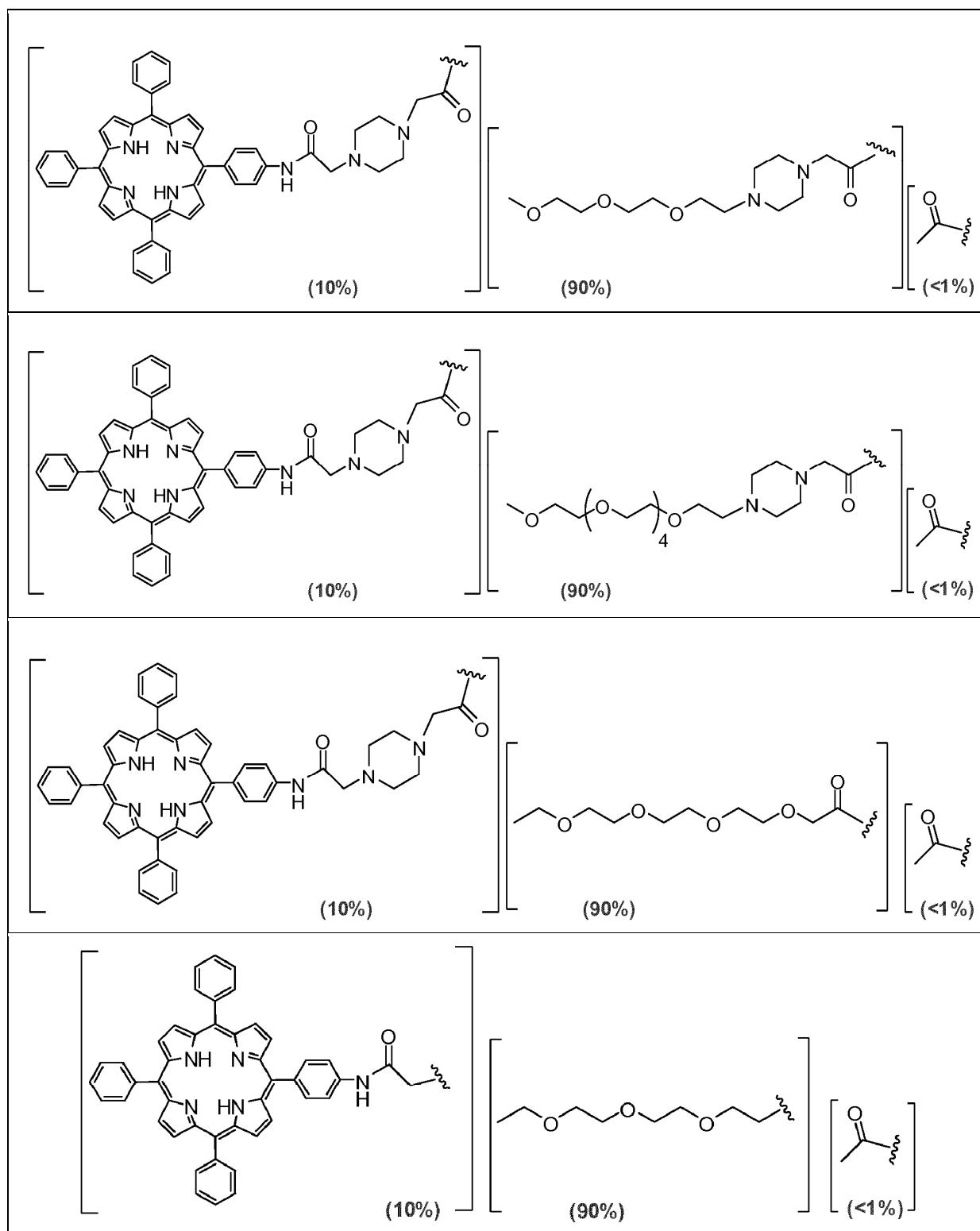


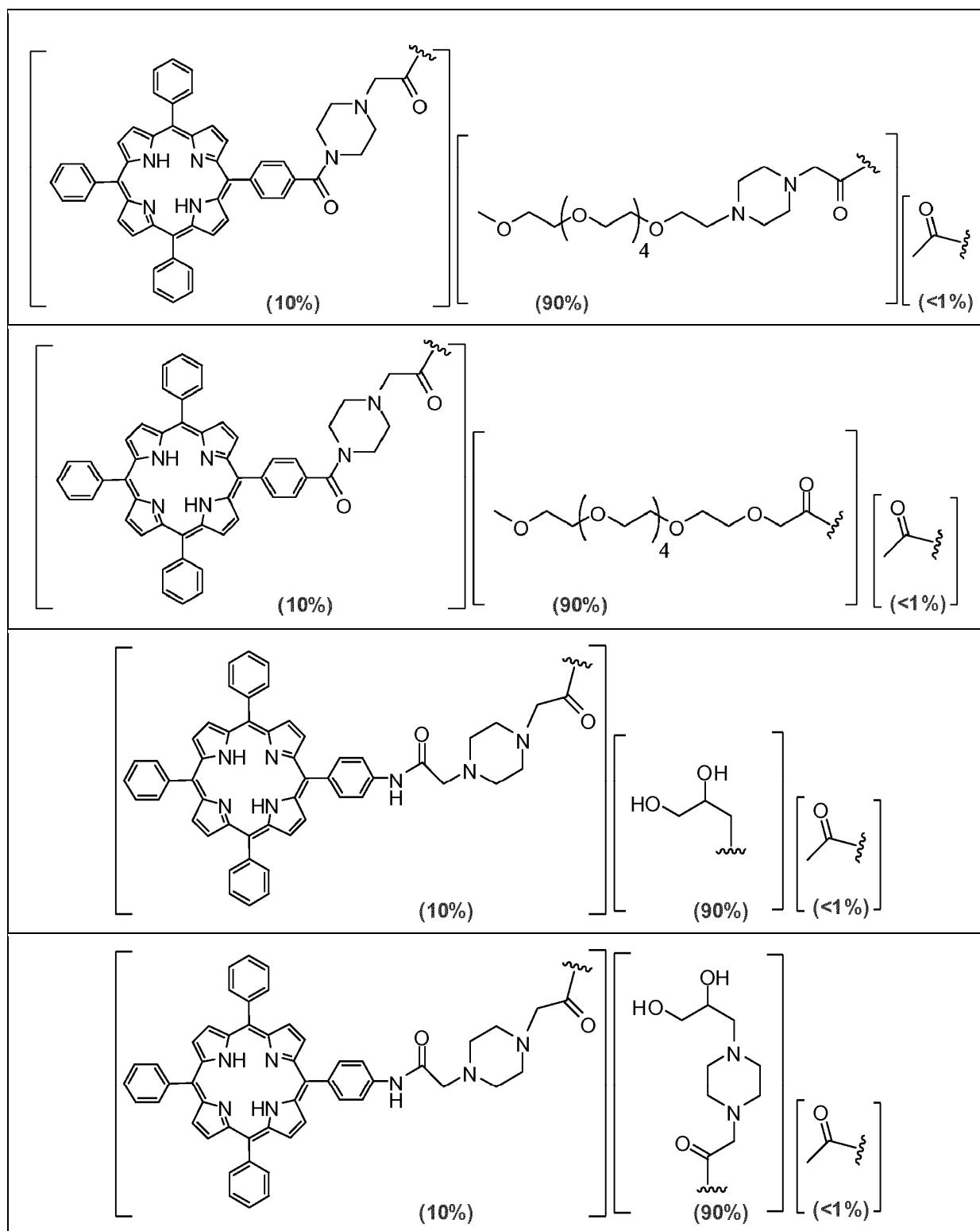
en los que preferiblemente p es 1.

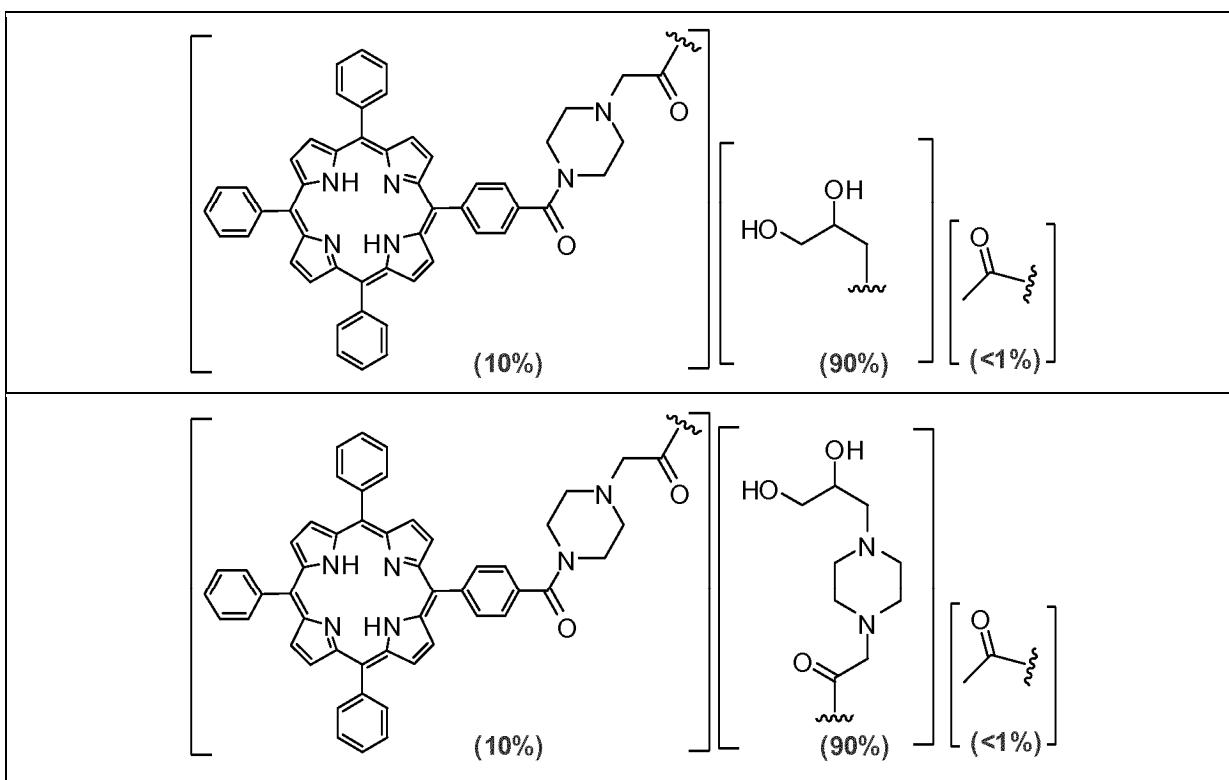
- 5 Los grupos R preferidos y su prevalencia relativa en los grupos Rn totales se proporcionan en la tabla a continuación en la que se muestran los diferentes grupos R posibles que se conjugan con el quitosano. El predominio de cada tipo de grupo R se indica entre paréntesis y puede variar dentro del 5 % a cada lado del valor indicado. Los grupos R del grupo B han unido grupos fotosensibilizadores R4 o R7.

Derivados TPP			
	(10%)		(90%)
	(25%)		(75%)
	(10%)		(90%)

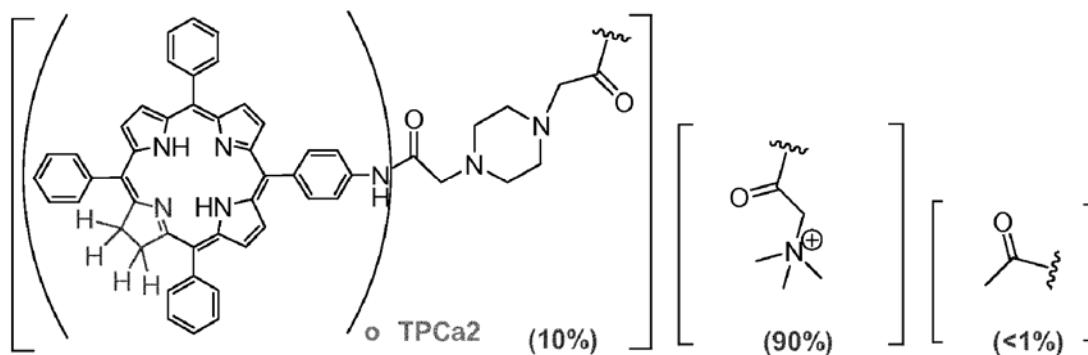




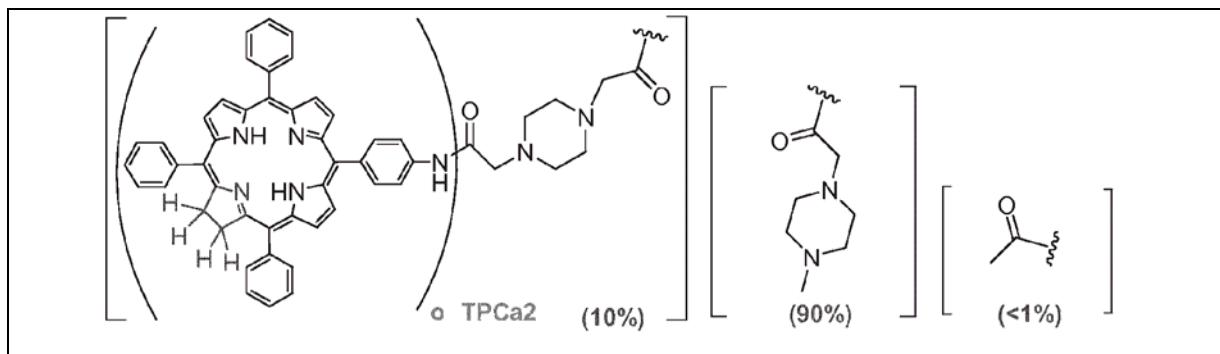


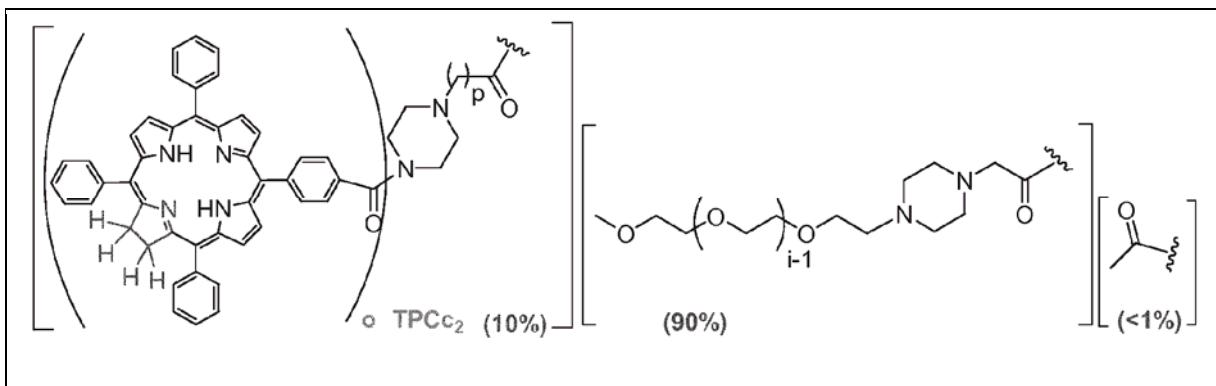
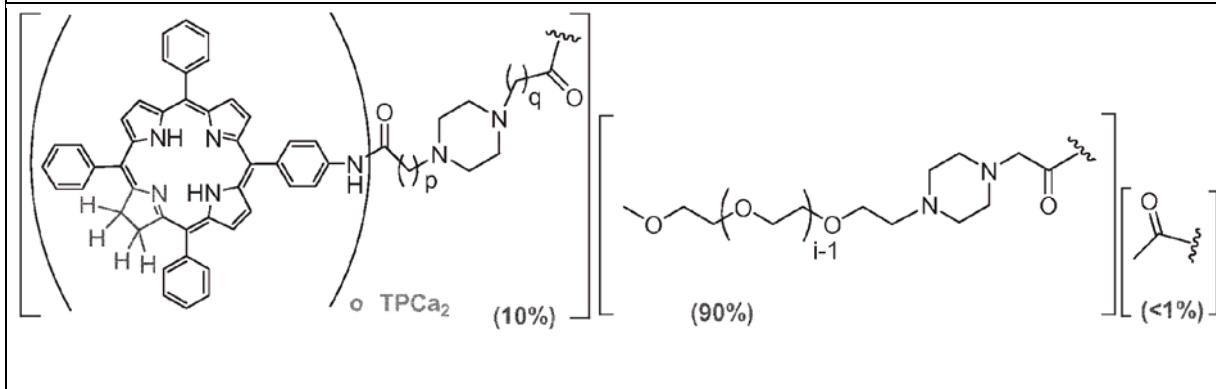
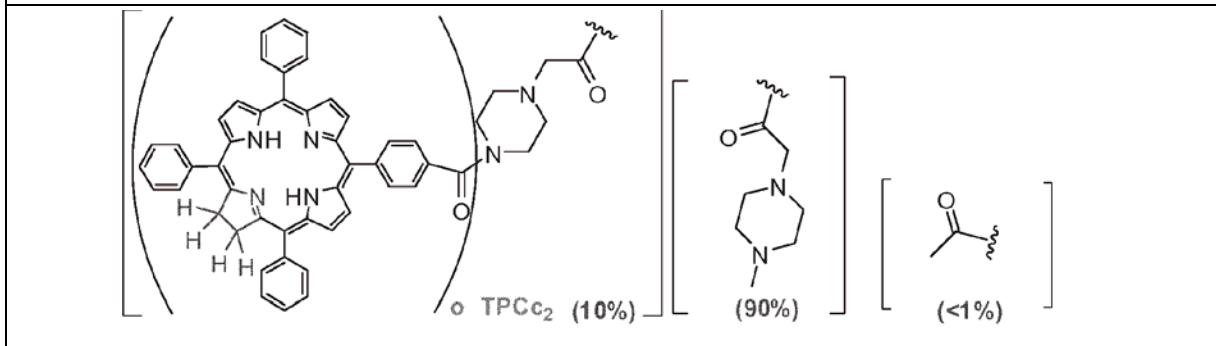
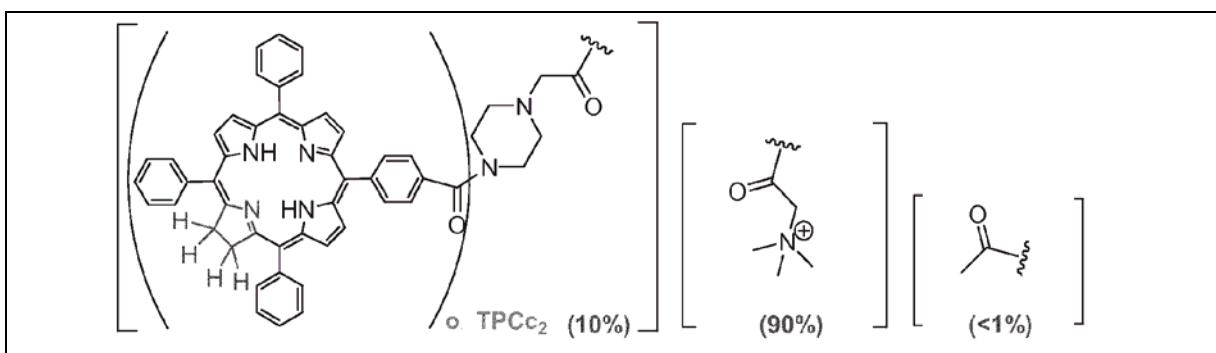


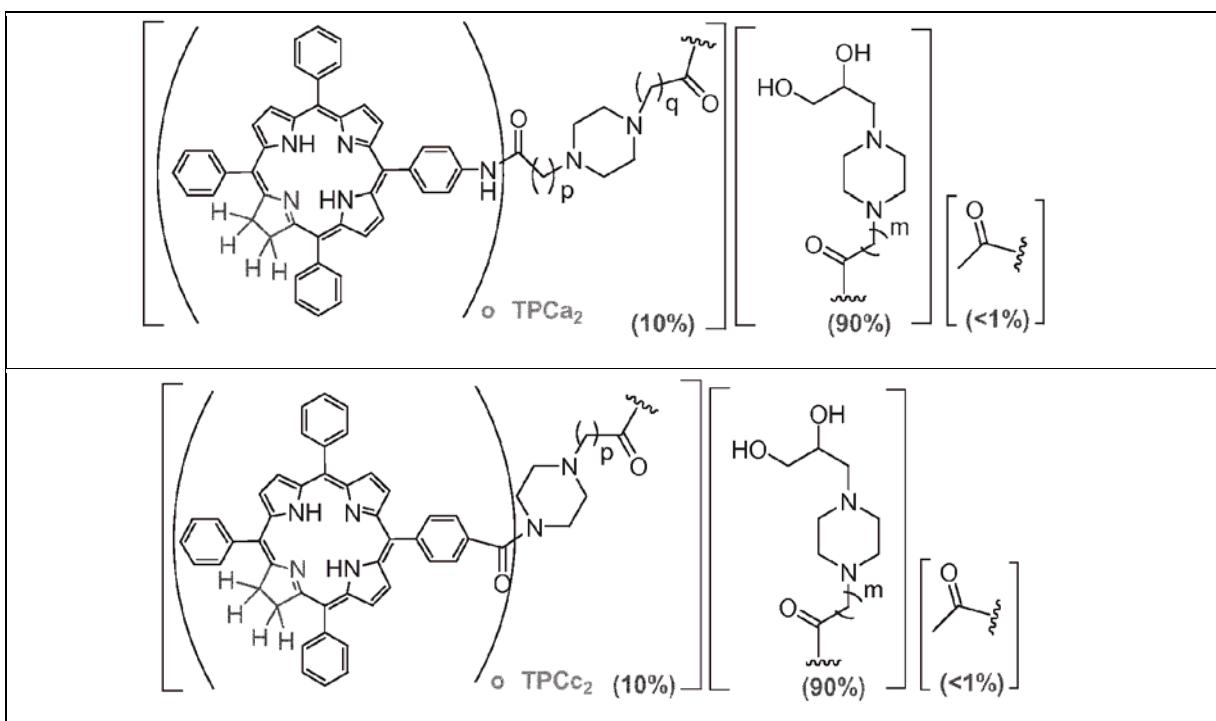
Derivados TPC



5







Los compuestos particularmente preferidos de la invención también se muestran en la Figura 1 en la que se indica la prevalencia de los grupos R, pero esto puede variar hasta en un 5 % a cada lado del valor indicado. En cada caso, el grupo R con el fotosensibilizador adjunto tiene la menor prevalencia indicada.

5 Los compuestos de la invención se pueden preparar como se describe en el presente documento en los Ejemplos. Los métodos de síntesis usan procedimientos estándar en la técnica, que serán conocidos para el experto, y que se describen en los siguientes Ejemplos. La PEGilación y la TEGilación para proporcionar grupos R relevantes se pueden llevar a cabo de acuerdo con métodos estándar en la técnica. La presente invención también se extiende a 10 métodos para preparar los compuestos de la invención, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos y esquemas descritos en el presente documento.

Los compuestos de la invención tienen baja toxicidad y, por lo tanto, son adecuados para una diversidad de 15 indicaciones médicas.

15 Los compuestos de la presente invención son particularmente adecuados para su uso en métodos de PCI. Como se ilustra en los presentes Ejemplos, se ha demostrado que los compuestos de la presente invención tienen una eficacia sorprendentemente buena en la internalización de moléculas en una célula. En el Ejemplo 3, se muestra que 20 la eficacia de un compuesto de la invención fue considerablemente mejor que la eficacia conseguida con un sensibilizador solo (en este caso se usó el fotosensibilizador TPCS_{2a} que se ha diseñado especialmente para su uso en PCI, y que está bajo desarrollo clínico para el tratamiento del cáncer (Berg et al., 2011, Photochem. Photobiol. Sci., 10, págs. 1637-1651)). En comparación con TPCS_{2a}, los compuestos de la invención fueron hasta al menos 10 veces más activos, es decir, que incluso cuando se usaron a una concentración 10 veces menor, los conjugados 25 proporcionaron una potencia de transfección sustancialmente mayor que la observada con TPCS_{2a} (véanse las Figuras 19 y 20).

El método básico de internalización fotoquímica (PCI) se describe en los documentos WO 96/07432 y WO 00/54802. 30 En resumen, la molécula a internalizar y un agente fotosensibilizador, en el presente caso un fotosensibilizador como parte de un compuesto de la presente invención, se ponen en contacto con una célula. El agente fotosensibilizador y la molécula que se va a internalizar se absorben en un subcompartimento unido a la membrana celular dentro de la célula. Al exponer la célula a la luz de la longitud de onda apropiada, se activa el agente fotosensibilizador que genera directa o indirectamente especies reactivas que rompen las membranas del compartimiento intracelular. Esto permite que la molécula internalizada se libere en el citosol.

35 Estos métodos usan el efecto fotoquímico como un mecanismo para introducir de otra manera moléculas impermeables a la membrana (o poco permeables) en el citosol de una célula de una manera que no da como resultado una destrucción celular o muerte celular diseminada si la metodología se ajusta adecuadamente para evitar la producción excesiva de especies tóxicas, por ejemplo, reduciendo los tiempos de iluminación o la dosis del fotosensibilizador.

Como tal, la invención también proporciona un método para introducir una molécula en el citosol de una célula, que comprende poner en contacto dicha célula con la molécula que se va a introducir y un compuesto de la invención, e irradiar la célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador del compuesto. Una vez activado, los compartimentos intracelulares dentro de dicha célula que contienen dicho compuesto liberan la molécula contenida en estos compartimentos en el citosol. El uso de un compuesto de la invención para internalizar una molécula que se desea internalizar también forma parte de la invención.

La PCI puede efectuar la transfección de varios tipos diferentes de moléculas en una célula. Por ejemplo, la molécula se puede seleccionar de ADN o ADN antisentido; oligo(desoxi)nucleótidos; ARN, tal como ARNm, ARNsi, ARN(ds) bicatenario, ARN(ss) monocatenario o ARN antisentido; PNA, azúcares; proteínas; péptidos; fármacos impermeables a la membrana; otras moléculas impermeables a la membrana, o combinaciones unidas covalente o no covalentemente de las moléculas mencionadas anteriormente. Preferiblemente, las moléculas que van a introducirse no se internalizan (es decir, en el citosol) significativamente sin la asistencia de PCI, por ejemplo, su internalización es limitada, de tal forma que menos del 50 % (por ejemplo, menos del 30 o del 10 %) de las células a las que se aplican internalizan una o más de las moléculas en el citosol en un periodo de tiempo de 4 horas.

La molécula que se va a internalizar se puede seleccionar para lograr diversos resultados, por ejemplo, para alterar, por ejemplo, reducir o aumentar la expresión de un gen diana o tener un efecto sobre las propiedades o la viabilidad de las células. Para afectar a la expresión génica, la molécula a transferir puede ser un oligo o polinucleótido sentido o antisentido, por ejemplo, una secuencia génica, por ejemplo, en un plásmido o un oligonucleótido antisentido o molécula de ARNsi. Dichos métodos pueden ser útiles para tratar o prevenir enfermedades y trastornos, tal como cáncer, y también pueden ser útiles en aplicaciones de terapia génica.

El método de la invención logra la translocación de la molécula a internalizar en el citosol. Se apreciará, sin embargo, que la captación de todas y cada una de las moléculas en contacto con la célula en el citosol no puede conseguirse. Sin embargo, se puede lograr una internalización significativa y mejorada con respecto a los niveles de fondo en los que no se usa PCI o el compuesto de la invención.

Preferiblemente, los métodos de la invención permiten la internalización de moléculas a niveles suficientes para que su efecto sea evidente, por ejemplo, en los productos expresados de esas células o por los efectos sobre la célula. La concentración apropiada de la molécula a poner en contacto con la célula puede ajustarse para lograr este objetivo, por ejemplo, en algunas aplicaciones, puede ser deseable lograr una elevación o reducción en la expresión de un gen diana (o gen introducido) o muerte celular después de introducción de una molécula citotóxica. La reducción o muerte celular puede ser de al menos el 10 %, por ejemplo, al menos el 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o el 90 % de reducción (por ejemplo, en la expresión de una o más proteínas codificadas por el gen diana) o la muerte celular después de la incubación con células durante, por ejemplo, 24, 48, 72 o 96 horas (por ejemplo, de 24 a 48 horas). La elevación de la expresión se puede evaluar en relación con los niveles existentes que pueden ser cero cuando se usa una molécula no endógena y se pueden alcanzar niveles numéricamente similares a los mencionados anteriormente para la reducción. Asimismo, el tipo y/o la concentración del compuesto (de la invención), y el tiempo de irradiación se pueden ajustar para lograr la reducción expuesta anteriormente.

Los niveles de productos expresados se pueden medir, por ejemplo, determinando el nivel de proteína en la célula, usando técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como transferencia Western. El nivel de reducción de la proteína depende de la semivida de la proteína, es decir, la proteína preeexistente se eliminará de acuerdo con su semivida. La muerte celular se puede determinar por cualquier medio apropiado.

Los efectos del material genético introducido también pueden medirse en términos de niveles de expresión de, por ejemplo, el ARNm que está presente en la célula, por ejemplo, el método puede llevarse a cabo para lograr una elevación o reducción en los niveles de ARNm de al menos el 10 %, por ejemplo, al menos el 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o el 90 % de elevación o reducción después de la incubación con células durante, por ejemplo, 24, 48, 72 o 96 horas, por ejemplo, de 24 a 48 horas, con respecto a los niveles de ARNm de la secuencia diana o introducida en el mismo punto de tiempo sin la adición del material genético. Esto también se puede medir usando técnicas estándar conocidas en la técnica tales como técnicas de hibridación o transferencia y RT-PCR.

El término "célula" se usa en el presente documento para incluir todas las células eucariotas (que incluyen células de insecto y células fúngicas). Por lo tanto, las "células" representativas incluyen todos los tipos de células de animales mamíferos y no mamíferos, células vegetales, células de insecto, células fúngicas y protozoos. Preferiblemente, sin embargo, las células son mamíferas, por ejemplo, células de gatos, perros, caballos, burros, oveja, cerdos, cabras, vaca, ratones, ratas, conejos, cobayas, pero mucho más preferiblemente de seres humanos.

Como se usa en el presente documento, "poner en contacto" se refiere a poner las células y el agente fotosensibilizador que contiene el compuesto de la invención y/o la molécula a introducir en contacto físico entre sí en condiciones apropiadas para la internalización en las células, por ejemplo, preferiblemente a 37 °C en un medio nutricional apropiado, por ejemplo, de 25-39 °C.

La "irradiación" de la célula para activar el agente fotosensibilizador se refiere a la administración de luz directa o indirectamente como se describe en lo sucesivo en el presente documento. Por lo tanto, las células pueden iluminarse con una fuente de luz, por ejemplo, directamente (por ejemplo, en células individuales *in vitro*) o indirectamente, por ejemplo, *in vivo* cuando las células están debajo de la superficie de la piel o están en forma de una capa de células que no están todas directamente iluminadas, es decir, sin la pantalla de otras células.

La etapa de irradiación de la luz para activar el agente fotosensibilizador puede tener lugar de acuerdo con técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica. La longitud de onda y la intensidad de la luz se seleccionan de acuerdo con el agente fotosensibilizador utilizado. Las fuentes de luz artificial adecuadas se conocen bien en la técnica, por ejemplo, usando una luz de longitud de onda de color azul (450-475 nm) o rojo (620-750 nm).

El tiempo durante el cual las células se exponen a la luz en los métodos de la presente invención puede variar. La eficacia de la internalización de una molécula en el citosol aumenta con una mayor exposición a la luz hasta un máximo más allá del cual aumenta el daño celular y, por lo tanto, la muerte celular.

Un periodo de tiempo preferido para la etapa de irradiación depende de factores tales como la diana, el fotosensibilizador (en el compuesto de la invención), la cantidad de fotosensibilizador acumulado en las células o tejido diana y la superposición entre el espectro de absorción del fotosensibilizador y el espectro de emisión de la fuente de luz. Generalmente, el periodo de tiempo para la etapa de irradiación es del orden de segundos a minutos o hasta varias horas, por ejemplo, preferiblemente hasta 60 minutos, por ejemplo, de 0,25 o de 1 a 30 minutos, por ejemplo, de 0,5 a 3 minutos o de 1 a 5 minutos o de 1 a 10 minutos, por ejemplo, de 3 a 7 minutos, y preferiblemente, aproximadamente 3 minutos, por ejemplo, de 2,5 a 3,5 minutos. También se pueden usar tiempos de irradiación más cortos, por ejemplo, de 1 a 60 segundos, por ejemplo, 10-50, 20-40 o 25-35 segundos.

Las dosis apropiadas de luz pueden ser seleccionadas por un experto en la técnica y de nuevo dependerán del fotosensibilizador (en el compuesto de la invención) usado y la cantidad de fotosensibilizador acumulado en las células o tejidos diana. Por ejemplo, la dosis de luz utilizada típicamente para el tratamiento fotodinámico de cánceres con el fotosensibilizador Photofrin y el precursor de protoporfirina ácido 5-aminolevulínico, está en el intervalo de 50-150 J/cm² en un intervalo de fluencia de menos de 200 mW/cm² para evitar la hipertermia. Las dosis de luz son generalmente más bajas cuando se usan fotosensibilizadores con coeficientes de extinción más altos en el área roja del espectro visible. Para los métodos PCI, se pueden usar dosis más bajas, por ejemplo, una dosis de luz en el intervalo de 5-25J/cm² a un intervalo de fluencia de 75-150 mW/cm². Además, para el tratamiento de tejidos no cancerosos con menos fotosensibilizador acumulado, la cantidad total de luz necesaria puede ser sustancialmente mayor que para el tratamiento de cánceres. Además, si se quiere mantener la viabilidad celular, se debe evitar la generación de niveles excesivos de especies tóxicas y los parámetros relevantes se pueden ajustar en consecuencia.

Los métodos PCI de la invención pueden dar lugar inevitablemente a cierta muerte celular en virtud del tratamiento fotoquímico, es decir, mediante efectos de PDT a través de la generación de especies tóxicas en la activación del agente fotosensibilizador. Dependiendo del uso propuesto, esta muerte celular puede no ser una consecuencia y, de hecho, puede ser ventajosa para algunas aplicaciones (por ejemplo, tratamiento del cáncer).

En una realización, la invención proporciona un método para lograr la muerte de una célula que comprende poner en contacto dicha célula con un compuesto de la invención, e irradiar la célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador del compuesto para generar especies reactivas de oxígeno que causen la muerte de dicha célula. Cuando se ha de lograr la muerte celular (mediante PDT), el tiempo, la intensidad y la longitud de onda para la etapa de irradiación se seleccionan de forma apropiada para lograr de manera óptima la muerte celular de las células diana.

En algunas realizaciones de la presente invención, sin embargo, se evita la muerte celular, por ejemplo, cuando es deseable la inhibición de la expresión de un gen en ausencia de toxicidad celular o si la molécula introducida debe lograr la muerte celular. Por ejemplo, en algunos usos es altamente ventajoso lograr la inhibición de la expresión o expresión génica en ausencia de toxicidad celular general o un efecto sobre la viabilidad celular, por ejemplo, en algunos enfoques de terapia génica. Los métodos de la invención se pueden modificar de tal forma que la fracción o proporción de las células supervivientes se regule seleccionando la dosis de luz en relación con la concentración del agente fotosensibilizador (en los compuestos de la invención). De nuevo, dichas técnicas se conocen en la técnica.

En aplicaciones en las que son deseables las células viables, no se destruyen sustancialmente todas las células, o una mayoría significativa (por ejemplo, al menos el 50 %, más preferiblemente al menos el 60, 70, 80 o 90 % de las células). La viabilidad celular después del tratamiento PCI puede medirse mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como la prueba MTS.

Independientemente de la cantidad de muerte celular inducida por la activación del fotosensibilizador, en algunas aplicaciones es importante que la dosis de luz esté regulada de tal manera que algunas de las células individuales en las que se manifiesta el efecto PCI no mueran por el tratamiento fotoquímico en solitario (aunque posteriormente pueden eliminarse por moléculas introducidas en las células si estas moléculas tienen un efecto citotóxico).

Se pueden conseguir efectos citotóxicos usando, por ejemplo, la introducción de una molécula citotóxica (por ejemplo, un péptido citotóxico tal como gelonina o bleomicina) o terapia génica en la que un agente, por ejemplo, un gen, oligonucleótido antisentido o molécula de ARNsi, se internaliza en una célula tumoral por el método de la invención.

5 Los compuestos y métodos de la invención se pueden usar *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, ya sea para el tratamiento *in situ* o para el tratamiento *ex vivo* seguido de la administración de las células tratadas al cuerpo, para diversos fines, incluida la inhibición o elevación de la expresión de productos genéticos específicos, por ejemplo, en los métodos de terapia génica.

10 Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención proporciona una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que contiene un compuesto o conjugado de la invención, y opcionalmente una molécula por separado a internalizar. Cuando dicha composición es una composición farmacéutica, contiene uno o más diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 En un aspecto adicional, la invención proporciona dicho compuesto o composición para su uso en terapia.

La presente invención proporciona un kit que comprende un compuesto o composición de la presente invención como se describe en el presente documento y una molécula a internalizar. Preferiblemente, dicho kit (o producto) es para uso simultáneo, separado o secuencial en un tratamiento médico, preferiblemente para tratar el cáncer o, como se describe con más detalle a continuación, con fines de vacunación.

20 Por lo tanto, un aspecto adicional proporciona el compuesto o la composición y opcionalmente una molécula a internalizar como se define en el presente documento para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o infección en un sujeto, preferiblemente en el que un crecimiento celular anormal o excesivo es evidente o en el que la expresión anormal elevada o suprimida del gen es evidente, especialmente preferiblemente en el que dicha enfermedad es cáncer.

25 Preferiblemente, dicho tratamiento o prevención se logra usando un método descrito en el presente documento.

30 Este método se puede llevar a cabo usando métodos PCI o cuando la muerte celular es el objetivo final, se pueden usar métodos PCI o PDT.

35 Por lo tanto, el método PCI puede llevarse a cabo como se ha descrito anteriormente, es decir, poniendo en contacto células en el sujeto con una molécula a introducir y dicho compuesto o composición, e irradiando las células con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador del compuesto. Preferiblemente, la molécula a introducir es una molécula citotóxica, preferiblemente bleomicina.

40 Se puede realizar un método PDT poniendo en contacto células en el sujeto con dicho compuesto o composición, e irradiando la célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador del compuesto para generar especies reactivas de oxígeno que causen la muerte de dichas células.

45 Como alternativa a lo descrito, la presente invención proporciona el uso de un compuesto o composición como se describe en el presente documento y opcionalmente una molécula a internalizar en una célula en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o infección. También se proporciona el uso de dicho compuesto o composición en la preparación de un medicamento para dicho tratamiento o prevención en el que dicho tratamiento o prevención es como se describe en el presente documento. La enfermedad, trastorno o infección preferiblemente presenta un crecimiento celular anormal o excesivo o una expresión génica anormal elevada o suprimida y/o se beneficiaría de la reducción en el crecimiento o la supresión celular o la elevación de la expresión de uno o más genes.

50 Como se hace referencia en el presente documento, anormal o excesivo se refiere a lo que se considera normal en individuos normales emparejados por edad y sexo u otras partes normales del cuerpo del mismo individuo. Por lo tanto, el crecimiento anormal puede referirse a cánceres, tumores benignos, y crecimiento celular excesivo puede referirse a afecciones cutáneas tales como queratosis actínica, verrugas y lunares. Los cánceres a los que se pueden aplicar los métodos incluyen cáncer de cabeza y cuello, cáncer del conducto biliar, cáncer de cerebro, melanoma, metástasis en la piel (de diferentes cánceres), cáncer pulmonar, mesotelioma, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer rectal, cáncer de ano, cáncer de pene, cáncer de vulva y cáncer de esófago. Por lo tanto, el medicamento puede usarse para tratar el cáncer. Cuando se usa una molécula a internalizar, puede ser un agente quimioterapéutico anticanceroso.

55 La expresión génica elevada o suprimida anormal se puede tratar alterando la expresión de uno o más genes diana en dicho sujeto, por ejemplo, cuando la molécula a internalizar es un gen, oligonucleótido antisentido o molécula de ARNsi. Preferiblemente, dicho medicamento es para terapia génica, es decir, para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o infección que se tipifica por expresión génica anormal o que se beneficiaría de la supresión de uno o más genes. Dicha alteración incluye regulación descendente de dicha expresión.

- 5 Cuando se usa un método PCI, el compuesto (o composición de la invención) y la molécula a internalizar pueden ponerse en contacto con células o tejidos de un paciente (o sujeto) simultánea o secuencialmente, y dichas células se irradian con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizante de dicho compuesto y la irradiación se realiza antes, durante o después de la captación celular de dicho compuesto y molécula en un compartimento intracelular que contiene dicho agente fotosensibilizante, preferiblemente antes de la captación celular de dicha molécula de transferencia en cualquier compartimento intracelular.
- 10 También se contemplan métodos en los que se tratan células que se administran al sujeto. Por lo tanto, en un aspecto alternativo, la invención proporciona células para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o infección en un paciente que comprende introducir un compuesto (o composición) de la invención y opcionalmente una molécula a internalizar en una o más células *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo* de acuerdo con los métodos descritos anteriormente en el presente documento y cuando sea necesario (es decir, cuando la transfección se realice *in vitro* o *ex vivo*) administrando dichas células a dicho paciente. Por lo tanto, las células generadas pueden usarse en terapia o para un uso específico como se ha descrito anteriormente en el presente documento.
- 15 Como se hace referencia en el presente documento, un sujeto es un animal, preferiblemente un animal mamífero, por ejemplo, una vaca, caballo, oveja, cerdo, cabras, conejos, gatos, perro, especialmente, preferiblemente, un ser humano.
- 20 Como se define en el presente documento, "tratamiento" se refiere a reducir, aliviar o eliminar uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno o infección que se está tratando, con respecto a los síntomas antes del tratamiento. "Prevención" se refiere a retrasar o prevenir la aparición de los síntomas de la enfermedad, trastorno o infección.
- 25 Las composiciones de la presente invención también pueden comprender una célula que contiene una molécula que se ha internalizado en el citosol de dicha célula mediante un método de la invención. La invención se extiende además a tales composiciones para su uso en terapia, particularmente cáncer o terapia génica.
- 30 Por lo tanto, otro aspecto más de la invención proporciona una célula o una población de células que contiene una molécula que se ha internalizado en el citosol de dicha célula, célula que se puede obtener mediante un método de la presente invención.
- 35 Un aspecto adicional más de la invención proporciona el uso de tal célula o población de células para la preparación de una composición o un medicamento para su uso en terapia como se ha descrito anteriormente en el presente documento, preferiblemente, cáncer o terapia génica.
- 40 La invención proporciona además células o composiciones para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de un paciente que comprende administrar a dichas células de paciente o composiciones de la presente invención, es decir, un método que comprende las etapas de introducir una molécula en una célula como se ha descrito anteriormente en el presente documento y administrar dicha célula preparada de este modo a dicho paciente. Preferiblemente, dichos métodos se usan para tratar cáncer o en terapia génica (o para vacunación como se describe en lo sucesivo en el presente documento).
- 45 *In vivo*, puede usarse cualquier modo de administración común o estándar en la técnica, por ejemplo, inyección, infusión, administración tópica, administración transdérmica, tanto a superficies internas como externas del cuerpo, etc. Para uso *in vivo*, la invención se puede usar en relación con cualquier tejido que contenga células en las que está localizado el agente fotosensibilizante que contiene el compuesto o la molécula a internalizar, incluidas las ubicaciones de fluidos corporales, así como los tejidos sólidos. Todos los tejidos se pueden tratar siempre que el fotosensibilizante sea absorbido por las células diana y la luz se pueda administrar adecuadamente.
- 50 Por lo tanto, las composiciones de la invención se pueden formular de cualquier manera conveniente de acuerdo con técnicas y procedimientos conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, usando uno o más diluyentes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. "Farmacéuticamente aceptable" como se define en el presente documento, se refiere a ingredientes que son compatibles con otros ingredientes de las composiciones, así como fisiológicamente aceptables para el receptor. La naturaleza de la composición y los vehículos o materiales excipientes, dosificaciones, etc. se pueden seleccionar de manera rutinaria según la elección y la vía de administración deseada, el propósito del tratamiento, etc. Las dosificaciones también se pueden determinar de manera rutinaria y pueden depender de la naturaleza de la molécula, el propósito del tratamiento, la edad del paciente, el modo de administración, etc. En relación con el agente fotosensibilizante, también se debe tener en cuenta la potencia/capacidad de alterar las membranas con la irradiación.
- 55 Un uso adicional de los compuestos y composiciones de la presente invención se encuentra en los protocolos de vacunación, ya que los métodos PCI pueden usarse para presentar o expresar antígenos en la superficie de una célula. Por lo tanto, después del transporte y la liberación de una molécula a internalizar en el citosol de la célula mediante PCI, se puede transportar a la superficie donde se puede presentar en el exterior de la célula, es decir, en la superficie celular. Este método tiene una utilidad particular en el campo de la vacunación, donde los componentes

de la vacuna, es decir, antígenos o inmunógenos, pueden introducirse en una célula para su presentación en la superficie con el fin de inducir, facilitar o aumentar una respuesta inmune.

Por lo tanto, la presente invención proporciona compuestos o composiciones para su uso en un método para expresar una molécula antigénica (por ejemplo, un antígeno) o parte de la misma en la superficie de una célula, preferiblemente una célula presentadora de antígeno, comprendiendo dicho método introducir una molécula en el citosol celular mediante PCI usando los compuestos y métodos como se describe en el presente documento, en donde dicha molécula, o parte de la misma, se presenta posteriormente en la superficie de dicha célula.

- 10 Como alternativa a lo expresado, la presente invención proporciona compuestos o composiciones para su uso en un método para expresar una molécula antigénica o una parte de la misma en la superficie de una célula, que comprende poner en contacto dicha célula con dicha molécula antigénica y un compuesto como se define en el presente documento, e irradiar la célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador del compuesto, en donde dicha molécula antigénica se libera en el citosol de la célula y la molécula antigénica o una parte de la misma, de tamaño suficiente para estimular una respuesta inmune, se presenta sobre la superficie de la célula.

Como se usa en el presente documento, "expresar" se refiere a la presencia de la molécula antigénica o una parte de la misma en la superficie de dicha célula de tal forma que al menos una porción de esa molécula quede expuesta y accesible al entorno que rodea la célula. Puede lograrse la expresión en la "superficie" en la que la molécula que se va a expresar está en contacto con la membrana celular y/o los componentes que pueden estar presentes o pueden estar presentes en esa membrana.

25 Dicha presentación antigénica puede dar lugar ventajosamente a la estimulación de una respuesta inmune, preferiblemente una respuesta inmune que confiere protección contra una exposición posterior por una entidad que comprende o contiene dicha molécula antigénica o parte de la misma, y por consiguiente, la invención encuentra utilidad particular como método de vacunación.

30 Más particularmente, este aspecto de la invención proporciona compuestos o composiciones para su uso en un método para expresar una molécula antigénica o una parte de la misma en la superficie de una célula, comprendiendo dicho método:

35 poner en contacto dicha célula con dicha molécula antigénica y con un compuesto de la presente invención, en donde dicha molécula y dicho compuesto se toman cada uno en un compartimento limitado a la membrana intracelular de dicha célula; e
irradiar dicha célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador del compuesto, de tal forma que la membrana de dicho compartimento intracelular se rompa, liberando dicha molécula en el citosol de la célula, sin matar a la célula,
en donde, dicha molécula antigénica liberada, o una parte de la misma, se presenta posteriormente en la superficie de dicha célula.

40 Como se usa en el presente documento, un compartimento "alterado" se refiere a la destrucción de la integridad de la membrana de ese compartimento de forma permanente o temporal, suficiente para permitir la liberación de la molécula antigénica contenida en su interior.

45 Como alternativa a lo visto, este aspecto de la invención también proporciona un compuesto o composición para su uso en la expresión de una molécula antigénica o una parte de la misma en la superficie de una célula, por ejemplo, para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o infección en un sujeto, preferiblemente para generar o estimular una respuesta inmune, preferiblemente un método de vacunación. Dicha composición preferiblemente comprende una molécula antigénica y un compuesto de la presente invención. Preferiblemente, dicha composición es farmacéuticamente aceptable y contiene también un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Preferiblemente, dicho tratamiento o prevención se logra usando un método descrito en el presente documento.

55 En un aspecto adicional, la invención también proporciona el uso de una molécula antigénica y/o un compuesto de la presente invención en la preparación de un medicamento para su uso en la expresión de dicha molécula antigénica o una parte de la misma en la superficie de un célula, por ejemplo, para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o infección en un sujeto, preferiblemente para generar o estimular una respuesta inmune, preferiblemente un método de vacunación. Preferiblemente, dicho tratamiento o prevención se logra usando un método descrito en el presente documento.

60 Otro aspecto más de la invención proporciona un producto que comprende una molécula antigénica y un compuesto de la presente invención como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en la expresión de dicha molécula antigénica o una parte de la misma en la superficie de una célula, por ejemplo, para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o infección en un sujeto, preferiblemente para estimular una respuesta inmune.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un kit para su uso en la expresión de una molécula antigénica o una parte de la misma en la superficie de una célula, comprendiendo dicho kit

- 5 un primer recipiente que contiene dicha molécula antigénica; y
 un segundo recipiente que contiene un compuesto de la presente invención.

En la invención, la molécula antigénica puede ser cualquier molécula en la que esa molécula o una parte de la misma sea capaz de estimular una respuesta inmune, cuando se presenta al sistema inmune de una manera apropiada. Ventajosamente, por lo tanto, la molécula antigénica será un antígeno de vacuna o un componente de vacuna, tal como una entidad que contiene un polipéptido.

10 Muchos de tales antígenos o componentes de vacunas antigénicas se conocen en la técnica e incluyen todo tipo de antígenos bacterianos o víricos o, de hecho, antígenos o componentes antigénicos de cualquier especie patógena incluyendo protozoos u organismos superiores. Aunque tradicionalmente los componentes antigénicos de las vacunas han comprendido organismos completos (vivos, muertos o atenuados), es decir, vacunas de células completas, además de vacunas de subunidades, es decir, vacunas basadas en componentes antigénicos particulares de organismos, por ejemplo, proteínas o péptidos, o incluso carbohidratos, se han investigado ampliamente e informado en la bibliografía. Se puede usar cualquier componente de vacuna basada en "subunidades" como la molécula antigénica de acuerdo con la presente invención.

20 Sin embargo, la invención encuentra una utilidad particular en el campo de las vacunas peptídicas. Por lo tanto, una molécula antigénica preferida de acuerdo con la invención es un péptido (que se define en el presente documento para incluir péptidos de longitudes tanto más cortas como más largas, es decir, péptidos, oligopeptídos o polipeptídos, y también moléculas proteicas o fragmentos de las mismas, por ejemplo, péptidos de 5-500, por ejemplo, de 10 a 250 tal como de 15 a 75, o de 8 a 25 aminoácidos). Las partes de las moléculas antigénicas que se presentan o expresan preferiblemente comprenden partes que se generan mediante maquinaria de procesamiento de antígenos dentro de la célula. Sin embargo, las partes pueden generarse por otros medios que pueden lograrse mediante un diseño de antígeno apropiado (por ejemplo, bandas sensibles al pH), o a través de otros medios de procesamiento celular. Convenientemente, tales partes tienen un tamaño suficiente para generar una respuesta inmune, por ejemplo, en el caso de péptidos mayores de 5, por ejemplo, de más de 10 o 20 aminoácidos de tamaño.

30 Se ha propuesto en la bibliografía un gran número de candidatos de vacunas peptídicas, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades virales e infecciones tales como infección por VIH/SIDA o gripe, parvovirus canino, virus de la leucemia bovina, hepatitis, hepatitis, etc. (véase, por ejemplo, Phanuphak *et al.*, Asian Pac. J. Allergy. Immunol. 1997, 15(1), 41-8; Naruse, Hokkaido Igaku Zasshi 1994, 69(4), 811-20; Casal *et al.*, J. Virol., 1995, 69(11), 7274-7; Belyakov *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95(4), 1709-14; Naruse *et al.*, Proc. Natl. Sci. USA, 1994 91(20), 9588-92; Kabeya *et al.*, Vaccine 1996, 14(12), 1118-22; Itoh *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83(23) 9174-8.

40 De forma similar, pueden usarse péptidos bacterianos, como también pueden ser antígenos peptídicos derivados de otros organismos o especies.

45 Además de los antígenos derivados de organismos patógenos, también se han propuesto péptidos para su uso como vacunas contra el cáncer u otras enfermedades tales como esclerosis múltiple. Por ejemplo, los péptidos de oncogenes mutantes son muy prometedores como vacunas contra el cáncer que actúan como antígenos en la simulación de linfocitos T citotóxicos. (Schirrmacher, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 1995, 121,443- 451; Curtis Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers, 1997, 17, 316-327). También se ha evaluado una vacuna de péptido sintético para el tratamiento del melanoma metastásico (Rosenberg *et al.*, Nat. Med. 1998, 4(3), 321-7). Una vacuna peptídica del receptor de linfocitos T para el tratamiento de la esclerosis múltiple se describe en Wilson *et al.*, J. Neuroimmunol. 1997, 76(1-2), 15-28. Puede usarse cualquiera de tales componentes de vacuna peptídica como la molécula antigénica de la invención, como de hecho puede cualquiera de los péptidos descritos o propuestos como vacunas peptídicas en la bibliografía.

55 Por lo tanto, el péptido puede ser sintético o aislado o derivado de otro modo de un organismo.

55 La célula que se somete a los métodos, usos, etc. de la invención puede ser cualquier célula que sea capaz de expresar, o presentar en su superficie una molécula que se administra o transporta a su citosol.

60 La célula es convenientemente una célula efectora inmune, es decir, una célula implicada en la respuesta inmune. Sin embargo, otras células también pueden presentar antígeno para el sistema inmune y estas también están dentro del alcance de la invención. Las células de acuerdo con la presente invención son así ventajosamente células presentadoras de antígeno. La célula presentadora de antígeno puede estar implicada en cualquier aspecto o "brazo" de la respuesta inmune, incluyendo la inmunidad tanto humoral como mediada por células, por ejemplo, la estimulación de la producción de anticuerpos, o la estimulación de células citotóxicas o asesinas, que pueden reconocer y destruir (o eliminar de otra manera) las células que expresan antígenos "extraños" en su superficie. Por

lo tanto, el término "estimular una respuesta inmune" incluye todos los tipos de respuestas inmunes y mecanismos para estimularlas.

5 La estimulación de células citotóxicas o células productoras de anticuerpos requiere que los antígenos se presenten en la célula a estimular de manera particular por las células presentadoras de antígeno, por ejemplo, presentación de MHC de Clase I (por ejemplo, la activación de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ requiere la presentación de antígeno MHC-1).

10 Las células presentadoras de antígeno se conocen en la técnica y se describen en la bibliografía e incluyen, por ejemplo, linfocitos (tanto linfocitos T como B), células dendríticas, macrófagos, etc. Otras incluyen, por ejemplo, células cancerosas, por ejemplo, células de melanoma.

15 Para la presentación del antígeno por una célula presentadora de antígeno a un linfocito T citotóxico (CTL), la molécula antigénica necesita entrar en el citosol de la célula presentadora de antígeno (Germain, Cell, 1994, 76, 287-299). La presente invención proporciona un medio eficaz de administración de la molécula antigénica en el citosol.

20 Una vez liberada en el citosol celular por el proceso de internalización fotoquímica, la molécula antigénica puede procesarse mediante la maquinaria de procesamiento de antígeno de la célula y presentarse en la superficie celular de una manera apropiada, por ejemplo, por Clase I MHC. Este procesamiento puede implicar la degradación del antígeno, por ejemplo, degradación de una proteína o antígeno polipeptídico en péptidos, péptidos que luego se complejan con moléculas del MHC para su presentación. Por lo tanto, la molécula antigénica expresada o presentada en la superficie de la célula de acuerdo con la presente invención puede ser una parte o fragmento de la molécula antigénica que se internaliza (en endocitosis).

25 Los antígenos pueden tomarse por las células presentadoras de antígeno mediante endocitosis y degradarse en las vesículas endocíticas en los péptidos. Estos péptidos se pueden unir a las moléculas MHC de clase II en los endosomas y transportarse a la superficie celular donde el complejo péptido-MHC de clase II puede ser reconocido por los linfocitos T auxiliares CD4⁺ e inducir una respuesta inmune. Como alternativa, las proteínas en el citosol 30 pueden degradarse, por ejemplo, por proteasomas y transportarse al retículo endoplasmático mediante TAP (transportador asociado a la presentación de antígenos) donde los péptidos se pueden unir a moléculas de MHC de clase I y transportarse a la superficie celular (Yewdell y Bennink, 1992, *Adv. Immunol.* 52: 1-123). Si el péptido es de origen de antígeno extraño, el complejo péptido-MHC clase I será reconocido por los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL). Los CTL se unirán al complejo péptido-MHC (HLA) de clase I y, por lo tanto, se activarán, comenzarán a proliferar y formarán un clon de CTL.

35 La célula diana y otras células diana con el mismo complejo péptido-MHC de clase I en la superficie de las células pueden ser destruidas por el clon de CTL. La inmunidad contra el antígeno extraño se puede establecer si se puede introducir una cantidad suficiente del antígeno en el citosol (Yewdell y Bennink, 1992, anteriormente; Rock, 1996, *Immunology Today* 17: 131-137). Esta es la base para el desarrollo, entre otras cosas, de vacunas contra el cáncer.

40 Uno de los mayores problemas prácticos es introducir cantidades suficientes de antígenos (o partes del antígeno) en el citosol. Esto puede resolverse de acuerdo con la presente invención.

45 Estos métodos se pueden usar *in vitro* o *in vivo*, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

50 Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención proporciona una célula presentadora de antígeno que expresa una molécula antigénica, o una parte de la misma, en su superficie, célula que se puede obtener (o se obtiene) mediante un método como se ha definido anteriormente en el presente documento. Otros aspectos de la invención proporcionan una población o cultivo de tales células, especialmente una población o cultivo viable y funcionalmente intacto de dichas células, y también tal célula (o población o cultivo de células) para su uso en terapia, particularmente para estimular una inmunidad respuesta, y especialmente para estimular CTL.

55 También se proporciona el uso de tal célula (o población o cultivo de células) para la preparación de un medicamento (por ejemplo, una composición de vacuna) para estimular una respuesta inmune, y especialmente para estimular CTL.

60 La invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes Ejemplos con referencia a los siguientes dibujos en los que:

La Figura 1 muestra compuestos particularmente preferidos de la presente invención (TPC = tetrafenilclorina).

65 La Figura 2 muestra el Esquema 1: Ruta sintética para la síntesis del compuesto 5. Reactivos y condiciones: (a) ácido propiónico, reflujo, 1 h (20 %); (b) NaNO₂ (1,8 equiv.), TFA, ta, 3 min, al 67 %; (c) SnCl₂.2H₂O, HCl conc., 60 °C, 1 h (88 %); (d) Bromuro de bromoacetilo, Et₃N, CH₂Cl₂, ta, 1 h (64 %) (e) Piperazina, CH₂Cl₂, ta, 1 h (94 %).

La Figura 3 muestra el Esquema 2. Síntesis de derivados de quitosano N-modificados (TPP-CS-TMA y TPP-CS-MP). Aquí, A representa compuestos del 1^{er} lote y B presenta compuestos del 2^o lote. Reactivos y condiciones: (a) MeSO₃H/H₂O, 10 °C-ta, 1 h, (90 %); (b) TBDMSCl, imidazol, DMSO, ta, 24 h (96 %); (c) Bromuro de bromoacetilo, Et₃N, CH₂Cl₂, -20 °C, 1 h (92 %); (d) compuesto 5, es decir TPP-NH-Pip (0,1 o 0,25 equiv.), Et₃N, CHCl₃, ta, 2 h (92-90 %) (e) NMe₃ o 1-metil piperazina, CHCl₃, ta, 24 h (f) TBAF, NMP, 55 °C, 24 h o HCl conc./MeOH, ta, 24 h.

La Figura 4 muestra la superposición de los espectros FT-IR representativos de todos los intermedios y el compuesto final en la síntesis de TPPp_{0,1}-CS-MP_{0,9} (18A): (A) TPP-NH-Pip 5; (B) BrA-DiTBDMS-C 9; (C) TPPp_{0,1}-CH₂CO-DiTBDMS-C 10A; (D) TPPp_{0,1}-DiTBDMSC 14A; (E) TPPp_{0,1}-CS-MP_{0,9} 18A.

La Figura 5 muestra la superposición de los espectros ¹H RMN representativos de todos los intermedios y el compuesto final en la síntesis de TPPp_{0,1}CS-MP_{0,9} (18A): (A) DiTBDMSC 8; (B) BrA-DiTBDMS-C 9; (C) TPPp_{0,1}-CH₂CO-DiTBDMS-C 10A; (D) TPPp_{0,1}-DiTBDMSC 14A; (E) TPPp_{0,1}-CS-MP_{0,9} 18A.

La Figura 6 muestra la división de compuestos disueltos en el sistema de dos fases acuoso:CHCl₃. (A) TPP(p-NH₂)₁ 3 (B) TPPNH-Pip 5 (C) TPPp_{0,25}-CS-TMA_{0,75} 17A (D)TPPp_{0,25}-CS-MP_{0,75} 19A. Las fases acuosas se muestran en la parte superior.

La Figura 7 muestra el espectro ¹³C RMN en estado sólido de los compuestos finales representativos de TPPp_{0,25}-CS-TMA_{0,75} (17B) y TPPp_{0,25}-CS-MP_{0,75} (19B).

La Figura 8 muestra I) los espectros de ¹H RMN de TPPp_{0,25}-CS-TMA_{0,75} 17B en los disolventes: (A) DMSO-d₆: D₂O (98:2); (B) DMSOd₆: D₂O (75:25); (C) DMSO-d₆: D₂O (50:50); (D) DMSO-d₆: D₂O (25:75); (E) DMSO-d₆: D₂O (0:100); (II) UV-vis. Superposición de espectros de absorción de TPPp_{0,25}-CS-TMA_{0,75} 17B a concentración constante (0,3 mg/l) en co-disolventes: (A) DMSO: H₂O (100:0); (B) DMSO: H₂O (75:25); (C) DMSO: H₂O (50:50); (D) DMSO: H₂O (25:75); (E) DMSO: H₂O (0:100); (III) Superposición de espectros de emisión de fluorescencia de TPPp_{0,25}-CS-TMA_{0,75} 17B a absorbancia constante (0,85-0,90; datos no mostrados) y cuando se excita a 419 nm (ranura 3-3) en co-disolventes: (A) DMSO: H₂O (100:0); (B) DMSO: H₂O (75:25); (C) DMSO: H₂O (50:50); (D) DMSO: H₂O (25:75); (E) DMSO: H₂O (0:100).

La Figura 9 muestra (A) imagen SEM de nanopartículas aisladas de TPP-CS-TMA (B) imagen SEM de nanoagregados dendríticos de TPP-CS-TMA (C) Gráfico de los ángulos de contacto de derivados de TPP-CS.

La Figura 10 muestra el Esquema 3 - Esquema de síntesis para los compuestos 1, 3, 20 y 21. Reacciones y condiciones: ((a) Ácido propiónico, refluxo, 1 h, (20 %); (b) NaNO₂ (1,8 equiv.), TFA, ta, 3 min; (c) SnCl₂.2H₂O, HCl conc., 60 °C, 1 h, (54 %); (d₁) p-Toluenosulfonilhidrazida, K₂CO₃, piridina, refluxo, 24 h; (d₂) o-Cloranilo, CH₂Cl₂, ta, (80 %); (e) Cloruro de cloroacetilo, Et₃N, CH₂Cl₂, ta, 2 h, *in situ*-(f) Piperazina, CH₂Cl₂, ta, 12 h, (61 %). Todos los derivados del compuesto 20 y 21 contendrán el isómero TPCa₁ y el isómero TPCa₂. Sin embargo, solamente la estructura TPCa₁ se muestra en los esquemas y en los dibujos de estructuras.

La Figura 11 muestra el Esquema 4 - Esquema de síntesis para los compuestos 22-28. Reacciones y condiciones: (a) Cloruro de acetilo, MeOH, refluxo, 24 h, (87 %); (b) BF₃.Et₂O, CHCl₃, ta, p-cloranilo, 48 h, (14 %); (c) KOH 2 N (en MeOH), THF:Piridina (10:1), refluxo, 24 h (71 %); (d₁) p-Toluenosulfonilhidrazida, K₂CO₃, Piridina, refluxo, 24 h; (d₂) o-cloranilo, CH₂Cl₂: MeOH (75:25), ta, (70 %); (e) EDCI.HCl, HOBT, Et₃N, N-Boc-piperazina 5, DMF, ta, 24 h (54 %) (f) TFA, CH₂Cl₂, ta, 1 h (89 %). Todos los derivados del compuesto 26-28 contendrán el isómero TPCc₁ y el isómero TPCc₂. Sin embargo, solamente la estructura TPCc₁ se muestra en los esquemas y en los dibujos de estructuras.

La Figura 12 muestra Esquema 5 - Síntesis de los compuestos 7-9. Reactivos y condiciones: (a) MeSO₃H/H₂O, 10 °C-ta, 1 h, (90 %); (b) TBDMSCl, imidazol, DMSO, ta, 24 h, (96 %); (c) Bromuro de bromoacetilo, Et₃N, CH₂Cl₂, -20 °C, 1 h, (92 %).

La Figura 13 muestra el Esquema 6A y 6B. Reactivos y condiciones (6A): (a) compuesto 21, es decir, TPC-NH-Pip (0,1 equiv.), Et₃N, CHCl₃, ta, 2 h (78 %) (b) NMe₃ o 1-metil piperazina, CHCl₃, ta, 24 h. Reactivos y condiciones (6b): a) compuesto 28, es decir, TPC-CO-Pip (0,1 equiv.), Et₃N, NMP, 75 °C, 12 h (89 %) (b) NMe₃ o 1-metil piperazina, CHCl₃, ta, 24 h.

La Figura 14 muestra el espectro de ¹H RMN de TPC-CO-Pip (28) en CDCl₃. Se muestran los dos isómeros.

La Figura 15 muestra el espectro de ¹H RMN del compuesto 21 (TPC-NH-Pip) en CDCl₃ (Se muestran los dos isómeros).

La Figura 16 muestra el espectro ¹H RMN del compuesto 29 en CDCl₃. Este compuesto contiene los isómeros TPCa1 y TPCa2.

La Figura 17 muestra el espectro ^1H RMN del compuesto 34 en CDCl_3 . Este compuesto contiene el isómero TPCc1 y el isómero TPCc2.

5 La Figura 18 muestra los espectros de RMN de los compuestos portadores finales (37, 38, 32 y 33) en d_6 - $\text{DMSO}/\text{D}_2\text{O}$.

10 La Figura 19 muestra la transfección con pEGFP-N1 en células HCT116/LUC. La transfección se midió 48 h después de la iluminación mediante citometría de flujo. La supervivencia celular se midió mediante el ensayo MTT. (a) 16A. 0,1 mg/ml de TPP. (b) 16B. 0,1 mg/ml de TPP. (c) 17A. 0,01 mg/ml de TPP. (d) 19A. 0,01 mg/ml de TPP. (e) TPCS_{2a}. 0,1 mg/ml.

15 La Figura 20 muestra la transfección con pEGFP-N1 en células HCT116/LUC. La transfección se midió 48 h después de la iluminación mediante citometría de flujo. La supervivencia celular se midió mediante el ensayo MTT. (a) compuesto 37. 0,05 mg/ml de TPC. (b) compuesto 38. 0,05 mg/ml de TPC. (c) compuesto 32. 0,05 mg/ml de TPC. (d) compuesto 33. 0,05 mg/ml de TPC. (e) TPCS_{2a}. 0,1 mg/ml.

20 La Figura 21 muestra la transfección con pEGFP-N1 en células HCT116/LUC. La transfección se midió 48 h después de la iluminación mediante citometría de flujo. La supervivencia celular se midió mediante el ensayo MTT. El compuesto 54 se usó a una concentración de 0,1 mg/ml.

25 La Figura 22 muestra imágenes de bioluminiscencia *in vivo* después del tratamiento de PCI de animales portadores de tumor con conjugados de quitosano y bleomicina. Los animales se trataron como se describe en la sección de Materiales y Métodos del Ejemplo 3. Se indica el tratamiento para cada animal y el punto de tiempo para la obtención de imágenes (días después de la inyección del fotosensibilizador).

30 La Figura 23 muestra el crecimiento de tumores después del tratamiento con PCI de animales portadores de tumor con el compuesto 37, 38 o 33 y bleomicina. Los animales se trataron como se describe en Materiales y Métodos en el Ejemplo 3. PS: fotosensibilizador.

35 La Figura 24 muestra el esquema 7 - La síntesis de reactivos para TEGilación y PEGilación. Condiciones de reacción: (a) KOH, p-TsCl, THF/ H_2O , ta, 12 h; (b) Piperazina, CH_3CN , ta, 12 h, (41 %); (c) oxidación de Swern: (COCl)₂, CH_2Cl_2 , DMSO, Et₃N, -78 °C.

40 La Figura 25 muestra el Esquema 8 - TEGilaciones y DiTBDMS-Quitosano. Reactivos y condiciones: (a) MeSO₃H/ H_2O , 10 °C-ta, 1 h, (90 %); (b) TBDMS-Cl, imidazol, DMSO, ta, 24 h (96 %); (c) TEG-OTs 42, Cs₂CO₃, NMP, KI, 50 °C, 24 h; (d) HCl/ MeOH (30 % v/v), ta, 24 h; (e) Bromuro de bromoacetilo, Et₃N, CH₂Cl₂, -20 °C, 1 h (92 %), (f) TEG-Pip 46 Et₃N, CH₂Cl₂, ta, 24 h; (g) HCl/ MeOH (30 % v/v), ta, 24 h.

45 La Figura 26 muestra el Esquema 9 - La síntesis de conjugados de quitosano-TPP TEGilados. Reactivos y condiciones: (a) Bromuro de bromoacetilo, Et₃N, CH₂Cl₂, -20 °C, 1 h (92 %), (b) TPP-NH-Pip 5 (0,1 equiv.), CH₂Cl₂, Et₃N, ta, (c) TEG-PIP (compuesto 46) (2 equiv.), CH₂Cl₂, Et₃N, ta, 24 h (d) 30 % (v/v) HCl en MeOH, ta, 12 h; (e) Compuesto 4 (0,25 equiv.), NMP, 50°C, Cs₂CO₃, 24 h; (f) TEG-monoetiléter-tosilato (compuesto 42), NMP, 50°C, KI, 24 h (g) 30 % (v/v) HCl en MeOH, ta, 12 h.

50 La Figura 27 muestra la ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d6: D₂O, 96:4) del compuesto 54.

55 La Figura 28 muestra la producción de IL-2 en macrófagos primarios murinos que se incubaron con el compuesto 32 (A) y 38 (B) y el antígeno peptídico de ovoalbúmina OVA 257-264 en un entorno de linfocitos T específico de antígeno con un clon de linfocitos T CD8+ específico de ovoalbúmina (OVA 257-264). La producción de IL-2 a partir de linfocitos T CD8+ activados se analizó mediante ELISA.

Ejemplo 1 - Síntesis de nanovehículos a base de meso-tetrafenilporfirina-quitosano

60 Se sintetizaron nanovehículos de quitosano altamente solubles en agua unidos al fotosensibilizador meso-tetrafenilporfirina (TPP), en un procedimiento de 7 etapas, a partir de 3,6-di-O-terc-butildimetilsilil-quitosano (DiTBDMS-CS) y 5-(p-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina [TPP(p-NH₂)₁] como materiales de partida. DiTBDMS-CS es altamente soluble en CH₂Cl₂ y, por lo tanto, el fotosensibilizador altamente lipófilo podría introducirse en una reacción cuantitativa para dar 0,1 y 0,25 grados de sustitución. Esto se siguió de la introducción de grupos trimetilamonio y/o 1-metilpiperazinilo en el esqueleto del polímero con el fin de aumentar la solubilidad acuosa de los vehículos desprotegidos finales. Se demostró que el método es altamente reproducible y que el material obtenido podría caracterizarse completamente por RMN en estado sólido, FT-IR, y ^1H RMN. Las investigaciones con UV-Vis, fluorescencia y RMN mostraron que los vehículos son estructuras dinámicas, que forman estructuras de tipo nanopartículas en solución acuosa con un núcleo de fotosensibilizadores π -apilados semisólidos. En entornos lipófilos, es probable que estas estructuras se puedan desplegar y, por lo tanto, el resto del fotosensor puede insertarse en la membrana celular.

Materiales y métodos generales

El polímero de quitosano fue donado por Genis EHF, Islandia, y se usó para la síntesis [polímero de quitosano GO 30626-2 (95 % de DD, 95 cp)]. Todos los disolventes y reactivos se compraron comercialmente y se usaron sin purificación adicional. Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro de RMN Bruker DRX de 400 MHz a 298 K y se informaron desplazamientos químicos con respecto al disolvente de RMN deuterado usado [^1H RMN: CDCl₃ (7,26 ppm), DMSO-d₆ (2,50 ppm); ^{13}C RMN: CDCl₃ (77,16 ppm), DMSO-d₆ (39,52 ppm)]. El pico de acetona (2,22 ppm) se usó como patrón interno para D₂O como disolventes. Los protones (*ortho*, *meta*, *para*) en los anillos de fenilo de porfirinas se identifican con respecto a sus posiciones relativas al sistema de anillo de porfirina y no con respecto al sustituyente en el anillo de fenilo.

La ^{13}C RMN en estado sólido de los compuestos 17B y 19B se obtuvo del Departamento de química, Durham University. Estos espectros se obtuvieron usando un espectrómetro Varian VRMNS que funcionaba a 100,56 MHz para ^{13}C . Se llevaron a cabo experimentos de rotación en ángulo mágico de polarización cruzada con una sonda de 6 mm (rotor o.d.). Los espectros se registraron a una velocidad de giro de 6,8 kHz, con un tiempo de contacto de 1 ms, un retardo de reciclado de 1,5 s y con supresión de banda lateral giratoria "TOSS". La referencia espectral es con respecto a una muestra externa de tetrametilsilano puro llevado a cabo indirectamente mediante el ajuste de la señal de alta frecuencia de adamantano a 38,5 ppm.

Los espectros de masas se registraron en un Bruker Autoflex III o Bruker micrOTOF-Q11. Las mediciones de FTIR se realizaron con un instrumento AVATAR 370 FT-IR (Thermo Nicolet Corporation, Madison, Estados Unidos). Las muestras (2-3 mg) se amasaron a fondo con KBr. La muestra se prensó en gránulos con un compresor Specac (Specac Inc., Smyrna, Estados Unidos). Los puntos de fusión se registraron en Melting Point B-540 de Buchi. Las muestras de polímero se dializaron utilizando membrana de diáisis Spectra/Por (MWCO: 3500).

Absorción y espectros de fluorescencia de estado estable.

Se registraron las mediciones de UV-Vis en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 25 UV-Vis equipado con un programador de temperatura Peltier. Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron usando un espectrómetro SPEX FluoroMax, usando una celda con un intervalo espectral de 170-2200 nm (Spectrocell Corporation, Oreland, PA, Estados Unidos). Los espectros de absorción se registraron a 20 °C y los espectros de emisión de fluorescencia se registraron a temperatura ambiente, usando una cubeta de cuarzo con una longitud de trayectoria de 10 mm. Todos los espectros de fluorescencia se registraron con anchuras de rendija constantes, 1 nm para la excitación y 1 nm para la emisión y los espectros de fluorescencia se promediaron en tres escaneos para el estudio de rendimiento cuántico. Sin embargo, para la figura 5 (III) se obtuvieron espectros de fluorescencia con anchuras de rendija de 3 nm para la excitación y 3 nm para la emisión.

Se determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia de los compuestos 3, 5, 16A-19B (todos excitados en $\lambda_{\text{ex.}} = \text{Amax} = 419$ nm) con respecto a una solución diluida de antraceno estándar ($\Phi_F = 0,27$, $\text{Aex} = 365,5$ nm) en etanol absoluto utilizando el método comparativo de estado estable usando la siguiente ecuación:

$$\Phi_X = \Phi_{\text{ST}} (\text{Grad}_X / \text{Grad}_{\text{ST}}) (\eta_X^2 / \eta_{\text{ST}}^2)$$

donde, los subíndices ST y X representan estándar y prueba respectivamente, Φ es el rendimiento cuántico de fluorescencia, Grad el gradiente de la gráfica de intensidad de fluorescencia integrada frente a la absorbancia, y η el índice de refracción del disolvente.

Estudio de estabilidad:

Para el estudio de estabilidad física 17A se disolvió en H₂O (1 mg/ml), se sonicó durante 30 minutos, se centrifugó (en HERMLE Z-320 4000 rpm durante 10 min), se decantó y se envolvió con papel de aluminio. La absorbancia UV-Vis se midió a $\lambda_{\text{máx}} = 419$ nm en H₂O durante el periodo de 0-90 días.

Determinación del grado de sustitución (DS) por ^1H RMN.

Para calcular los grados de sustitución de TPP-NH-Pip, se usó la ^1H RMN de los compuestos finales. Para calcular el DS de los compuestos finales 16A-19B, se usaron los valores de integración de los picos de TPP (de la parte de TPP-NH-Pip) y los de los picos de H-1 (de la parte de quitosano). Se consideró la integral de TPP (cuatro picos de la región aromática), mientras que las integrales del grupo H-1 se calcularon y se usaron en las siguientes ecuaciones:

$$DS = \frac{\int \text{Picos TPP aromáticos } I_{27})}{(\int H - 1 \text{ pico } I_1)}$$

En esta condición, el esqueleto del polímero está parcialmente solapado por el pico HDO, pero el DS puede determinarse con buena precisión a partir de la relación relativa de las integrales del pico H-1 y los picos de TPP.

Para calcular el DS de TPC-NH-Pip y TPC-CO-Pip, se usaron los compuestos intermedios 29 y 34 y los valores de integración de los picos de TPC (de TPC-NH-Pip o TPC-CO-Pip en la región aromática, así como las integraciones del pico de α -pirrol NH) y los de la integración de picos de TBDMS (de quitosano) en las siguientes ecuaciones:

$$\frac{DS}{= \left(\int \text{Picos TPC aromáticos} + \text{Pico } \alpha \text{ pirrol NH} / 27 \right) / \left(\int \text{Picos TBDMS} / 30 \right)}$$

10 Para calcular el DS de la TEGilación, para diversos derivados de quitosano, se usó la ^1H RMN correspondiente. Se consideraron los valores de integración del pico H-1 de quitosano y el valor de integración de CH_3 (del pico de etilo terminal de TEG) en un esqueleto de quitosano. El valor de integración para el triplete de etilo será igual a 3 si el grado de sustitución es del 100 %. Por lo tanto, la ecuación es la siguiente:

$$15 DS (\%) = \left(\int \text{Pico de etilo (triplete final, } \text{CH}_3 \text{)} / 3 \right) / \left(\int \text{H - 1 pico} / 1 \right) * 100\%$$

SEM y elipsometría.

20 Las soluciones se revistieron por centrifugación a 1000 rpm sobre sustratos de silicio <100> prístinos (15 mm x 15 mm) usando una centrifugadora convencional en un entorno de sala limpia Clase-100. El silicio tiene una capa de óxido nativo de aproximadamente 15 Å de espesor. Además, 10 μl de las mismas soluciones se añadieron por pipeteo directamente sobre sustratos de silicio y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente. Los sustratos revestidos se obtuvieron en imágenes en un microscopio de barrido electrónico Zeiss LEO 1550 a un voltaje de aceleración de 10 keV y una distancia de trabajo de 2 mm usando un detector en la lente.

25 Mediciones del ángulo de contacto de agua.

30 Los ángulos de contacto con el agua se determinaron usando un medidor de ángulo de contacto óptico KSV CAM 200 (Instrumentos KSV). Se dejó caer una gota de agua desionizada de 5 μl en el centro de la oblea de silicona y se determinaron los ángulos de contacto con el agua en base a la ecuación de Laplace y Young. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente y humedad ambiental.

Síntesis

35 Véase el esquema 1 en la Figura 2 para la síntesis de TPP-NH-Pip

Meso-Tetrafenilporfirina (1). Siguiendo el procedimiento de la bibliografía (Adler, J Organic Chem 1967, 32:476).

40 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirina [TPP(p-NO₂)₁] (2). Siguiendo el procedimiento de la bibliografía (Luguya R et al. Tetrahedron 2004, 60:2757).

5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina [TPP(p-NH₂)₁] (3). Siguiendo el procedimiento de la bibliografía (Luguya R et al. Tetrahedron 2004, 60:2757).

45 5-(4a-Bromoacetilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirina (4). El compuesto 3 (500 mg, 0,793 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (15 ml) y se agitó en una atmósfera de N₂. Se añadió trietilamina (0,24 ml, 1,75 mmol) seguido de la adición gota a gota de bromuro de bromoacetilo (0,097 ml, 1,11 mmol) a tasa y la agitación continuó a tasa durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó en CH_2Cl_2 (45 ml), se lavó con agua (2 x 25 ml) y salmuera (20 ml). Después, la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, usando CH_2Cl_2 y hexano como eluyente, lo que produjo 385 mg (64 %) del producto deseado 4. TLC (Hexano/ CH_2Cl_2 , 3:7): Fr = 0,17; FT-IR, ν cm⁻¹: 3313 (N-H), 3049,3019 (arilo C-H), 1687,1594 (CONH), 1556, 1514, 1471, 1439,1399, 1348, 1177, 1153, 964, 798, 726, 699; ^1H RMN (CDCl_3): δ = 8,88-8,91 (m. 8H, β -pirrol H), 8,41 (s a, 1H, TPPNHCO), 8,22-8,27 (m, 8H, tetrafenilo H_o), 7,91 (d, J = 8 Hz, 2H, CONH-fenil-H_m), 7,75-7,80 (m, 9H, trifenil-H_{m,p}), 4,15 (s, 2H, COCH₂Br), -2,70 (s a, 2H, α -pirrol NH) ppm; ^{13}C RMN (CDCl_3): δ = 163,78, 142,26, 139,20, 136,78, 135,25, 134,68, 131,23, 127, 87, 126,83, 120,42, 120,38, 119,24, 118,34, 29,72 ppm; MS (ESI): m/z calc. para C₄₆H₃₃BrN₅O ([M+H]⁺) 750,1863 observado 750,1864; UV-vis (DMSO): $\lambda_{\text{máx}}$: 417, 517, 542, 597, 650 nm.

55 5-(4a-Piperazinaacetilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirina [TPP-NH-Pip] (5). El compuesto 4 (275 mg, 0,366 mmol) y exceso de piperazina (158 mg, 1,83 mmol) se mezclaron entre sí en CH_2Cl_2 (10 ml) y se agitaron a tasa durante 1 h en

una atmósfera de N₂. Tras completarse la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (85 ml) y se lavó con agua (2 x 40 ml) y salmuera (35 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando 1:12 de MeOH: CH₂Cl₂ como eluyente para proporcionar el compuesto del título 5 (260 mg, 94 %) en forma de un sólido de color púrpura. TLC (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1): Fr = 0,15; FT-IR (KBr): v 3442 (pip. NH), 3312 (arilo N-H), 3052,3022 (arilo C-H), 2903, 2816 (CH₂ alifático), 1691,1596 (CONH),1557, 1517, 1471,1439, 1400, 1349, 1309, 1179, 1153, 1071, 1001,965, 799, 728, 700 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃): δ = 9,51 (s a, 1H, TPP-NHCO), 8,89-8,93 (m, 8H, β-pirrol H), 8,23-8,26 (m, 8H, tetrafenilo H_o), 8,01 (d, J = 8,0 Hz, 2H, Pip-NH-fenil-Hm), 7,75-7,81 (m, 9H, trifenil-Hm,p), 3,31 (s, 2H, COCH₂Pip.), 3,11 (t, 4H), 2,77 (t a, 4H), 2,60 (s a, 1H, piperazina NH), -2,71 (s a, α-pirrol 2H) ppm; ¹³C RMN (CDCl₃): δ = 168,75, 142,30, 138,26, 137,44, 135,33, 134,68, 131,26, 127,86, 126,83, 120,32, 119,66, 117,89, 62,87, 54,53, 46,24 ppm; MS (ESI): m/z calc. para C₅₀H₄₂N₇O ([M+H]⁺) 756,3445 observado 756,3467; UV-vis (DMSO): λ_{máx}: 417, 517, 542, 597, 650 nm.

Véase el esquema 2 en la Figura 3 y el Esquema 5 en la Figura 12

Mesilato de quitosano (7). Sintetizado de acuerdo con un procedimiento publicado previamente (Song et al. Carbohydrate Polymers 2010, 81:140).

3,6-O-di-terc-butildimethylsilyl quitosano [DiTBDMS-CS] (8). Sintetizado de acuerdo con un procedimiento publicado previamente (Song et al. Carbohydrate Polymers 2010, 81:140).

N-bromoacetil-3,6-O-DiTBDMS-CS [BrA-DiTBDMS-CS] (9). Se disolvió DiTBDMS-CS 8 (1 g, 2,60 mmol) en CH₂Cl₂ seco (15 ml) en un matraz de fondo redondo en una atmósfera de N₂. Después, la mezcla de reacción se enfrió a -20 °C con una mezclador de hielo/sal. Se añadió Et₃N (1,81 ml, 13 mmol) seguido de una adición gota a gota lenta de bromuro de bromoacetilo (0,91 ml, 10 mmol). Se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se concentró al vacío. El producto en bruto se agitó en acetonitrilo, se filtró y se lavó con acetonitrilo recién preparado. El material seco se disolvió y se extrajo en CH₂Cl₂, se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre Na₂SO₄, se concentró al vacío. Se obtuvieron 1,2 g del producto en polvo de color amarillo pálido 9 (rendimiento del 92 %). FT-IR (KBr): v 3402 (a, NH), 2957, 2931, 2886, 2858 (s, C-H TBDMS), 1682 (vs, C=O amida I), 1530 (vs, C=O amida II), 1473, 1391, 1362, 1311, 1259, 1101, 1005, 837, 777 (Si-C), 669 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃) δ ppm: 4,40 (s a, H-1), 4,02-3,26 (m, H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' y 2H GluNH-C=OCH₂Br), 0,90 y 0,88 (s a, (CH₃)₃C), 0,13 y 0,07 (s a, (CH₃)₂Si) ppm.

(N-TPP-NH-Pip-acetyl)_{0,1}-(N-bromoacetil)_{0,9}-DiTBDMS-CS [TPPp_{0,1}-BrA_{0,9}-DiTBDMS-CS] (10A). El compuesto 9 (700 mg, 1,38 mmol) y el compuesto NH-pip-TPP 5 (105 mg, 0,138 mmol) se disolvieron en CH₂Cl₂ en una atmósfera de N₂. Se añadió una cantidad equimolar exacta de Et₃N (19,3 μl, 0,130 mmol) con la respectiva a 5 y la mezcla de reacción se agitó a t a durante 24 h. El consumo total del material de partida se confirmó por TLC. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂, se extrajo, y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se concentró al vacío para producir 730 mg (92 %) del producto 10A. FT-IR (KBr): v 3324 (a, NH), 2955, 2929, 2884, 2856 (s, C-H TBDMS), 1678 (vs, C=O amida I), 1600,1524 (vs, C=O amida II), 1472, 1403, 1361, 1311, 1256, 1098,1004, 966, 837, 801, 778, 701, 670, 550 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃) δ ppm: 9,30 (s, TPPNHCO), 8,85 (m, β-pirrol H), 8,23-8,20 (m, fenil-Ho y Pip- NHTPP-fenil-Hm), 7,97 (d, J = 8,0 Hz, RNTPP-fenil-Ho), 7,79-7,73(m, trifenil-Hm,p), 4,41 (s a, H-1), 4,13-3,50 (m, H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' y 2H GluNH-C=O, TPPNHCOCH₂pip, CH₂CONGlc y (CH₂)₂ de piperazina), 2,81-2,86 (m, piperazina-H), 0,92, 0,89 (s a, (CH₃)₃C), 0,14, 0,07(s a, (CH₃)₂Si), -2,77 (s a, α-pirrol NH) ppm; UV-vis (DMSO): λ_{máx}: 417, 517, 542, 597, 650 nm.

TPPp_{0,1}-BrA_{0,9}-DiTBDMS-CS (10B): El compuesto 10B (1,3 mg, 91 %) se preparó exactamente según el procedimiento anterior usando el intermedio 5 (180 mg, 0,24 mmol) y 9 (1,2 g, 2,4 mmol).

TPPp_{0,25}-BrA_{0,75}-DiTBDMS-CS (11A). El compuesto 9 (550 mg, 1,09 mmol) y el compuesto NH-pip-TPP 5 (206 mg, 0,273 mmol) se disolvieron en CH₂Cl₂ en una atmósfera de N₂. Se añadió una cantidad equimolar exacta de Et₃N (38 μl, 0,27 mmol) con respecto a 5 y la mezcla de reacción se agitó a t a durante 24 h. El consumo total del material de partida se confirmó por TLC. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂, se extrajo, y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, y se concentró al vacío para producir 670 mg (91 %) del producto 11A. FT-IR (KBr): v 3317(a, NH), 2952, 2926, 2883, 2855 (s, C-H TBDMS), 1680 (vs, C=O amida I), 1598, 1520,1471, 1440, 1402, 1361, 1309, 1254, 1096, 1002, 966, 837, 800, 778, 730, 701, 667, 558 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃) δ ppm: 9,30 (s, TPPNHCO), 8,85 (m, β-pirrol H), 8,22-8,20 (m, fenil-Ho y Pip-NHTPP-fenil-Hm), 7,97 (d, J = 8,0 Hz, RNTPP-fenil-Ho), 7,80-7,75(m, trifenil-Hm,p), 4,40 (s a, H-1), 4,06-3,63 (m, H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' y 2H GluNH-C=O, TPPNHCOCH₂pip, CH₂CONGlc y (CH₂)₂ de piperazina), 2,81-2,86 (m, piperazina-H), 0,92, 0,89(s a, (CH₃)₃C), 0,14, 0,10, 0,07 y 0,02(s a, (CH₃)₂Si), -2,77 (s a, α-pirrol NH) ppm; UV-vis (DMSO): λ_{máx}: 417, 517, 542, 597, 650 nm.

TPPp_{0,25}-BrA_{0,75}-DiTBDMS-CS (11B): El compuesto 11B (1,35 g, 92 %) se preparó exactamente según el procedimiento anterior usando el intermedio 5 (415 mg, 0,55 mmol) y 9 (1,1 g, 2,18 mmol).

Procedimiento general A para la Síntesis de los compuestos 12A, 12B, 13A y 13B (N-TPP-NH-Pip-acetyl)_{0,1}-(N-(N,N,N-trimetilamonioil)acetil)_{0,9}-DiTBDMS-CS [TPPp_{0,1}-DiTBDMS-CS-TMA_{0,9}] (12A). El compuesto 10A (350 mg,

0,61 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 en una atmósfera de N_2 . Se añadió una cantidad en exceso de una solución de trimetilamina y la mezcla de reacción se agitó a t a durante 24 h. El disolvente se eliminó al vacío. El producto en bruto se secó completamente a alto vacío produciendo el producto en bruto 12A (420 mg, 99 %) en forma de un sólido de color púrpura. FT-IR (KBr): v 3426, 3021, 3011, 2962, 2855, 27,7, 2560, 2438, 1749, 1689, 1599, 1563, 1482, 1443, 1401, 1360, 1288, 1254, 1053, 1010, 966, 922, 901, 837, 797, 779, 744, 701, 671, 552 cm^{-1} .

TPP_{0,1}-DiTBDMS-CS-TMA_{0,9} (12B). El procedimiento general A se siguió usando 10B (600 mg, 1,04 mmol) y NMe₃ para dar 12B en forma de un sólido en bruto (720 mg, 99 %).

TPP_{0,25}-DiTBDMS-CS-TMA_{0,75} (13A). El procedimiento general A se siguió usando 11A (300 mg, 0,44 mmol) y NMe₃ para dar 13A en forma de un sólido en bruto (340 mg, 98 %). FTIR (KBr): v 3415, 3021, 3011, 2962, 2854, 1749, 1686, 1598, 1522, 1482, 1442, 1402, 1360, 1311, 1288, 1252, 1053, 1010, 966, 922, 901, 837, 798, 779, 744, 701, 671, 558 cm^{-1} .

TPP_{0,25}-DiTBDMS-CS-TMA_{0,75} (13B). El procedimiento general A se siguió usando 11B (600 mg, 0,89 mol) y NMe₃ para dar 13B en forma de un sólido en bruto (685 mg, 99 %)

Procedimiento general B para los compuestos 14A, 14B, 15A y 15B ($\text{N-TPP-NH-Pip-acetil})_{0,1}-(\text{N-(N-metilpiperazinil)acetil})_{0,9}\text{-DiTBDMS-CS}$ [TPP_{0,1}-DiTBDMS-CS-MP_{0,9}] (14A). El compuesto 10A (350 mg, 0,61 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 en una atmósfera de N_2 . Se añadió una cantidad en exceso de 1-metilpiperizina y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. El disolvente se eliminó al vacío. Despues, el producto en bruto se secó completamente a alto vacío produciendo el producto en bruto correspondiente 14A (425, 105 %). FT-IR (KBr): v 3378, 2950, 2930, 2884, 2854, 2798, 2694, 2608, 2477, 2223, 1678, 1617, 1519, 1461, 1394, 1371, 1293, 1253, 1168, 1092, 1051, 1003, 966, 939, 920, 837, 801, 779, 701, 671, 612 cm^{-1} .

TPP_{0,1}-DiTBDMS-CS-MP_{0,9} (14B). El procedimiento general B se siguió usando 10B (600 mg, 1,04 mol) y 1-metilpiperazina para dar 14B en forma de un sólido en bruto (710 mg, 102 %).

TPP_{0,25}-DiTBDMS-CS-MP_{0,75} (15A). El procedimiento general B se siguió usando 11A (250 mg, 0,37 mmol) y 1-metilpiperazina para dar 15A en forma de un sólido en bruto (290 mg, 104 %). FT-IR (KBr): v 3380, 2950, 2930, 2884, 2854, 2800, 2480, 1677, 1598, 1519, 1461, 1400, 1394, 1371, 1284, 1252, 1168, 1089, 1050, 1003, 966, 939, 920, 837, 801, 779, 732, 701, 671, 591 cm^{-1} .

TPP_{0,25}-DiTBDMS-CS-MP_{0,75} (15B). El procedimiento general B se siguió usando 11B (650 mg, 0,96 mol) y 1-metilpiperazina para dar 15B en forma de un sólido en bruto (735 mg, 102 %).

Procedimiento de desprotección por TBDMS general C para los compuestos 16A, 17A, 18A y 19A (Compuestos del 1^{er} lote).

TPP_{0,1}-CS-TMA_{0,9} (16A). El material 12A (350 mg, 0,50 mmol) se disolvió en MeOH (5-10 ml) seguido de la adición de HCl concentrado (2-3 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 12 h a t a. Se añadió una cantidad en exceso de agua desionizada a la mezcla de reacción y se agitó durante 30 minutos antes de la dialisis contra NaCl al 8 % durante un día, y contra agua desionizada durante 3 días. Durante este tiempo, el color de la solución cambió gradualmente de verde oscuro a rojo. Despues, la solución de colo rojo se liofilizó para producir un material de tipo esponja de color pardo. Los materiales se desprotegieron de nuevo, se intercambiaron iónicamente, se dializaron y se liofilizaron. El procedimiento se repitió usando las mismas condiciones para eliminar la cantidad traza de TBDMS para obtener 16A (210 mg, 89 %) en forma de un material de esponja de color pardo. FT-IR (KBr): v 3419 (a, O-H), 3064 (C-H), 1683, 1558, 1506, 1488, 1473, 1403, 1296, 1153, 1112, 1068, 1032, 966, 911, 800, 730, 701, 618 cm^{-1} ; ¹H RMN (DMSO-d₆: D₂O 96:4) δ ppm: 8,81 (m a, β-pirrol H), 8,12-8,16 (m a, fenil-Ho y Pip-NHTPP-fenil-Hm), 8,04 (d a, J = 8,0 Hz, RNTPP-fenil-Ho), 7,75-7,84(m, trifenil-Hm,p), 4,66 (s a, H-1), 4,21 (s a, BrCH₂C=O), 3,83-3,54 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3,32 (s, ¹N(CH₃)₃) ppm.

TPP_{0,25}-CS-TMA_{0,75} (17A). El procedimiento general C se siguió usando 13A (240 mg, 0,30 mmol) y HCl conc./MeOH para dar 17A en forma de un sólido de color púrpura (120 mg, 71 %). FT-IR (KBr): v 3392, 3061, 2950, 1683, 1559, 1506, 1489, 1473, 1402, 1350, 1296, 1154, 1112, 1068, 1032, 966, 911, 800, 730, 701, 619 cm^{-1} ; ¹H RMN (DMSO-d₆: D₂O 98:2) δ ppm: 8,81 (m a, β-pirrol H), 8,12-8,16 (m a, fenil-Ho y Pip-NHTPP-fenil-Hm), 8,04 (d a, J = 8,0 Hz, RNTPP-fenil-Ho), 7,79-7,87(m, trifenil-Hm,p), 4,50 (s a, H-1), 4,15 (s a, BrCH₂C=O), 3,27-3,65 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3,24 (s, +N(CH₃)₃) ppm.

TPP_{0,1}-CS-MP_{0,9} (18A). El procedimiento general C se siguió usando 14A (350 mg, 0,52 mmol) y HCl conc./MeOH para dar 18A en forma de un sólido de color púrpura (200 mg, 87 %). FT-IR (KBr): v 3419 (a, O-H), 3057 (C-H), 1683, 1558, 1474, 1403, 1296, 1234, 1154, 1112, 1068, 1032, 966, 930, 911, 799, 730, 701 cm^{-1} ; ¹H RMN (DMSO-d₆: D₂O 96:4) δ ppm: 8,83 (m a, β-pirrol H), 8,13-8,19 (m a, fenil-Ho y Pip-NHTPP-fenil-Hm), 8,08 (d a, J = 8,0 Hz, RNTPP-fenil-Ho), 7,79-7,87(m, trifenil-Hm,p), 4,48 (s a, H-1), 3,24-3,78 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3,92 (dd, J = 12 Hz, Pip-CH₂C=O), 2,30-2,67 (m, piperazina (CH₂)₄), 2,48 (s a, piperazina, N-CH₃) ppm.

TPP_{0,25}-CS-MP_{0,75} (19A). El procedimiento general C se siguió usando 15A (200 mg, 0,26 mmol) y 1-metilpiperazina para dar 19A en forma de un sólido de color púrpura (80 mg, 58 %). FT-IR (KBr): v 3392, 3056, 2947, 1683, 1558, 1520, 1489, 1472, 1458, 1400, 1349, 1309, 1248, 1154, 1068, 1031, 1001, 966, 911, 800, 729, 701, 658 cm⁻¹. ¹H RMN (DMSO-d₆: D₂O 96:4) δ ppm: 8,83 (m a, β-pirrol H), 8,14-8,20 (m a, fenil-Ho y Pip-NHTPP-fenil-Hm), 8,08 (d a, J = 8,0 Hz, RNTPP-fenil-Ho), 7,78-7,86(m, trifenil-Hm,p), 4,50 (s a, H-1), 3,24-3,78 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3,92 (dd, J = 12 Hz, Pip-CH₂C=O), 2,28-2,67 (m, piperazina (CH₂)₄), 2,48 (s a, piperazina, N-CH₃) ppm.

Procedimiento de desprotección por TBDMS general D para los compuestos finales 16B, 17B, 18B y 19B (Compuestos del 2º lote). (Compuesto 16B como Representativo).

TPP_{0,1}-CS-TMA_{0,9} (16B): El material 12B (600 mg, 0,86 mmol) se disolvió en N-Metil-2-pirrolidona (NMP) (5-10 ml) seguido de la adición de una cantidad en exceso de fluoruro de tetra-n-butilamonio (TBAF). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a 55 °C, se enfrió, se acidificó con HCl diluido y se agitó durante 30 minutos antes de la dialización contra NaCl al 8 % (p/v) en agua desionizada durante dos días y contra agua desionizada durante 3 días. Durante este tiempo, el color de la solución cambió gradualmente de gris a rojo. Después, la solución de colo rojo se liofilizó para producir un material de tipo esponja de color pardo. Los materiales se desprotegieron de nuevo, se intercambiaron iónicamente, se dializaron y se liofilizaron. El procedimiento se repitió usando las mismas condiciones para eliminar la cantidad traza restante de TBDMS para obtener 16B (350 mg, 87 %) en forma de un material de esponja de color pardo. FTIR (KBr): v 3405, 2943, 2817, 1655, 1528, 1459, 1401, 1375, 1308, 1248, 1153, 1111, 1068, 1031, 966, 832, 799, 729, 702 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆: D₂O 96:4) δ ppm: 8,82 (m a, β-pirrol H), 8,12-8,16 (m a, fenil-Ho y Pip-NHTPP-fenil-Hm), 8,04 (d a, J = 8,0Hz, RNTPP-fenil-Ho), 7,75-7,84(m, trifenil-Hm,p), 4,47 (s a, H-1), 4,04 (s a, BrCH₂C=O), 3,24-3,55 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3,19 (s a, +N(CH₃)₃) ppm.

TPP_{0,25}-CS-TMA_{0,75} (17B): El procedimiento general C se siguió usando 13B (650 mg, 0,84 mmol) y TBAF/NMP para dar 17B en forma de un sólido de color púrpura (400 mg, 87 %). FTIR(KBr): v 3396, 2942, 2829, 1662, 1526, 1458, 1441, 1401, 1310, 1249, 1068, 1032, 1002, 966, 800, 730, 701 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆: D₂O 98:2) δ ppm: 8,81 (m a, β-pirrol H), 8,12-8,16 (m a, fenil-Ho y Pip-NHTPP-fenil-Hm), 8,08 (d a, J = 8,0Hz, RNTPP-fenil-Ho), 7,74-7,86(m, trifenil-Hm,p), 4,51 (s a, H-1), 4,10 (s a, BrCH₂C=O), 3,26-3,55 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3,22 (s a, +N(CH₃)₃) ppm; ¹³C RMN en estado sólido (100,56 MHz): δ 170,85, 164,68, 128,11, 119,45, 101,53, 75,39, 61,09, 55,47.

TPP_{0,1}-CS-MP_{0,9} (18B): El procedimiento general C se siguió usando 14B (600 mg, 0,90 mmol) y TBAF/NMP para dar 18B en forma de un sólido de color púrpura (315 mg, 80 %). FTIR (KBr): v 3396, 3315 (a, OH, NH), 2941, 1655 (vs, C=O amida I), 1534 (vs, C=O amida II), 1522, 1471, 1440, 1401, 1375, 1310, 1244, 1069, 1030, 1001, 966, 800, 729, 701cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆: D₂O 98:2) δ ppm: 8,81 (m a, β-pirrol H), 8,13-8,19 (m a, fenil-Ho y Pip-NHTPP-fenil-Hm), 8,07 (d a, J = 8,0 Hz, RNTPP-fenil-Ho), 7,79-7,85(m, trifenil-Hm,p), 4,48 (s a, H-1), 3,24-3,72 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3,92 (dd, J = 12 Hz, Pip-CH₂C=O), 2,33-2,67 (m, piperazina (CH₂)₄), 2,48 (s a, piperazina, N-CH₃) ppm.

TPP_{0,1}-CS-MP_{0,9} (19B): El procedimiento general C se siguió usando 15B (700 mg, 0,93 mmol) y TBAF/NMP para dar 19B en forma de un sólido de color púrpura (415 mg, 85 %). FTIR (KBr): v 3396, 3315 (a, OH, NH), 2941, 1655 (vs, C=O amida I), 1534 (vs, C=O amida II), 1522, 1471, 1440, 1401, 1375, 1310, 1244, 1069, 1030, 1001, 966, 800, 729, 701cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆: D₂O 95:5) δ ppm: 8,82 (m a, β-pirrol H), 8,13-8,19 (m a, fenil-Ho y Pip-NHTPP-fenil-Hm), 8,07 (d a, J = 8,0 Hz, RNTPP-fenil-Ho), 7,79-7,87(m, trifenil-Hm,p), 4,49 (s a, H-1), 3,24-3,78 (m, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3,92 (dd, J= 12 Hz, Pip-CH₂C=O), 2,30-2,67 (m, piperazina (CH₂)₄), 2,40 (s a, piperazina, N-CH₃) ppm; ¹³C RMN en estado sólido (100,56 MHz): δ 171,63, 138,74, 127,97, 119,74, 101,93, 75,54, 61,54, 55,42, 45,34 ppm.

50 Resultados y análisis

Intermedio de TPP nucleófilo 5. En el estudio actual, se ha sintetizado TPP1 a gran escala y se ha utilizado como material de partida. La funcionalidad de mono-nitro TPP(p-NO₂)₁ 2 se introdujo regioselectivamente usando NaNO₂ 1,8 equivalentes en TFA, seguido de reducción con SnCl₂·2H₂O para obtener la mono-aminoporfirina TPP(p-NH₂)₁ 3. El procedimiento descrito anteriormente se simplificó evitando la purificación prolongada del material en bruto 2 antes de la etapa de reducción. La aminoporfirina 3 se obtuvo entonces después de la purificación sin comprometer su rendimiento global (54 %).

60 Se sabe que la aminoporfirina TPP(p-NH₂)₁ 3 es débilmente nucleófila y los intentos de unir este compuesto a BrA-DiTBDMS-CS 9 electrófilo mediante ataque de SN² no dieron los resultados deseados en el estudio inicial, incluso en condiciones difíciles. Por lo tanto, para convertir este derivado fotosensibilizador en un nucleófilo más potente, en primer lugar se aciló TPP(p-NH₂)₁ para dar bromoacil-TPP 4 seguido de la sustitución nucleófila con piperazina en exceso para dar el intermedio de porfirina nucleófila TPP-NH-Pip 5. El motivo de piperazina tiene carga positiva en condiciones fisiológicas (pH acuoso 7,4). El resto piperazina también es adecuado como un espaciador debido a la

baja toxicidad y las biotransformaciones que implican varias reacciones metabólicas bien conocidas. La ruta sintética global para la síntesis de TPP-NH-Pip se muestra en el Esquema 1 en la Figura 2.

- 5 Intermedio de quitosano electrófilo 9. El quitosano se modificó, como se ha informado previamente para obtener DiTBDMS-CS 8. Después de la protección de los grupos hidroxilo, la solubilidad del biopolímero cambia drásticamente y se vuelve libremente soluble en disolventes orgánicos comunes como CH_2Cl_2 , lo que facilita la modificación con restos muy lipófilos. Por lo tanto, el intermedio electrófilo BrA-DiTBDMS-CS 9 se preparó haciendo reaccionar 8 con bromuro de 2-bromoacetilo (Esquema 2 en la Figura 3). Esta reacción requiere un control preciso de las relaciones de tiempo de reacción, temperatura y equivalentes de los diferentes reactivos para evitar reacciones secundarias tales como desprotección y esterificación. La reacción de 8 con bromuro de bromoacetilo a 0 °C durante 1,5 h dio como resultado un material que era insoluble en CH_2Cl_2 y los análisis de FT-IR revelaron un pico de éster a 1760 cm^{-1} junto con el pico amida a 1680 cm^{-1} (datos no mostrados). Por lo tanto, fue necesario optimizar con precisión la reacción para evitar reacciones secundarias y obtener material libremente soluble. Las condiciones optimizadas para esta reacción requieren el uso de exactamente 4 equivalentes de bromuro de bromoacetilo y 5 equivalentes de Et_3N y el mantenimiento de la temperatura de reacción a -20 °C durante 1 h. El intermedio obtenido 9 era completamente soluble en CH_2Cl_2 y la estructura correcta se podía confirmar mediante análisis de ^1H RMN y FT-IR. Después, el compuesto 9 se usó como un intermediario electrófilo clave en la síntesis de los vehículos de quitosano.
- 10 20 Derivados de TPP de quitosano (16A-19B). Se sintetizaron un total de ocho derivados de TPP de compuestos de quitosano en dos lotes separados de cuatro compuestos diferentes. El primer lote (etiquetado como "A") se sintetizó en una escala de 80-200 mg y el segundo lote (etiquetado "B") se sintetizó en una escala ligeramente mayor de 300-450 mg para confirmar la reproducibilidad y la coherencia del procedimiento.
- 15 25 El PS lipófilo se unió covalentemente a la cadena principal del polímero por reacción de BrA-DiTBDMS-CS 9 con el intermedio nucleófilo de TPP-NH-Pip 5. La reacción fue cuantitativa, lo que facilitó un buen control del grado de sustitución en el material resultante. Las investigaciones preliminares mostraron que los vehículos con un alto grado de sustitución (DS) de porfirina eran insolubles en solución acuosa y, por lo tanto, la modificación se limitó a 0,1 y 0,25 DS (por unidad de monómero de glucosamina). Por lo tanto, TPP-NH-Pip 5 se hizo reaccionar de manera controlada a 0,1 o 0,25 equivalentes por unidades monoméricas del intermedio de quitosano electrófilo 9 para obtener los productos deseados $\text{TPPp}_{0,1}\text{-BrA}_{0,9}\text{-DiTBDMS-CS}$ (10A/10B) o $\text{TPPp}_{0,25}\text{-BrA}_{0,75}\text{-DiTBDMS-CS}$ (11A/11B) respectivamente. El progreso de la reacción se controló mediante TLC y la reacción se detuvo cuando 5 ya no estaba presente para evitar reacciones secundarias. El análisis de ^1H RMN de estos materiales fue consistente con la reacción cuantitativa en el enlace covalente de TPP con respecto a quitosano.
- 30 35 A continuación, se introdujeron restos catiónicos en la cadena principal de quitosano sustituido con TPP para potenciar la solubilidad acuosa de los vehículos y proporcionar afinidad a la membrana endocítica. Por lo tanto, los compuestos 10A/10B y 11A/11B se hicieron reaccionar con una cantidad en exceso de Me_3N (TMA) para proporcionar $\text{TPPp}_{0,1}\text{-DiTBDMS-CS-TMA}_{0,9}$ (12A/12B) y $\text{TPPp}_{0,25}\text{-DiTBDMS-CS-TMA}_{0,75}$ (13A, 13B) respectivamente con una carga catiónica fija. De forma similar, los compuestos 10A/10B y 11A/11B se hicieron reaccionar con una cantidad en exceso de 1-metil piperazina (MP) para proporcionar $\text{TPPp}_{0,1}\text{-DiTBDMS-CS-MP}_{0,9}$ (14A/14B) y $\text{TPPp}_{0,25}\text{-DiTBDMS-CS-MP}_{0,75}$ (15A, 15B) respectivamente. Los materiales en bruto se usaron directamente para las etapas finales de desprotección.
- 40 45 50 Finalmente, los materiales en bruto del primer lote 12A-15A se desprotegieron mediante HCl conc. en MeOH a t.a., durante 12 h, donde los materiales en bruto del segundo lote 12B-15B se desprotegieron por TBAF/NMP a 60 °C, métodos de 24 h, para dar los productos finales 16A-19A y 16B-19B, respectivamente. En ambos casos, se repitió la etapa de desprotección para eliminar parte de la cantidad traza de TBDMS (1,5-7 %) que todavía estaba presente después de la primera etapa de desprotección. Se ha usado previamente la desprotección con HCl conc. en MeOH, pero, recientemente se ha introducido la desprotección por TBAF/NMP más suave de los derivados de DiTBDMS quitosano para evitar condiciones muy ácidas que pueden contribuir a la degradación de la cadena principal del polímero. Sin embargo, la desventaja del último método es que requiere un largo proceso de diáisis para eliminar el disolvente de NMP. Los derivados de trimetilamonio (Me_3N^+) [$\text{TPPp}_{0,1}\text{-CS-TMA}_{0,9}$ (16A, 16B) y $\text{TPPp}_{0,25}\text{-CS-TMA}_{0,75}$ (17A, 17B)] solubilizaron más rápido en agua que los derivados de 1-metil-piperazina [$\text{TPPp}_{0,1}\text{-CS-MP}_{0,9}$ (18A, 18B), $\text{TPPp}_{0,25}\text{-CS-MP}_{0,75}$ (19A, 19B)]. Esto puede deberse a la presencia de la carga iónica fija en los compuestos portadores anteriores.
- 55 Caracterización de los nano-vehículos.
- 60 65 Análisis de FT-IR: La comparación de los espectros de FT-IR de diversos intermedios en la síntesis del compuesto final representativo $\text{TPPp}_{0,1}\text{-CS-MP}_{0,9}$ (18A) se muestra en la Figura 4. Los picos característicos para el intermedio de porfirina TPP-NH-Pip 5 (Figura 4A) se ilustran como estiramiento de N-H en la región de $3310\text{-}3450 \text{ cm}^{-1}$ y con estiramiento de C-H aromático y alifático a 3022 y 2816 cm^{-1} . Los picos a 1691 y 1595 cm^{-1} son consistentes con los enlaces amida y tres picos fuertes a 966 , 799 y 700 cm^{-1} son característicos del sistema anular de TPP (mostrado por las flechas).

El pico característico principal en el intermedio BrA-DiTBDMS-CS 9 se observa a 2858-2957 cm⁻¹ mostrando estiramiento de C-H de Si-CH₃, los picos amida a 1682 y 1530 cm⁻¹. Asimismo, los picos a 836 y 777 cm⁻¹ representan el estiramiento de Si-C y el balanceo de CH₃ (estos dos últimos picos se indican por las flechas en la Figura 4B).

La aparición de picos de TPP característicos en los espectros del intermedio TPP_{0,1}-BrA_{0,9}-DiTBDMS-CS 10A (Figura 4C) confirma la unión covalente de porfirina (TPP-NH-Pip 5) a quitosano (9). No se observó ningún cambio marcado en los espectros cuando éste se convirtió en TPP_{0,1}-DiTBDMS-CS-MP_{0,9} 14A en bruto. Sin embargo, la desprotección por TBDMS final del material para dar TPP_{0,1}-CS-MP_{0,9} 18A está claramente indicada por la ausencia de los picos característicos de Si-CH₃ y la aparición del pico de OH amplio, mientras que los picos de TPP característicos permanecen intactos (Figura 4).

Análisis de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C (estado sólido):

15 Análisis de ¹H RMN: El ejemplo representativo de la superposición de los espectros de ¹H RMN de todos los intermedios y el producto final en la síntesis de TPP_{0,1}-CS-MP_{0,9} 18A se muestra en la Figura 5. Después de la protección por TBDMS, el material (DiTBDMS-CS 8) se vuelve claramente soluble en CDCl₃ y también muestra picos bien resueltos (Figura 5A) de cada protón en el esqueleto de quitosano. Los picos a 0,90-0,89 (s a) y 0,13-0,05 (s a) pueden asignarse a (CH₃)₃C-Si y (CH₃)₂Si respectivamente.

20 La bromoacetilación de DiTBDMS-CS para dar BrA-DiTBDMS-CS 9 se marca por un desplazamiento campo abajo del pico H-2 (GluN). Asimismo, todos los picos del esqueleto de quitosano H-1 a H-6 junto con los picos de COCH₂Br se unen a 4,40-3,26 ppm, mientras que los picos TBDMS no muestran cambios significativos en sus posiciones (Figura 5B).

25 25 Los espectros de ¹H RMN del intermedio TPP_{0,1}-BrA_{0,9}-DiTBDMS-CS 10A (Figura 5C) confirman los picos característicos del resto TPP que pueden observarse en la región aromática y también podría identificarse un pico a -2,7 [no mostrado en la Figura 5C], que típicamente está asociado con los dos protones de amina interna pirrólica en el núcleo de la porfirina de base. Además, uno de los picos distintivos que se pueden asignar a la mitad del grupo -CH₂ del resto de piperazina puede observarse a 2,81-2,86 (m) ppm, y el grupo de -CH₂ cíclico restante de la piperazina está en la región amplia (3,3-4,5 ppm) del resto de quitosano.

30 35 En los espectros de TPP_{0,1}-DiTBDMS-CS-MP_{0,9} 14A, se observaron nuevos picos para N-CH₃ del resto de 1-metilpiperazina (Figura 5D). La purificación no se realizó en esta etapa y, por lo tanto, el espectro muestra un exceso de 1-metilpiperazina.

40 Después de la etapa de desprotección final, se obtuvo un material con excelente solubilidad acuosa. En los espectros de ¹H RMN del compuesto final TPP_{0,1}-CS-MP_{0,9} 18A, todos los picos del esqueleto de quitosano junto con los picos de 1-metilpiperazina pueden identificarse claramente; sin embargo, no hay señal de RMN observable del resto de TPP (Figura 5E). Se observaron los mismos resultados para todos los compuestos finales desprotegidos (17A-19B). En d₆-DMSO, se pudieron observar los picos de TPP, pero en este caso los picos del esqueleto de quitosano se ampliaron y no se identificaron claramente. La solubilidad del vehículo también fue mala en este disolvente y se encontró que los mejores resultados podrían obtenerse con una mezcla de estos dos disolventes (véase el análisis posterior). La TPP_{0,1}-CS-MP_{0,9} 18A tiene un color rojo oscuro que confirma la presencia del PS.

45 Un experimento de reparto mostró que los restos PS altamente lipófilos TPP-NH₂ y TPP-NH-Pip no se dividieron en la fase acuosa en un sistema de dos fases de H₂O/CHCl₃ (Figura 6) mientras que, mientras que el TPP-CS-TMA final (polar) y los vehículos de TPP-CS-MP son altamente polares. Se solubilizaron completamente en la fase acuosa y no se dividieron en la fase orgánica.

50 50 Análisis de ¹³C RMN en estado sólido: Los picos de carbono de los vehículos finales podrían observarse en la RMN en estado sólido (Figura 7). Los carbonos C2-C6 de la glucosamina y el carbono COCH₂ se observaron en el intervalo 60-80 ppm y el pico C1 se resuelve claramente a -102 ppm. Los picos entre 115-155 ppm pueden asignarse como Cmeso (~119), Cm, p (~128), Cβ (~131), Co (~138), Ci (~140) y Ca (~150) del resto TPP y esta asignación puede compararse completamente con los espectros de ¹³C RMN del estado en solución de TPP-NH-Pip.

55 5. El carbonilo (CS-NH-C=O y TPP-NH-C=O) aparece a 160-169 ppm. En el derivado de N-(2-(N,N,N-trimetilamoniol) acetilo) TPP_{0,25}-CS-TMA_{0,75} (17B), los carbonos de metilo cuaternario (+N(CH₃)₃) pueden observarse como un pico intenso a 55,5 ppm. En el derivado de N-metil-piperazinilo TPP_{0,25}-CS-MP_{0,75} (19B), el metil carbono (N-CH₃) puede observarse a 45 ppm y los carbonos de metileno cíclico (-CH₂-N) se fusionan con las señales de glucosamina en la región de 50-55 ppm. Por lo tanto, la ¹³C RMN en estado sólido fue consecuente con los vehículos con un PS unido covalentemente.

60 Grado de sustitución (DS) y eficacia de conversión. La Tabla 1 a continuación muestra el DS para los compuestos portadores finales. El objetivo era controlar el DS con una relación equivalente entre los compuestos 5 y 9 en la etapa de reacción "e" (Esquema 2 en la Figura 3). El DS final coincide con el valor diana en función de la equivalencia en la reacción (0,1 o 0,25) dentro de un margen del 2 % e indica una eficacia del 100 % en la reacción. Previamente, se ha investigado la unión covalente de diversos restos lipófilos al quitosano. Esto incluye fármacos

como doxorrubicina y paclitaxel; biomoléculas endógenas como ácido 5 α -colánico, ácido 5 β -colánico, ácido desoxicólico y colesterol y fotosensibilizadores como cloro e6 (Ce6) y protoporfirina IX (PpIX). En la mayoría de los casos, el DS es significativamente menor de lo que se notifica aquí para la TPP altamente lipófila. Los investigadores anteriores también observaron que la eficacia de la conjugación disminuirá significativamente a medida que aumente el grado de sustitución. El proceso actual tiene la ventaja de que utiliza quitosano protegido que es altamente soluble en disolventes orgánicos y, por lo tanto, se puede combinar de manera eficiente con un resto PS lipófilo en condiciones suaves. La excelente reproducibilidad de la reacción también se confirma, ya que el DS en los dos lotes (A y B) coincide dentro del mismo margen del 2 %.

10 Tabla 1: Grado de sustitución (DS) para los vehículos de quitosano modificados por TPP 16A-19B

Registro	Derivados de quitosano	Compuesto	TPP-NH-Pip (equiv. por unidad de azúcar usada)	DS* (restos de TPP unidos por unidad de azúcar)
1.	TPP _{0,1} -CS-TMA _{0,9}	16A	0,10	0,10
2.	TPP _{0,1} -CS-TMA _{0,9}	16B	0,10	0,10
3.	TPP _{0,25} -CS-TMA _{0,75}	17A	0,25	0,23
4.	TPP _{0,25} -CS-TMA _{0,75}	17B	0,25	0,25
5.	TPP _{0,1} -CS-MP _{0,9}	18A	0,10	0,09
6.	TPP _{0,1} -CS-MP _{0,9}	18B	0,10	0,10
7.	TPP _{0,25} -CS-MP _{0,75}	19A	0,25	0,25
8.	TPP _{0,25} -CS-MP _{0,75}	19B	0,25	0,25

* DS determinado por ¹H RMN

Análisis de la autoagregación de vehículos para formar nanopartículas y despliegue de nanopartículas portadoras.

15 Las porfirinas aromáticas pueden formar sistemas de apilamiento π - π que se definen como agregados de tipo J (desplazamiento rojo) o H (desplazamiento azul). Los grupos de sustituyentes periféricos pueden contribuir a los mecanismos de agregación. Esta agregación se puede observar por RMN, UV-Vis y espectroscopía de fluorescencia. Por lo tanto, se ha informado del ensanchamiento extremo de los picos y la pérdida de picos en la ¹H RMN para los agregados de carboxifenil-porfirina (TCPP), p-sulfonatofenilo y porfirinas fenil meso-sustituidas y tres tipos de porfirinas catiónicas (TOPyP, TMPyP y APP). Se han realizado observaciones similares de la pérdida de señal debida a la inmovilización en la copolimerización en dispersión de n-butilmelanocírato lipófilo con un macromónómero de polí(óxido de etileno).

20 En el trabajo actual, la falta de picos en la región aromática, en la ¹H RMN en D₂O de los compuestos finales 16A-19B sugirió la agregación de los restos TPP en D₂O debido al apilamiento π - π y la interacción hidrófoba. El estudio 25 de RMN del compuesto TPP_{0,1}-CS-TMA_{0,9}, 16B representativo, en una mezcla DMSO-d₆:D₂O, es muestra en la Figura 8. En el resto D₂O TPP puro faltan picos y solo se observan picos muy débiles en la región aromática en la mezcla DMSO-d₆: D₂O (25:75), mientras que se pueden observar picos del esqueleto de quitosano. Cuando el contenido de DMSO-d₆ se aumenta adicionalmente con respecto a DMSO-d₆: D₂O (50:50), pueden observarse picos anchos (Figura 8IC). La intensidad relativa de los picos aromáticos aumenta a medida que aumenta el contenido de DMSO-d₆ en la mezcla y en d₆-DMSO casi puro (solamente D₂O al 2 % v/v), los picos TPP aromáticos están 30 claramente visibles junto con los picos H-1 y del esqueleto de quitosano restante y el pico de ¹³NMe₃ (Figura 8IA). Esto también sugiere que el vehículo está completamente desplegado en estas condiciones. Esta interpretación fue apoyada por estudios de UV-Vis y de fluorescencia (Figura 8).

35 Los nanovehículos disueltos en agua muestran una banda Soret amplia para el fotosensibilizador apilado π - π con un máximo de absorción a 417 nm (Figura 8II). Este pico se vuelve gradualmente más agudo y ligeramente desplazado (a 420 nm en DMSO al 100 %) cuando la concentración de DMSO aumenta y la estructura se despliega.

40 En agua pura, la fluorescencia se inactiva casi por completo, lo que también es consistente con la agregación de los restos fotosensibilizadores. La intensidad de fluorescencia aumenta drásticamente, pero a medida que el contenido de DMSO aumenta al 50 %, se produce un aumento brusco en la intensidad de fluorescencia con un aumento gradual adicional hasta una concentración de DMSO del 100 % observada (Figura 8III).

45 Se realizó un intento para caracterizar adicionalmente las partículas de nanovehículo mediante microscopía electrónica de barrido. Se añadieron por pipeteo gotitas de solución de nanovehículo sobre una superficie de oblea de silicona y se dejaron secar (Figura 9A, B) mediante SEM. En algunas muestras, se pudieron observar nanopartículas con una dispersión de tamaño de 10-200 nm, ya sea aisladas (Figura 9A), agrupadas o cristalizando en estructuras dendríticas (Figura 9B), similares a las típicamente observadas al secar suspensiones de nanopartículas. Con el fin de evitar la agregación de partículas, se intentó el recubrimiento por rotación de las 50 muestras, pero en este caso, se observaron películas sin rasgos y pocas partículas. Se estimó que el espesor de la película después del recubrimiento por rotación era significativamente menor de 10 nm por elipsometría

espectroscópica. El espesor máximo de las capas formadas después del secado de las soluciones en la superficie, sin embargo, era del orden de 100 nm. La medición del ángulo de contacto con el agua reveló una superficie de película relativamente hidrófoba y que la hidrofobicidad de la película dependía de la concentración de la muestra portadora aplicada (Figura 9C). Estos resultados son consistentes con las nanopartículas dinámicas que se despliegan cuando se recubren, y que el esqueleto del polímero hidrófilo se adherirá a la superficie polar de dióxido de silicón exponiendo los restos fotosensibilizadores hidrófobos del núcleo de la partícula.

Se observa comúnmente la agregación de nanopartículas y la inestabilidad física que conducen a la formación de agregados insolubles. Se controló la estabilidad física de una solución acuosa de 1 mg/ml de TPP_{p0,25-CS-MP0,75} (17A) durante un periodo de tres meses. No se observó precipitación de este compuesto.

Rendimientos cuánticos de fluorescencia.

En el presente documento, los rendimientos cuánticos de fluorescencia de TPP(p-NH₂)₁, TPP-NH-Pip y derivados de quitosano de TPP (16A-19B) se investigaron en DMSO (excitados a 419 nm). El rendimiento cuántico de TPP(p-NH₂)₁ fue menor que el de su derivado TPP-NH-Pip, así como los derivados de TPP-CS-TMA y TPP-CS-MP. Esto demostró un alto grado de inactivación en estado excitado de TPP(p-NH₂)₁ en comparación con sus derivados. Φ_F es casi igual para todos los compuestos portadores (16A-19B) con una fluctuación menor $\pm 0,004$ alrededor del valor obtenido para el intermedio TPP-NH-Pip.

Sin embargo, los valores Φ_F de TPP(p-NH₂)₁ (0,0002) son inferiores en comparación con algunos datos publicados de la bibliografía. Bhaumik et.al. (J Org Chem 2009, 74:5894) notificaron 0,05 cuando se excitaron a 418 nm en DMF. Notificaron máximos de emisión de fluorescencia a 664 nm, lo que es diferente de este hallazgo actual de 650 nm. Se usó TPP como estándar, mientras que se usó antraceno como estándar. Un Φ_F bajo en el trabajo actual puede deberse a la autoasociación de los fotosensibilizadores. La Tabla 2 a continuación muestra el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) de los vehículos de quitosano modificados por TPP 16A-19B.

Tabla 2

Registro	Derivados de quitosano	Compuesto	λ_{abs}^* (nm)	λ_{em}^* (nm)	Rendimiento cuántico (Φ_F)
1.	TPP(p-NH ₂) ₁	3	419	651	0,0002
2.	TPP-NH-Pip	5	419	651	0,0036
3.	TPPP _{0,1} -CS-TMA _{0,9}	16A	419	651	0,0032
4.	TPP _{p0,1} -CS-TMA _{0,9}	16B	419	651	0,0034
5.	TPPP _{0,25} -CS-TMA _{0,75}	17A	419	651	0,0036
6.	TPPP _{0,25} -CS-TMA _{0,75}	17B	419	651	0,0032
7.	TPP _{p0,1} -CS-MP _{0,9}	18A	419	651	0,0036
8.	TPP _{p0,1} -CS-MP _{0,9}	18B	419	651	0,0033
9.	TPPP _{0,25} -CS-MP _{0,75}	19A	419	651	0,0036
10.	TPP _{p0,25} -CS-MP _{0,75}	19B	419	651	0,0033

Todos los datos recopilados en DMSO a temperatura ambiente

λ - Longitud de onda

Conclusión

Se ha demostrado que DiTBDMS quitosano se puede utilizar para la síntesis altamente eficiente de nanovehículos a base de quitosano unido a meso-tetrafenilporfirina. La síntesis de estos vehículos fue totalmente reproducible y el método permitió un control preciso del grado de sustitución del fotosensibilizador altamente lipófilo. Los estudios de RMN, fluorescencia y UV-Vis fueron consistentes con la autoasociación de los restos fotosensibilizadores. Los vehículos son polares y muestran buena solubilidad acuosa y estabilidad física. En DMSO, el fotosensibilizador se disocia de la autoasociación y, por lo tanto, se vuelve fluorescente. En solución acuosa, los vehículos se ensamblan en estructuras de tipo nanopartícula con el grupo catiónico y el esqueleto del polímero formando una cubierta exterior alrededor de un núcleo compuesto por los restos TPP lipófilos agregados ($\pi-\pi$). Los grupos catiónicos y el esqueleto del polímero tienen un movimiento relativamente libre en el líquido y, por lo tanto, se pueden observar por RMN. Por el contrario, el núcleo de TPP es semisólido con un movimiento muy limitado y, por lo tanto, solo se puede detectar en RMN de estado sólido. Esta estructura está en equilibrio dinámico con la forma desplegada y fluorescente, que se vuelve dominante en DMSO permitiendo la detección del TPP por RMN. Cuando el vehículo está en contacto con la célula o la membrana endocítica, la estructura se despliega y los restos lipófilos se insertan en la membrana endocítica, lo que permite la excitación y la fotosensibilización que conduce a los efectos de la PDT y la PCI.

Ejemplo 2 - Síntesis de nanovehículos a base de TPC-quitosano

Los materiales y métodos generales fueron según el Ejemplo 1, cuando fue adecuado.
Síntesis

Véase el esquema 3 en la Figura 10 para la síntesis de TPC-NH-Pip

Meso-Tetrafenilporfirina (1). El compuesto 1 (TPP) se preparó por el procedimiento descrito en Journal of Organic Chemistry 1967, 32, 476.

5-*(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina* [TPP(p-NH₂)₁] (3). El compuesto 3 se preparó siguiendo el procedimiento de la bibliografía en Tetrahedron 2004, 60, 2757.

5-*(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilclorina*: TPC(p-NH₂)₁ (20). El compuesto 3 (1,5 g, 2,38 mmol) se disolvió en piridina en una atmósfera de N₂ y en oscuridad. Se añadieron K₂CO₃ (2,96 g, 21,5 mmol) y p-toluenosulfonilhidrazida (0,887 g, 4,77 mmol) y la mezcla de reacción resultante se calentó a la temperatura de reflujo. Se añadieron cantidades adicionales de p-toluenosulfonilhidrazida (0,887 g, 4,77 mmol) después de un intervalo de 2, 4, 6 y 8 h. La agitación continuó a la temperatura de reflujo durante 24 h. La mezcla de reacción se añadió a una mezcla 1:1 de EtOAc:H₂O (2:1,900 ml) y se calentó a reflujo durante 1 h. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, la fase orgánica se separó y se lavó con HCl 2 N (3 x 200 ml) seguido de lavado con agua (2 x 100 ml) y NaHCO₃ acuoso saturado (2 x 150 ml). Después, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío para proporcionar una mezcla en bruto de 1,3 g. El análisis del espectro visible del producto en bruto mostró que era una mezcla de cloro y bacteroclorina (banda a 651 y 738, respectivamente). Asimismo, el análisis por espectros de ¹H RMN mostró que no quedaba cantidad traza del material de partida *porfirina*.

El material en bruto (1,3 g) (mezcla de cloro/bacteroclorina) obtenido de la etapa de reacción anterior se disolvió en CH₂Cl₂ (100 ml). Después, se añadió *ortho*-Cloranilo (420 mg, 2,7 mmol) en una porción a la solución orgánica en agitación a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se control simultáneamente por UV-vis. Inmediatamente después de la disminución por completo del pico de bacteroclorina (738 nm), la mezcla de reacción se lavó con bisulfito sódico acuoso al 5 % (2 x 125 ml), seguido de lavado con agua (100 ml), NaOH al 5 % (2 x 150 ml), y finalmente con agua (150 ml). Después, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío para proporcionar exclusivamente el compuesto de clorina del título 20 (1,2 g, 80 %) en forma de un sólido de color pardo. El compuesto 3 parece existir en más de un isómero. TLC (Hexano/CH₂Cl₂, 3:7): Fr = 0,23, ¹H RMN (CDCl₃): δ = 7,86-8,66 (m, 14H, β-pirrol-H y fenil-H_o), 7,63-7,73 (m, 9H, trifénil-H_{m,p}), 7,00 (d, J = 8 Hz, 2H, NH₂-fenil-H_m), 4,14-4,23 (m, 4H, *clorina* β-pirrol-CH₂), 3,95 (s a, 2H, NH₂), -1,38 y -1,46 (s a, 2H, α-pirrol-NH) ppm; MS (ESI): m/z calc. para C₄₄H₃₄N₅ ([M+H]⁺) 632,2809, observado 632,2792.; UV-vis (DMSO): λ_{máx}: 422, 524, 553, 600, 652 nm.

Síntesis del intermedio TPC-NH-pip (21). El compuesto 20 (600 mg, 0,95 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (15 ml) y se agitó en una atmósfera de N₂. Se añadió Et₃N (0,32 ml, 2,27 mmol) seguido de la adición gota a gota de cloruro de cloroacetilo (0,092 ml, 1,15 mmol) a temperatura ambiente y continuó la agitación a temperatura ambiente. Después de 2 h *in situ* se añadió una cantidad en exceso de piperazina (0,328 g, 3,8 mmol) y la agitación continuó durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (85 ml), se extrajo, se lavó con agua (3 x 35 ml) y salmuera (35 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. Después, el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice. El producto deseado se aisló en MeOH: CH₂Cl₂ (8:92) como eluyente para proporcionar el intermedio del título 21 (440 mg, 61 %) en forma de un sólido de color pardo. TLC (CH₂Cl₂: MeOH, 9:1): F_r = 0,15; ¹H RMN (CDCl₃): δ = 9,34, 9,39 (s, 1H, TPC-NH), 7,86-8,65 (m, 16H, β-pirrol-H, fenil-H_o y R-NHTPC-fenil-H_m,_p), 7,66-7,73 (m, 9H, trifénil-H_{m,p}), 4,18-4,19 (s a, 4H, *clorina* β-pirrol-CH₂), 3,30 (s, 2H, ArNHCOCH₂-pip), 3,17 (m a, 4H, anillo de piperazina-CH₂), 2,81 (m a, 4H, anillo de piperazina-CH₂), -1,37 (s a, 2H, α-pirrol-NH); ¹³C RMN (CDCl₃): δ = 168,37, 167,48, 152,61, 143,14, 142,22, 140,86, 139,20, 138,32, 137,19, 136,99, 135,33, 134,64, 133,98, 133,01, 132,37, 132,12, 131,96, 128,17, 127,69, 126,81, 123,56, 123,38, 122,79, 122,08, 119,22, 117,94, 112,41, 111,65, 62,63, 53,50, 45,59, 35,90 ppm; UV-vis (DMSO): λ_{máx}: 421, 521, 549, 598, 651 nm.

Véase el esquema 4 en la Figura 11

Síntesis de piperazin-1-carboxilato de *terc*-butilo (22). Se disolvió piperazina (6 g, 69,6 mmol) en CH₂Cl₂ (120 ml). La solución se enfrió a 0 °C y se añadió gota a gota Boc₂O (7,6 g, 34,8 mmol) en CH₂Cl₂ (80 ml). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y la agitación continuó durante 24 h. El precipitado se eliminó por filtración y se lavó con CH₂Cl₂ (2 x 20 ml) y el filtrado combinado se separó, se lavó con agua (3 x 40 ml) y salmuera (30 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto del título 22 (6,5 g, 50 %) en forma de un sólido de color blanco.
P.f. 44-46 °C (lit. p.f. 46-47 °C); ¹H RMN (CDCl₃): δ = 3,32 (t, J = 4 Hz, 4H), 2,74 (t, J = 4 Hz, 4H), 1,39 (s, 9H); ¹³C RMN (CDCl₃): δ = 154,85, 80,00, 79,52, 45,96, 44,45, 28,45 ppm; MS (ESI): m/z calc. para C₉H₁₉N₂O₂ ([M+H]⁺) 187,1441 observado 187,1412.

Síntesis de p-(Metoxicarbonil)benzaldehído (23). Se suspendió 4-carboxibenzaldehído (4 g, 26,6 mmol) en 60 ml de MeOH anhídrico y se agitó en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió gota a gota

cloruro de acetilo (9,5 ml, 133 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 12 h a temperatura ambiente. El MeOH se eliminó al vacío, y la mezcla en bruto se diluyó con EtOAc (120 ml). La fase orgánica se lavó con NaOH acuoso 1 N (5 x 30 ml) y salmuera (2 x 25 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. Despues, el sólido en brugo se recristalizó usando EtOAc y éter de petróleo para proporcionar el éster 23 (3,8 g, 87 %) en forma de un sólido de color blanco. TLC (Hexano: CH₂Cl₂, 3:7): F_r = 0,36; P.f.: 61-63 °C (lit. p.f. 59-64 °C); ¹H RMN (CDCl₃): δ = 10,06 (s, 1H, CHO), 8,15 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,91 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 3,92 (s, 3H) ppm; ¹³C RMN (CDCl₃): δ = 191,66, 166,07, 139,21, 135,13, 130,23, 129,55, 52,62 ppm.

5 Síntesis de 5-(4-Metoxicarbonilfenil)-10,15,20-trifenilporfirina TPP(p-CO₂Me)₁ (24). Siguiendo el procedimiento de la bibliografía, (J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 4236-4237).

10 Síntesis de 5-(4-Carboxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina TPP(p-CO₂H)₁ (25).

15 El compuesto 24 (1,2 g, 1,78 mmol) se disolvió en una mezcla de THF: Se añadió piridina (10:1, 100 ml), KOH metanólico 2 N (120 ml) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 24 h. Despues, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se neutralizó con una solución acuosa saturada de ácido cítrico. Posteriormente, la mezcla de reacción se concentró al vacío hasta la eliminación de MeOH y THF según se completó. La mezcla en bruto después se diluyó con CH₂Cl₂ (150 ml) y agua (120 ml) y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 50 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (2 x 40 ml) y salmuera (35 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío. La mezcla en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando MeOH: CH₂Cl₂ (100:0 to 96:4 como eluyente) para proporcionar el ácido del título 25 (0,83 g, 71 %) en forma de un sólido de color púrpura. TLC (CH₂Cl₂: MeOH, 95:5): F_r = 0,54; ¹H RMN (DMSO-d₆): δ = 8,84 (s a, 8H, β-pirrol-H), 8,33-8,39 (m, 4H, R-COTPP-fenil-Ho,m), 8,21-8,23 (m, 6H, trifénil-Ho), 7,81-7,88 (m, 9H, trifénil-Hm,p), -2,92 (s, 2H, NH) ppm; MS (ESI): m/z calc. para C₄₅H₃₁N₄O₂ ([M+H]⁺) 659,2442, observado 659,2420.

20 25 Síntesis de 5-(4-Carboxifenil)-10,15,20-trifenilclorina TPC(p-CO₂H)₁ (26)

30 El compuesto 25 (600 mg, 0,9 mmol) y K₂CO₃ anhidro (1,13 g, 8,2 mmol) se disolvió en piridina (42 ml) en una atmósfera de N₂ y en oscuridad. Despues, se añadió tolueno-4-sulfonilhidrazida (340 mg, 1,8 mmol) y la mezcla se agitó a la temperatura de reflujo. Se añadieron cantidades adicionales de tolueno-4-sulfonilhidrazida (340 mg, 1,8 mmol) en 3 ml de piridina después de un intervalo de 2, 4, 6, 8 y 10 h de reacción. La agitación continuó a la temperatura de reflujo durante 24 h. Despues del enfriamiento a temperatura ambiente, se añadieron EtOAc (500 ml) y H₂O desionizada (250 ml) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo de nuevo durante 1 h. Despues de enfriar a temperatura ambiente, la fase orgánica se separó y se lavó con HCl 2 N (2 x 150 ml) y despues con agua (2 x 150 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío para proporcionar 565 mg de la mezcla en bruto. El análisis del espectro visible del producto en bruto mostró que era una mezcla de clorina y bacteroclorina (banda a 651 y 738, respectivamente). Asimismo, el análisis por espectros de ¹H RMN mostró que no quedaba cantidad traza del material de partida *porfirina*.

40 45 55 El material en bruto (mezcla de clorina/bacteroclorina, 565 mg) obtenido de la etapa de reacción anterior, se disolvió completamente en una mezcla de CH₂Cl₂: MeOH (75:25). Despues, se añadió *orto*-cloranilo (180 mg, 0,7 mmol) en una porción a la solución orgánica agitada a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se controló simultáneamente por UV-Vis. Inmediatamente después de la absorción, el pico de bacteroclorina (738 nm) disminuyó, la fase orgánica se lavó con una solución acuosa al 5 % de bisulfito (2 x 150 ml), seguido de lavado con agua (100 ml), despues por NaOH acuoso al 5 % (2 x 150 ml) y finalmente con agua (120 ml). Si se observó una emulsión, la fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de ácido cítrico. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar exclusivamente el compuesto del título de clorina 26 (420 mg, 70 %) en forma de un sólido de color pardo. El compuesto 9 está presente en más de un isómero.

50 55 60 TLC (CH₂Cl₂: MeOH, 95:5): F_r = 0,54, ¹H RMN (DMSO-d₆): δ = 7,91-8,58 (m, 16H, β-pirrol-H, fenil-Ho y R-COTPC-fenil-Ho,m), 7,68-7,77 (m, 9H, trifénil-Hm,p), 4,12-4,13 (m, 4H, *clorina* β-pirrol-CH₂), -1,53 y -1,60 (2 s a, 2H, α-pirrol-NH); ¹H RMN (CDCl₃): δ = 7,87-8,60 (m, 16H, β-pirrol-H, fenil-Ho y R-COTPC-fenil-Ho,m), 7,64-7,74 (m, 9H, trifénil-Hm,p), 4,16-4,18 (m, 4H, *clorina* β-pirrol-CH₂), -1,39 y -1,49 (2 s a, 2H, α-pirrol-NH) ppm; MS (ESI) calc. para C₄₅H₃₃N₄O₂ ([M+H]⁺) 661,2598, observado 661,2566; UV-vis (DMSO): λ_{máx}: 420, 520, 547, 599, 651 nm.

Síntesis del intermedio N-[piperazin-1-carboxilato de *terc*-butilo]-5-(4-carboxifenil)-10,15,20-trifenilclorina (27). Se disolvieron el compuesto de clorina 26 (500 mg, 0,76 mmol) y piperazin-1-carboxilato de *terc*-butilo 22 (155 mg, 0,83 mmol) en DMF (4 ml) en una atmósfera de N₂ y en la oscuridad. A la mezcla de reacción, se le añadieron EDCI-HCl (174 mg, 0,91 mmol) y HOBT(123 mg, 0,91 mmol) seguido de la adición de Et₃N (0,26 ml, 1,82 mmol) a temperatura ambiente. Despues, la mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente antes de verterse lentamente en agua en agitación (100 ml). El material sólido se eliminó por filtración, se lavó con abundante agua, y se secó bien. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂: MeOH, de 100:0 a 99:1) para proporcionar la amida del compuesto del título 27 (340 mg, 54 %) en forma de un sólido de color pardo.

65

TLC (CH₂Cl₂: MeOH, 99:1): Fr = 0,74; ¹H RMN (CDCl₃): δ = 7,74-8,59 (m, 16H, β-pirrol-H, fenil-Ho y R-COTPC-fenil-Ho,m), 7,65-7,72 (m, 9H, trifénil-Hm,p), 4,16-4,17 (m, 4H, clorina β-pirrol-CH₂), 3,78-3,86 (m a, 4H, anillo de piperazina-CH₂), 3,63 (m a, 4H, anillo de piperazina-CH₂), 1,53 (s, 9H, boc-(CH₃)₃), -1,39 y -1,47 (2 s a, 2H, α-pirrol-NH) ppm.

Síntesis del intermedio TPC-CO-pip (28). El compuesto 27 (320 mg, 0,39 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (8 ml) en una atmósfera de N₂ en la oscuridad. Se añadió CH₂Cl₂:TFA (1:1, 4 ml) y se agitó a ta durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (40 ml) y se lavó con agua (2 x 15 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (2 x 15 ml) y salmuera (15 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío. Después, el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂: MeOH, 100:0 a 92:8 como eluyente) para proporcionar el intermedio del título 28 (250 mg, 89 %) en forma de un sólido de color pardo.
TLC (CH₂Cl₂: MeOH, 9:1): F_r = 0,35, ¹H RMN (CDCl₃): δ = 7,74-8,59 (m, 16H, β-pirrol-H, fenil-Ho y R-COTPC-fenil-Ho,m), 7,64-7,72 (m, 9H, trifénil-Hm,p), 4,16-4,17 (m, 4H, clorina β-pirrol-CH₂), 3,73-3,90 (m a, 4H, anillo de piperazina-CH₂), 3,04 (m a, 4H, anillo de piperazina-CH₂), -1,40 y -1,47 (2 s a, 2H, α-pirrol-NH) ppm; MS (ESI) calc. para C₄₉H₄₂N₆O ([M+2H]⁺²) 365,1705, observado 365,1707; UV-vis (DMSO): λ_{máx}: 420, 520, 546, 599, 651 nm.

Sal mesilato de quitosano (7). Se sintetizó de acuerdo con el procedimiento publicado previamente (Carbohydrate Polymers 2010, 81:140-144).

N-bromoacetil-3,6-O-DiTBDMS-CS (BrA-DiTBDMS-CS, 9). Se disolvió DiTBDMS-CS 8 (1 g, 2,60 mmol) en CH₂Cl₂ seco (15 ml) en un matraz de fondo redondo en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se enfrió a -20 °C con una mezclado de hielo/sal. Se añadió Et₃N (1,81 ml, 13 mmol) seguido de la adición lenta gota a gota de bromuro de bromoacetilo (0,91 ml, 10 mmol). La agitación se continuó durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se concentró al vacío. El producto en bruto se agitó en acetonitrilo, se filtró y se lavó con acetonitrilo recién preparado. El material seco se disolvió y se extrajo en CH₂Cl₂, se lavó con agua y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se concentró al vacío para proporcionar el bromo del compuesto del título 26 (1,2 g, 92 %) en forma de un sólido en polvo de color amarillo pálido.

FT-IR (KBr): ν 3402 (a, NH), 2957,2931,2886, 2858 (s, C-H TBDMS), 1682 (vs, C=O amida I), 1530 (vs, C=O amida II), 1473, 1391, 1362, 1311, 1259, 1101, 1005, 837, 777 (Si-C), 669 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃) δ ppm: 4,40 (s a, H-1), 4,02-3,26 (m, H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' y 2H GluNH-C=OCH₂Br), 0,90 y 0,88 (s a, (CH₃)₃C-Si), 0,13 y 0,07 (s a, (CH₃)₂Si) ppm.

Véase el esquema 6A en la Figura 13

Síntesis del intermedio 29

(N-TPC-NH-Pip-acetyl)_{0,1}-(N-bromoacetyl)_{0,9}-DiTBDMS-CS (TPCNP_{0,1}-BrA_{0,9}-DiTBDMS-CS, 29). El compuesto 9 (800 mg, 1,58 mmol) y el compuesto TPC-NH-Pip 21 (120 mg, 0,158 mmol) se disolvieron en CH₂Cl₂ (25 ml) en una atmósfera de N₂ y en la oscuridad. Se añadió una cantidad equimolar exacta de Et₃N (22 μl, 0,158 mmol) con respecto a 21 y la mezcla de reacción se agitó a ta durante 24 h. El consumo total del material de partida se confirmó por TLC. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (55 ml) y se lavó con agua (2 x 25 ml) y salmuera (25 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se concentró al vacío para proporcionar el compuesto 29 (700 mg, 78 %).

¹H RMN (CDCl₃): δ = 9,21, 9,25 (s, TPCNHC), 7,86-8,60 (m, β-pirrol-H, fenil-Ho y R-NHTPC-fenil-Ho,m), 7,65-7,73 (m, trifénil-Hm,p), 3,35-4,50 [m a, quitosano (H-1, H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' y 2H GluNH-C=O, CH₂CONGlc), TPCNHCOC₂pip, anillo de piperazina-CH₂ y clorina β-pirrol-CH₂], 2,77-2,83 (m, anillo de piperazina-CH₂), 0,88-0,89 [s a, (CH₃)₃C-Si], 0,02-0,13 [(m a, (CH₃)₂Si], -1,44 (s a, 2H, α-pirrol-NH) ppm.

Véase el esquema 6B en la Figura 13

Síntesis del intermedio 34

(N-TPC-CO-Pip-acetyl)_{0,1}-(N-bromoacetyl)_{0,9}-DiTBDMS-CS (TPC_{CP0,1}-BrA_{0,9}-DiTBDMS-CS, 34). El compuesto 9 (800 mg, 1,58 mmol) se disolvió en NMP (25 ml) en una atmósfera de N₂ y en la oscuridad. Se añadieron TPC-CO-Pip 28 (125 mg, 0,173 mmol) y NaHCO₃ (0,29 g, 3,45 mmol) a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se calentó a 75 °C y se agitó durante una noche antes de enfriarse y verterse en agua en agitación. El sólido se eliminó por filtración, se lavó con abundante agua, y se secó bajo succión. Después, el sólido obtenido se disolvió en CH₂Cl₂, se filtró y se secó sobre Na₂SO₄, y el disolvente se eliminó al vacío para proporcionar el compuesto 34 (810 mg, 89 %) en forma de un sólido de color pardo.

¹H RMN (CDCl₃): δ = 7,75-8,60 (m, β-pirrol-H, fenil-Ho y R-COTPC-fenil-Ho,m), 7,64-7,71 (m, trifénil-Hm,p), 3,38-4,5 [m a, quitosano (H-1, H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' y 2H GluNH-C=O, CH₂CONGlc), anillo de piperazina-CH₂ y clorina β-pirrolo-CH₂], 2,76-2,84 (m, anillo de piperazina-CH₂), 0,89-0,92 [s a, (CH₃)₃C-Si], 0,02-0,10 [(m a, (CH₃)₂Si)], -1,40 y -1,48 (s a, α-pirrol-NH) ppm.

Procedimiento general A para los compuestos 30 y 35

(N-TPC-NH-Pip-acetil)_{0,1}-(N-(N,N,N-trimetilamonioil)acetil)_{0,9}-DiTBDMS-CS (TPCNP_{0,1}-DiTB- DMS-CS-TMA_{0,9}, 30). El compuesto 29 (350 mg, 0,61 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (15 ml) en una atmósfera de N₂ y en la oscuridad. Se añadió una cantidad en exceso de una solución de trimetilamina y la mezcla de reacción se agitó a t a durante 24 h.

El disolvente se eliminó al vacío. El producto en bruto se secó completamente a alto vacío, produciendo el producto en bruto 30 (355 mg, 94 %) en forma de un sólido de color pardo. El compuesto en bruto se usó tal cual en la siguiente etapa.

(N-TPC-CO-Pip-acetil)_{0,1}-(N-(N,N,N-trimetilamonioil)acetil)_{0,9}-DiTBDMS-CS (TPC_{CP0,1}-DiTB- DMS-CS-TMA_{0,9}, 35). El procedimiento general A se siguió usando 34 (350 mg, 0,61 mol) y una solución de trimetilamina para dar 35 en forma de un sólido en bruto (360 mg, 94 %). El compuesto en bruto se usó tal cual en la siguiente etapa.

Procedimiento general B para los compuestos 31 y 36

(N-TPC-NH-Pip-acetil)_{0,1}-(N-(N-metilpiperazinil)acetil)_{0,9}-DiTBDMS-CS (TPCNP_{0,1}-DiTBDMS-CS- MP_{0,9}, 31). El compuesto 29 (350 mg, 0,61 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (15 ml) en una atmósfera de N₂ y en la oscuridad. Se añadió una cantidad en exceso de 1-metilpiperazina y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. El disolvente se eliminó al vacío. Después, el producto en bruto se secó completamente a alto vacío produciendo el producto en bruto correspondiente 31 (330, 89 %). El compuesto en bruto se usó tal cual en la siguiente etapa.

(N-TPC-CO-Pip-acetil)_{0,1}-(N-(N-metilpiperazinil)acetil)_{0,9}-DiTBDMS-CS (TPC_{CP0,1}-DiTBDMS-CS- MP_{0,9}, 36). El procedimiento general B se siguió usando 34 (250 mg, 0,38 mol) y 1-metilpiperazina para dar 36 en forma de un sólido en bruto (265 mg, 93 %). El compuesto en bruto se usó tal cual en la siguiente etapa.

Síntesis de productos finales (32, 33, 37 y 38)

La desprotección final se consiguió siguiendo el procedimiento general C: Los compuestos (30/31/35/36) se disolvieron en MeOH en una atmósfera de N₂ y en la oscuridad. La mezcla de reacción se desgasificó mediante purga con N₂ durante 5 minutos y posteriormente se enfrió a 0 °C antes de la adición de 4 ml de HCl conc. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 12 h, antes de concentrarse completamente al vacío. El residuo en bruto se disolvió de nuevo en MeOH y se desgasificó en una atmósfera de N₂ y en la oscuridad. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C antes de la adición de 2 ml de HCl conc. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 12 h. Después, la mezcla de reacción se diluyó y se intercambió iónicamente mediante la adición de NaCl acuoso al 5 % durante 1 h, antes de dializarse contra NaCl acuoso al 8 % durante 24 h y después contra agua desionizada durante 3 días. La solución de color pardo transparente se liofilizó posteriormente durante una noche para proporcionar los productos finales (32/33/37/38 respectivamente) en forma de un material mullido de color pardo.

TPCNP_{0,1}-CS-TMA_{0,90} (32). El procedimiento general C se siguió usando 30 (325 mg, 0,52 mmol) y HCl conc./MeOH para dar 32 en forma de un sólido de color pardo (175 mg, 85 %). ¹H RMN (DMSO-d₆: D₂O, 98:2): δ = 7,83-8,62 (m, β-pirrol- H, fenil-Ho y R-NHTPC-fenil-Ho,*m*), 7,69-7,77 (m, trifenil-H*m,p*), 4,52 (s a, H-1), 4,11-4,14 (m, -CH₂CONGlc y clorina β-pirrol-CH₂), 3,26-3,67 (m a, parcialmente solapado con el pico HDO, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6', 2H GluNH-C=O, TPCNHCOCOCH₂-pip, anillo de piperazina-CH₂] 3,24 (s, +N(CH₃)₃) ppm; UV-vis (DMSO): λ_{máx}: 421, 520, 549, 599, 651 nm.

TPCNP_{0,1}-CS-MP_{0,90} (33). El procedimiento general C se siguió usando 31 (300 mg, 0,45 mmol) y HCl conc./MeOH para dar 33 (165 mg, 84 %) en forma de un sólido de color pardo. ¹H RMN (DMSO-d₆: D₂O, 98:2): δ = 7,83-8,62 (m, β-pirrol-H, fenil- Ho y R-NHTPC-fenil-Ho,*m*), 7,66-7,75 (m, trifenil-H*m,p*), 4,50 (s a, H-1), 4,10-4,14 (m, clorina β-pirrol-CH₂), 2,92-3,55 (m, parcialmente solapado con pico de HDO, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6', 2H GluNH-C=O, CH₂CONGlc, TPCNHCOCOCH₂-pip), 2,33-2,63 (m, parcialmente solapado con el pico DMSO-d₆, anillo de piperazina-CH₂, piperazina-N-CH₃) ppm; UV-vis (H₂O): λ_{máx}: 412, 430, 531, 560, 611, 664 nm; UV-vis (DMSO): λ_{máx}: 421, 521, 548, 596, 651 nm.

TPCCP_{0,1}-CS-TMA_{0,90} (37).

El procedimiento general C se siguió usando 35 (300 mg, 0,48 mmol) y HCl conc./MeOH para dar 37 en forma de un sólido de color pardo (170 mg, 89 %).

FT-IR (KBr): v 3353, 3061, 2950, 1683, 1580, 1473, 1440, 1376, 1291, 1154, 1112, 1067, 1032, 970, 911, 794, 703 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆: D₂O, 98:2): δ = 7,89-8,62 (m, β-pirrol-H, fenil-Ho y R-COTPC-fenil-Ho,*m*), 7,67-7,76 (m, trifenil-H*m,p*), 4,50 (s a, H-1), 4,06-4,16 (m, CH₂CONGlc y clorina β-pirrol-CH₂), 3,26-3,75 (m, parcialmente solapado con pico de HDO, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6', 2H GluNH-C=O, anillo de piperazina-CH₂), 3,24 (s, +N(CH₃)₃) ppm; UV-vis (DMSO): λ_{máx}: 420, 520, 547, 599, 651 nm.

TPC_{0,1}-CS-MP_{0,90} (38). El procedimiento general C se siguió usando 36 (240 mg, 0,38 mmol) y HCl conc./MeOH para dar 38 en forma de un sólido de color pardo (85 mg, 52 %).

FT-IR (KBr): v 3349, 2927, 1644, 1580, 1461, 1440, 1374, 1285, 1070, 1043, 985, 945, 794719, 703 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆: D₂O, 98:2): δ = 7,86-8,63 (m, β-pirrol-H, fenil-Ho y R-COTPC-fenil-Ho,*m*), 7,67-7,76 (m, trifénil- *Hm,p*),

5 4,50 (s a, H-1), 4,08-4,14 (m, clorina β-pirrol-CH₂), 2,92-3,55 (m, parcialmente solapado con pico de HDO, H-2 GlcNAc, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6', 2H GluNH-C=O, CH₂CONGlc) 2,27-2,63 (m, parcialmente solapado con el pico DMSO-d₆, anillo de piperazina-CH₂, piperazina-N-CH₃) ppm; UV-vis (DMSO): λ_{máx}: 421,520, 547, 599, 651 nm.

Análogos de TPP de los compuestos 32, 33, 37 y 38

10 Se observaron resultados inesperados (Retro-oxidación de los compuestos de TPC con respecto a los compuestos de TPP por TBAF/NMP) cuando se usaron siguiendo el procedimiento de desprotección por TBDMS general D para los compuestos finales 32, 33, 37 y 38).

15 Ejemplo: Análogo de TPP del compuesto 32 (TPPNP_{0,1}-CS-TMA_{0,9}): El material 30 (600 mg, 0,86 mmol) se disolvió en N-Metil-2-pirrolidona (NMP) (5-10 ml) seguido de la adición de una cantidad en exceso de fluoruro de tetra-n-butilamonio (TBAF). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a 55 °C, se enfrió, se acidificó con HCl diluido, y se agitó durante 30 minutos antes de dializarse contra NaCl al 8 % (p/v) en agua desionizada durante dos días y contra agua desionizada durante 3 días. Durante este tiempo, el color de la solución cambió gradualmente de gris a rojo.

20 Después, la solución de colo rojo se liofilizó para producir un material de tipo esponja de color pardo. Los materiales se desprotegieron de nuevo, se intercambiaron iónicamente, se dializaron y se liofilizaron. Sin embargo, sorprendentemente debido a la retro-oxidación, los compuestos se convirtieron de nuevo en sus análogos de TPP, que se confirmó por UV-Vis (ya que el pico característico a 650 disminuyó casi completamente). (Datos no mostrados)

25 Resultados

30 La Tabla 3, a continuación, muestra el DS para los compuestos portadores finales. La Tabla 4 muestra los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de los vehículos de quitosano modificado por TPC. La Figura 14 muestra el espectro de ¹H RMN de TPC-CO-Pip (28) - se muestran ambos isómeros. Las Figuras 15-17 muestran espectros equivalentes para los compuestos 21, 29 y 34, respectivamente. La Figura 18 muestra los espectros de RMN de los compuestos portadores finales 37, 38, 32 y 33 en d₆-DMSO/D₂O.

Tabla 3

Registro	Derivados quitosano	Compuesto	TPC-NH-Pip (equiv. por unidad de azúcar usada)	TPC-CO-Pip (equiv. por unidad de azúcar usada)	DS (restos de TPP unidos por unidad de azúcar)
1.	TPCNP _{0,1} -CS-TMA _{0,9}	32	0,10	--	0,10*
2.	TPCNP _{0,1} -CS-MP _{0,9}	33	0,10	--	0,10*
3.	TPCCP _{0,1} -CS-TMA _{0,9}	37	--	0,11	0,13**
4.	TPCCP _{0,1} -CS-MP _{0,9}	38	--	0,11	0,13**

* DS determinado por el ¹H RMN del intermedio 29

** DS determinado por el ¹H RMN del intermedio 34

Tabla 4

Registro	Derivados de quitosano	Compuesto	λ _{abs} * (nm)	λ _{em} * (nm)	Rendimiento cuántico (Φ_F)
1.	TPC(p-NH ₂) ₁	20	420	653	0,00246
2.	TPC-NH-Pip	21	420	653	0,01355
3.	TPCNP _{0,1} -CS-TMA _{0,9}	32	420	653	0,01383
4.	TPCNP _{0,1} -CS-MP _{0,9}	33	420	653	0,01353
5.	TPC(<i>p</i> -CO ₂ H) ₁	26	420	653	0,01331
6.	TPC-CO-Pip	28	420	653	0,01366
7.	TPCCP _{0,1} -CS-TMA _{0,9}	37	420	653	0,01270
8.	TPCCP _{0,1} -CS-MP _{0,9}	38	420	653	0,01275

* Todos los datos recopilados en DMSO a temperatura ambiente

λ - Longitud de onda

Ejemplo 3 - Estudios *in vitro* e *in vivo* Materiales

La línea celular de carcinoma de colon humano HCT116/LUC (transfectado permanentemente con un gen que codifica luciferasa) fue proporcionada amablemente por el Dr. Mohammed Amarzguioui, siRNAsense, Oslo, Noruega. MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) era de Sigma-Aldrich (MO, Estados Unidos; cat. n.º M 2128), disuelto en PBS a una concentración de 5 mg/ml, se filtró estéril y se almacenó a 4 °C. El plásmido *pEGFP-N1* se adquirió en Clontech Laboratories Inc. (CA, Estados Unidos; Cat. N.º 6085-1), producido por ELIM Biopharmaceuticals, Inc. (CA, Estados Unidos) (lote n.º 1002) y se administró a una concentración de 2 mg/ml en agua estéril. Esta solución madre se dividió en alícuotas y se mantuvo a -20 °C. La poli-L-lisina HBr (PM 15000-30000) era de Sigma-Aldrich (MO, Estados Unidos; cat. n.º P 7890). La poli-L-lisina HBr se disolvió y se diluyó en agua destilada, se esterilizó por filtración y se almacenó a -20 °C.

Estudios *in vitro*

15 Cultivo de células.

HCT116/LUC se cultivaron en medio DMEM (Lonza, Veviers, Bélgica) complementadas con suero fetal bovino al 10 % (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) a 37 °C y CO₂ al 5 % en un entorno húmedo.

20 Tratamiento de las células.

Las células HCT116/LUC ($1,5 \times 10^5$ células por pocillo para las mediciones de transfección, $3,75 \times 10^5$ células por pocillo para el ensayo de MTT) se sembraron en placas de 6 pocillos (transfección) y de 24 pocillos (MTT) (Nunc, Roskilde, Dinamarca) y se incubaron durante 24 h (CO₂ al 5 %, 37 °C). El fotosensibilizador TPCS_{2a} o los conjugados de quitosano (16A, 16B, 17A, 19A, 37, 38, 32 o 33) se añadieron entonces a las células, y las células se incubaron durante 18 h (CO₂ al 5 %, 37 °C). Después, las células se lavaron tres veces con medio de cultivo celular y se incubaron durante 4 h (CO₂ al 5 %, 37 °C) en medio que contenía el complejo plasmídico. Después, las células se lavaron una vez. Después de la adición de medio recién preparado, las células se iluminaron con diferentes dosis de luz. Después de 48 h de incubación, la expresión de EGFP (Proteína verde fluorescente mejorada) se analizó mediante citometría de flujo. La supervivencia celular se midió mediante el ensayo MTT en experimentos paralelos. Las células se expusieron a la luz de LumiSource® (PCI Biotech, Oslo, Noruega). LumiSource® se administra con un banco de 4 tubos de luz (4 x 18 W Osram L 18/67, azul) que emiten principalmente luz azul con una longitud de onda pico en la región de 420-435 nm.

35 Preparación de complejos de plásmido/poli-L-lisina.

Se formaron complejos de plásmido/poli-L-lisina con una relación de carga de 2,2 mediante mezcla suave de ADN de plásmido y soluciones de poli-L-lisina. Se diluyeron 2,5 µl de ADN (solución madre 2 µg/µl) con 47,5 µl agua, y se diluyeron 6,92 µl de poli-L-lisina (1 µg/µl) con 43,08 µl de agua. Después de la mezcla, la solución se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se diluyó con medio de cultivo hasta un volumen final de 1 ml y se añadió a las células (1 ml por pocillo).

45 Medida de la transfección.

Las células se tripsinizaron en 100 µl de tripsina (Tripsina-EDTA, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos), se suspendieron de nuevo en 500 µl de medio de cultivo celular y se filtraron a través de un tubo de poliestireno redondo de 5 ml con tapón de filtro celular (BD Falcon) (filtro de nylon con malla de 50 µm) antes del análisis en un citómetro de flujo BD LSR (Becton Dickinson, CA, Estados Unidos). Se midió la EGFP a través de un filtro de 425-475 nm después de la excitación a 488 nm, y se midió el yoduro de propidio (Calbiochem Corporation, CA, Estados Unidos) a través de un filtro de 600-620 nm después de la excitación a 561 nm. Se usó yoduro de propidio (1 µg/ml) para discriminar las células muertas de las células viables, y se realizó un procesamiento por impulsos para discriminar los dobletes celulares de las células individuales. Se recolectaron 10000 eventos para cada muestra, y los datos se analizaron con el software BD FACSDiva (Becton Dickinson, CA, Estados Unidos).

55 Medición de la supervivencia celular.

La supervivencia celular se midió mediante un método basado en la reducción de una sal de tetrazolio soluble en agua (MTT) en un producto de formazano insoluble de color púrpura por deshidrogenasas mitocondriales presentes en células vivas metabólicamente activas. Se añadieron 0,5 ml de medio que contenía 0,125 mg de MTT a las células, seguido de una incubación de 2 h a 37 °C, CO₂ al 5 %. Los cristales de formazano resultantes se disolvieron mediante la adición de 500 µl de DMSO (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) por pocillo. Las placas se leyeron por un espectrofotómetro de microplacas PowerWave XS2 (BioTek Instruments, VT, Estados Unidos). La supervivencia celular se calculó como el porcentaje de controles (paralelos sin luz).

Estudios *in vivo*

Animales. Se criaron ratones hembra Hsd:atómicos *nude-Foxn1^{nu}* en el departamento de animales del Norwegian Radium Hospital. Los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos. El agua y la comida se administraron *ad libitum*. Todos los procedimientos con ratones se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos aprobados por el comité de cuidado de los animales en el Norwegian Radium Hospital, bajo las directrices del Comité Nacional de Ética sobre el bienestar animal.

Los ratones pesaban 22-25 g (5-8 semanas de edad) cuando se incluyeron en el experimento. Las células HCT116/LUC se cultivaron a 37 °C y CO₂ al 5 % en un ambiente húmedo antes del trasplante. Se inyectaron 1,5 x 10⁶ células por vía subcutánea en la cadera derecha de cada ratón. El tamaño del tumor se midió dos o tres veces por semana midiendo dos diámetros perpendiculares. El volumen del tumor se calculó usando la siguiente fórmula:

$$V = (W^2 \times L)/2$$

donde *W* es la anchura y *L* la longitud del tumor medido.

Tratamiento.

Los quitosanos se diluyeron en 1,25 mg/ml de TPC en PBS (compuesto 37) y Tween 80 al 3 % (compuestos 38 y 33). Se inyectaron 88-100 µl por vía intravenosa en la vena de la cola (dosis final 5 m/kg) cuando los tumores habían alcanzado un volumen de 60-100 mm³. Los TPCS_{2a} se diluyeron en 1,25 mg/ml en Tween 80 al 3 % y se inyectaron 88-100 µl por vía intravenosa en la vena de la cola (dosis final 5 m/kg) cuando los tumores habían alcanzado un volumen de 60-100 mm³. 96 horas después de la inyección del fotosensibilizador, los tumores se iluminaron con un láser de diodo de 652 nm (Ceramoptec GmbH, Bonn, Alemania) a una irradiación de 90 mW/cm² y una dosis de luz de 15 J/cm². Para los animales que recibieron tratamiento con PCI + Bleomicina, se inyectaron 1500 UI de Bleomicina (unidades europeas) en 100 µl por vía intraperitoneal. Los tumores se iluminaron 30 minutos después de la inyección de BLM con un láser de diodo de 652 nm (Ceramoptec GmbH, Bonn, Alemania) a una irradiancia de 90 mW/cm². Los animales se cubrieron con papel de aluminio, excepto el área del tumor donde se hizo un orificio en la lámina con un diámetro 2 mm mayor que el área del tumor.

Sistema de imágenes *in vivo*.

La bioluminiscencia se midió con una serie IVIS Lumina 100 de Caliper Life Sciences, MA, Estados Unidos. Los animales se anestesizaron (Zoletil) y se inyectaron con 200 µl de D-Luciferina (Caliper Life Sciences) (20 mg/ml en PBS) por vía intraperitoneal. Las imágenes se tomaron 10 minutos después de la inyección de D-Luciferina. La bioluminiscencia se midió aproximadamente una vez a la semana desde el día 11 después de la inyección de PS. Los animales se sacrificaron cuando el tumor alcanzó un volumen >1000 mm³ o cuando el animal mostraba signos de dolor o comportamiento anormal.

Los datos se analizaron con el software Living Image 4.2 (Caliper Life Sciences).

El efecto biológico de los conjugados de TPP-quitosano 16A y 16B se ensayó en experimentos en los que los conjugados se usaron como agentes fotosensibilizadores en la internalización fotoquímica para potenciar la liberación génica. Los detalles experimentales se describen en Materiales y métodos. Como se puede ver en las Figuras 19 ((a) y (b)), los conjugados 16A y 16B fueron excelentes fotosensibilizadores para la PCI ya que se pudo observar una potenciación sustancial de la transfección con dosis bajas de luz. El efecto se mejoró en relación con el obtenido con el fotosensibilizador TPCS_{2a} que se ha diseñado especialmente para su uso en PCI, y que está en desarrollo clínico para el tratamiento del cáncer (Berg et al., 2011, anteriormente). Por lo tanto, con TPCS_{2a}, no se alcanzaron niveles de transfección similares ni siquiera cuando se emplearon dosis de luz más altas (Figura 19 (e)).

Se realizaron experimentos similares con los TPP-quitosanos 17A y 19A (Figura 19 (c) y (d)). Se puede observar que estos conjugados son incluso más potentes que 16A y 16B. Por lo tanto, en comparación con TPCS_{2a}, fueron al menos 10 veces más activos, ya que incluso cuando se usaron en una concentración 10 veces menor, estos conjugados proporcionaron una potenciación de transfección sustancialmente mayor que la observada con TPCS_{2a}. Esto fue bastante sorprendente en el sentido de que se podría haber esperado que la proximidad de las moléculas sensibilizadoras en los conjugados de quitosano condujera a la inactivación del efecto fotosensibilizador haciendo que los conjugados fueran menos eficaces que las moléculas sensibilizadoras libres que no estarían sometidas a dichos efectos inhibidores. Por lo tanto, parece que los conjugados fotosensibilizador-quitosano interactúan con las membranas endocíticas de alguna manera desconocida que los hace especialmente adecuados para su uso en PCI y métodos relacionados.

Como se puede ver en la Figura 20, se obtuvieron resultados similares con conjugados de TPC-quitosano (compuestos 37, 38, 32 y 33), que en comparación con los conjugados de TPP, tienen la ventaja de que también se pueden activar mediante iluminación con luz roja, lo que permite una mejor penetración del tejido cuando se usa *in*

vivo. Esta es una característica importante en el tratamiento de lesiones más grandes *in vivo* (por ejemplo, tumores más grandes), pero es una desventaja en casos en los que uno solo quiere tener un efecto fotoquímico superficial, por ejemplo, en enfoques de vacunación donde el efecto deseado estará en las capas superiores de la piel.

5 Como se puede ver en la Figura 21, también se obtuvieron resultados similares con el compuesto 54, lo que demuestra que también los conjugados que contienen PEG son eficaces para inducir un efecto PCI.

10 También se han explorado conjugados de TPC en experimentos *in vivo*, investigando si los conjugados son activos en enfoques terapéuticos basados en PDT y PCI. La Figura 22 muestra imágenes de ratones portadores de tumores iluminados tratados con los conjugados 38 y 33 en solitario o junto con el agente anticanceroso citotóxico bleomicina (para más detalles véase Materiales y Métodos). Se usaron animales no tratados y animales inyectados con TPCS_{2a} + bleomicina como controles. Las células cancerosas utilizadas se transfecaron permanentemente para expresar luciferasa de manera que la extensión de los tumores pudiera controlarse mediante imágenes de bioluminiscencia después de la inyección de luciferina. Como se muestra en la Figura 22, los animales de control no tratados y los de TPCS_{2a} + bleomicina (8 y 7, respectivamente) presentaron una fuerte fluorescencia 11 y 15 días después de la inyección del fotosensibilizador (7 y 11 días después de la iluminación), lo que indica la presencia de grandes cantidades de células cancerosas vivas en el tumor. En estos animales, los tumores habían crecido tanto que los animales tuvieron que sacrificarse por razones humanitarias después del día 15. Por el contrario, para los animales tratados con los conjugados de quitosano solo había fluorescencia débil en solo uno de los animales (animal 3) en el día 11, lo que muestra que tanto el tratamiento fotoquímico puro (PCI solo, análogo a un tratamiento con PDT) como el tratamiento de combinación PCI + bleomicina han reducido fuertemente la cantidad de células cancerosas en el tumor. Se puede observar que en los animales tratados con PCI solo (animales 3 y 5) la fluorescencia aumentó entre el día 15 y el día 20, lo que demuestra que el tratamiento fotoquímico de PCI solo no fue suficiente para destruir todas las células tumorales. En contraste, los animales tratados con PCI + bleomicina (animales 4 y 6) no mostraron esencialmente fluorescencia incluso el día 20, lo que demuestra que esta combinación fue significativamente más eficaz que la PCI sola, lo que indica que los conjugados de quitosano indujeron un fuerte efecto de internalización fotoquímica; y mucho más fuerte que lo que indujo el fotosensibilizador TPCS_{2a} que se encuentra en desarrollo clínico para el tratamiento del cáncer.

30 En la Figura 23 se muestran curvas del crecimiento tumoral en los animales tratados (incluyendo también el compuesto 37 del conjugado de quitosano) que corroboran los resultados de imagen mostrados en la Figura 22, y que muestran que en los animales tratados con compuesto 38 + bleomicina o 33 + bleomicina, los tumores parecen estar completamente erradicados. Estos resultados indican nuevamente que los conjugados de quitosano son agentes mucho más eficaces para PCI que TPCS_{2a} (que en combinación con bleomicina no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral en este experimento). Además, se puede observar que la adición de bleomicina al programa de tratamiento mejoró significativamente el efecto terapéutico para los tres conjugados de quitosano probados (en comparación con el tratamiento fotoquímico solo), lo que indica la inducción de un fuerte efecto de internalización fotoquímica por estos conjugados. Esta eficacia mejorada es muy sorprendente ya que la razón principal para diseñar conjugados de fotosensibilizador-polímero es obtener una mejor selectividad del tratamiento debido al denominado efecto EPR. Sin embargo, se debe esperar que esta selectividad potencialmente potenciada vaya seguida de una menor eficacia debido al gran peso molecular de los conjugados, lo que conduce a una difusión mucho más lenta a través de los tejidos que para los fotosensibilizadores de moléculas pequeñas, y por lo tanto, a una menor concentración de sensibilizador en las células tumorales, y dificultades para administrar el sensibilizador a todas las células de un tumor. Con los conjugados de quitosano descritos en la presente invención, claramente éste no era el caso.

Ejemplo 4

Los materiales y métodos generales fueron según el Ejemplo 1, cuando fue adecuado.

50 Véase el Esquema 7 en la Figura 24

Síntesis de trietilenglicol monometil éter tosilato (40) (también denominado 4-metilbencenosulfonato de 2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etilo)

55 Se disolvió trietilenglicol monometil éter 39 (4,87 ml, 30,43 mmol) en THF (25 ml). Se añadió una solución acuosa (25 ml) de hidróxido potásico (3,7 g, 65,95 mmol) y la mezcla resultante se enfrió a 0 °C. Despues, se añadió gota a gota cloruro de p-toluenosulfonilo (6,86 g, 48,77 mmol) disuelto en THF (50 ml) a través de un embudo de adición por goteo durante un periodo de 30 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h más a 0 °C y después se dejó agitar a t a durante una noche. La mezcla de reacción se concentró al vacío para eliminar el THF antes de que se diluyera con EtOAc (40 ml) y agua (30 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 75 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto 40 (7,13 g) en forma de un material oleoso turbio de color gris.

60 FT-IR: 2878, 1598, 1453, 1356, 1177, 1097 cm⁻¹; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,80 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,34 (d, J = 8 Hz, 2H), 4,16 (t, 2H, CH₂OTs), 3,67-3,70 (m, 2H, - CH₂-CH₂OTs), 3,58-3,62 (m, 6H, TEG OCH₂s), 3,37 (s, 3H,

OCH_3), 2,44 (s, 3H, Ar- CH_3) ppm; ^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3 = 144,91,133,19, 129,94, 128,12, 72,05, 70,90, 70,71, 69,36, 68,83, 59,17, 21,78 ppm.

5 Síntesis de (trietilenglicol monoetil éter tosilato)(42) (también denominado 4-metilbencenosulfonato de 2-(2-(2-
etoxietoxi)etoxi)etilo)

10 Se disolvió trietilenglicol monoetil éter 41 (4,9 ml, 28,1 mmol) en THF (30 ml). Se añadió una solución acuosa (25 ml) de hidróxido potásico (3,7 g, 65,95 mmol). Después, la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Después, se añadió gota a gota cloruro de p-toluenosulfonilo (6,86 g, 48,77 mmol) disuelto en THF (50 ml) a través de un embudo de adición por goteo durante un periodo de 30 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h más a 0 °C y después se dejó agitar a ta durante una noche. La mezcla de reacción se concentró al vacío para eliminar el THF antes de que se diluyera con EtOAc (40 ml) y agua (30 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 75 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto 42 (6,83 g) en forma de un material oleoso turbio de color gris.

15 FT-IR: 2870, 2975, 1598, 1453, 1358, 1177, 1110 cm^{-1} ; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,77 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,31 (d, J = 8 Hz, 2H), 4,13 (t, 2H, CH_2OTs), 3,64-3,67 (m, 2H, - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OTs}$), 3,52-3,59 (m, 8H, TEG OCH₂s), 3,49 (c, J = 8 Hz, 2H, -OCH₂CH₃), 2,42 (s, 3H, Ar- CH_3), 1,17 (t, J = 8 Hz, 3H, -OCH₂CH₃) ppm.

20 Síntesis de tosilato de metoxi polietilenglicol (44)

25 Se disolvió polietilenglicol monometil éter 43 (5 g, 14,29 mmol, PM promedio: 350 Da) en THF (50 ml). Se añadió una solución acuosa (25 ml) de hidróxido potásico (1,76 g, 31,44 mmol). Después, la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Después, se añadió gota a gota cloruro de p-toluenosulfonilo (3,27 g, 17,14 mmol) disuelto en THF (50 ml) a través de un embudo de adición por goteo durante un periodo de 30 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h más a 0 °C y después se dejó agitar a ta durante una noche. La mezcla de reacción se concentró al vacío para eliminar el THF antes de que se diluyera con EtOAc (40 ml) y agua (30 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 75 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto 44 (5,91 g) en forma de un material oleoso turbio de color gris.

30 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,74 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,29 (d, J = 8 Hz, 2H), 4,11 (t a, 2H, CH_2OTs), 3,49-3,65 (m, 28H, - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OTs}$ y PEG OCH₂s), 3,32 (s, 3H, OCH₃), 2,39 (s, 3H, Ar- CH_3) ppm.

35 Síntesis de trietilenglicol monoetiléter piperazina (46)

(también denominada 1-(2-(2-(2-
etoxietoxi)etoxi)etil)piperazina (46) (TEG-Pip))

40 Se disolvió piperazina (10,4 g, -120 mmol) en acetonitrilo (150 ml) en una atmósfera de nitrógeno. El compuesto 42 (5 g, 15,04 mmol) disuelto en acetonitrilo (30 ml) se añadió gota a gota. La mezcla resultante se agitó a ta durante 12 h antes de concentrarse al vacío para eliminar el acetonitrilo. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice usando MeOH: CH_2Cl_2 (8:92) como eluyente para proporcionar el compuesto puro 46 (1,52 g, 41 %) en forma de un líquido incoloro. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 3,54-3,64 (m, 10H, TEG OCH₂s), 3,50 (c, J = 8 Hz, 2H, -OCH₂CH₃), 3,43 (s, 1H, NH), 2,88 (t, 4H, Anillo de piperazina-CH₂), 2,55 (t, 2H, OCH₂-CH₂-Piperazina), 2,46 (m a, 4H, Anillo de piperazina-CH₂), 1,18 (t, J = 8 Hz, 3H, -OCH₂CH₃) ppm; ^{13}C RMN: 70,76, 70,70, 70,47, 69,92, 68,86, 66,73, 58,47, 54,89, 50,55, 45,99, 15,25 ppm; MS (ESI) calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3$ ([M+H]⁺) 247,2016, observado 247,2014.

45 Síntesis de 2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)acetaldehído (45)

50 Se disolvió cloruro de oxalilo (5 ml, 58,24 mmol) en CH_2Cl_2 (75 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se enfrió a -78 °C usando una mezcla de hielo seco/acetona antes de la adición gota a gota cuidadosamente de DMSO (5 ml) diluido en CH_2Cl_2 (15 ml). Después de que se completara la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos más antes de la adición gota a gota de trietilenglicol monometil éter 39 (5 ml, 31 mmol) diluido en CH_2Cl_2 (30 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos después de la adición completa. Después, se añadió gota a gota Et₃N (20 ml, 143 mmol) diluido en CH_2Cl_2 (20 ml) durante un periodo de 20 minutos y se agitó durante 30 minutos más a -78 °C antes de dejar que alcanzara la ta. Después, la mezcla de reacción de color blanco "lechoso" se lavó con agua (2 x 45 ml) y con salmuera (40 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró al vacío. El producto en bruto resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando MeOH/EtOAc (0:100-10:90) como eluyente para proporcionar el aldehído 45 (2,40 g). El análisis de ^1H RMN reveló que el compuesto 47 estaba contaminado con algunas impurezas inseparables.

60 FT-IR: 3436, 2879, 1734, 1454, 1353, 1108, 1028 cm^{-1} ; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,73 (s, 1 H, CHO), 4,16 (s, 2H), 3,54-3,76 (m, 10H), 3,38 (s, 3H) ppm. (El producto está contaminado con material de partida. El producto es aproximadamente el 50 %).

Síntesis de 2-(2-(2-etoxyetoxi)etoxi)acetaldehído (47)

El mismo procedimiento que se usó para el compuesto anterior; excepto que el material de partida usado fue trietilenglicol monoetil éter (41) en lugar de trietilenoglicol monometil éter (39). Compuesto 47 (Rendimiento: 2,34 g, ~42 %) contaminado con algunas impurezas inseparables.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9,67 (s, 1 H, CHO), 4,10 (s, 2H), 3,52-3,69 (m, 10H), 3,45 (c, 2H), 1,15 (t, 3H) ppm. (El producto está contaminado con material de partida. El producto es aproximadamente el 42 %).

TEGilación de quitosano por N-modificaciones directas de 3,6-di-O-TBDMS-quitosano Véase el esquema 8 en la Figura 25.

Síntesis de N-(2-(2-etoxyetoxi)etoxi)etilamino quitosano TEG_{0,41}-CS (49a)

Se disolvió DiTBDMS-quitosano 8 (300 mg, 0,77 mmol) en NMP (5 ml) y se calentó a 50 °C en un vial de reacción. Se añadió Cs₂CO₃ (1 g, 3,07 mmol) y una cantidad catalítica de yoduro potásico. Después, el vial de reacción se cerró herméticamente y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h antes de la adición del compuesto 42 (767 mg, 2,31 mmol) a través de una jeringa. La mezcla de reacción se agitó durante 48 h antes de enfriarse y verterse en hielo-agua, y el precipitado obtenido se eliminó por filtración, y se secó usando un horno de vacío. El producto en bruto 48a (270 mg) se obtuvo en forma de un polvo de color amarillo y se usó tal cual estaba en la siguiente etapa de desprotección como se describe a continuación.

Para la desprotección de grupos hidroxilo (eliminación de los grupos sililo), el compuesto en bruto 48a se suspendió en MeOH (15 ml). Se añadió lentamente HCl concentrado (2 ml) a ta y la mezcla resultante se agitó durante 12 h antes de concentrarse al vacío. El producto en bruto obtenido se suspendió de nuevo en MeOH (15 ml) y se añadió HCl conc. (2 ml) y se agitó durante 12 h antes de diluirse e intercambiarse iónicamente con una solución acuosa NaCl (5 %, 35 ml), y después se dializó contra agua desionizada durante 3 días. Después de la finalización de la diáisisis, el material soluble en agua se liofilizó para proporcionar 49a (125 mg) en forma de un material pegajoso de color blanco.

FT-IR: 3418, 2874, 1712, 1631, 1536, 1378, 1077 cm⁻¹; ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ = 4,68 y 4,27 (s, 1H, quitosano H-1 y H-1'), 3,14-3,97 (m a, 10H, quitosano H-2 a H-6, TEG (~ 41 % DS) OCH₂'s y O-CH₂CH₃), 2,96-3,14 (m a, 1H, H-2 y H-2'), 1,21 (t, 1,24 H (~41 % DS) TEG O-CH₂CH₃) ppm.

Síntesis de N-(2-(2-etoxyetoxi)etoxi)etilamino quitosano TEG_{0,27}-CS (51b) (27 % de DS)

El compuesto 49b se preparó usando el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente, excepto que se usaron 1,5 equivalentes del reactivo tosilato de trietilenglicol (42) en lugar de 3 equivalentes. El compuesto 49b (27 mg) se obtuvo en forma de un material pegajoso de color blanco.

FT-IR: 3417, 2876, 1602, 1382, 1259, 1078, 599 cm⁻¹; ¹H RMN (400 MHz, D₂O: DCI, 95:5) δ = 5,13 y 4,95 (s, 1H, quitosano H-1 y H-1'), 3,24-3,99 (m a, 12H, quitosano H-2 a H-6, H-2', TEG (27 % de DS) OCH₂'s y O-CH₂CH₃), 1,21 (t, 0,89 H, TEG O-CH₂CH₃) ppm.

Síntesis de N-acetilbromo-3,6-0-d/TBDMS-quitosano (9)

Se disolvió DiTBDMS-quitosano 8 (3 g, 7,70 mmol) (sintetizado previamente por Ingólfur Magnússon) en CH₂Cl₂ (30 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se enfrió a -20 °C antes de la adición de trietilamina (5,30 ml, 38 mmol) usando una jeringa. Después de 10 minutos de agitación, se añadió gota a gota bromuro de bromoacetilo (2,65 ml, 30,51 mmol) diluido en CH₂Cl₂ (2,5 ml) usando una jeringa. Después, la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a -20 °C, antes de diluirse con CH₂Cl₂ (70 ml) e inmediatamente se concentró al vacío. Después, el material de color pardo espeso se trituró y se lavó con acetonitrilo (3 x 35 ml), se secó antes de disolverse de nuevo en CH₂Cl₂ (40 ml) y se puso en un embudo de decantación, donde se lavó con agua (2 x 25 ml) y con salmuera (35 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar el intermedio bromoacilo 9 (2,57 g) en forma de un material sólido de color pardo.

FT-IR (KBr): ν 3404 (a, NH), 2956-2858 (s, C-H TBDMS), 1682 (vs, C=O amida I), 1530 (vs, C=O amida II), 1473, 1391, 1362, 1311, 1259, 1101, 1005, 837, 777 (Si-C), 669 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃) δ ppm: 4,40 (s a, 1H, H-1), 3,26-4,02 (m, 8H, H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' y GluNH-C=OCH₂Br), 0,90 y 0,88 (s a, 18H, (CH₃)₃C-Si), 0,13 y 0,07 (s a, 12H, CH₃-Si) ppm.

PEGilación de quitosano por sustitución nucleófila en N-acetil bromo-3,6-d/TBDMS-quitosano N-(acetil piperazina-TEG)-quitosano (51)

(i) Se disolvió acetil bromoquitosano 9 (200 mg, 0,397 mmol) en CH₂Cl₂ (25 ml) en una atmósfera de nitrógeno. El compuesto 46 (204 mg, 0,828 mmol) diluido en CH₂Cl₂ (10 ml) se añadió gota a ta. La mezcla resultante se agitó durante 10 minutos antes de la adición de trietilamina (115 µl, 0,828 mmol). La agitación se continuó a ta durante 24 h y el consumo total del material de partida 46 se confirmó por TLC de comprobación en MeOH: CH₂Cl₂ (1:9). Después, la mezcla de reacción se puso en un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con agua (2 x 35 ml) y salmuera (35 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para

proporcionar el compuesto 50 (214 mg) en forma de un líquido en bruto que se usó tal cual en la siguiente etapa de desprotección.

(ii) Para la desprotección de grupos hidroxilo (eliminación de los grupos sililo), el compuesto en bruto 50 se suspendió en MeOH (15 ml). Se añadió lentamente HCl concentrado (2 ml) a ta y la mezcla resultante se agitó durante 12 h antes de concentrarse al vacío. El producto en bruto obtenido se suspendió de nuevo en MeOH (15 ml) y se añadió HCl conc. (2 ml) y se agitó durante 12 h antes de diluirse e intercambiarse iónicamente con una solución acuosa NaCl (5 %, 35 ml), y después se dializó contra agua desionizada durante 3 días. Después de la finalización de la diáisisis, el material soluble en agua se secó al vacío para proporcionar 51 (112 mg) en forma de un material pegajoso transparente de color amarillento.

¹⁰ ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ = 4,63 (s, 1H, quitosano H-1), 2,74-3,76 (m, 30H, quitosano H-2 a H-6, GlcNHCOCH₂-Pip- TEG, TEG OCH₂'s y O-CH₂CH₃, anillo de piperazina-CH₂'s), 1,21 (t, 3 H, TEG O-CH₂CH₃) ppm; DS = 100 %.

Síntesis de N-acetil-piperazina tetrafenilporfirina (TPP-NH-Pip) (5)

¹⁵ Se realizó como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1 y el Esquema 1.

Síntesis de TPP-NH-CO-CH₂-TBDMS-quitosano (55)

²⁰ Véase el esquema 9 en la Figura 26.

Se disolvió DiTBDMS-quitosano (100 mg, mmol) en NMP (10 ml) a 55 °C. Se añadió carbonato de cesio (500 mg, 1,54 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos antes de la adición del compuesto 4 (72,2 mg, 0,096 mmol). Se añadió una cantidad catalítica de yoduro potásico y la agitación se continuó durante 24 h antes de añadir una cantidad catalítica de DMAP y se agitó durante 24 h antes de enfriarse y verterse en agua. El precipitado se eliminó por filtración, se secó en un horno de vacío para proporcionar el compuesto 55 en forma de un sólido en bruto. Sin embargo, se observó un color rojo de la solución de agua que indicaba que parte del compuesto se perdió en el agua. Eso podría deberse a NMP; por lo tanto, la diáisisis en esta etapa podría ser útil.

³⁰ ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ ppm: 8,84-8,86 (m a, β-pirrol H), 8,68 (s, TPPNHCO), 8,21-8,22 (m, tetrafenil-Ho), 7,99 (d, J = 8,0 Hz, RNHTPP-fenil-Hm), 7,72-7,79 (m, trifénil-Hm,p), 2,72-4,80 (m, quitosano H-2-H6, TPPNHCOCH₂), 0,89-0,90 (s a, (CH₃)₃C-Si), 0,05-0,07 (s a, 12H, CH₃-Si). -2,78 (s, α-pirrol NH); ((DS de TPP-NHCOCH₂ = ~ 5 %)

Síntesis de TPPp_{0,1}-BrA_{0,9}-DiTBDMS-CS (52)

³⁵ El compuesto 9 (800 mg, 1,587 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (40 ml) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Se añadió TPP-NH-Pip 5 (120 mg, 0,158 mmol) seguido de la adición de trietilamina (30 µl, 0,216 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a ta. El consumo completo del material de partida 5 se confirmó por TLC (MeOH: CH₂Cl₂, 1:9). La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (75 ml), se lavó con agua (2 x 35 ml) y salmuera (25 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar 52 (rendimiento: 716 mg) en forma de un sólido de color púrpura.

⁴⁰ ¹H RMN (CDCl₃) δ ppm: 9,31 (s, TPPNHCO), 8,84-8,86 (m, β-pirrol H), 8,20-8,23 (m, tetrafenil-Ho), 7,97 (d, J = 8,0 Hz, RNHTPP-fenil-Hm), 7,74-7,79 (m, trifénil-Hm,p), 4,43 (s a, H-1), 3,50-4,14 (m, quitosano H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' y H-2 GluNHCO, TPPNHCOCH₂-Pip, -CH₂CONGlc y anillo de piperazina-CH₂'s), 2,81-2,86 (m, anillo de piperazina-CH₂'s), 0,91, 0,87 (s a, (CH₃)₃C-Si), 0,07, 0,14 (s a, CH₃-Si), -2,77 (s a, α-pirrol NH) ppm; (DS de TPP-NH-Pip = ~10 %).

TEGilación y desprotección de DiTBDMS-CS conjugado con TPP

⁵⁰ Síntesis de N-(TPP-NH-CO-CH₂)-quitosano TEGilado (57)

(i) El compuesto en bruto 55 (350 mg, 0,833 mmol) se disolvió en NMP (10 ml) a 50 °C en un vial de reacción. Se añadió Cs₂CO₃ (1,09 g, 3,33 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos antes de la adición del compuesto 42 (1,108 g, 4,16 mmol) y una cantidad catalítica de yoduro potásico. La agitación se continuó durante 12 h antes del enfriamiento de la mezcla de reacción, se diluyó con agua (30 ml) y se dializó contra agua desionizada durante 3 días antes de liofilizarse para proporcionar el compuesto 56 que se usó tal cual en la siguiente etapa de desprotección.

(ii) El compuesto en bruto 56 se suspendió en MeOH (15 ml). Se añadió lentamente HCl concentrado (2 ml) a ta y la mezcla resultante se agitó durante 12 h antes de concentrarse al vacío. El producto en bruto obtenido se suspendió de nuevo en MeOH (15 ml) y se añadió HCl conc. (2 ml) y se agitó durante 12 h antes de diluirse e intercambiarse iónicamente con una solución acuosa NaCl (5 %, 35 ml), y después se dializó contra agua desionizada durante 3 días. Después de la finalización de la diáisisis, el material parcialmente soluble en agua se secó al vacío para proporcionar 57 (115 mg) en forma de un sólido de color pardo.

Síntesis de TPP-NH-Pip-quitosano TPP_{0,1}-CS-TEG_{0,9} TEGilado (54)

(i) El compuesto 52 (400 mg, 0,799 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (35 ml) en una atmósfera de nitrógeno. El compuesto 46 (394 mg, 1,56 mmol) se añadió seguido de la adición de Et₃N (222 µl, 1,56 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 24 h a ta. Después, el análisis por TLC se comprobó y se añadió Et₃N (222 µl, 1,56 mmol) con el fin de completar el consumo del material de partida 46 y la agitación continuó durante 12 h más. Después, la mezcla de reacción se concentró al vacío para proporcionar 53 (417 mg) en forma de un material en bruto que se usó tal cual en la siguiente etapa de desprotección.

(ii) El compuesto en bruto 53 se suspendió en MeOH (15 ml). Se añadió lentamente HCl conc. (2 ml) a ta y la mezcla resultante se agitó durante 12 h antes de concentrarse al vacío. El producto en bruto obtenido se suspendió de nuevo en MeOH (15 ml) y se añadió HCl conc. (2 ml) y se agitó durante 12 h antes de diluirse e intercambiarse iónicamente con una solución acuosa NaCl (5 %, 35 ml), y después se dializó contra agua desionizada durante 3 días. Después de la finalización de la diálsis, el material soluble en agua se liofilizó para proporcionar el compuesto final 54 (252 mg) en forma de un sólido de color púrpura-rojo-pardo.

FT-IR: 3431,2869, 1665, 1529, 1442, 1308, 1109, 1070, 1029, 800, 701, 559 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d6: D₂O 96:4) δ ppm: 8,83 (m a, β-pirrol H), 8,15-8,22 (m, tetrafenil-Ho), 8,11 (d, J = 8,0 Hz, RNHTPP-fenil-Hm), 7,80-7,88 (m, trifenil-Hm,p), 4,55 (s a, H-1), 2,54-3,65 (m a, parcialmente solapado con el pico HDO, quitosano H-2 GlcN, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6' y H-2 GluNHCO, TPPNHCOCH₂-pip, CH₂CONGlc, anillo de piperazina-CH₂'s, TEG OCH₂'s y TEG OCH₂CH₃), 1,09 (t, TEG OCH₂CH₃) ppm.; (DS de TPP-NH-Pip = ~ 10 % y DS de TEG= ~90 %)

Los datos estructurales se confirmaron por RMN, Análisis FT-IR y de masas (datos no mostrados). Se muestra un espectro de RMN representativo para el compuesto 54 en la Figura 27.

Ejemplo 5

Ensayo de activación de linfocitos T *in vitro*

Para probar el efecto de los conjugados de quitosano 32 y 38 sobre la presentación del antígeno restringido a MHC de clase I y la activación de linfocitos T CD8+, se incubaron macrófagos primarios murinos con los conjugados 32 y 38 y el antígeno peptídico de ovoalbúmina OVA 257-264 en una configuración de linfocitos T específicos de antígeno con un clon de linfocitos T CD8+ específico de ovoalbúmina (OVA 257-264). La producción de IL-2 a partir de linfocitos T CD8+ activados se analizó mediante ELISA.

Se usaron macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) como células presentadoras de antígeno (APC) en una configuración de linfocitos T específicos de antígeno con hibridomas de linfocitos T específicos de ovoalbúmina. Los BMDM se generaron cultivando células de médula ósea de ratón durante al menos 5 días en medio complementado con sobrenadante de línea celular L-292 al 20 %.

Se incubaron 30.000 APC por pocillo durante una noche en placas de 96 pocillos con o sin conjugados de quitosano 32 y 38 a una concentración de conjugados que dio una concentración de TPC de 0,05 µg/ml. Al día siguiente, las APC se incubaron con 2 µg/ml de péptido antigénico (OVA 257-264, de Anaspec) durante 4 h (todas las estimulaciones por triplicado).

Las células se lavaron y se expusieron a diferentes dosis de luz azul (0; 30, 60, 90, 180 s) antes de que se añadieran 100.000 linfocitos T específicos de ovoalbúmina por pocillo y se cocultivaron con las APC durante una noche. Se usó el clon de linfocitos T CD8+ RF33.70 (reconocimiento restringido de MHC I de OVA 257-264).

Después del co-cultivo durante una noche de los linfocitos T CD8+ y las APC, se recogieron los sobrenadantes del cultivo celular. Los sobrenadantes se analizaron para la producción de interleucina (IL)-2 a partir de linfocitos T activados mediante el uso de un ELISA de IL-2 de ratón estándar (IL-2 ELISA DuoSet, RnD Systems, análisis de duplicados de cada pocillo de cultivo de linfocitos T, se analizaron 25 µl del sobrenadante no diluido en cada pocillo ELISA).

Los resultados (Figura 28) mostraron que, con ambos conjugados, la producción de IL-2 por los linfocitos T específicos de antígeno CD8+ se aumentaba significativamente en las células iluminadas (por ejemplo, una duplicación para el conjugado de compuesto 32, Figura 28A). En las células de control iluminadas incubadas con los conjugados sin el antígeno no se observó dicho aumento (datos no mostrados). Esto demuestra que el efecto observado fue dependiente de antígeno, y no se debió a algún efecto inespecífico del tratamiento fotoquímico, demostrando una presentación mejorada del péptido antigénico en la superficie de las APC como la causa del aumento observado en la producción de IL-2.

REIVINDICACIONES

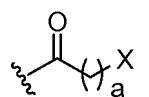
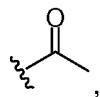
1. Un compuesto que comprende un conjugado de un fotosensibilizador y quitosano, en el que dicho compuesto es un compuesto de Fórmula (I):

5



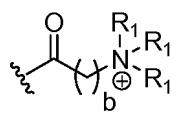
en la que

10 n es un número entero superior o igual a 10, preferiblemente un número entero de 10 a 100,
R aparece n veces en dicho compuesto y
en el 0,5 %-99,5 % de dichos grupos Rn totales, cada R es un grupo A seleccionado de:
H,



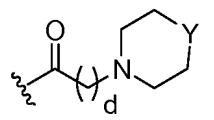
15

en la que a es 1, 2, 3, 4 o 5; y X es Br, Cl u OH;



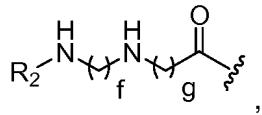
20

en la que cada R1, que puede ser igual o diferente, se selecciona de H, CH3 y -(CH2)c-CH3; b es 1, 2, 3, 4 o 5; y c es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

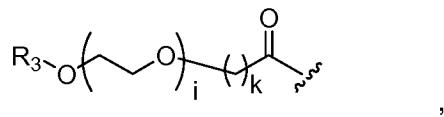


25

en la que Y es O; S; SO2. -NCH3, o -N(CH2)eCH3. d = 1, 2, 3, 4 o 5; y e = 1, 2, 3, 4 o 5;

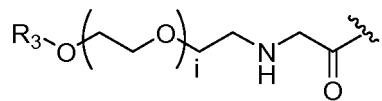


30 en la que R2 es -(CH2)h-CH3 o -CO-(CH2)h-CH3; f es 1, 2, 3, 4 o 5; g es 1, 2, 3, 4 o 5; y h es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

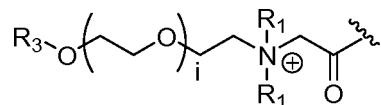


35

en la que R3 es -(CH2)j-CH3, i es un número entero de 1 a 200, preferiblemente de 1-10; j es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y k es 1, 2, 3, 4 o 5;



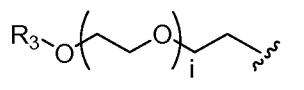
en la que R_3 es $-(\text{CH}_2)_j\text{-CH}_3$, i es un número entero de 1 a 200, preferiblemente de 1-10; y j es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;



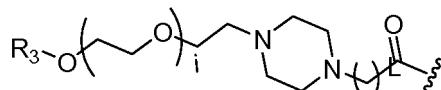
5

en la que R_3 es $-(\text{CH}_2)_j\text{-CH}_3$, i es un número entero de 1 a 200, preferiblemente de 1-10; j es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R_1 , que pueden ser iguales o diferentes, se selecciona de H , CH_3 y $-(\text{CH}_2)_c\text{-CH}_3$; y c es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

10



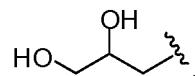
en la que $\text{R}_3=-(\text{CH}_2)_j\text{-CH}_3$, i es un número entero de 1 a 200, preferiblemente de 1-10; y j es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;



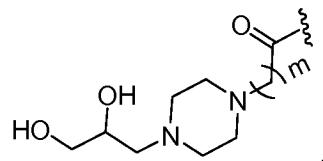
15

en la que $\text{R}_3=-(\text{CH}_2)_j\text{-CH}_3$, i es un número entero de 1 a 200, preferiblemente de 1-10; L es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; y j es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

20

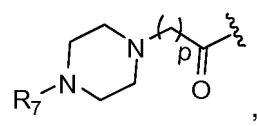
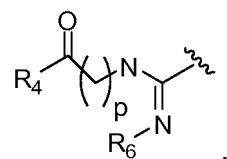
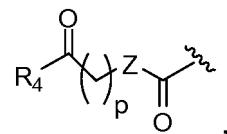
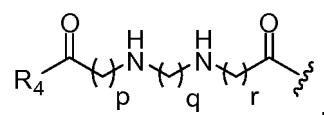
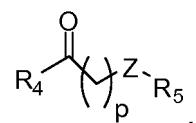
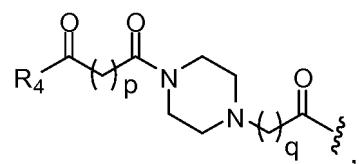
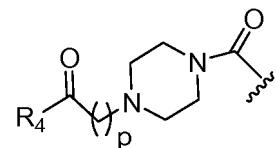
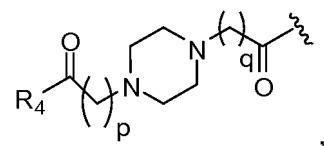
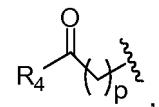
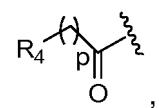


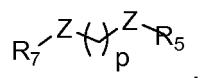
y



25

en la que m es 1, 2, 3, 4 o 5; en la que cada grupo R puede ser igual o diferente; y en el 0,5 %-99,5 % de dichos grupos R_n totales, cada R es un grupo B seleccionado de:

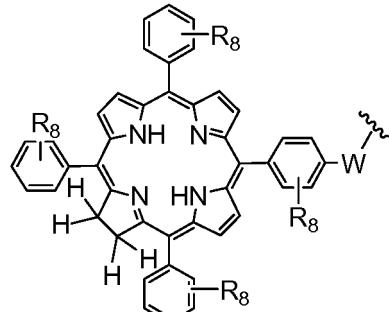
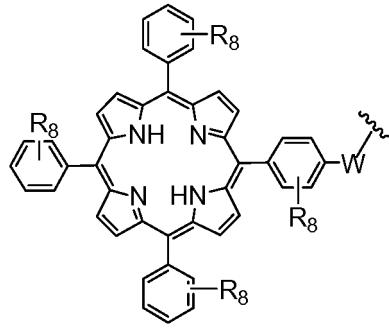




en la que

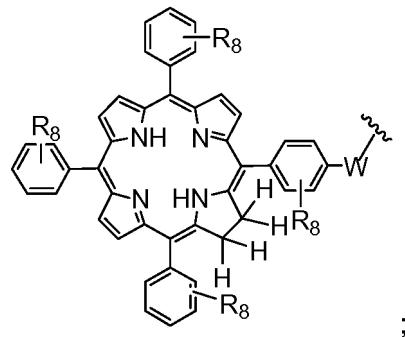
p es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; q es 1, 2, 3, 4 o 5; y r es 1, 2, 3, 4 o 5;

R₄ es un grupo seleccionado de:



y

10



;

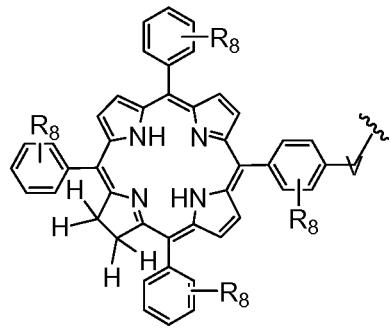
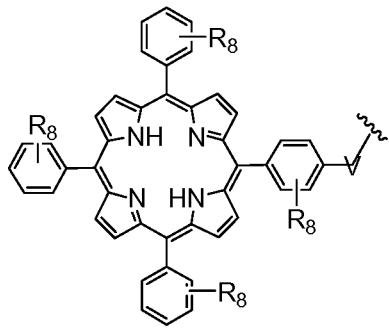
W es un grupo seleccionado de O, S, NH o N(CH₃);

R₅ es un grupo seleccionado de: -(CH₂)_s-CO-; -(CH₂)_s-Z-(CH₂)_tCO- y -(CH₂)_s-Z-(CH₂)_t-Z-CO-; en las que s es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; t es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

Z es NH, O, S, o SO₂;

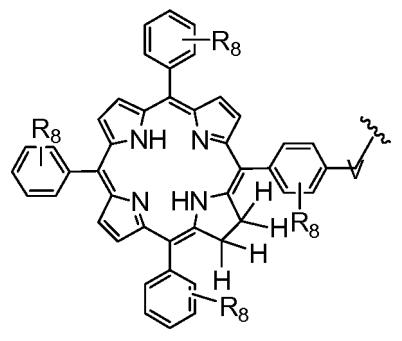
R₆ es un grupo seleccionado de -CN y CH₃;

R₇ es un grupo seleccionado de:



20

y

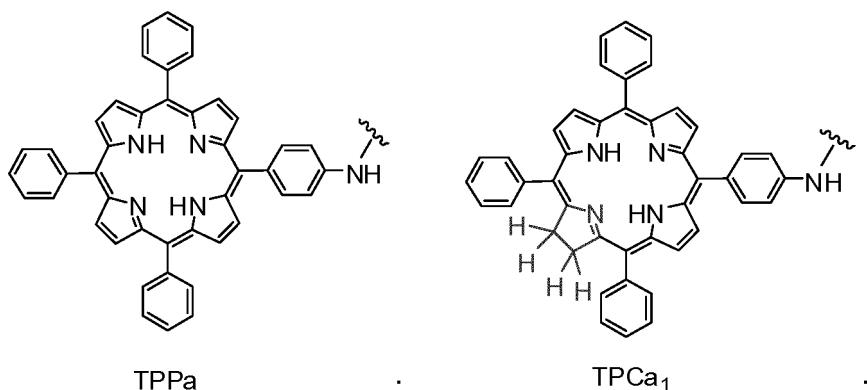


V es un grupo seleccionado de CO, SO₂, PO, PO₂H o CH₂; y

R₈ es un grupo (sustituido en la posición o, m o p), que puede ser igual o diferente, seleccionado de H, -OH, -OCH₃, -CH₃, -COCH₃, C(CH₃)₄, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂ y -NCOCH₃; en la que cada grupo R puede ser igual o diferente.

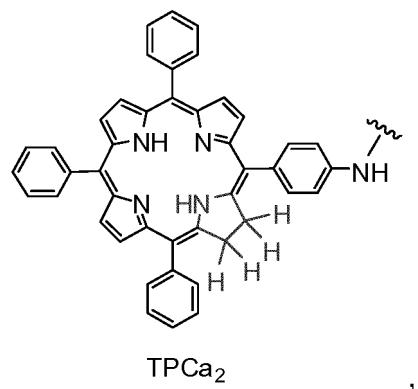
5

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R₄ se selecciona de



10

y

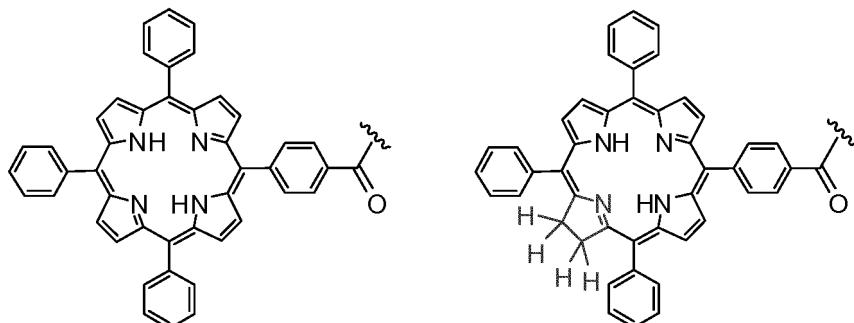


15

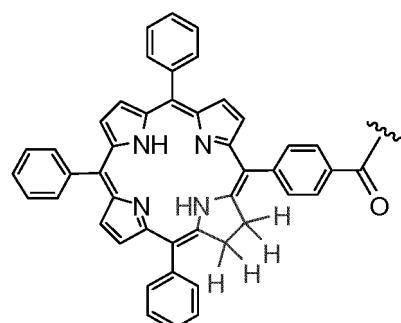
preferiblemente TPCa₁ o TPCa₂;

y/o

en el que R₇ se selecciona de



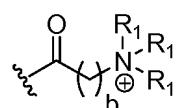
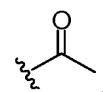
y



5

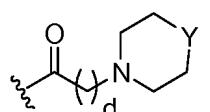
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el grupo A proporciona del 70 al 95 % de los grupos Rn totales y el grupo B proporciona del 5 al 30 % de los grupos Rn totales.

10 4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que cada grupo R del grupo A se selecciona de:



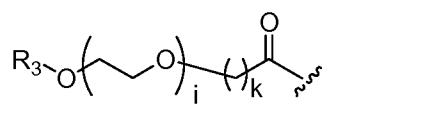
15

en los que preferiblemente cada R₁ es CH₃ y b es 1;



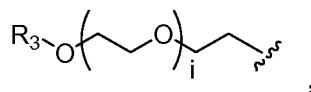
20

en los que preferiblemente Y es -NCH₃ y d es 1;

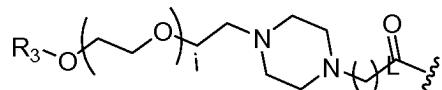


25

en los que preferiblemente j es 0 o 1; i es 3 o 6 y k es 1;

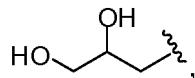


en los que preferiblemente j es 1 e i es 2;



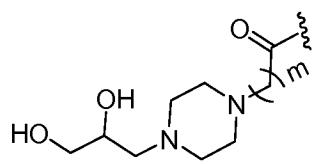
5

en los que preferiblemente j es 0 o 1 e i es 2, 4 o 5 y L es 1;



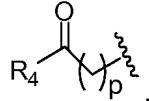
10

y



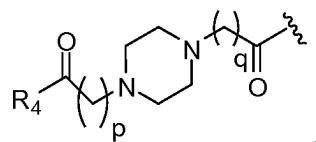
15 en los que preferiblemente m es 1, y cada grupo R puede ser igual o diferente;
y/o

en los que cada grupo R del grupo B se selecciona de:



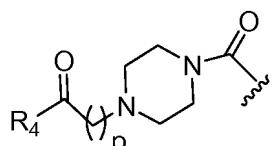
20

en los que preferiblemente p es 1;



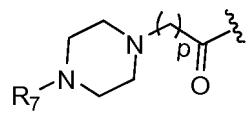
25

en los que preferiblemente p es 1 y q es 1;



30

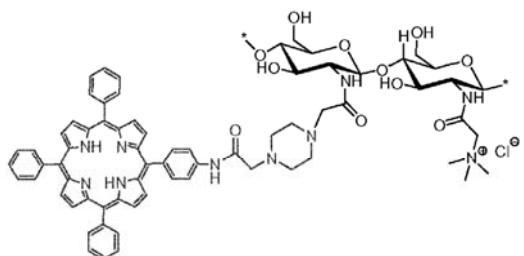
en los que preferiblemente p es 1; y



35

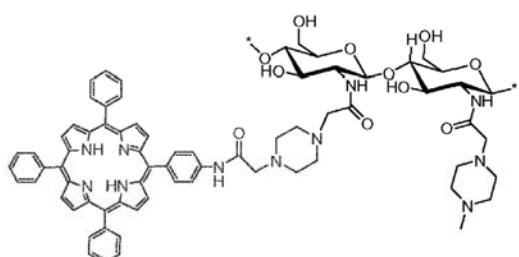
en los que preferiblemente p es 1, y cada grupo R puede ser igual o diferente.

5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho compuesto se selecciona de un compuesto como se expone a continuación:

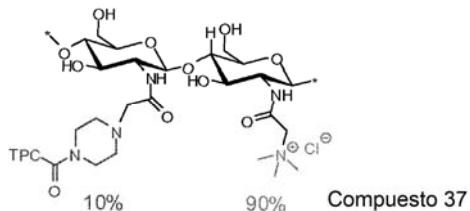


Compuesto 16A, 16B - 10%, 90%
Compuesto 17A, 17B - 25%, 75%

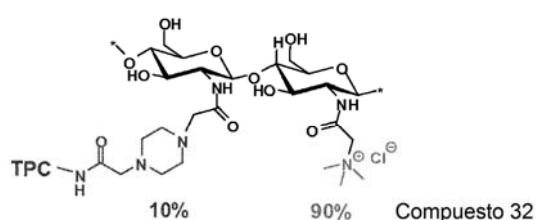
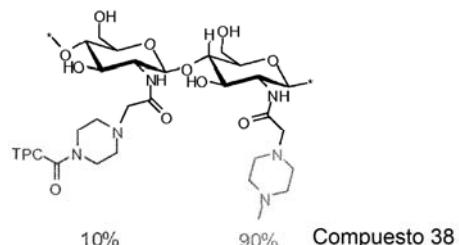
5

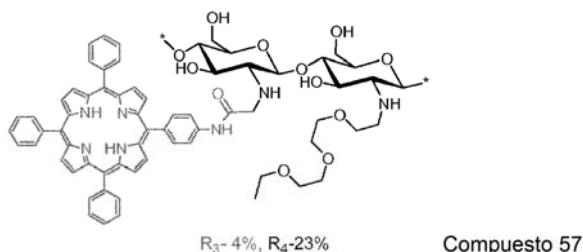
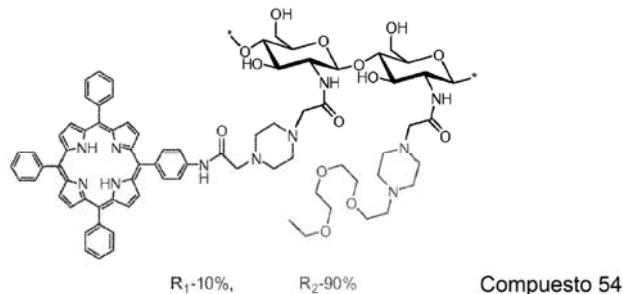
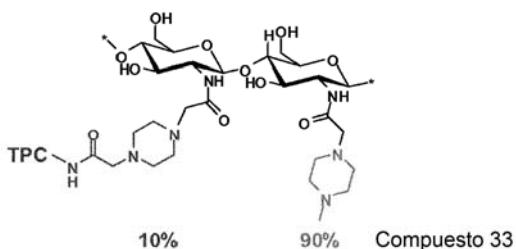


Compuesto 18A, 18B - 10%, 90%
Compuesto 19A, 19B - 25%, 75%



10





5

6. Un método *in vitro* o *ex vivo* para introducir una molécula en el citosol de una célula, que comprende poner en contacto dicha célula con la molécula a introducir y un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, e irradiar la célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador del compuesto, liberando así la molécula en el citosol.

10 7. Un método *in vitro* o *ex vivo* para lograr la muerte de una célula que comprende poner en contacto dicha célula con un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, e irradiar la célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador del compuesto para generar especies reactivas de oxígeno que causen la muerte de dicha célula.

15 8. Un método *in vitro* o *ex vivo* para expresar una molécula antigénica o una parte de la misma en la superficie de una célula, que comprende poner en contacto dicha célula con dicha molécula antigénica y un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, e irradiar la célula con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador del compuesto, en el que dicha molécula antigénica se libera en el citosol de la célula y la molécula antigénica o una parte de la misma, de tamaño suficiente para estimular una respuesta inmune, se presenta sobre la superficie de la célula.

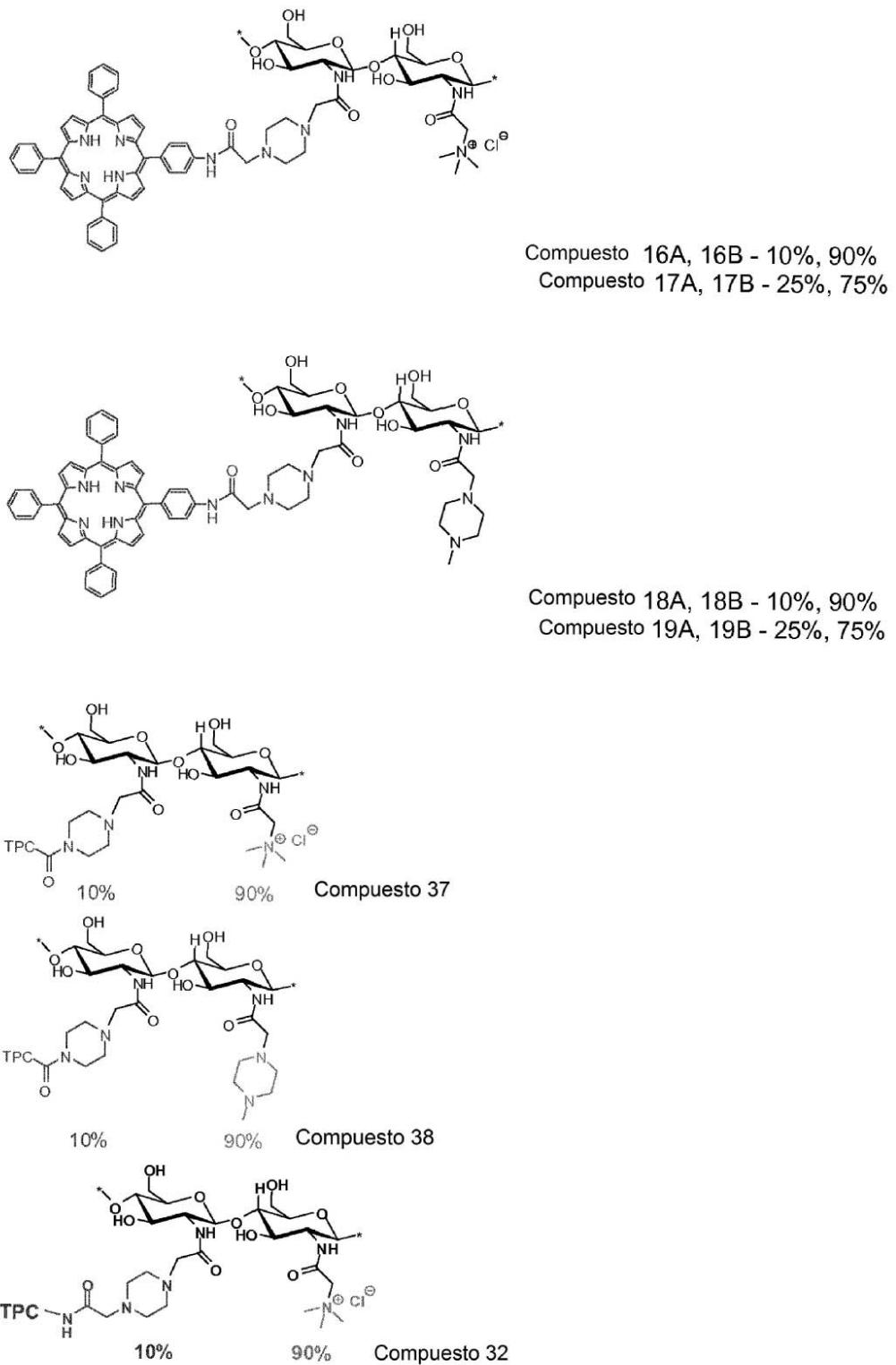
20 9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y uno o más diluyentes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente una molécula a internalizar.

25 10. Un compuesto o composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 9 para su uso en terapia, preferiblemente para terapia contra el cáncer, terapia génica o para estimular una respuesta inmune.

30 35 11. Un compuesto o composición como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 9, y opcionalmente una molécula a internalizar, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o infección en un sujeto, preferiblemente en el que un crecimiento celular anormal o excesivo es evidente o en el que la expresión anormal elevada o suprimida del gen es evidente, especialmente preferiblemente en el que dicha enfermedad es cáncer, en el que, preferiblemente,

- a) dicho tratamiento o prevención comprende poner en contacto células en el sujeto con una molécula a introducir y dicho compuesto o composición, e irradiar las células con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador del compuesto, en donde preferiblemente dicha molécula a introducir es una molécula citotóxica, preferiblemente bleomicina; o
- 5 b) dicho tratamiento o prevención comprende poner en contacto células en el sujeto con dicho compuesto o composición, e irradiar las células con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador del compuesto para generar especies reactivas de oxígeno que causen la muerte de dichas células.
- 10 12. Un compuesto o composición como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 9 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o infección en un sujeto generando una respuesta inmune, preferiblemente un método de vacunación, en el que preferiblemente dicho tratamiento o prevención comprende poner en contacto células en un sujeto con dicho compuesto o composición, e irradiar las células con luz de una longitud de onda eficaz para activar el agente fotosensibilizador del compuesto, en el que dicha molécula antigénica se libera en el citosol de las células y la molécula antigénica o una parte de la misma, de tamaño suficiente para estimular una respuesta inmune, se presenta sobre la superficie de las células.
- 15 13. Una célula o una población de células que puede obtenerse por un método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
- 20 14. La célula o población de células según la reivindicación 13 para su uso en terapia, preferiblemente para terapia contra el cáncer, terapia génica o para estimular una respuesta inmune.
- 25 15. Un kit que comprende un compuesto o composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 9 y una molécula a internalizar, preferiblemente para uso simultáneo, separado o secuencial para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o infección en un sujeto, preferiblemente para su uso en terapia, preferiblemente terapia contra el cáncer, terapia génica o para estimular una respuesta inmune.

Figura 1



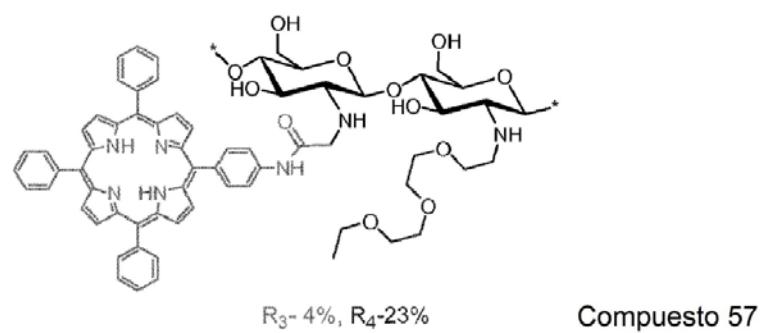
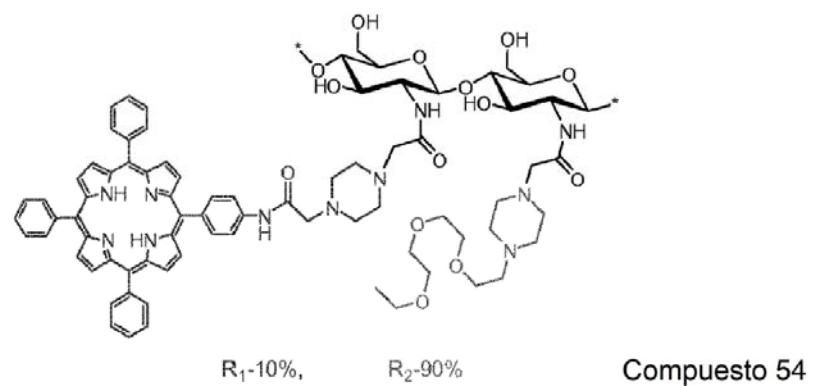
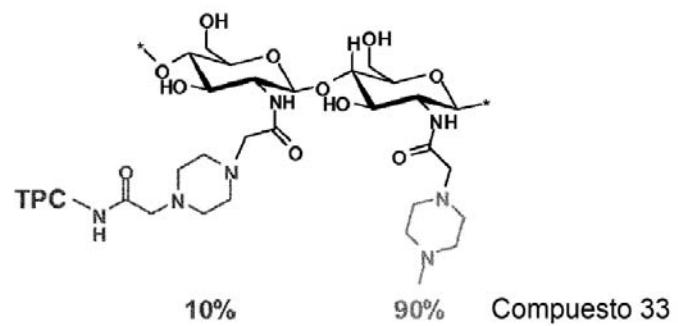


Figura 2
Esquema 1

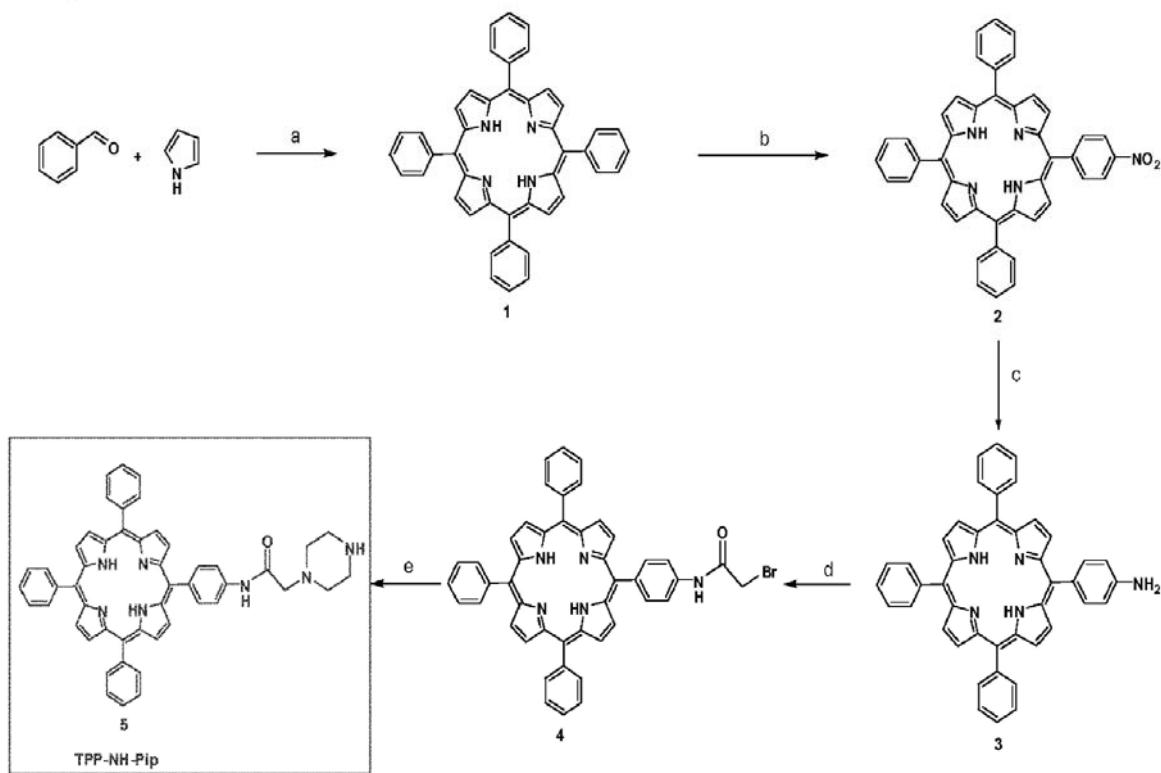


Figura 3
Esquema 2

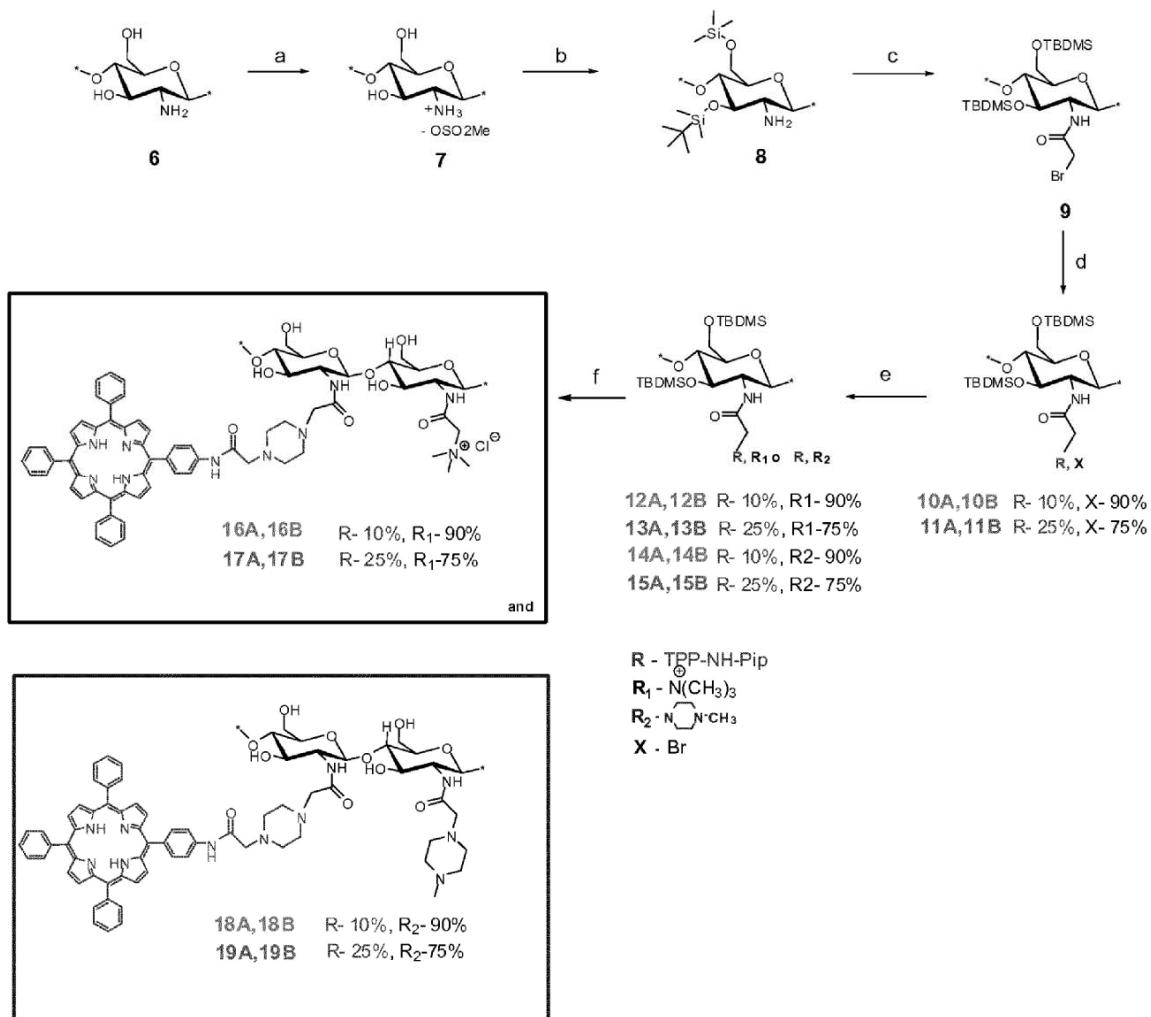


Figura 4

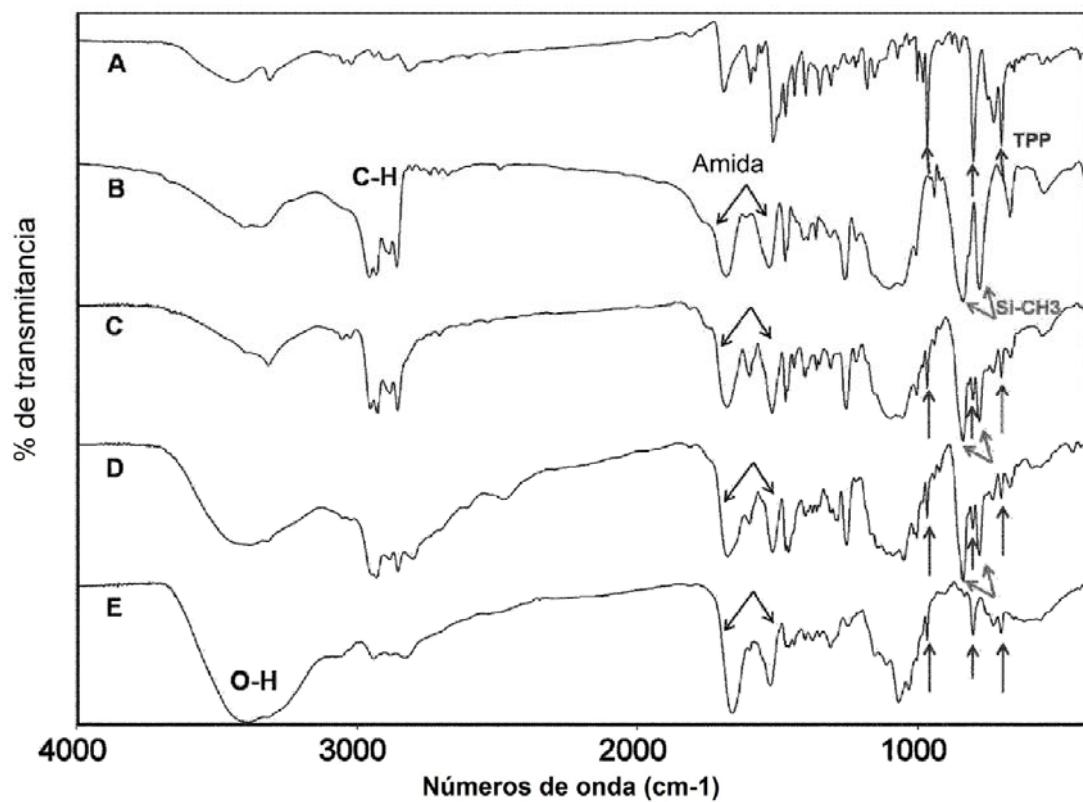


Figura 5

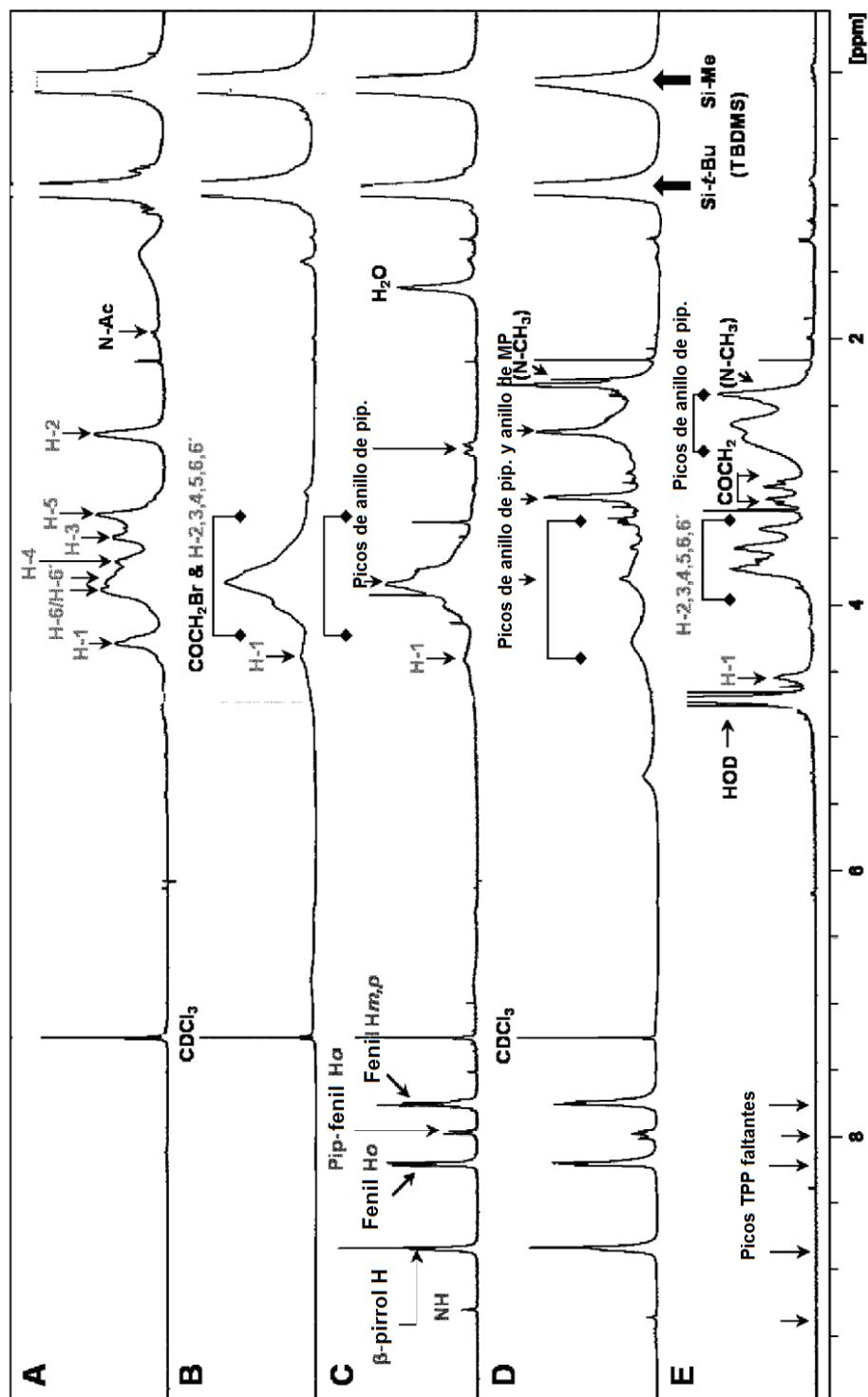


Figura 6

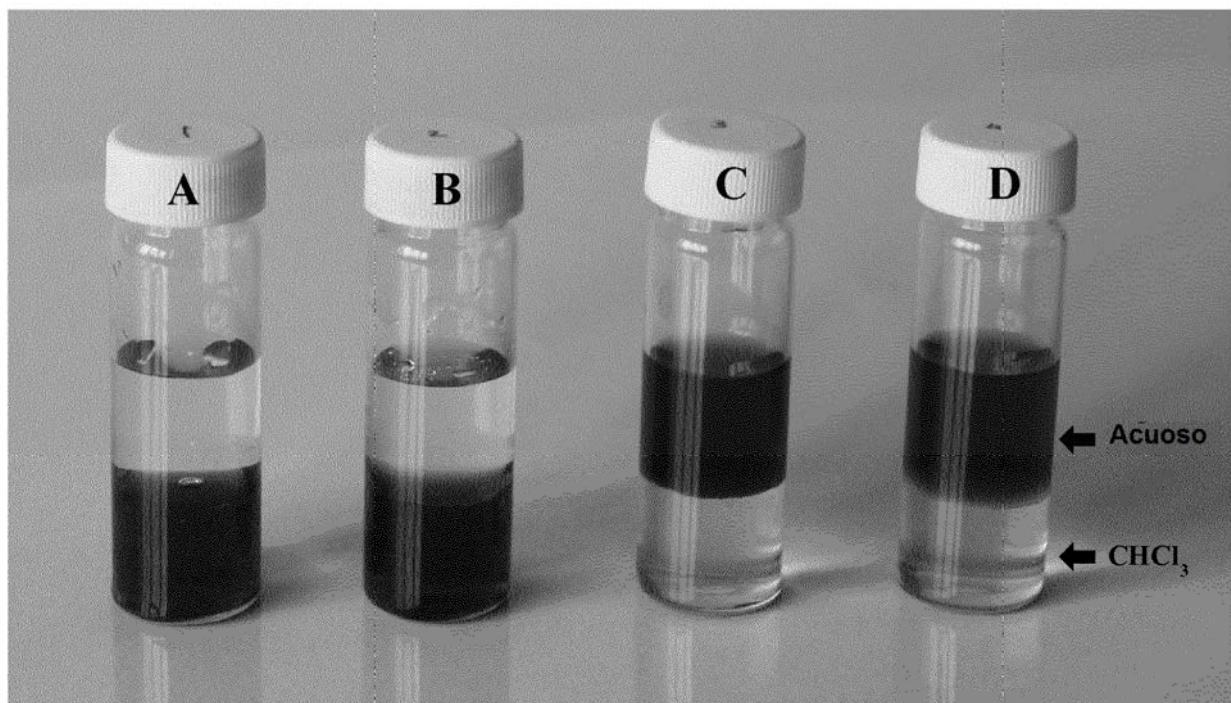


Figura 7

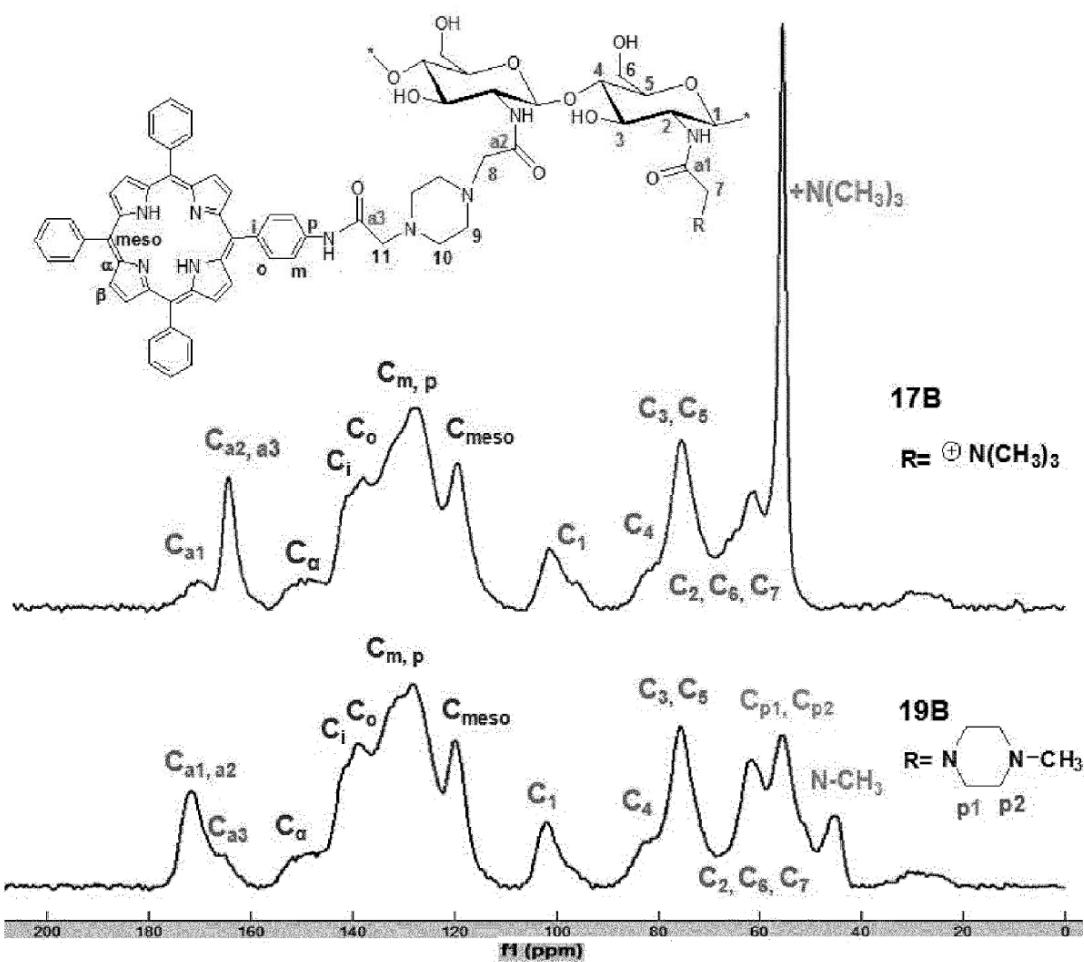


Figura 8

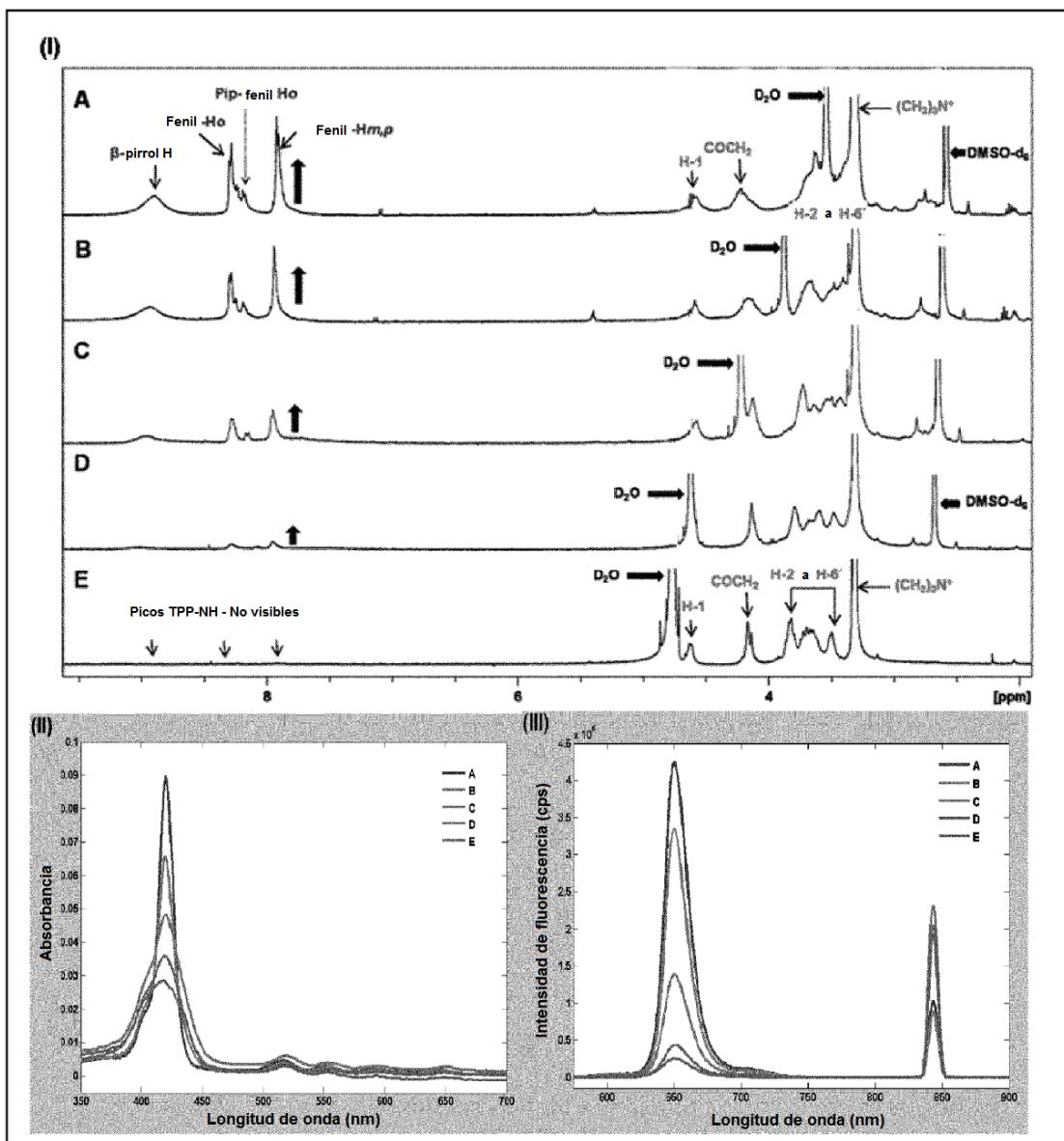


Figura 9

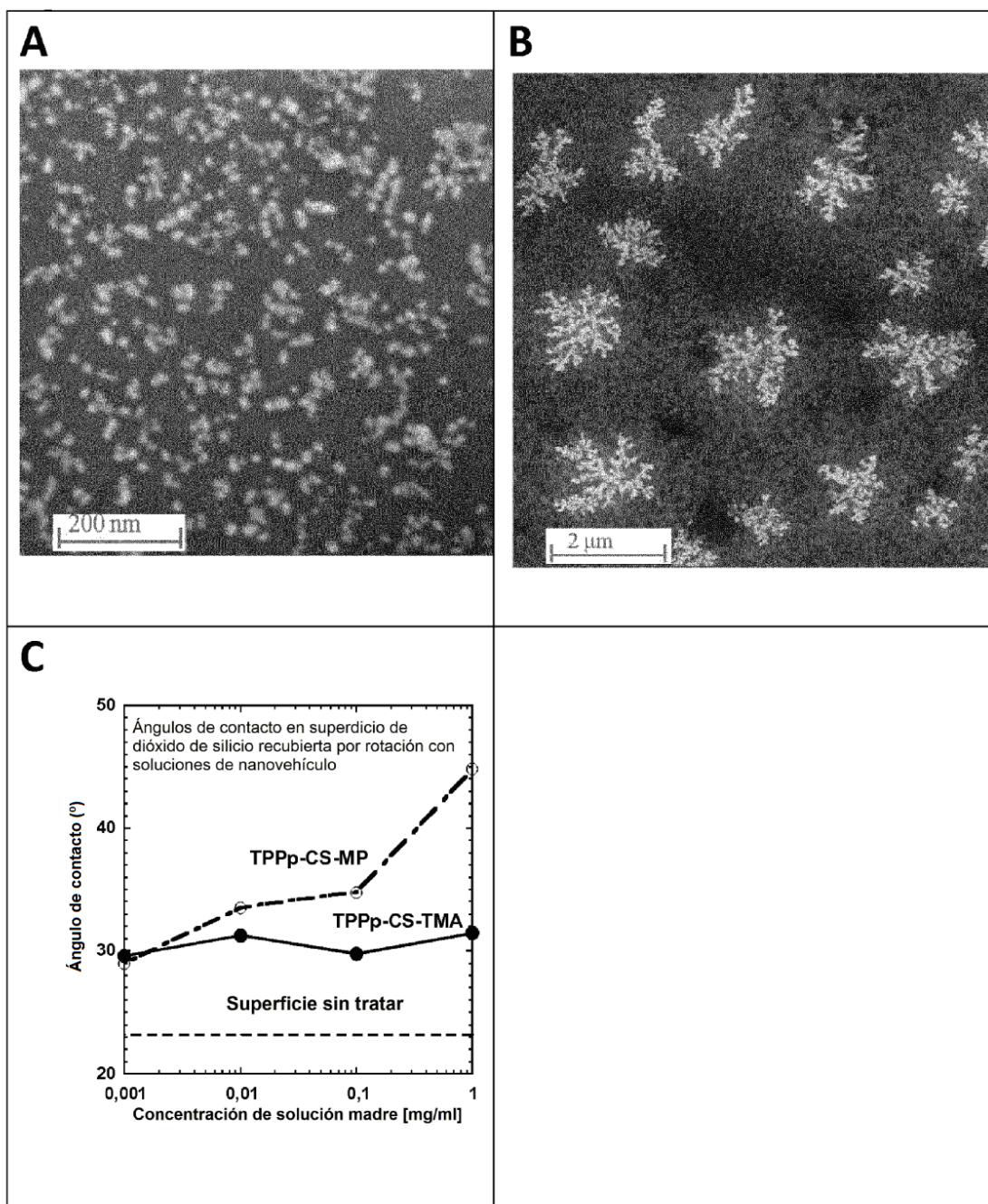


Figura 10
Esquema 3

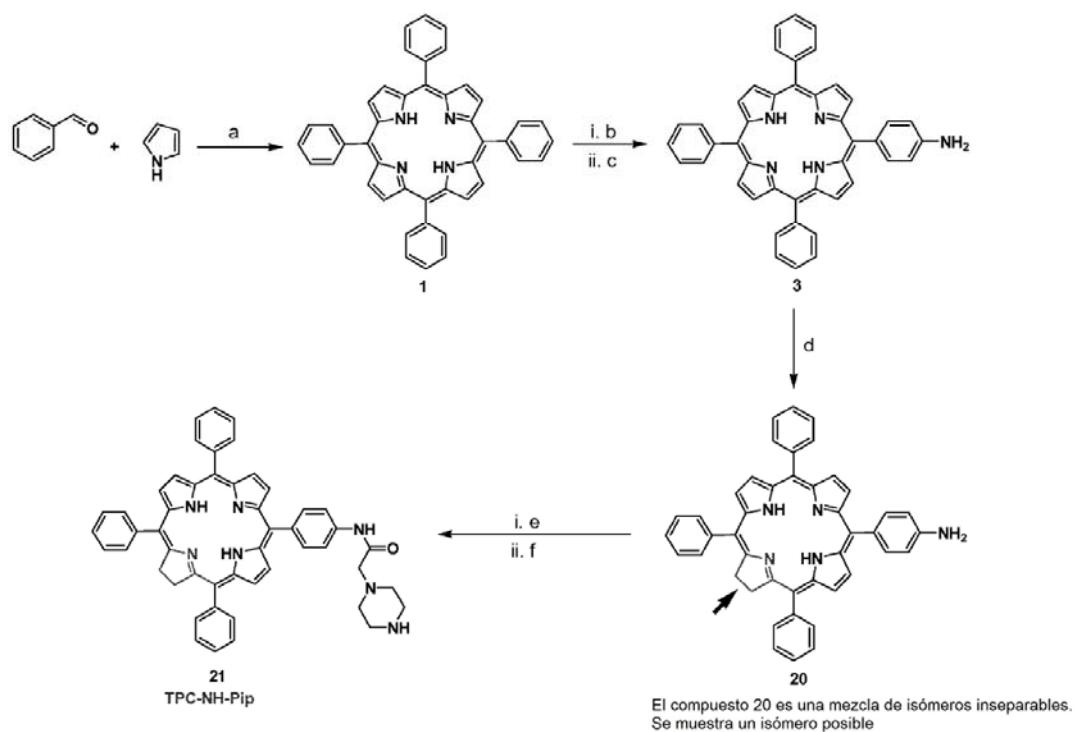


Figura 11
Esquema 4

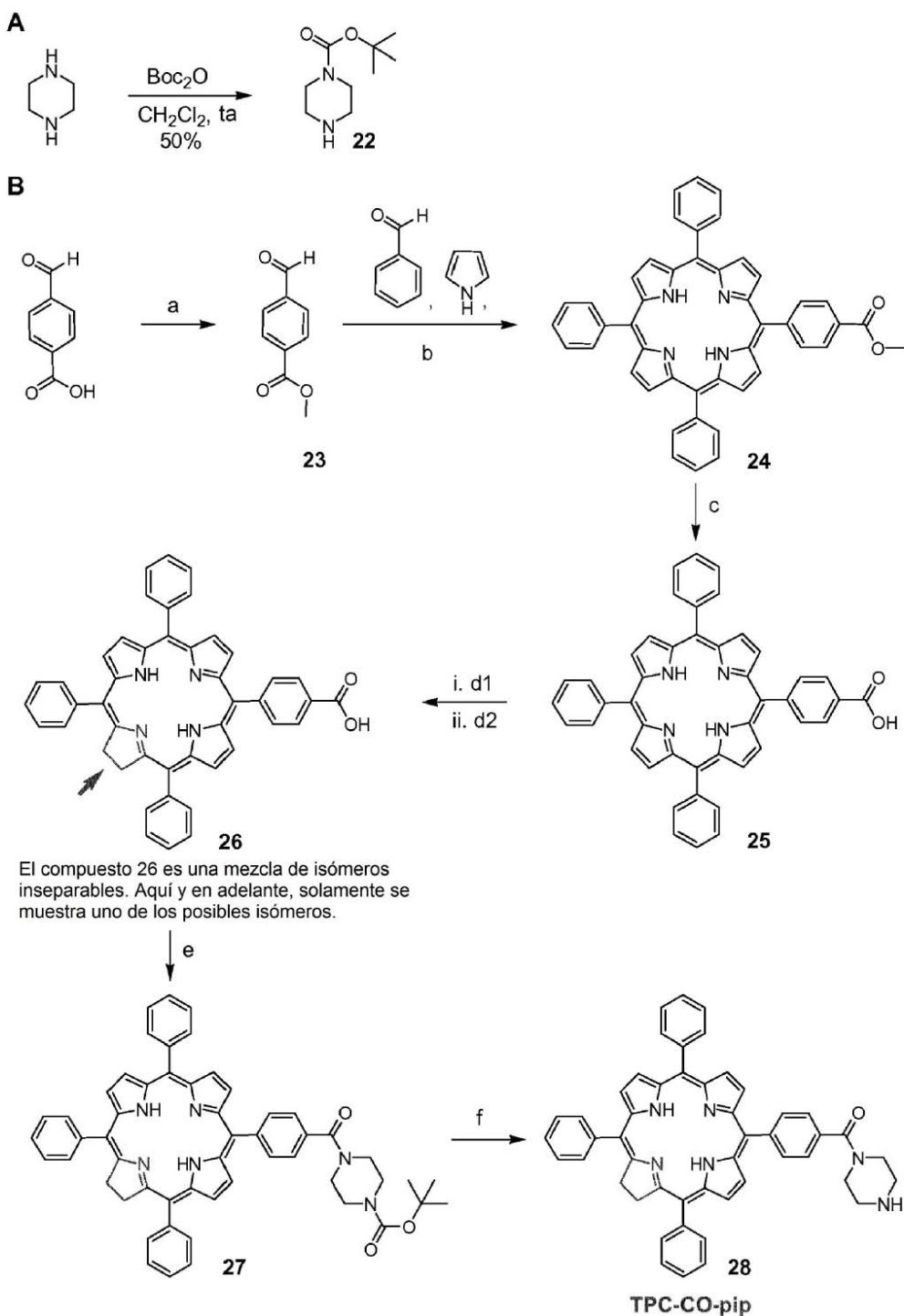


Figura 12
Esquema 5

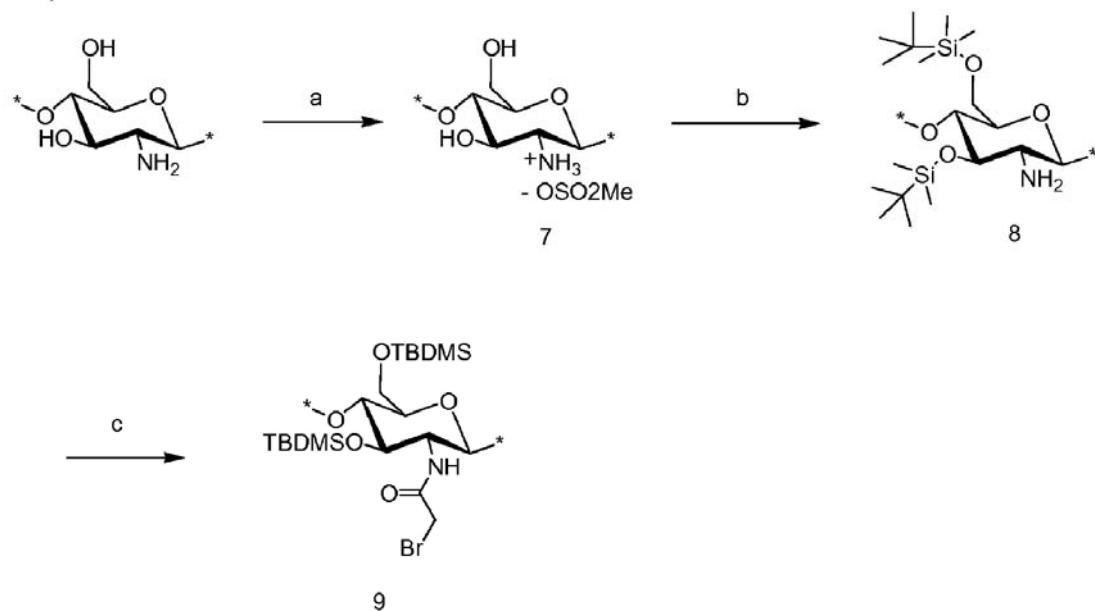
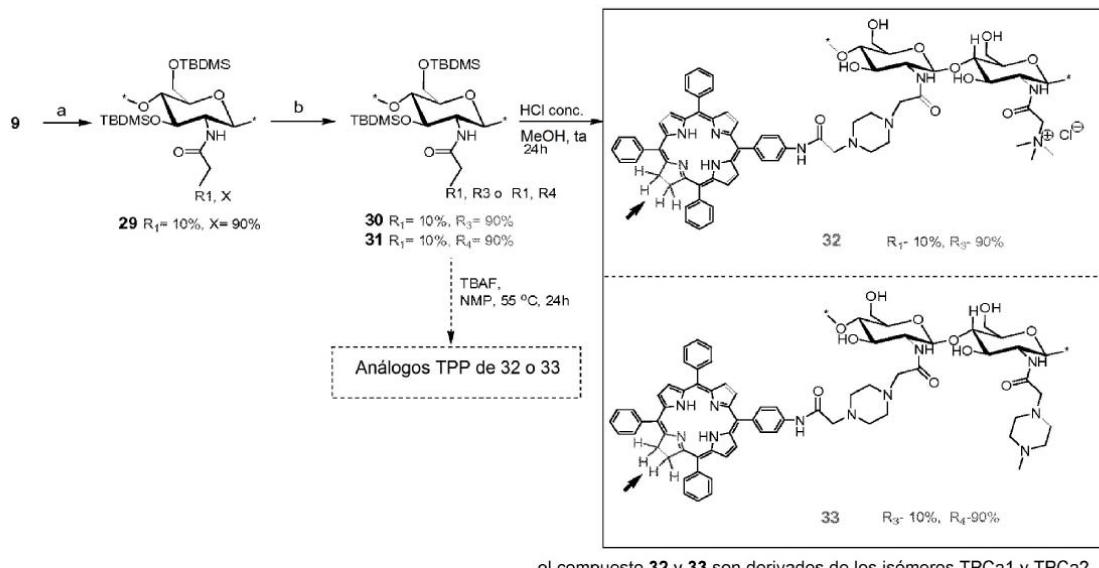
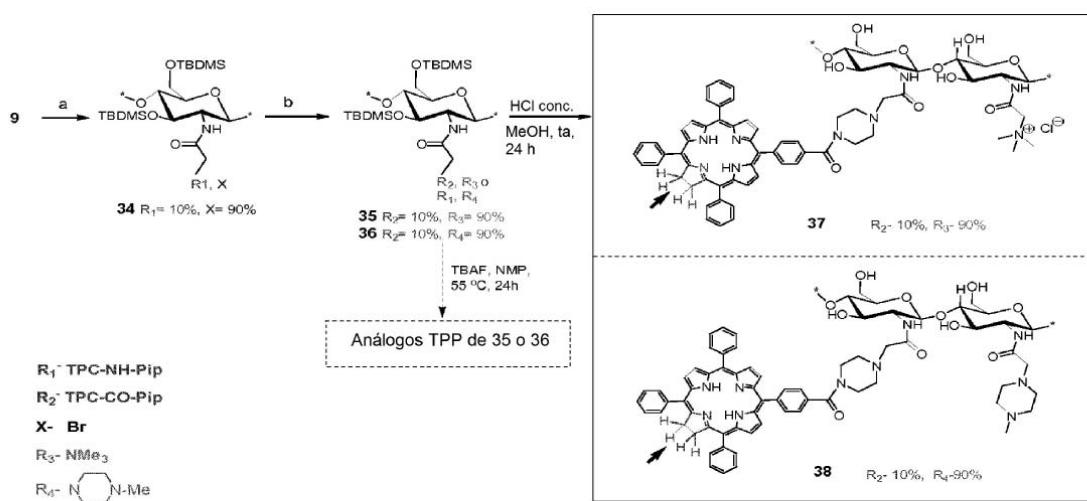


Figura 13
Esquema 6A



el compuesto 32 y 33 son derivados de los isómeros TPCa1 y TPCa2. Solamente se muestra la estructura del isómero TPCa1 en el dibujo de la estructura

Esquema 6B



el compuesto 37 y 38 son derivados de los isómeros TPCc1 y TPCc2. Solamente se muestra la estructura del isómero TPCc1 en el dibujo de la estructura

Figura 14

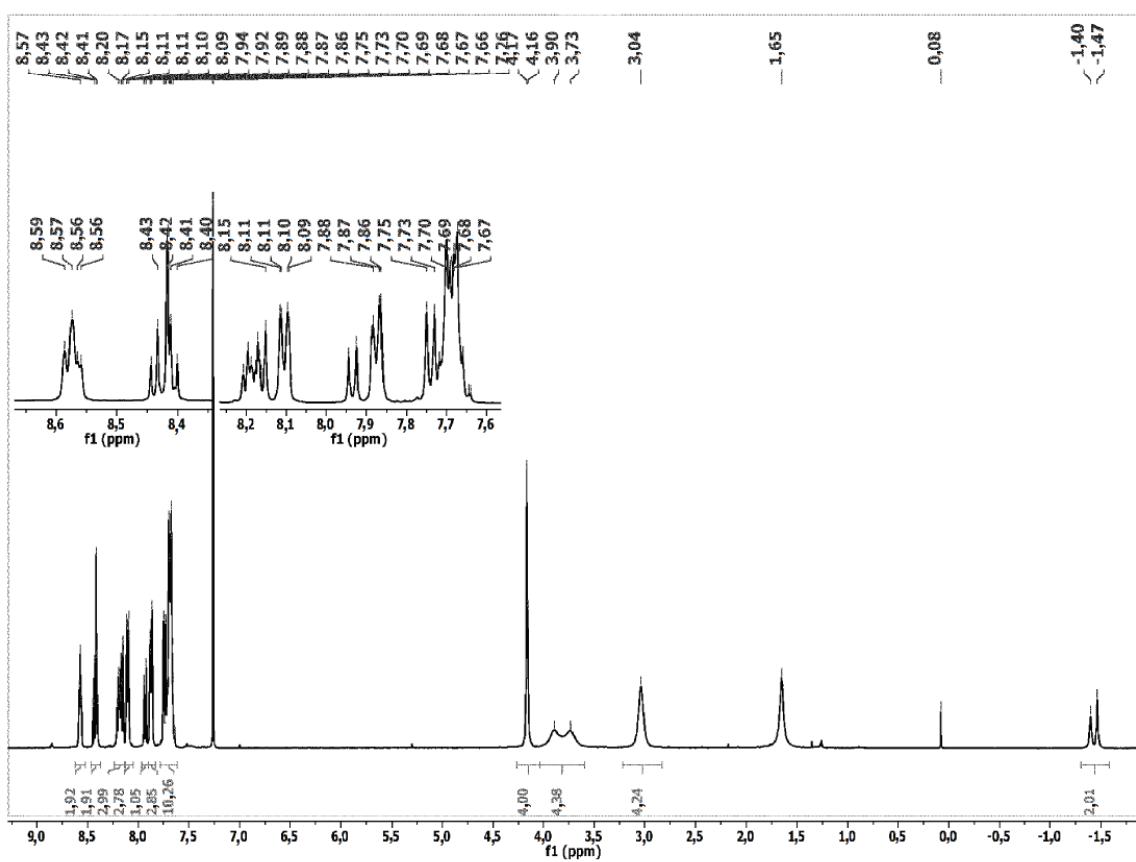
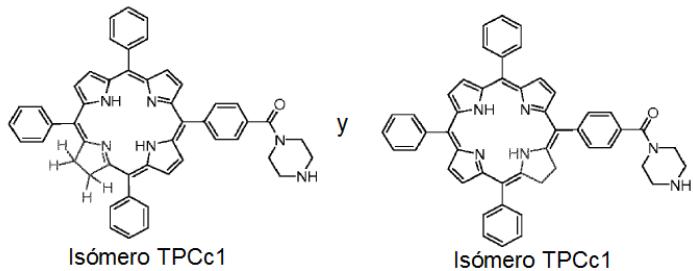
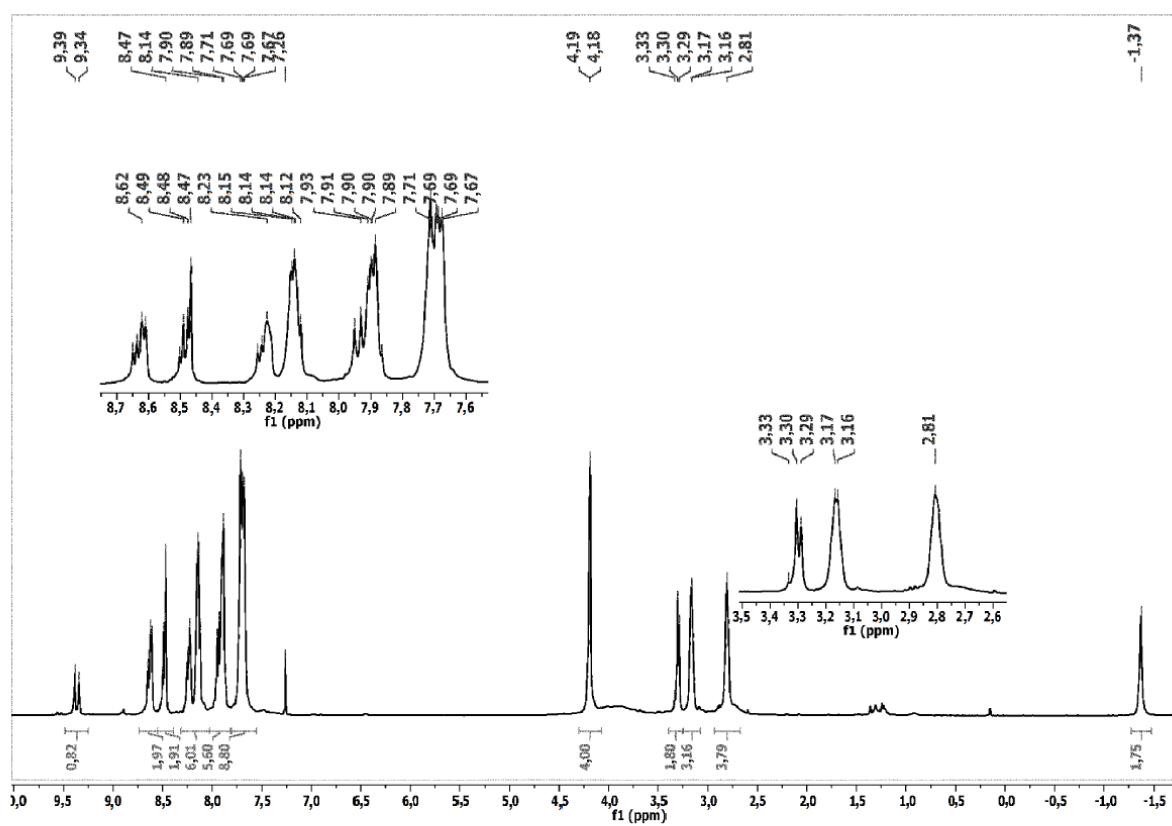
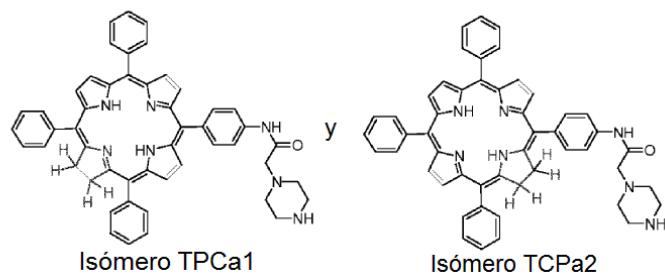
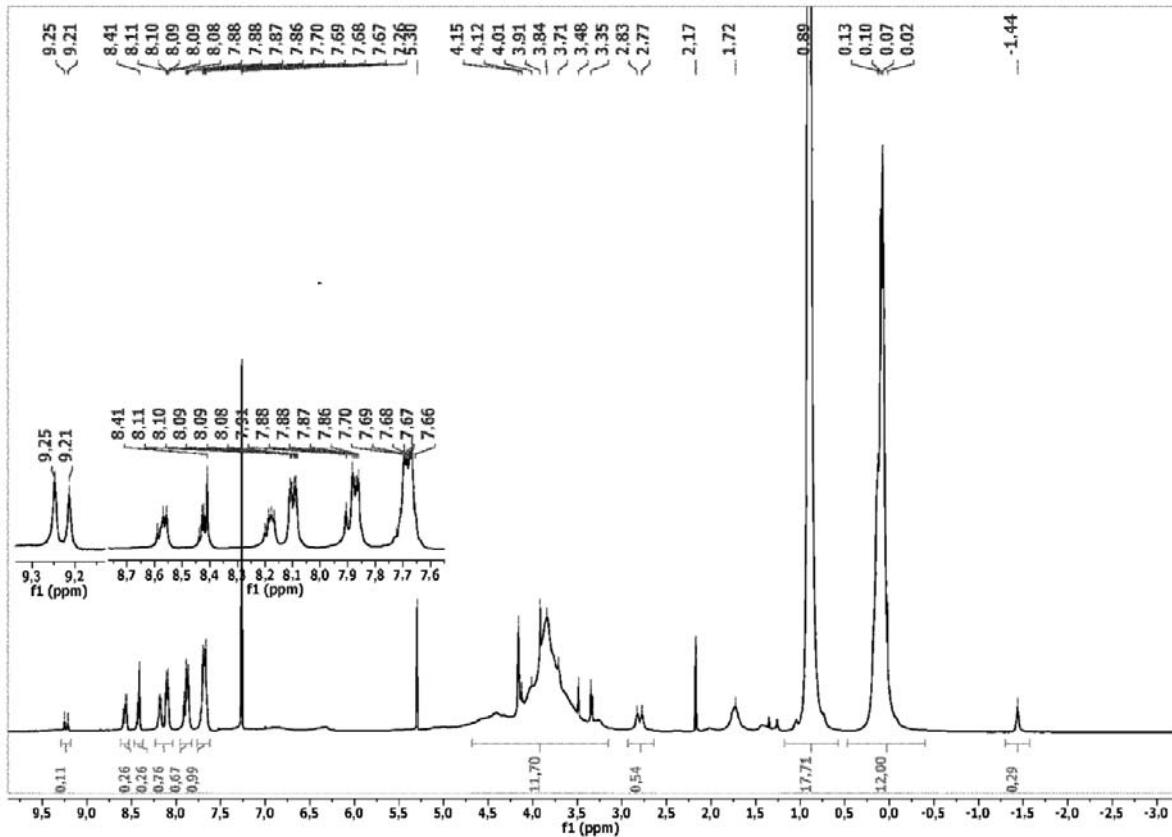


Figura 15



ES 2 682 762 T3

Figura 16



ES 2 682 762 T3

Figura 17

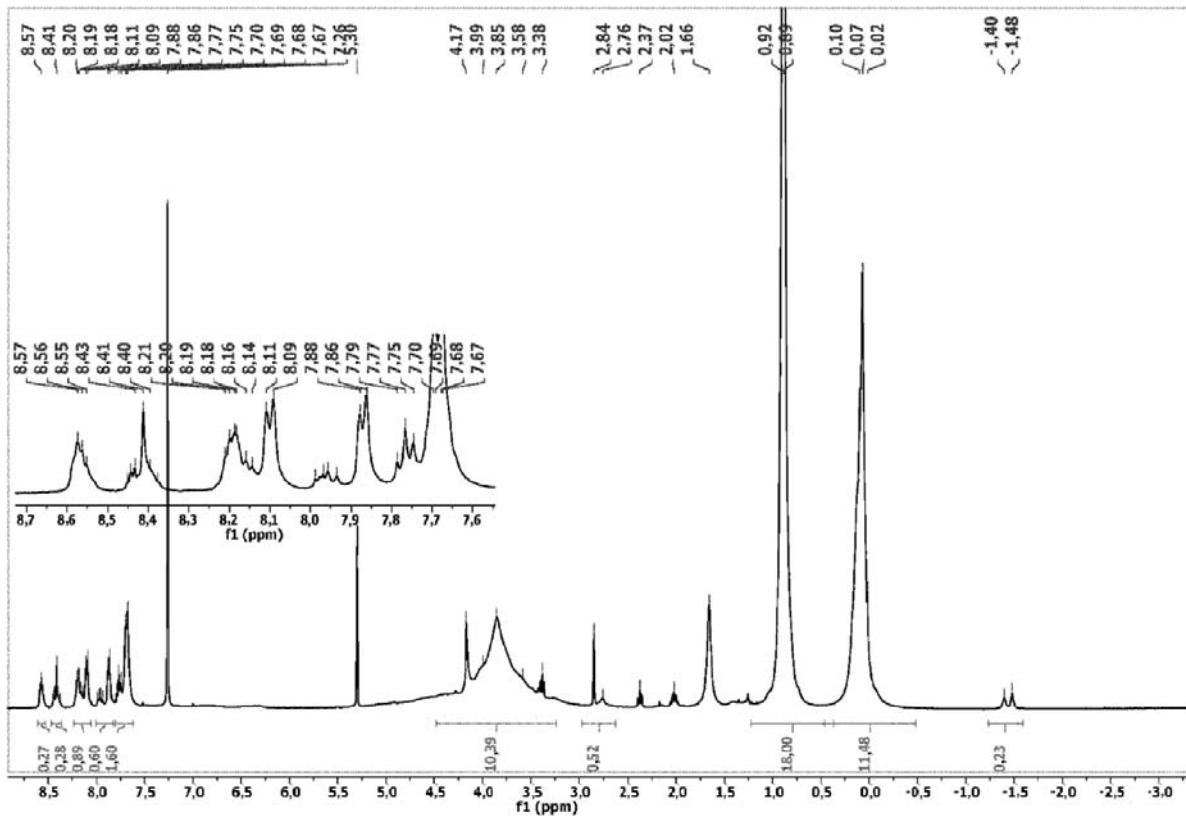


Figura 18

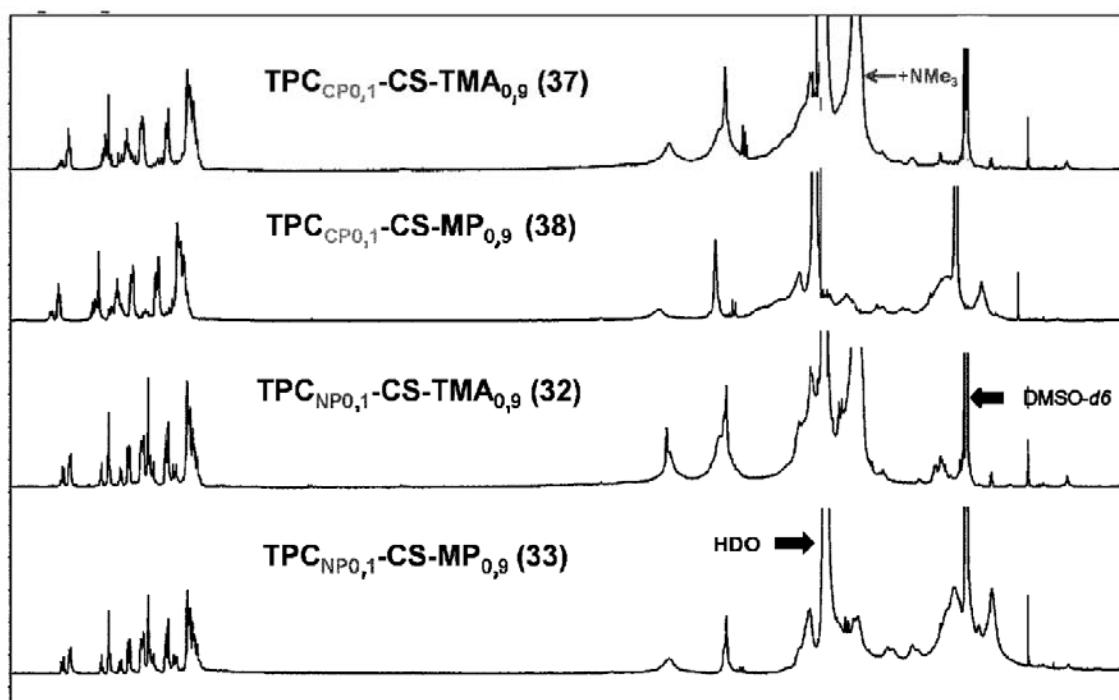
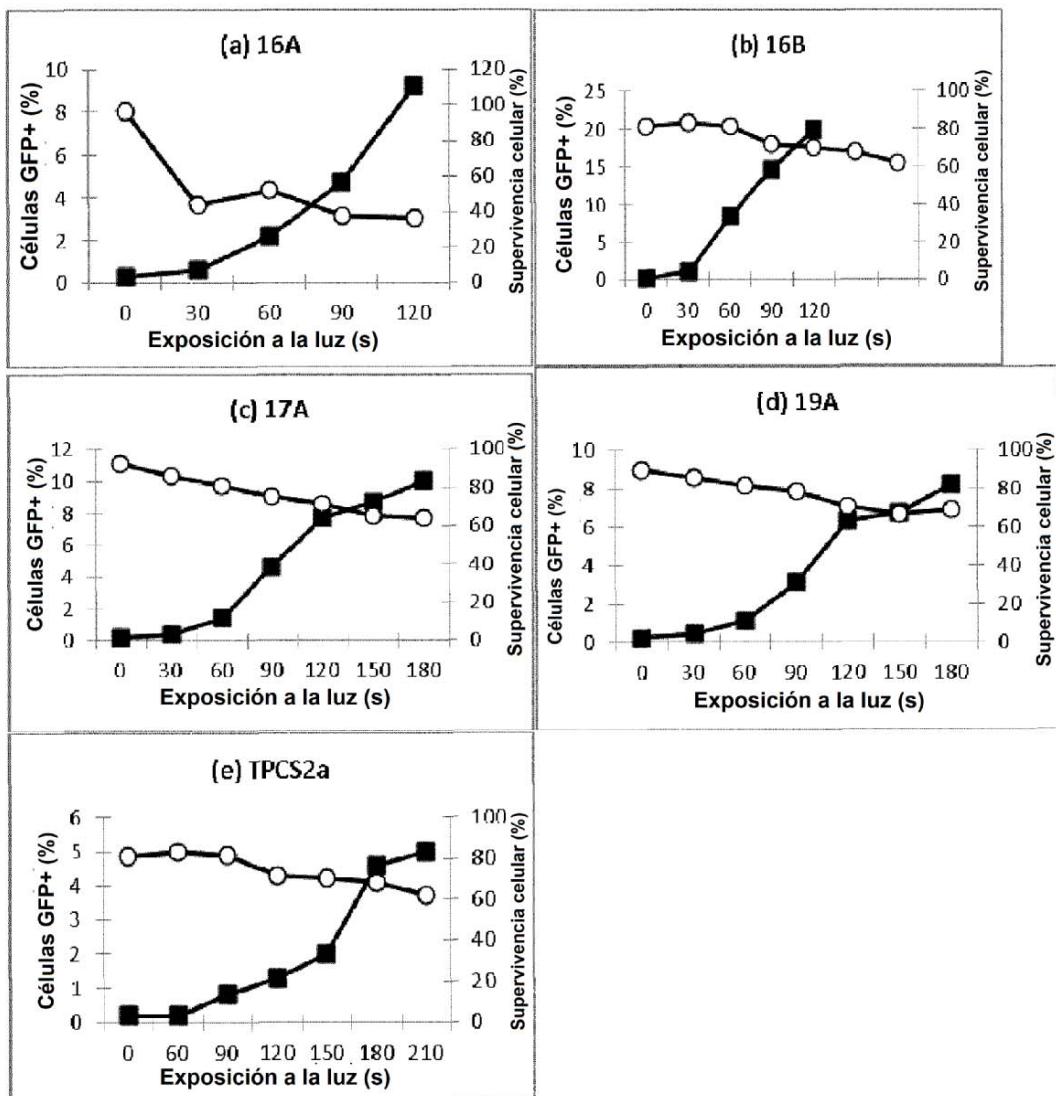


Figura 19



■ células GFP+. ○ Supervivencia celular.

Figura 20

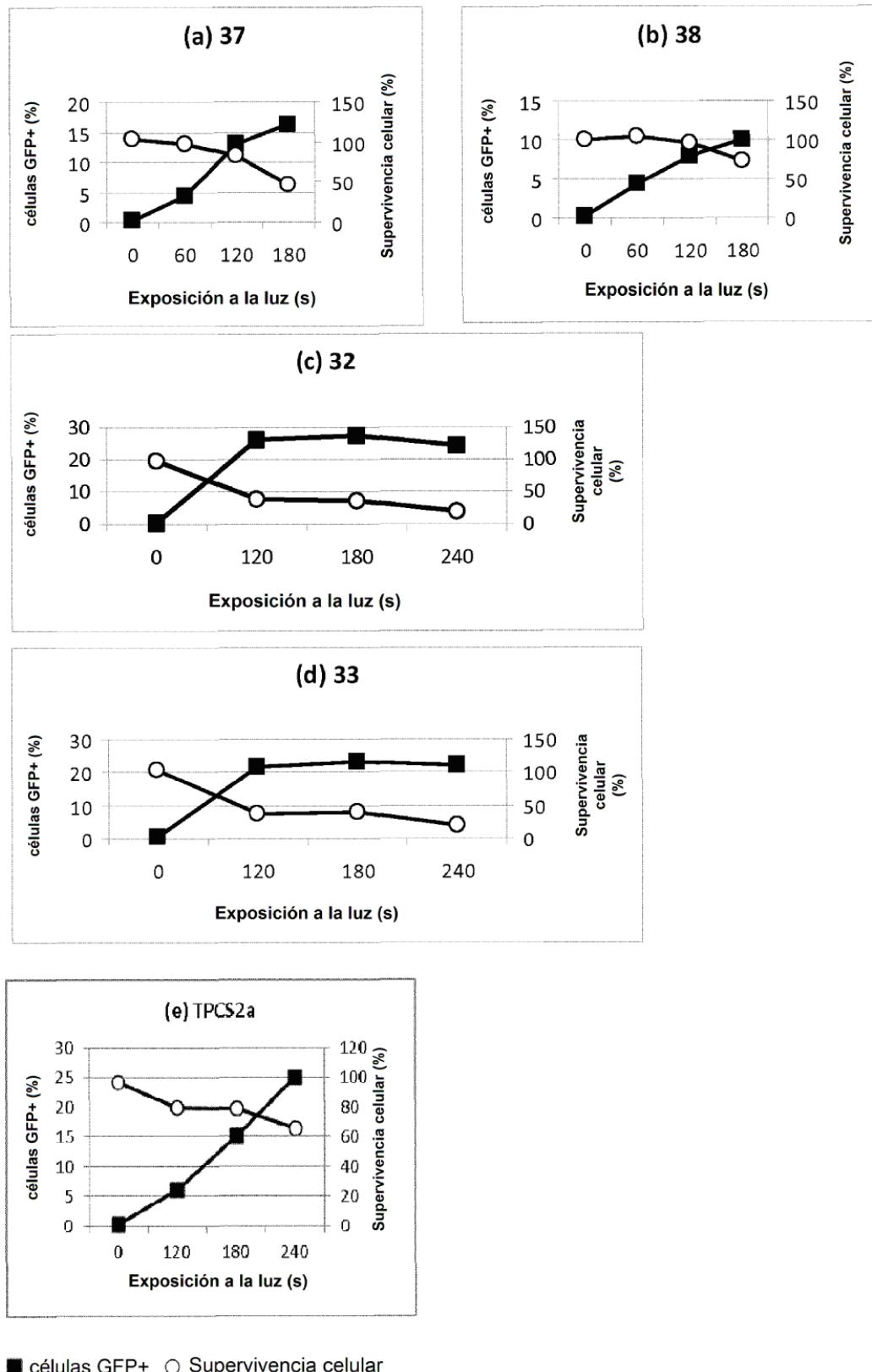


Figura 21

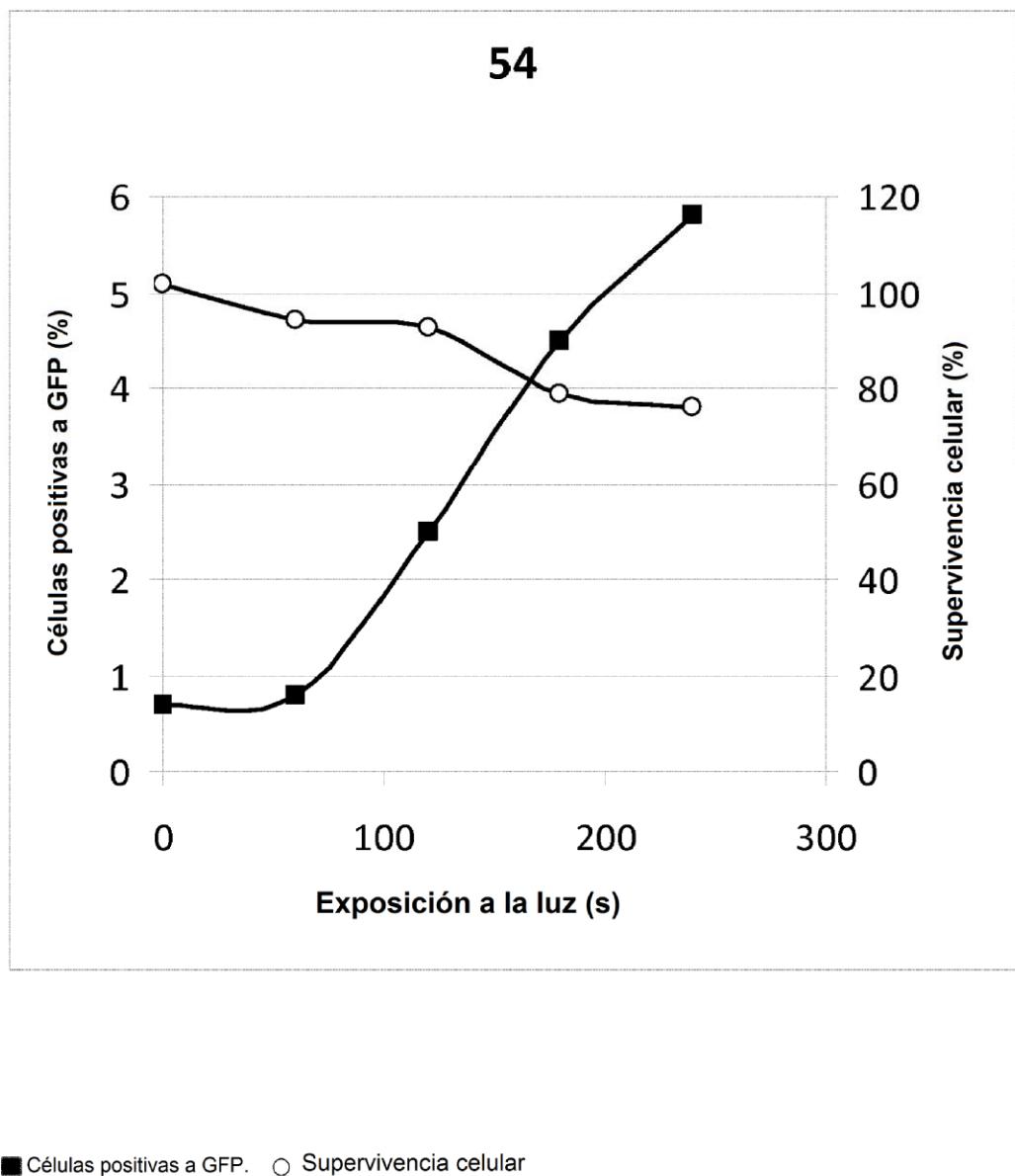
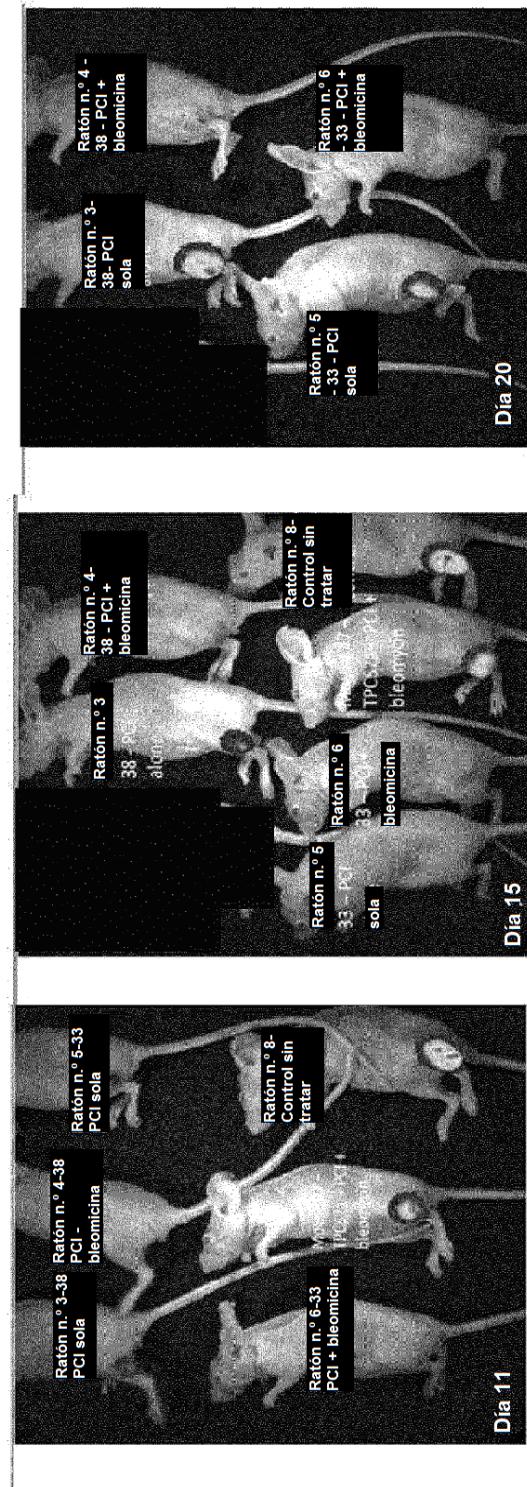


Figura 22



ES 2 682 762 T3

Figura 23

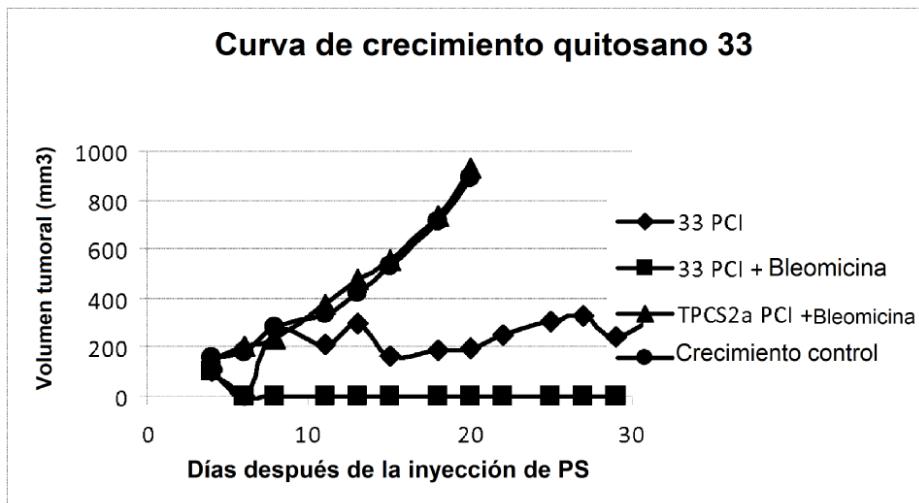
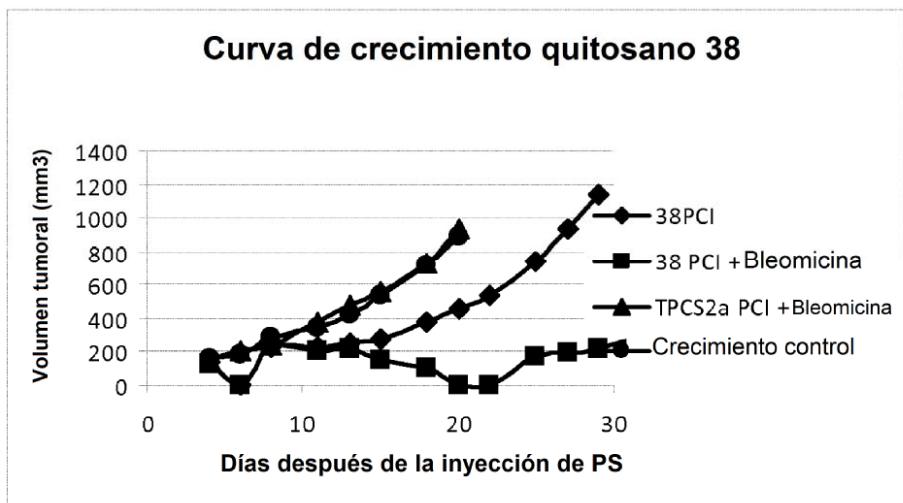
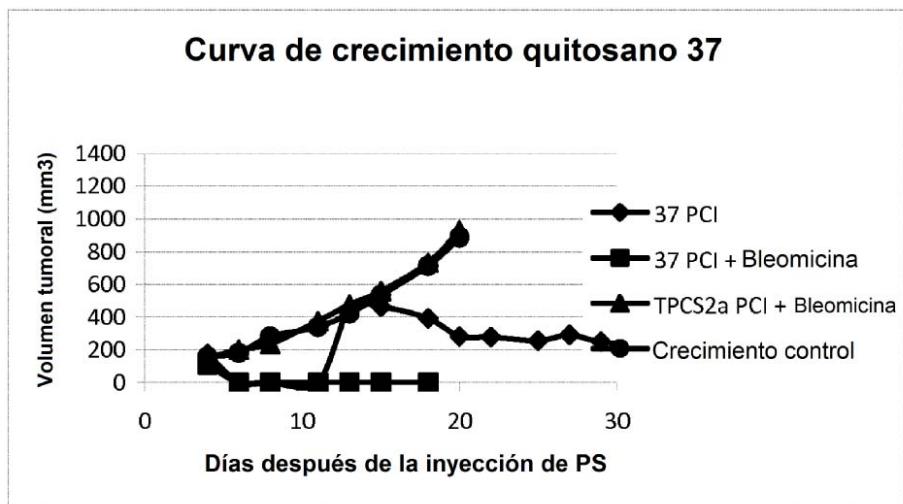


Figura 24

Esquema 7

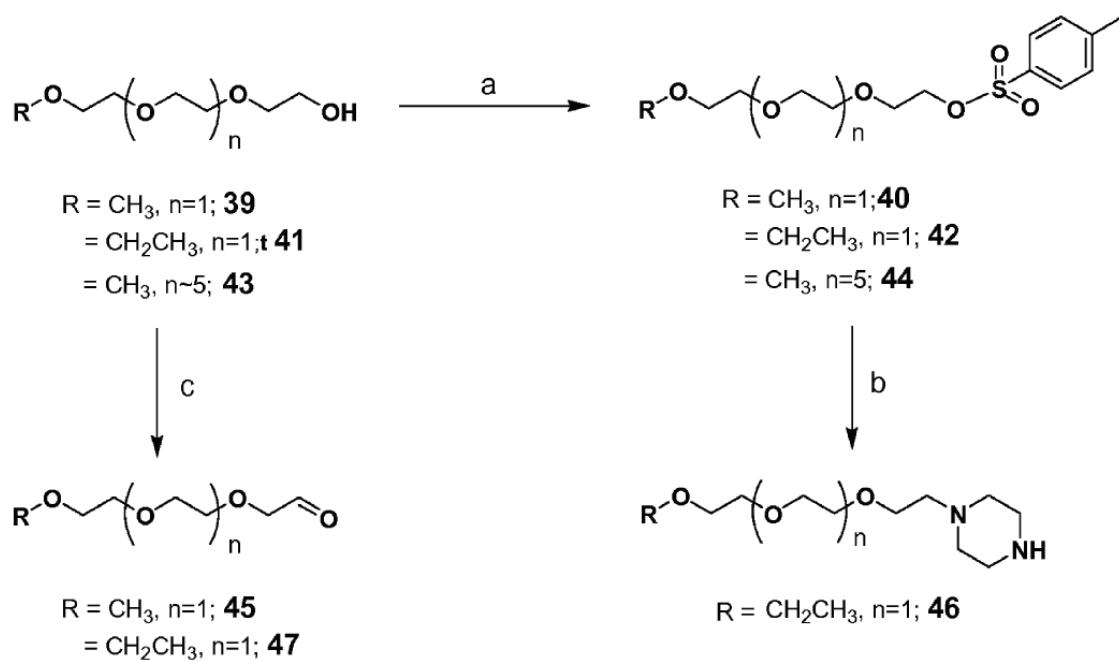


Figura 25

Esquema 8

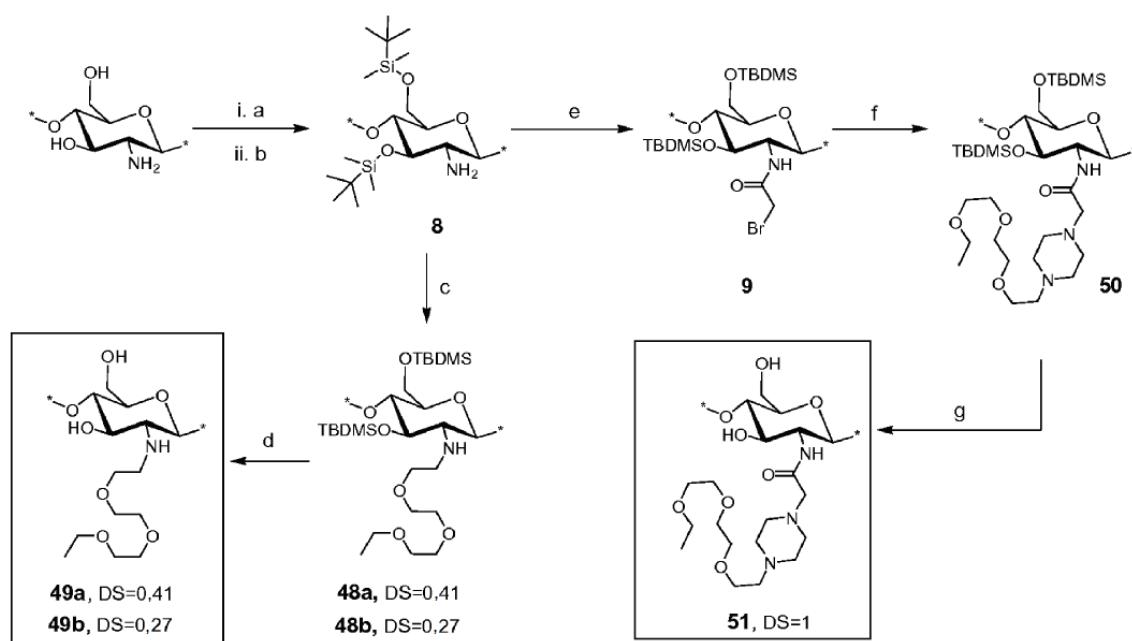


Figura 26

Esquema 9

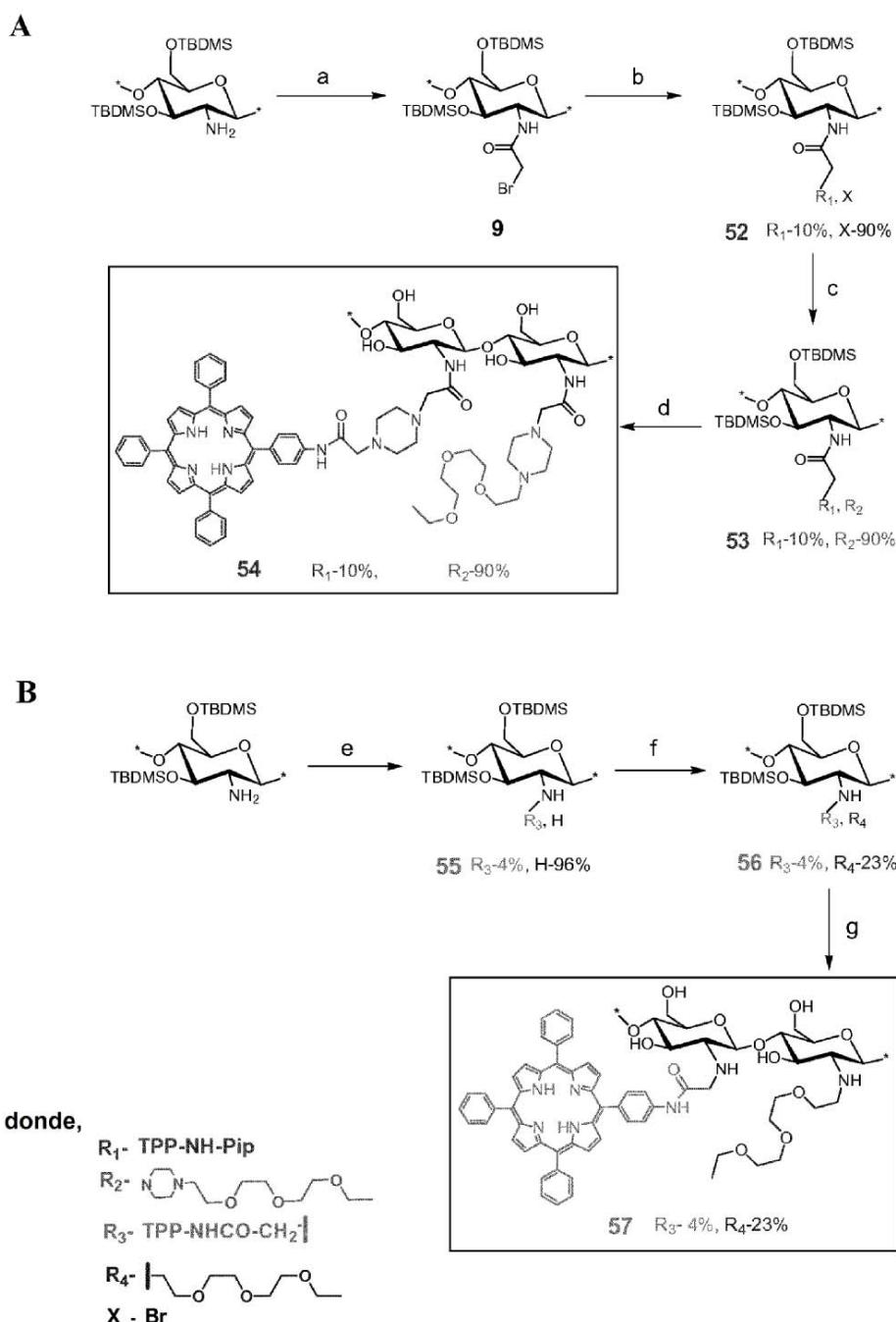


Figura 27

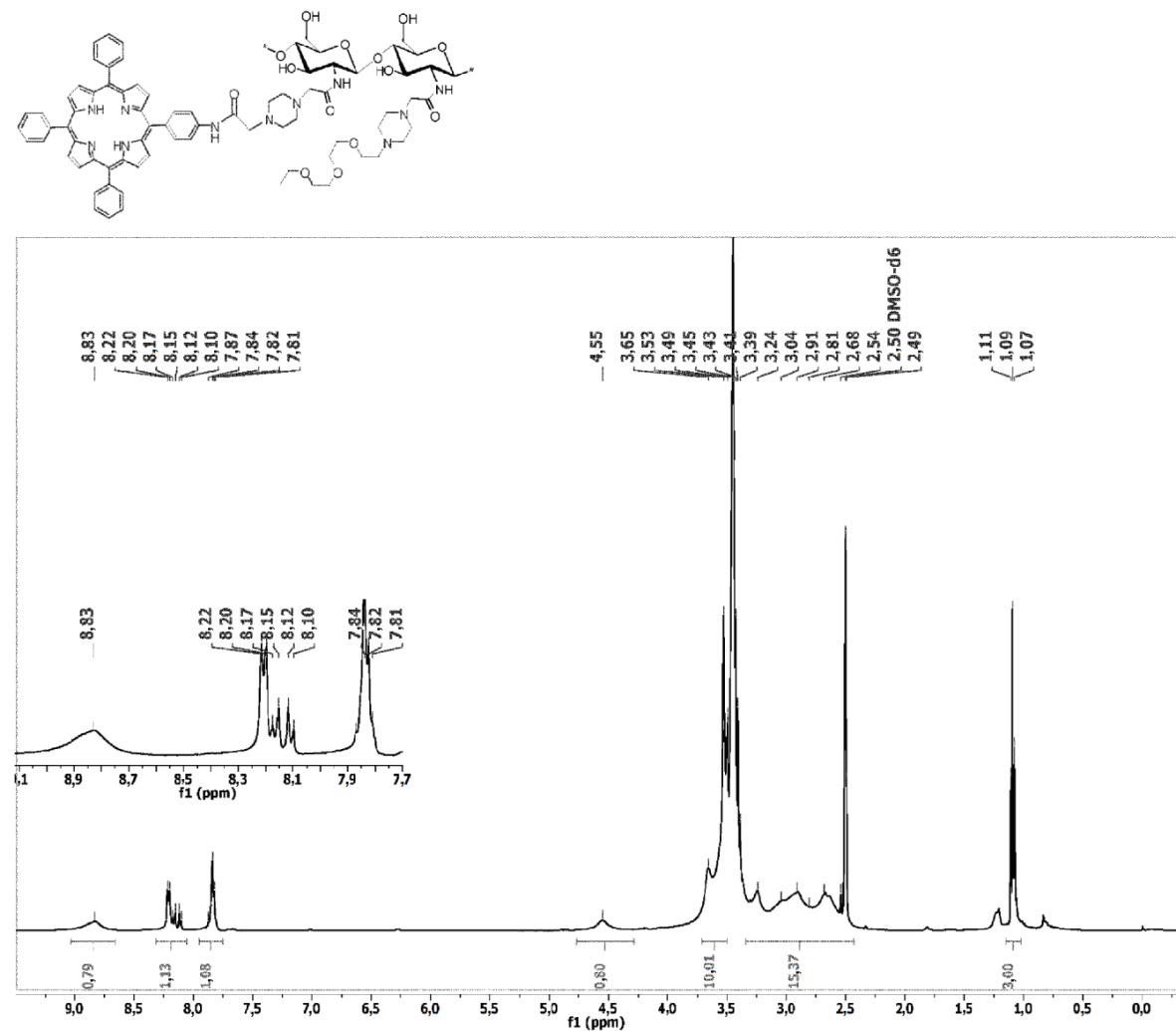
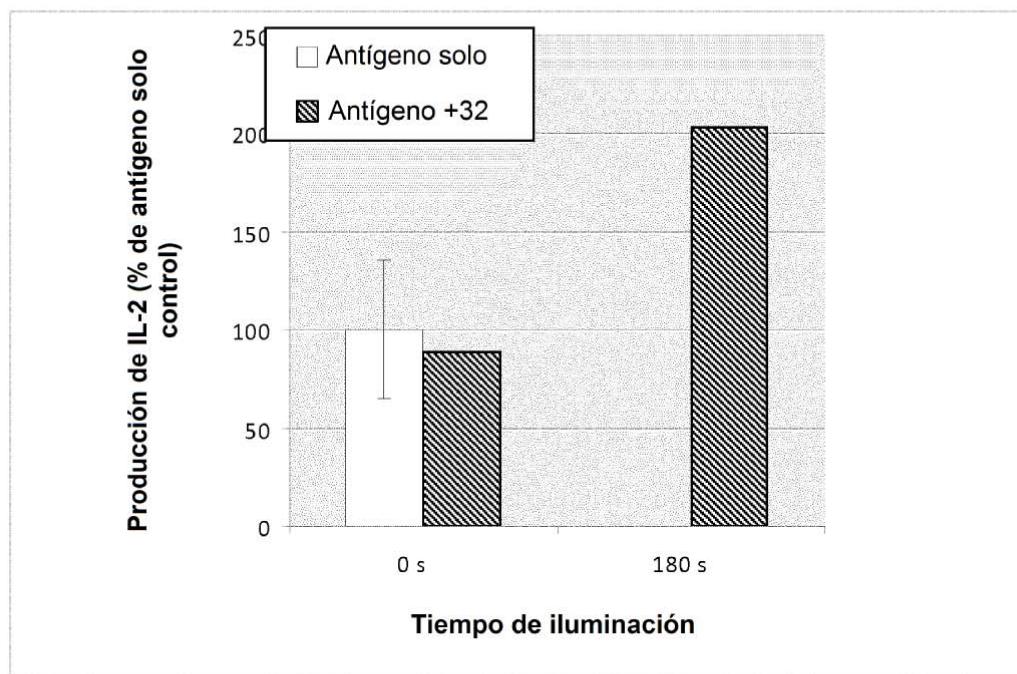


Figura 28 A



B

