

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 505 890**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2009 E 09768395 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 2379114**

54 Título: **Conjugados que comprenden nanopartículas recubiertas con compuestos que contienen platino**

30 Prioridad:

16.12.2008 EP 08171870

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

10.10.2014

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT CATALÀ DE NANOTECNOLOGIA (20.0%)
Campus UAB, Edifici CM7 (Ciències Nord)
08193 Bellaterra (Barcelona), ES;
INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS (20.0%);
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (20.0%);
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (20.0%) y
FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE RECERCA DE L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU (20.0%)**

72 Inventor/es:

**FRANCO PUNTES, VÍCTOR;
DOMÍNGUEZ PUENTE, FERNANDO;
ROMERO MARTÍNEZ, FRANCISCO MANUEL y
GALLEGO RUBIO, ÓSCAR**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 505 890 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

Conjugados que comprenden nanopartículas recubiertas con compuestos que contienen platino

5 **[0001]** La presente invención se refiere a conjugados que tienen estabilidad coloidal en un medio que comprende nanopartículas metálicas recubiertas con compuestos que contienen platino. También se refiere a un procedimiento para su preparación y a composiciones farmacéuticas que los contienen. Los conjugados de la invención se usan para el tratamiento de cáncer.

10 **Técnica anterior**

[0002] Los compuestos de platino desempeñan una función importante en la quimioterapia para el cáncer. El cisplatino, la primera generación de fármaco para quimioterapia basado en platino, es uno de los agentes antineoplásicos más comunes y tiene un amplio espectro de actividad antineoplásica. Sin embargo, inconvenientes tales como la mala selectividad entre células malignas y normales, que conduce a graves efectos tóxicos (tales como nefrotoxicidad, neurotoxicidad y ototoxicidad), y la presencia de resistencia intrínseca o adquirida, de manera que las dosis deben aumentarse, limitan de manera importante su eficacia. Además, el cisplatino tiene inconvenientes adicionales, tales como baja solubilidad en disoluciones acuosas y efectos secundarios tales como náuseas y vómitos.

20 **[0003]** Aunque se dedicaron grandes esfuerzos a vencer estas cuestiones importantes desarrollando nuevas generaciones de derivados de platino que fueran menos tóxicas y más activas que el cisplatino y/o no mostraran resistencia cruzada, las mejoras son todavía bastante pequeñas. Así, los fármacos basados en platino de la segunda generación, tales como carboplatino u oxaliplatino, tienen menores toxicidades renales y gastrointestinales, pero la toxicidad de la médula ósea producida por el carboplatino y la neurotoxicidad del oxaliplatino son limitantes. Su espectro antineoplásico y eficacia son diferentes de los del cisplatino.

30 **[0004]** Los sistemas de administración de fármaco en los que los vehículos incorporan el fármaco tanto mediante enlace químico como adsorción pasiva pueden administrar el fármaco a células específicas y evitar la eliminación por el sistema inmunitario. Idealmente, tales sistemas de administración extravasan la vasculatura tumoral y se acumulan dentro del entorno del tumor. Un sistema de administración de partículas capaz de liberar un fármaco antineoplásico únicamente dentro del tumor también puede reducir la acumulación de fármaco en tejidos sanos.

35 **[0005]** Hay varios sistemas de administración de fármacos descritos en la bibliografía que se basan en nanomateriales. En algunos casos, el fármaco se adsorbe sobre el nanomaterial o encapsula en nanocápsulas. En otros casos se une covalentemente a la superficie del nanomaterial.

40 **[0006]** En este contexto se han descrito muchos intentos para obtener el cisplatino con nanoestructuras, tales como cápsulas poliméricas, nanotubos de carbono de una sola pared solubles funcionalizados (SWNT), nanocuernos, partículas de Fe_3O_4 , o polímeros tales como Prolindac®, un copolímero de hidroxipropilmetacrilamida de 22 kD como esqueleto y luego un engarce de quelante de glicina que es sensible al pH. En Ren L. et al., Mater. Sci. Eng. C 2003, vol. 23, pág. 113-116, y el documento US 2006/099146 se describen nanopartículas sensibles al infrarrojo cercano, que comprenden un tensioactivo cargado con cisplatino comercial mediante interacciones electrostáticas. Además, el resumen de Vázquez-Campos et al., "Gold nanoparticles as carriers of cisplatin: A new approach for cancer treatment", Trends in nanotechnology conference-TNT2008, 1 de septiembre de 2008, desvela cisplatino conjugado con nanopartículas de oro mediante engarces de ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) para el tratamiento de cáncer. En muchos de aquellos sistemas, que incluyen los desvelados por Ren L. et al. y Vázquez-Campos et al., la estabilidad coloidal y de los conjugados en el entorno de trabajo es una cuestión no resuelta.

50 **[0007]** Por tanto, a pesar de la enseñanza de la técnica anterior, la investigación de los nuevos sistemas de administración de fármacos en cáncer es todavía un campo emergente y existe la necesidad de explorar adicionalmente los sistemas de administración que aumentan la eficacia relativa y seguridad de una terapia contra el cáncer. En particular, es de interés encontrar sistemas de administración de fármacos estables que puedan transportar eficazmente el fármaco a su diana.

55

Resumen de la invención

60 **[0008]** Los inventores han encontrado que cuando un compuesto de platino se conjuga con una nanopartícula metálica mediante un engarce (*linker*) por enlaces de coordinación que convierten un conjugado que tiene estabilidad coloidal, el sistema de administración resultante puede administrar 10 veces más platino al tumor sin aumentar la toxicidad a tejidos normales. Como resultado, la resistencia del tumor a compuestos de platino se reduce y se disminuyen los efectos secundarios. Además, los conjugados de la invención son altamente solubles en comparación con los compuestos de platino libre actualmente usados, cuya solubilidad es baja.

65 **[0009]** En comparación con las estrategias descritas en la técnica anterior, el enfoque de los inventores usado

para la preparación de los conjugados de la invención comprende ambas de las dos siguientes propiedades que se requieren con el fin de tener efectos terapéuticos: i) controla eficazmente la estabilidad coloidal de los conjugados que maximizan la carga de fármaco terapéutico y ii) proporciona conjugados que tienen al mismo tiempo un enlace sensible al pH que hace que el fármaco se desactive cuando se une a la nanopartícula y solo se vuelve activo después de desprenderse del conjugado cuando encuentra un entorno ácido como el endolisosoma.

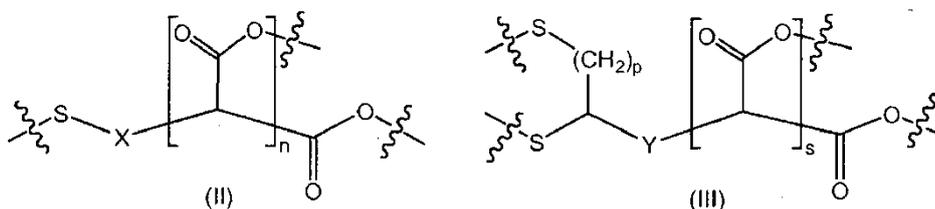
[0010] Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un conjugado de fórmula (I)



que tiene estabilidad coloidal en un medio en la que

NP es una nanopartícula de oro, plata o platino;

L es un engarce de fórmula (II) o un estereoisómero del mismo, que está unido a la nanopartícula NP mediante el átomo de azufre; o L es un engarce de fórmula (III) o un estereoisómero del mismo, que está unido a la nanopartícula NP mediante los dos átomos de azufre



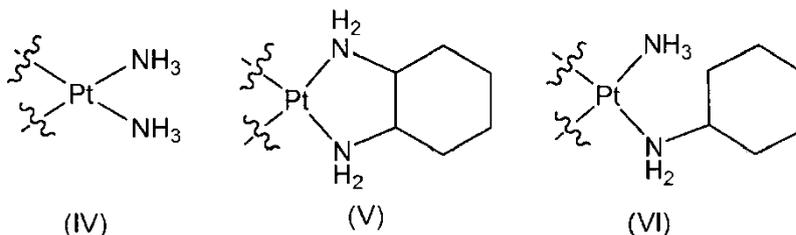
en las que:

X e Y representan independientemente una cadena de hidrocarburo (C_2-C_{20}), en los que al menos un átomo de carbono está opcionalmente sustituido con un grupo CO o un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O y N; y en los que la cadena de hidrocarburo (C_2-C_{20}) está opcionalmente sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, OH, $CONH_2$, CO_2 -alquil (C_1-C_6) y -CHO;

n y s representan independientemente un valor de 0 a 1;

p representa un valor de 1 a 2; y

A es un birradical de platino (II) seleccionado del grupo que consiste en la fórmula (IV), la fórmula (V) y la fórmula (VI) que incluye cualquiera de los estereoisómeros de todos ellos que está unido al engarce L mediante el átomo de oxígeno de enlace sencillo de los grupos carboxilo, en el que el birradical está opcionalmente en forma de una sal



con la condición de que:

cuando en el engarce de fórmula (II) o fórmula (III), $n = 1$ o $s = 1$; el birradical (II) de platino está unido a una molécula de engarce de fórmula (II) o fórmula (III), formando así dos enlaces COO-Pt con la misma molécula de engarce; y

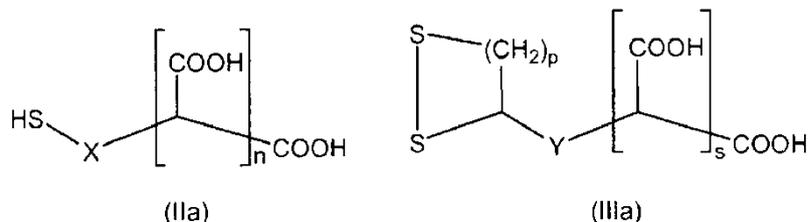
cuando en el engarce de fórmula (II) o fórmula (III), $n = 0$ o $s = 0$; el birradical (II) de platino está unido a dos moléculas de engarce independientes de fórmula (II) o fórmula (III), formando así un enlace COO-Pt con cada una de estas dos moléculas de engarce; y

estando al menos el 45 % de los engarces L de fórmula (II) o fórmula (III) en forma de grupos carboxilo libres.

[0011] Los conjugados coloidales estables de la invención pueden prepararse convenientemente por un procedimiento de conjugación apropiado. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un conjugado de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, que comprende las siguientes etapas:

5

a) hacer reaccionar una nanopartícula NP de oro, plata o platino con un exceso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en la fórmula (IIa), la fórmula (IIIa), un estereoisómero, y una sal de cualquiera de las fórmulas (IIa) y (IIIa), en una disolución acuosa dando lugar a un conjugado intermedio

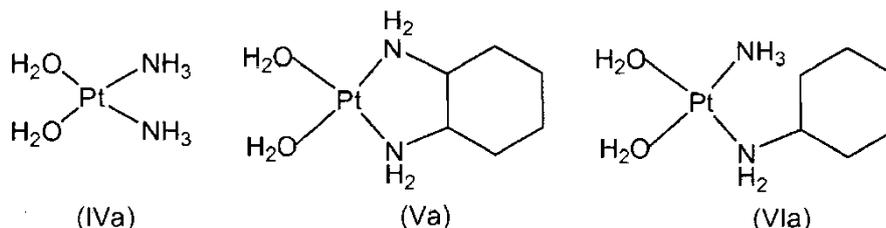


10

en las que X, n, p, Y y s tienen el mismo significado que se ha definido anteriormente; y

15

b) hacer reaccionar el conjugado intermedio obtenido en la etapa a) con una cantidad apropiada de un compuesto de platino (II) dando lugar a un conjugado de fórmula (I) que tiene estabilidad coloidal, en una disolución acuosa en presencia de una base, estando el compuesto de platino (II) seleccionado del grupo que consiste en la fórmula (IVa), la fórmula (Va), la fórmula (VIa), y una sal de cualquiera de las fórmulas (IVa), (Va) y (VIa), que incluye cualquiera de los estereoisómeros de todos ellos.



20

[0012] Los conjugados de la presente invención pueden administrarse a mamíferos, que incluye seres humanos, que padecen un cáncer. Así, otro aspecto de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de fórmula (I) como se han definido anteriormente junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

25

[0013] Otro aspecto de la invención se refiere a un conjugado de fórmula (I) como se ha definido anteriormente para su uso en cáncer. Por tanto, este aspecto se refiere al uso de los conjugados de fórmula (I) como se han definido anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer. Alternativamente, este aspecto también puede formularse como los conjugados de fórmula (I) según las reivindicaciones para su uso en un procedimiento para el tratamiento de cáncer en un mamífero, que incluye un ser humano, comprendiendo el procedimiento administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de los conjugados previamente definidos de fórmula (I) junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

30

[0014] Estos aspectos de la presente invención se describirán adicionalmente en la sección de descripción detallada que sigue. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Durante toda la descripción y reivindicaciones, la palabra "comprender" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas.

35

Breve descripción de los dibujos

[0015]

45

La FIG. 1 muestra una vista esquemática de un conjugado según la invención, en particular un conjugado de fórmula (I) NP-L-A en la que NP es una nanoesfera de oro; L se corresponde con ácido mercaptopropoico (MPA); y A es un birradical de platino (II) obtenido de cisplatino.

50

La FIG. 2 muestra la determinación de la máxima carga de compuesto de platino por nanopartícula.

La FIG. 3 muestra la evolución temporal de la unión de cisplatino a nanopartículas recubiertas de engarce.

La FIG. 4 muestra espectros de UV-Vis (absorbancia frente a longitud de onda) que monitorizan el desplazamiento al rojo de la banda de resonancia de plasmones superficiales (SPR) debido a conjugación. A representa nanoesferas de oro sin recubrir del Ejemplo 1.1; B representa el conjugado intermedio del Ejemplo 2.1; y C representa el conjugado del Ejemplo 4.1.

La FIG. 5 muestra la caída de potencial ζ ya que la superficie de la nanopartícula está recubierta (intensidad frente a potencial zeta). El potencial zeta de -25,9 mV se corresponde con el conjugado del Ejemplo 4.1; el potencial zeta de -65,8 mV se corresponde con el conjugado intermedio del Ejemplo 2.1; y el potencial zeta de -33,6 mV se corresponde con las nanoesferas de oro sin recubrir del Ejemplo 1.1.

La FIG. 6 muestra XPS de alta resolución de las regiones espectrales C1s, Pt4f, Au4f, S2p y S2s (intensidad frente a energía de unión) que muestran la presencia de C (FIG. 6A), S (FIG. 6B), Au (FIG. 6C) y Pt (FIG. 6D) del conjugado del Ejemplo 4.1.

La FIG. 7 muestra espectros de UV-Vis (absorbancia frente a longitud de onda) que monitorizan el desplazamiento al rojo de la banda de resonancia de plasmones superficiales (SPR) debido a conjugación. A representa nanoesferas de oro sin recubrir del Ejemplo 1.2; B representa el conjugado intermedio del Ejemplo 2.2; y C representa el conjugado del Ejemplo 4.2.

La FIG. 8 muestra espectros de UV-Vis (absorbancia frente a longitud de onda) que monitorizan el desplazamiento al rojo de la banda de resonancia de plasmones superficiales (SPR) debido a conjugación. A representa nanoesferas de oro sin recubrir del Ejemplo 1.3; B representa el conjugado intermedio del Ejemplo 2.3; y C representa el conjugado del Ejemplo 4.3.

La FIG. 9 muestra espectros de UV-Vis (absorbancia frente a longitud de onda) que monitorizan el desplazamiento al rojo de la banda de resonancia de plasmones superficiales (SPR) debido a conjugación. A representa nanoesferas de oro sin recubrir del Ejemplo 1.4; B representa el conjugado intermedio del Ejemplo 2.4; y C representa el conjugado del Ejemplo 4.4 a una concentración de platino 5 μ M; y D representa el conjugado del Ejemplo 4.4 a una concentración de platino 50 μ M.

La FIG. 10 muestra la estabilidad medida como la variación en el tiempo de la cantidad de platino atómico de A: el conjugado del Ejemplo 4.1 en medios celulares; B: el conjugado del Ejemplo 5 en agua; y C: el conjugado del Ejemplo 5 en medios celulares.

La FIG. 11 muestra un ensayo de MTT del efecto de los conjugados en la viabilidad de las células tumorales A549 (una línea celular derivada de carcinoma de pulmón humano). B representa las nanoesferas de oro sin recubrir del Ejemplo 1.1; C representa el conjugado intermedio del Ejemplo 2.1; D se corresponde con el conjugado del Ejemplo 4.1; E se corresponde con cisplatino comercial; F se corresponde con el derivado de cisplatino del Ejemplo 3; y A y G representan los valores de control a 0 y 48 h respectivamente.

La FIG. 12 muestra el % de aumento del tamaño del tumor en tiempo (días) para tres grupos diferentes: A se corresponde con el grupo no tratado; B se corresponde con el grupo tratado con cisplatino comercial; y C se corresponde con el grupo tratado con los conjugados del Ejemplo 4.1.

Descripción detallada de la invención

[0016] Según la invención, el término “conjugado” se refiere a una nanopartícula de oro, plata o platino que está unida a otro compuesto que contiene platino. En particular, el término conjugado, también denominado NP-L-A, se refiere a una nanopartícula de oro, plata o platino que está unida a un engarce L mediante un enlace pseudo-covalente, como el que se produce entre S y Au (45 kcal/mol), y en el que el engarce L está unido a un compuesto de platino mediante un enlace de coordinación entre O y Pt (aproximadamente 4 kcal/mol). El enlace de coordinación no es sensible a variaciones débiles del pH. Así, dichos enlaces de coordinación solo se hidrolizan a pH inferior a 5, liberando así el fármaco de platino. Así, mientras que el conjugado es estable en suero, libera su carga de fármaco cuando el pH se reduce, como se produce en el endolisosoma de una célula tumoral.

[0017] Los conjugados de la invención tienen estabilidad coloidal en un medio. Esto significa que los conjugados de la invención cuando se dispersan en otro medio pueden resistir a la agregación (es decir, precipitación). Así, la dispersión obtenida presenta una larga estabilidad en almacén y tiene el aspecto de una disolución.

La estabilidad coloidal de los conjugados de la invención es esencial ya que si los conjugados no son estables, no muestran ningún beneficio tanto *in vivo* como *in vitro* con respecto al fármaco libre.

[0018] Los conjugados muestran estabilidad coloidal en condiciones fisiológicas, que es la condición o estado del cuerpo o funciones corporales que comprenden pH próximo a neutro (7) y alta concentración de solución salina.

[0019] La espectroscopía de UV-Vis es una técnica útil para determinar la estabilidad coloidal de conjugados.

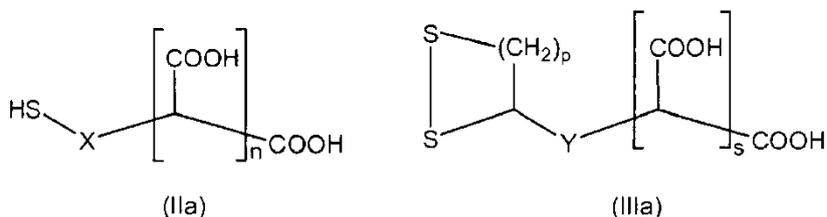
[0020] La FIG. 2 muestra espectros de UV-Vis para varios conjugados (NP: nanoesfera de oro de 20 nm, L: ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA), A: cisplatino) que comprende cada uno una carga diferente del compuesto de platino, que oscila de 0,04 mM a 0,3 mM. La agregación irreversible (es decir, desplazamiento al rojo y ensanchamiento del pico de resonancia plasmática superficial (SPR) pico) puede observarse cuando la concentración del compuesto de platino es suficientemente alta para extinguir toda la carga negativa dada por la envuelta del engarce. Así, a partir de 0,10 mM de cisplatino se observa la formación de agregados y a partir de 0,20 mM la agregación es irreversible, conduciendo a la precipitación de la muestra.

10

[0021] Como se describirá en detalle más adelante, en la preparación de un conjugado que tiene estabilidad coloidal, es clave controlar el número de moléculas del compuesto de platino que están unidas a las moléculas de engarce, de manera que una cantidad suficiente del último siga desprotonada. Así, la concentración de compuesto de platino que un conjugado puede soportar está relacionada con la carga superficial. Al pH de trabajo, las moléculas de engarce se desprotonan y, por tanto, se cargan. Generalmente, el pH de trabajo se corresponde con el pH bajo condiciones fisiológicas. La adición del complejo de coordinación de platino extingue parte de esa carga. Esto puede medirse por la disminución en los valores del potencial ζ a un pH dado. Es muy conocido que una partícula coloidal generalmente necesite aproximadamente 30 mV (positivos o negativos) para ser estable a la agregación. Este valor depende del pH y la fuerza iónica. Los conjugados de la invención que tienen una carga absoluta electrostática superficial de al menos 25 mV también son estables y también forman parte de la invención. Así, en una realización particular, la presente invención se refiere a conjugados de fórmula (I) que tienen una carga absoluta electrostática superficial de al menos 25 mV, que es un valor absoluto de potencial zeta de al menos 25mV bajo condiciones fisiológicas. En otra realización, los conjugados de fórmula (I) tienen una carga absoluta electrostática superficial de al menos 30 mV, que es un valor absoluto de potencial zeta de al menos 30 mV bajo condiciones fisiológicas.

[0022] Los conjugados de la invención comprenden nanopartículas (también denominadas en el presente documento NP) hechas de oro, plata o platino. Estos metales muestran una alta afinidad hacia grupos de azufre (incluyendo tanto grupos SH como disulfuro S-S), tales como los grupos de azufre de un compuesto de fórmula (IIa) o fórmula (IIIa)

30



en las que X, n, p, Y y s tienen los significados descritos anteriormente.

35

[0023] Así, un grupo SH libre o un grupo disulfuro tienen una alta tendencia a reaccionar espontáneamente con la nanopartícula metálica para formar un enlace pseudo-covalente metal-S. Se necesita la fuerte unión entre el engarce y la nanopartícula para evitar la desorción de la molécula de engarce.

[0024] Además, la nanopartícula inorgánica es una buena antena para campos electromagnéticos que incluyen, por ejemplo, rayos gamma, rayos X, infrarrojos cercanos (NIR) o UV-Vis y microondas.

[0025] En una realización preferida de la invención se usan nanopartículas de oro (AuNP). Las AuNP tienen una fuerte absorción potenciada por plasmones superficiales y dispersión que las hace ideales como marcas y agentes de contraste de obtención de imágenes. No son susceptibles al fotoblanqueamiento, biocompatibles y no citotóxicas. Además, pueden calentarse cuando absorben luz a su frecuencia resonante, permitiendo terapia contra el cáncer fototérmica.

[0026] Para los fines de la invención, el término "nanopartículas" se refiere a partículas de tamaño nanométrico que pueden tener diferentes formas y tamaños. En cuanto a la forma de las nanopartículas descritas en el presente documento, dentro del alcance de la invención están comprendidos esferas y poliedros que comprenden caras planas y bordes rectos. Ejemplos de tales poliedros incluyen cubos, prismas y varillas. Los poliedros tienen la ventaja de que pueden ser sensibles al infrarrojo cercano (NIR) y, por tanto, las nanopartículas pueden calentarse localmente. En una realización preferida, las nanopartículas son esferas. En una realización preferida, las nanopartículas son nanoesferas de oro.

55

[0027] El tamaño de la nanopartícula debe ser de forma que permita una vida en plasma prolongada, es decir, el conjugado sigue en la circulación sistémica hasta que encuentra capilares tumorales hiperpermeables.

[0028] En el caso de las nanoesferas, el diámetro está comprendido en el intervalo de 3 a 100 nm, preferentemente en el intervalo de 4 a 20 nm.

5 **[0029]** En el caso de nanocubos y nanoprismas, el tamaño se define en términos de la esfera inscrita fuera del nanocubo o el nanoprisma, que tiene el máximo diámetro posible. En ambos casos, el diámetro de dicha esfera está comprendido en el intervalo de 3 a 100 nm, preferentemente en el intervalo de 4 a 20 nm.

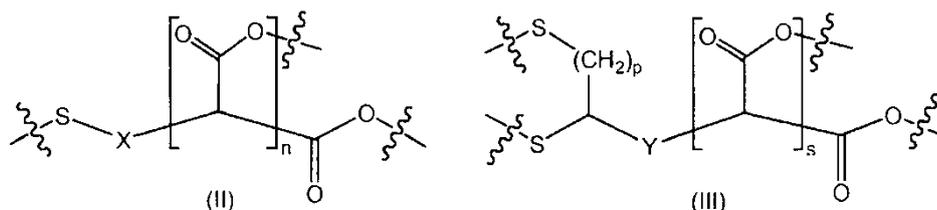
10 **[0030]** Además, en el caso de varillas, el tamaño es 100 nm de longitud y 15 nm de anchura, preferentemente 45 nm de longitud x 15 nm de anchura.

[0031] Los valores de tamaño anteriormente mencionados producen conjugados que son suficientemente largos para evitar el riñón, y suficientemente pequeños para evitar el sistema reticuloendotelial, parte del sistema inmunitario, que consiste en las células fagocíticas localizadas en tejido conjuntivo reticular, principalmente monocitos y macrófagos. Además, este tamaño de los conjugados de la invención (por encima de aquel de moléculas pequeñas esenciales como aminoácidos o péptidos pequeños) promueve la endocitosis.

15 **[0032]** En una realización más preferida, las nanoesferas de la invención tienen un diámetro de aproximadamente 10 nm. En otra realización más preferida, la invención se refiere a nanocubos y nanoprismas en los que su esfera inscrita tiene un diámetro de aproximadamente 10 nm. En la realización más preferida, las nanopartículas de la invención son nanoesferas de oro que tienen un diámetro de 4 a 20 nm.

20 **[0033]** Como ya se ha mencionado, los conjugados de la invención comprenden un engarce L seleccionado del grupo que consiste en la fórmula (II), la fórmula (III), y un estereoisómero de cualquiera de las fórmulas (II) y (III),

25



en las que X, n, p, Y y s tienen los significados que se han descrito previamente.

30 **[0034]** Como se ha mencionado anteriormente, en los conjugados de carga superficial de fórmula (I) NP-L-A, no todos los engarces L están unidos a compuestos de platino, pero están en forma de grupos carboxilo libres, es decir, en los conjugados de fórmula (I) NP-L-A algunos de los birradicales de platino A no existen. Generalmente, estos grupos carboxilo libres se desprotonarán bajo condiciones neutras o básicas. En el conjugado de carga superficial de fórmula (I) NP-L-A según las reivindicaciones, al menos el 45 % de los engarces L están en forma de grupos carboxilo libres, es decir, en un conjugado de carga superficial de fórmula (I) NP-L-A, al menos el 45 % de los birradicales de platino A no existen.

35 **[0035]** Para los fines de la presente invención, el término cadena de hidrocarburo (C_2-C_{20}) se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que comprende de 2 a 20 átomos de carbono, en la que al menos un átomo de carbono puede estar opcionalmente sustituido con un grupo CO o un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O y N y que puede comprender opcionalmente una o más insaturaciones en forma de dobles enlaces y/o triples enlaces. La cadena de hidrocarburo (C_2-C_{20}) está opcionalmente sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, OH, $CONH_2$, CO_2 -alquilo (C_1-C_6) y -CHO.

40 **[0036]** Además, cuando L es un engarce de fórmula (II), está unido a la nanopartícula NP mediante el único átomo de azufre disponible; mientras que cuando L es un engarce de fórmula (III), está unido a la nanopartícula NP mediante los dos átomos de azufre.

45 **[0037]** En una realización particular, X e Y representan independientemente una cadena de hidrocarburo (C_2-C_{20}) sin sustituir como se ha definido anteriormente.

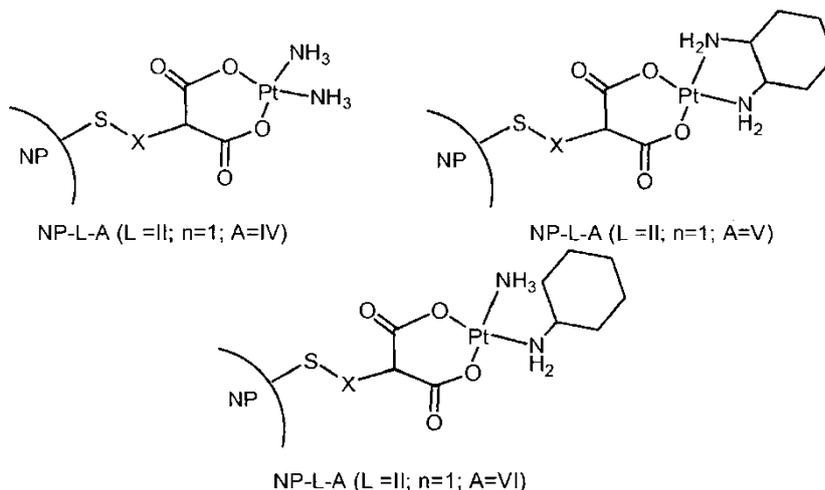
50 **[0038]** En una realización preferida, en un engarce de fórmula (II), X representa $-(CH_2)_m-$ y en un engarce de fórmula (III) Y representa $-(CH_2)_r-$ en la que m representa un valor de 2 a 10 con la condición de que $m+n$ represente un valor de 2 a 10; y r representa un valor de 2 a 10 con la condición de que $r+s$ represente un valor de 2 a 10.

55 **[0039]** En una realización más preferida, en un engarce de fórmula (II), $n = 0$ y en un engarce de fórmula (III), $s = 0$. En este caso particular, la molécula de engarce es lineal y más moléculas pueden unirse a la nanopartícula.

[0040] En una realización incluso más preferida, en el engarce de fórmula (II), $n = 0$ y $m = 10$; y en el engarce de fórmula (III), $p = 2$, $s = 0$ y $r = 4$.

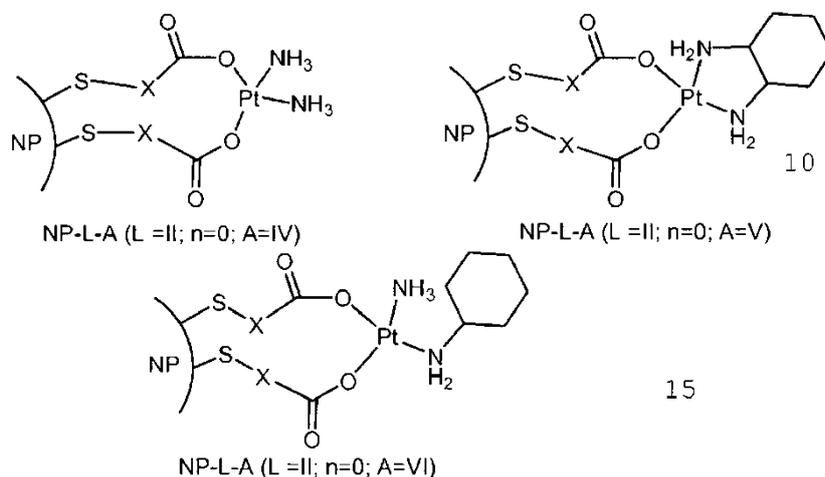
[0041] En los conjugados de fórmula (I), el engarce L se une adicionalmente a un birradical de platino (II) como se ha definido anteriormente. Así, si L es un engarce de fórmula (II) en la que $n = 1$, o un engarce de fórmula (III) en la que $s = 1$; el birradical (II) de platino está unido a una molécula de engarce, formando así dos enlaces COO-Pt con la misma molécula de engarce. En el siguiente esquema se muestran tres conjugados en los que L es un engarce de fórmula (II) en la que $n = 1$ y A es un birradical de platino (II) seleccionado del grupo que consiste en la fórmula (IV), (V) y (VI).

10



[0042] Además, si L es un engarce de fórmula (II) en la que $n = 0$, o un engarce de fórmula (III) en la que $s = 0$; el birradical (II) de platino está unido a dos moléculas de engarce independientes, formando así un enlace COO-Pt con cada una de estas dos moléculas de engarce. En el siguiente esquema se muestran tres conjugados en los que L es un engarce de fórmula (II) en la que $n = 0$ y A es un birradical de platino (II) seleccionado del grupo que consiste en la fórmula (IV), (V) y (VI).

20



[0043] En una realización preferida, el conjugado de fórmula (I) comprende un engarce de fórmula (II) en la que X representa $-(CH_2)_m-$ o un engarce fórmula (III) en la que Y representa $-(CH_2)_r-$ en la que m representa un valor de 2 a 10 con la condición de que $m+n$ represente un valor de 2 a 10; y r representa un valor de 2 a 10 con la condición de que $r+s$ represente un valor de 2 a 10.

[0044] En una realización más preferida, el conjugado de fórmula (I) comprende un engarce de fórmula (II) en la que X representa $-(CH_2)_m-$ y $n = 0$, o un engarce fórmula (III) en la que Y representa $-(CH_2)_r-$ y $s = 0$. En una realización incluso más preferida, el conjugado de fórmula (I) comprende un engarce de fórmula (II) en la que X representa $-(CH_2)_m-$ y $n = 0$.

[0045] En otra realización preferida de la invención, A representa un birradical de platino (II) de fórmula (IV).

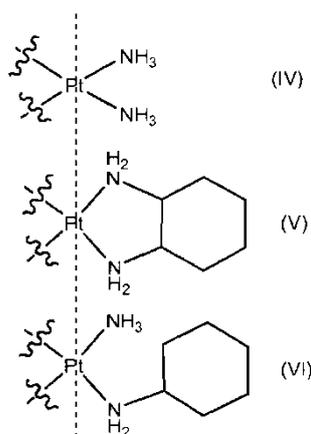
[0046] En la realización más preferida, el conjugado de fórmula (I) comprende un engarce de fórmula (II) en la que X representa $-(CH_2)_m-$ y $n = 0$ y un birradical de platino (II) de fórmula (IV).

[0047] Los estereoisómeros del birradical de platino de fórmulas (IV), (V) y (VI) también forman parte de la invención.

[0048] El birradical de platino de fórmulas (IV), (V) y (VI) puede formar una sal junto con un anión. Ejemplos no limitantes de aniones que pueden estar presentes en un birradical en forma de sal son cloruro, nitrato o hidróxido.

10 **[0049]** En el conjugado de fórmula (I), A es un birradical de platino (II) que tiene sustancialmente una configuración cis. Esto significa que al menos el 80 % de los compuestos de platino (II) muestran configuración cis.

[0050] Los compuestos de platino de la invención comprenden dos lados diferentes como se muestra en el siguiente esquema, el lado izquierdo (lado reactivo) se diseña para unirse al ADN de las células cancerosas. El lado derecho (lado inerte) que comprende los átomos de N es responsable de la biodistribución del fármaco.



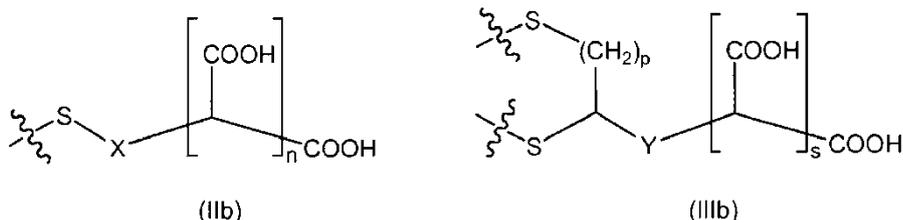
20 **[0051]** Generalmente, la funcionalización parcial de los conjugados de fórmula (I) con compuestos de platino da lugar a un trastorno superficial. El empaquetamiento de las moléculas de fármaco que contienen platino con respecto a la nanopartícula, especialmente por sus extremos reactivos, protege las moléculas de la biodegradación hasta que son liberadas. Este hecho, junto con la alta hidrofiliia de los grupos COO^- , previene la opsonización, es decir, el recubrimiento de las partículas con proteínas especiales llamadas opsoninas, y el posterior reconocimiento por fagocitos y transporte al hígado. Así, cuando los conjugados alcanzan las células diana, puede administrarse una gran cantidad de fármaco que contiene platino.

25 Así, los conjugados de la invención son estables en el sentido de que no precipitan en un medio como se ha mencionado anteriormente, y en el sentido de que el fármaco que contiene platino no se desprende de la nanopartícula en el entorno de trabajo.

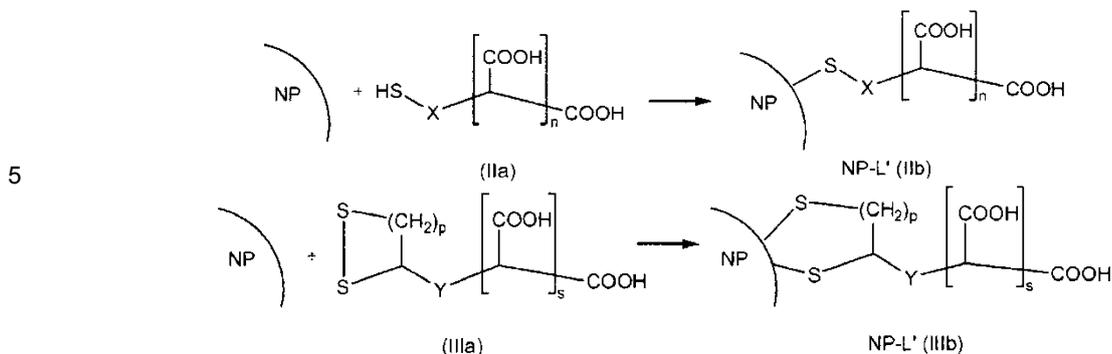
30 **[0052]** Una vista esquemática de un conjugado de fórmula (I) NP-L-A en la que NP es una nanoesfera de oro; L es un engarce de fórmula (II) en la que X representa $-(CH_2)_m-$, $n = 0$ y $m = 2$; y A es un birradical de platino (II) de fórmula (IV) se muestra en la FIG. 1.

35 **[0053]** Como se ha mencionado anteriormente, los conjugados de fórmula (I) puede prepararse convenientemente por un procedimiento de dos etapas, en primer lugar preparando un conjugado intermedio NP-L' y en segundo lugar uniendo el compuesto que contiene platino a este conjugado intermedio.

40 **[0054]** En la primera etapa del procedimiento, un exceso de un compuesto de fórmula (IIa) o fórmula (IIIa), o un estereoisómero o una sal de cualquiera de estas fórmulas, en una disolución acuosa, se usa con el fin de dar lugar al conjugado intermedio de fórmula NP-L' como se ha definido anteriormente, en el que L' es un engarce de fórmula (IIb) o fórmula (IIIb)



o un estereoisómero o una sal de cualquiera de estos engarces, tales como, por ejemplo, la sal de sodio. Esta primera etapa se muestra en el siguiente esquema:



[0055] Generalmente, se supone que esta reacción en presencia de un exceso de un compuesto de fórmula (IIa) o fórmula (IIIa), o un estereoisómero o una sal de cualquiera de estas fórmulas, conduce a un conjugado intermedio NP-L' en el que la superficie completa está recubierta con el engarce L'.

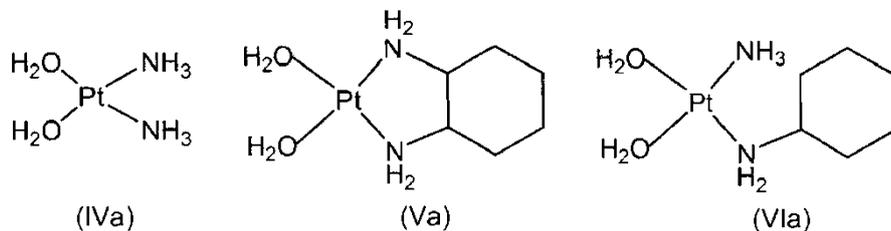
[0056] En una realización preferida se usa un compuesto de fórmula (IIa), que es ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) o ácido 3-mercaptopropanoico (MPA). En otra realización preferida se usa un compuesto de fórmula (IIIa) que es ácido 5-[(3R)-ditiolan-3-il]pentanoico (también llamado ácido alfa-lipoico o ácido tióctico).

[0057] Las nanopartículas pequeñas son difíciles de purificar por centrifugación, por tanto, las moléculas no reactivas del compuesto de fórmula (IIa) o fórmula (IIIa) y el agente reductor pueden eliminarse mediante diálisis de la disolución coloidal presente en disolución después de la conjugación.

[0058] Las nanopartículas metálicas sin recubrir pueden prepararse usando protocolos de síntesis para nanopartículas que permiten la producción simple y aumentable a escala de nanopartículas monodispersas con control de tamaño y forma. En particular, las nanopartículas pueden prepararse por la rápida inyección de una sal metálica seleccionada de una sal de Au, Ag y Pt en un agente reductor, produciendo así una nucleación homogénea temporalmente discreta empleada para la producción de nanopartículas metálicas monodispersas. El agente reductor puede ser, por ejemplo, citrato a alta temperatura (procedimiento de Turkevitch clásico), borohidruro de sodio o una mezcla de borohidruro de sodio y ácido ascórbico, opcionalmente en presencia de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

[0059] La formación de nanopartículas metálicas puede observarse por un cambio en el color en el medio de reacción. Dependiendo del procedimiento usado, las nanopartículas obtenidas tendrán un tamaño y forma diferentes en presencia de tensioactivos adecuados como CTAB.

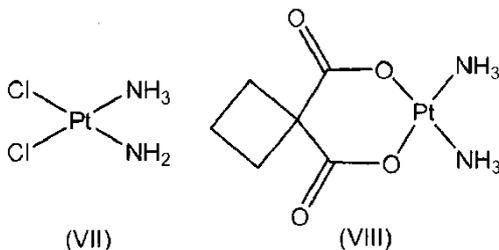
[0060] En una segunda etapa, los conjugados intermedios de fórmula NP-L' se hacen reaccionar adicionalmente con un compuesto de platino seleccionado del grupo que consiste en la fórmula (IVa), la fórmula (Va) y la fórmula (VIa), incluyendo los estereoisómeros de todos ellos

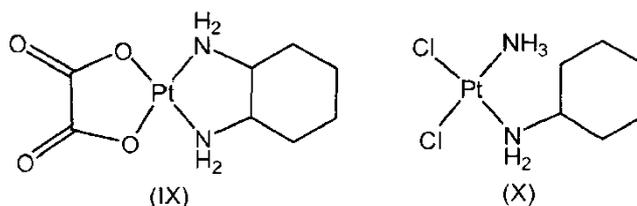


dando lugar a un conjugado de fórmula (I) en la que A es un birradical de platino (II) seleccionado del grupo que consiste en la fórmula (IV), la fórmula (V) y la fórmula (VI), respectivamente, en el que el birradical de fórmulas (IV), (V) y (VI) está opcionalmente en forma de una sal. Esta reacción puede llevarse a cabo en una disolución acuosa en presencia de una base con el fin de desprotonar los grupos ácido carboxílico del engarce L' de fórmula (IIb) o fórmula (IIIb).

[0061] Los compuestos (IVa), (Va) y (VIa), que incluyen los estereoisómeros de todos ellos, pueden formar una sal en presencia de un anión tal como, por ejemplo, cloruro o nitrato.

- [0062]** Como se ha mencionado anteriormente, con el fin de obtener un conjugado soluble de fórmula (I), que es un conjugado que tiene estabilidad coloidal en el medio, alguna carga tiene que mantenerse en la superficie para proveer las NP de suficiente carga electrostática y repulsión para evitar la agregación y precipitación. Así, la superficie está recubierta con moléculas de engarce que terminan en los grupos carboxilo (COO⁻), que a pH fisiológico se desprotonan y presentan carga superficial negativa. Entonces, las moléculas de fármaco de platino se ligan a una fracción de las terminaciones de carboxilo, de manera que se cancela algo de la carga superficial, pero dejan carga suficiente para la repulsión electrostática.
- [0063]** Con el fin de alcanzar el grado deseado de carga de fármaco (es decir, los mayores efectos terapéuticos posibles mientras que se preserva carga superficial suficiente para evitar la desestabilización y agregación) pueden seguirse dos enfoques diferentes: a) una cantidad previamente calculada de compuesto de platino, que cumple con los requisitos anteriores, puede mezclarse con los conjugados intermedios de NP-L', o alternativamente b) un exceso de compuesto de platino puede mezclarse con los conjugados intermedios de NP-L'.
- [0064]** En el primer caso, la cantidad del compuesto de platino (II) tiene que calcularse previamente. Esta cantidad puede determinarse fácilmente por tareas rutinarias. En particular, puede usarse una curva de calibración usando diferentes cantidades de compuesto de platino (II). La idea tras esto es que diferentes cantidades de compuestos de platino (II) se hagan reaccionar con los conjugados intermedios y los conjugados resultantes se analicen por espectroscopía de UV-Vis. Cuando la cantidad de compuesto de platino es demasiado alta para conducir a un conjugado que tiene estabilidad coloidal, y así, se forma un agregado, esto puede detectarse por el desplazamiento al rojo del pico de UV-Vis cuando se comparan los espectros de UV-Vis del conjugado resultante y el conjugado intermedio correspondiente. Así, la cantidad de compuesto de platino se reduce posteriormente hasta que no se observa agregación.
- [0065]** En el segundo caso, si se usa un exceso de compuesto de platino, la conjugación se detiene antes de que demasiadas moléculas de compuesto de platino se unan a las moléculas de engarce. Los inventores han encontrado que, cuando se monitoriza la unión del compuesto de platino a nanopartículas recubiertas de engarce, si el procedimiento no se detiene eficazmente, el compuesto de platino continúa recubriendo la capa de engarce y las nanopartículas se vuelven inestables. La FIG. 3 muestra el análisis de espectroscopía de UV-Vis de alícuotas de reacción tomadas cada diez minutos (NP: nanoesfera de oro de 20 nm, L: ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA), A: cisplatino). En líneas discontinuas se representan la etapa inicial. La estabilidad de nanopartículas se mantiene en esta etapa, aunque puede observarse la presencia de algunos aglomerados en momentos posteriores. En líneas discontinuas se muestran las etapas finales cuando la agregación de las partículas debido a la pérdida de estabilidad (el cisplatino extingue la estabilidad dada por la capa de MUA) conduce a precipitación de las nanopartículas.
- [0066]** Por tanto, cuando se trabaja con un exceso de compuesto de platino, la unión de las moléculas de compuesto de platino a las moléculas de engarce tiene que detenerse cuando la carga de fármaco de platino es máxima y el conjugado resultante es todavía estable. Esto no puede lograrse espontáneamente. Para detener la conjugación, la disolución de conjugación se dispone, por ejemplo, en una bolsa de diálisis de la que las moléculas del compuesto de platino libre escapan rápidamente dejando el conjugado NP-L' parcialmente recubierto con el compuesto de platino. El momento en el que la reacción tiene que detenerse puede calcularse previamente en experimentos similares a los mostrados en la FIG. 3. Este último procedimiento tiene la ventaja de que es más rápido y está más controlado.
- [0067]** La conjugación puede monitorizarse por la combinación de series de experimentos que incluyen dispersión dinámica de la luz (DLS), espectroscopía de UV-Vis, potencial zeta, microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía óptica, electroforesis en gel e ICP-EM para análisis cuantitativos.
- [0068]** El compuesto de fórmula (IVa) puede sintetizarse a partir del compuesto de fórmula (VII) (cisplatino) o fórmula (VIII) (carboplatino); el compuesto de fórmula (Va) puede sintetizarse a partir del compuesto de fórmula (IX) (oxaliplatino); y el compuesto de fórmula (VIa) puede sintetizarse a partir del compuesto de fórmula (X).

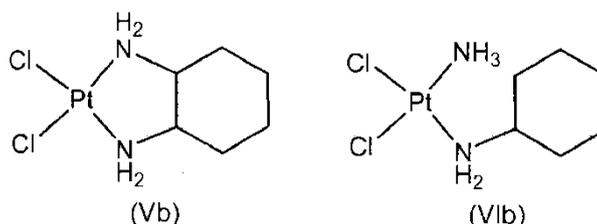




[0069] En el caso de cisplatino, la conversión se lleva a cabo tratando el compuesto con una fuente de un catión Ag, tal como AgNO_3 , para eliminar el Cl de la molécula de cisplatino y dar las especies hidratadas. En el caso de carboplatino, el compuesto se convierte en un compuesto de fórmula (IVa) mediante hidrólisis de los enlaces COO mediante procedimientos convencionales muy conocidos en la técnica. Similarmente, un compuesto de fórmula (VII) puede convertirse en un compuesto de fórmula (V) por procedimientos análogos.

[0070] Alternativamente, los compuestos de fórmula (Va) y (VIa) pueden obtenerse por una síntesis de dos etapas que comprende:

- 1) hacer reaccionar PtCl_4 con la amina correspondiente: ciclohexano-1,2-diamina o amoniaco/ciclohexilamina dando los productos intermedios (Vb) y (VIb), y



15

- 2) tratar los productos intermedios obtenidos en la etapa 1) con una fuente de un catión Ag, tal como AgNO_3 , para eliminar el Cl y dar las especies hidratadas (Va) y (VIa) respectivamente.

[0071] Los productos secundarios no deseados, en particular, compuestos de platino trans, pueden eliminarse por medio de cromatografía.

[0072] El hecho de que un compuesto de platino de fórmula (IVa), (Va) o (VIa) esté conjugado con el conjugado intermedio NP-L' en lugar de los compuestos de platino de fórmulas (VII) a (X) tiene consecuencias importantes. Así, en los conjugados de la invención se forman enlaces de coordinación entre el engarce y el compuesto de platino. Estos enlaces, como ya se ha mencionado, son fuertes y proporcionan estabilidad de la molécula, en particular en un medio a condiciones fisiológicas. Estos enlaces solo se hidrolizan a pH bajo, tal como el presente en los endosomas y endolisosomas.

[0073] Por otra parte, cuando el cisplatino se conjuga directamente con un conjugado intermedio de fórmula NP-L' como se ha descrito en la técnica anterior, se forman enlaces electrostáticos entre el engarce y el compuesto de platino. Generalmente, los enlaces electrostáticos no son tan fuertes como los enlaces de coordinación (aproximadamente 0,4 Kcal/mol en disolución acuosa con electrolitos). En particular, estos enlaces, a diferencia de los conjugados de la invención, conducen a conjugados que muestran inestabilidad coloidal (agregación y precipitación). Esto se mostrará en más detalle en los ejemplos.

[0074] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse como composiciones sólidas o líquidas. La administración de la composición farmacéutica puede ser intramuscular, intravenosa, intraperitoneal o intratumoral. Generalmente, las formulaciones adecuadas incluyen disoluciones para inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que tienen pH y estabilidad adecuados, que pueden contener, por ejemplo, agentes antioxidantes, tampones y agentes bacteriostáticos; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, espesantes, estabilizadores y conservantes.

[0075] Como ya se ha mencionado, los conjugados de la invención pueden ser útiles para el tratamiento de cáncer en un paciente que lo padece, especialmente en casos en los que no sea factible la cirugía.

[0076] Cánceres representativos de interés incluyen tejido de cabeza, cuello y pulmón; tubo gastrointestinal y páncreas, tales como carcinoma gástrico, adenoma colorrectal, carcinoma colorrectal y carcinoma pancreático; tejido hepático, tal como carcinoma hepatocelular; riñón y vías urinarias, tal como carcinoma de vejiga, carcinoma renal; tejido de mama, tal como carcinoma de mama; tejido neural, tal como neuroblastoma y meningioma maligno; tejido de piel, tal como melanoma; y tejidos hematológicos, tales como linfoma y leucemia.

[0077] Aquellos expertos en la materia apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar, entre otros, en función del compuesto específico, la naturaleza del vehículo de administración y la naturaleza del tumor que va a tratarse. Con el fin de tener dosis realistas para la administración *in vivo* de la invención, la concentración de los conjugados se aumenta aproximadamente 50 veces. Para este fin, las nanopartículas se precipitan por centrifugación y el sedimento se recupera y se redissuelve en cantidades progresivamente decrecientes de disolvente sin perder ninguna estabilidad.

[0078] Los conjugados de la invención tienen la ventaja de que reducen los efectos secundarios en comparación con las terapias actualmente usadas con cisplatino y análogos.

[0079] Los conjugados de la invención pueden concentrarse sobre los tumores como resultado del efecto de permeabilidad y retención potenciadas (EPR). Brevemente, el efecto de EPR es el resultado de integridad defectuosa del tejido, cambios en los mediadores de permeación y drenaje linfático alterado en tumores. Así, el endotelio vascular de tumores tiende a tener huecos relativamente grandes que permiten que especies moleculares mayores de hasta 200 nm se infiltren en el tejido en vez de en tejidos sanos. Los mediadores de permeación alterados y el mecanismo de drenaje linfático alterado aseguran entonces que las moléculas que han penetrado en el tumor permanezcan allí. Así, los conjugados de la invención se acumulan pasivamente en el tumor y de allí se internalizan mediante endocitosis. Una ventaja de esto es que necesitan administrarse menores cantidades de fármaco de platino que resultan en menos efectos secundarios.

[0080] Además, debido a la conjugación, los conjugados son inactivos en la circulación sistémica y son solo activables después de alcanzar el tumor, o en el hígado, como hace la materia particulada, en la que no se ha observado toxicidad. Cuando entra en la célula tumoral, una vez en el endosoma, el bajo pH usado por el aparato digestivo de la célula (el endolisosoma, resultante de la fusión del endosoma y el lisosoma) conduce a la hidrólisis del enlace de coordinación entre el engarce y el fármaco de platino, de manera que el fármaco de platino se libera próximo al núcleo.

[0081] Como ya se ha mencionado, la invención también se refiere a los conjugados según las reivindicaciones para su uso en un procedimiento para el tratamiento de cáncer que comprende administrar a un mamífero en necesidad del mismo, que incluye un ser humano, una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de fórmula (I) junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El procedimiento posterior puede comprender además irradiar localmente el tumor con radioterapia a cualquier frecuencia (de gamma a XR, NIR y MW) con el fin de que el fármaco de platino se vuelva más eficaz.

35 Ejemplos

[0082] Los siguientes ejemplos se proporcionan para fines ilustrativos.

Técnicas de caracterización

40

1) Espectroscopía de UV-Vis

[0083] Se adquirieron espectros de UV-Visible con un espectrofotómetro Shimadzu UV-2400. Se dispuso 1 ml de nanopartículas o conjugados en una celda, y se realizó el análisis espectral en el intervalo de 300 nm a 800 nm.

45

2) Potencial zeta

[0084] El potencial zeta de nanopartículas y conjugados se determinó usando un Malvern ZetaSizer Analyser (Malvern Instruments, RU). Estas mediciones se realizaron con control del pH (7,0).

50

3) Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

[0085] Para XPS, 10 µl de una disolución de nanopartículas o conjugados se dispusieron sobre una superficie de nitruro de silicio y se analizaron usando equipo PHI ESCA-5500. Se usó una fuente de rayos X de Al K monocromática y la cámara se mantuvo por debajo de 2×10^{-9} Torr. Los espectros se analizaron usando el software Multipak.

55

Ejemplo 1: Síntesis de nanoesferas de oro (AuNP)

60 Ejemplo 1.1: Nanoesferas de oro que tienen un diámetro de 4 nm

[0086] Se añadió una disolución acuosa de NaBH₄ (0,1 M, 0,6 ml) recientemente preparada fría en hielo a 20 ml de disolución acuosa de HAuCl₄ (0,25 mM) y citrato de trisodio (0,25 mM) mientras se agitaba a temperatura ambiente. La disolución se volvió rosa inmediatamente después de la adición de NaBH₄, que indica la formación de partículas. Siguiendo este procedimiento se obtuvieron nanoesferas de oro que tenían un diámetro de 4 nm. La

65

caracterización de la disolución coloidal se llevó a cabo por espectroscopía de UV-Vis obteniendo una $\lambda_{\text{máx}} = 512,5$ nm (FIG. 4, A) y potencial ζ (-33,6 mV, FIG. 5, A).

[0087] Tras un procedimiento similar (procedimiento de Turkevich) se obtuvieron las siguientes nanopartículas:

Ejemplo 1.2: Nanoesferas de oro que tienen un diámetro de 13 nm (FIG. 7, A).

Ejemplo 1.3: Nanoesferas de oro que tienen un diámetro de 20 nm (FIG. 8, A).

Ejemplo 2: Conjugados intermedios (AuNP-L')

Ejemplo 2.1: Conjugados intermedios AuNP(NP:13 nm)-MUA

[0088] La conjugación se llevó a cabo mediante la adición de una disolución acuosa de ácido mercaptoundecanoico (MUA, 10 mM, 50 μ l/ml de NP) a la disolución de AuNP obtenida en el Ejemplo 1.1). La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente, observándose instantáneamente un cambio de color de la disolución coloidal tras la adición de las moléculas tioladas. Se dejó que la reacción se realizara durante al menos 30 min para alcanzar la conjugación óptima. La purificación se hizo por diálisis contra H₂O MilliQ (10 ml de NP/ 5 l de H₂O) a pH neutro durante dos días. Los conjugados intermedios de AuNP(NP:4 nm)-MUA se caracterizaron por espectroscopía de UV-Vis ($\lambda_{\text{máx}} = 519$ nm, FIG. 4, B), potencial ζ (-65,8 mV, FIG. 5, B) y XPS confirmando la etapa de conjugación (S_{2p} 164,8 eV).

[0089] Siguiendo el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente se obtuvieron los siguientes conjugados intermedios:

Ejemplo 2.2: Conjugados intermedios de AuNP(NP:13 nm)-MUA (FIG. 7, B).

Ejemplo 2.3: Conjugados intermedios de AuNP(NP:20 nm)-MUA (FIG. 8, B).

[0090] Similarmente, siguiendo el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente, pero usando ácido tióctico (TA) en lugar de MUA, se obtuvo el siguiente conjugado intermedio: Ejemplo 2.4: Conjugado intermedio de AuNP(NP:4 nm)-TA (FIG. 9, B).

Ejemplo 3: Síntesis de derivados de platino: *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂](NO₃)₂ (compuesto de fórmula (IVa))

[0091] Se añadió una disolución de AgNO₃ (169 mg, 1 mmol) en 2,5 ml de H₂O gota a gota a una suspensión de cisplatino (150 mg, 0,5 mmoles) en 2,5 ml de H₂O. Precipitó un sólido blanco (AgCl) y el color amarillo de la mezcla inicial desaparece después de completarse la adición. La suspensión resultante se calentó a 50 °C durante 1 h y luego se separó AgCl por centrifugación. La disolución de sobrenadante se evaporó a sequedad y el residuo se recristalizó en una mezcla de etanol/agua. Rendimiento: 174 mg (89 %).

Ejemplo 4: Síntesis de conjugados AuNP-L-A

Ejemplo 4.1: Conjugados de AuNP(NP:4 nm)-MUA-Pt

[0092] Una disolución coloidal del Ejemplo 2.1 (10 ml, $\approx 7,12 \times 10^{13}$ NP/ml) se llevó a pH básico (9-14) con una disolución acuosa de NaOH (0,1 M). Se añadió un exceso del compuesto de fórmula (IVa) obtenido en la etapa 3 (0,5 equiv. con respecto al exceso de MUA añadido) a la disolución mientras se agitaba a temperatura ambiente. Se dejó que la reacción se realizara durante al menos 30 min y la purificación se llevó a cabo mediante diálisis de la disolución coloidal conjugada (5 ml de conjugados de AuNP(NP:4 nm)-MUA-Pt / 5 l de H₂O MilliQ) a pH neutro durante 2 días. La caracterización se hizo por espectroscopía de UV-Vis observando un desplazamiento al rojo en la resonancia de plasmones superficiales de 1,5 nm ($\lambda_{\text{máx}} = 520,5$ nm). Además, la caracterización por XPS confirma la presencia de derivados de Pt sobre las nanopartículas (Pt_{4f} 74,1 y 77,6 eV). La cuantificación del fármaco sobre la disolución de AuNP se midió por ICP-EM (1,9 mg/l).

Los conjugados obtenidos se caracterizaron por espectroscopía de UV-Vis (FIG. 4, C), potencial ζ (-25,9 mV, FIG. 5) y XPS confirmando la etapa de conjugación (FIG. 6).

[0093] Siguiendo el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente, pero empezando a partir de conjugados intermedios de los Ejemplos 2.2, 2.3 y 2.4, se obtuvieron respectivamente los siguientes conjugados:

Ejemplo 4.2: AuNP(NP:13 nm)-MUA-Pt (FIG. 7, C).

Ejemplo 4.3: AuNP(NP:20 nm)-MUA-Pt (FIG. 8, C).

Ejemplo 4.4: AuNP(NP:4 nm)-TA-Pt (FIG. 9, C y D).

Ejemplo 5: Síntesis de un conjugado AuNP(NP:4 nm)-MUA-cisplatino (ejemplo comparativo)

[0094] Este ejemplo tuvo como objetivo comparar el efecto de conjugados obtenidos mediante interacciones

electrostáticas. Para este fin, un conjugado intermedio AuNP-MUA, en el que las nanoesferas tienen un diámetro de 4 nm como se han obtenido en la etapa 2, se funcionalizó adicionalmente con cisplatino del siguiente modo:

5 **[0095]** Los conjugados AuNP-MUA (Ejemplo 2.1, 5 ml de 10^{12} NP/ml) se dispensaron en 5 ml de 1 mg/ml de disolución acuosa comercial de cisplatino después de al menos tres lavados. Se dejó que la absorción del cisplatino sobre las nanopartículas recubiertas tuviera lugar durante 2 días. El exceso de cisplatino se eliminó por centrifugación. Los conjugados cargados de fármaco se lavaron al menos tres veces y se dispensaron en agua.

10 **[0096]** La estabilidad de estos conjugados se comparó con la estabilidad de los conjugados de la invención. La FIG. 10 muestra la estabilidad medida como la variación en el tiempo de la cantidad de platino atómico de A: el conjugado del Ejemplo 4.1 en medios celulares; B: el conjugado del Ejemplo 5 en agua; y C: el conjugado del Ejemplo 5 en medios celulares. Después de 48 h de incubación con medio celular a 37 °C, la liberación del fármaco de platino de la nanopartícula solo se observó en el caso de conjugados formados mediante interacciones electrostáticas. Las pruebas de estabilidad se basaron en cuantificaciones de espectroscopía de masas con plasma
15 inductivamente acoplado ICP-MS de liberación de fármaco de platino después de la incubación de ambos sistemas.

Ensayo de MTT de los conjugados en células tumorales

20 **[0097]** Se sembraron células en una placa de 96 pocillos Multiwell (Iwaki) a 4×10^3 células / pocillo y, 24 horas después, el medio se cambió para los tratamientos. Se usó la sal de tetrazolio bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Acros Organics) para la evaluación de la actividad mitocondrial en estudios de viabilidad celular 24 y 48 horas después de los tratamientos. Las placas se midieron en el lector de microplacas modelo 550 (BIO-RAD) y los datos se procesaron con Excel y el software SPSS. Usando medidas de absorbancia [tiempo cero (Az), crecimiento de control (C) y crecimiento de prueba en presencia de fármaco a los diversos niveles de
25 concentración (Ai)], el porcentaje de crecimiento se calculó en cada uno de los niveles de concentración de fármaco. Los ensayos se hicieron con tres líneas de cáncer celular: HeLa, A549 y HEK. Estudios con las diferentes células cancerosas cultivadas (HeLa, A549 y HEK) mostraron que los conjugados de la invención, en particular los conjugados del Ejemplo 4.1, alcanzaron mayores niveles de fármaco intracelular que cuando se administró cisplatino libre a estas células.
30

[0098] La Figura 11 muestra el % de viabilidad de células tumorales de pulmón A549 cuando las células se exponen a las nanoesferas de oro sin recubrir del Ejemplo 1.1 (B); al conjugado intermedio del Ejemplo 2.1 (C); al conjugado del Ejemplo 4.1 (D); a cisplatino comercial (E); y al derivado de cisplatino del Ejemplo 3 (F). A y G representan los valores de control a 0 y 48 h, respectivamente. Como puede observarse, se observó una detención
35 de la proliferación significativa cuando se exponen las células al conjugado de la invención (D), que muestra el efecto citostático del conjugado. Por el contrario, las nanopartículas sin recubrir, conjugados intermedios o derivado de cisplatino hidratado no provocaron ninguna respuesta.

Ensayo animal

40 **[0099]** Se eligieron quince ratones SCID para el experimento *in vivo*. Los ratones se inyectaron con 20×10^6 células tumorales de pulmón A549 en sus flancos. Se prepararon tres grupos aleatorios de cinco ratones cada uno. Entonces, los presentes inventores esperaron hasta que el tumor creció a un tamaño fácilmente medible. Al primer grupo (A) no se le administró tratamiento. Al segundo grupo (B) se le administró una dosis suave de cisplatino
45 comercial (30 mg por kg de peso de animal). El tercer grupo (C) se trató con los conjugados del Ejemplo 4.1 con 100 ml de 1,9 mg de fármaco de platino por litro en una dosis intraperitoneal. El tamaño tumoral (como un signo de éxito terapéutico) y el peso del animal (como un signo de efectos secundarios) se midieron cada tres días. Después de quince días se detuvieron los experimentos. Como se muestra en la FIG. 12, en el primer caso (A) el tumor creció como era de esperar. En el segundo caso (B) hubo una reducción del tamaño tumoral, como era de esperar, y una
50 pérdida de peso corporal (no mostrada), como efecto secundario del tratamiento. En el tercer caso (C) se observó una mayor reducción del tumor a dosis 5 veces inferiores al cisplatino libre, y no se observó pérdida de peso corporal (no mostrada), de acuerdo con la menor dosis o la biodistribución modificada del fármaco de platino unido a la nanopartícula o ambos. Las mediciones bioquímicas preliminares no indicaron ninguna disfunción significativa del riñón y hepática en ningún caso, lo que está de acuerdo con la baja dosis usada en cada caso.
55

REIVINDICACIONES

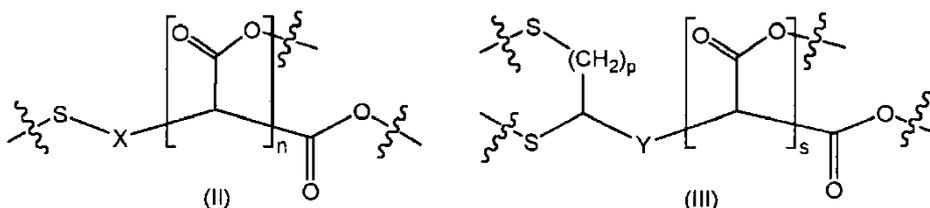
1. Un conjugado de fórmula (I)

5 NP-L-A (I)

que tiene estabilidad coloidal en un medio en la que

NP es una nanopartícula de oro, plata o platino;

10 L es un engarce de fórmula (II) o un estereoisómero del mismo, que está unido a la nanopartícula NP mediante el átomo de azufre; o L es un engarce de fórmula (III) o un estereoisómero del mismo, que está unido a la nanopartícula NP mediante los dos átomos de azufre



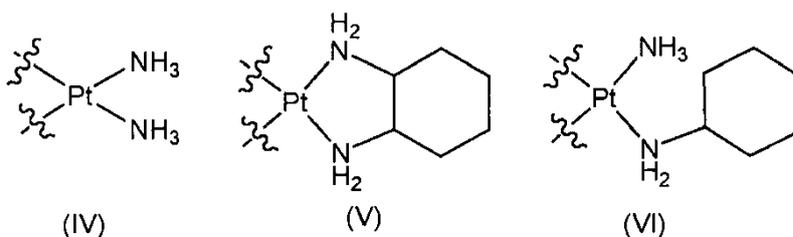
15 en las que:

X e Y representan independientemente una cadena de hidrocarburo (C₂-C₂₀), en los que al menos un átomo de carbono está opcionalmente sustituido con un grupo CO o un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O y N; y en los que la cadena de hidrocarburo (C₂-C₂₀) está opcionalmente sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, OH, CONH₂, CO₂-alquilo (C₁-C₆) y -CHO;

n y s representan independientemente un valor de 0 a 1;

p representa un valor de 1 a 2; y

25 A es un birradical de platino (II) seleccionado del grupo que consiste en la fórmula (IV), la fórmula (V) y la fórmula (VI) que incluye cualquiera de los estereoisómeros de todos ellos, en el que el birradical está opcionalmente en forma de una sal, y está unido al engarce L mediante el átomo de oxígeno de enlace sencillo de los grupos carboxilo



30 con la condición de que:

cuando en el engarce de fórmula (II) o fórmula (III), n = 1 o s = 1; el birradical (II) de platino está unido a una molécula de engarce de fórmula (II) o fórmula (III), formando así dos enlaces COO-Pt con la misma molécula de engarce; y

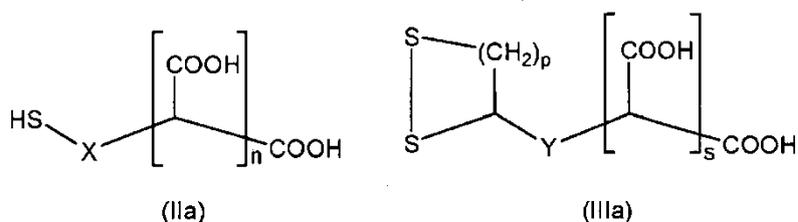
35 cuando en el engarce de fórmula (II) o fórmula (III), n = 0 o s = 0; el birradical (II) de platino está unido a dos moléculas de engarce independientes de fórmula (II) o fórmula (III), formando así un enlace COO-Pt con cada una de estas dos moléculas de engarce; y

estando al menos el 45 % de los engarces L de fórmula (II) o fórmula (III) en forma de grupos carboxilo libres.

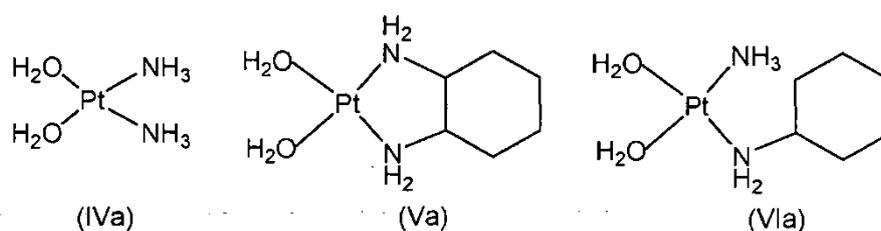
40 2. El conjugado según la reivindicación 1, que tiene una carga absoluta electrostática superficial de al menos 25 mV bajo condiciones fisiológicas.

45 3. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que X representa -(CH₂)_m- e Y representa -(CH₂)_r- en la que m representa un valor de 2 a 10 con la condición de que m+n represente un valor de 2 a 10; y r representa un valor de 2 a 10 con la condición de que r+s represente un valor de 2 a 10.

4. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que NP es una nanopartícula de oro.
5. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la nanopartícula es una nanoesfera que tiene un diámetro de 4 a 20 nm.
6. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que tiene estabilidad coloidal en un medio fisiológico.
7. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que en el engarce de fórmula (II), $n = 0$; y en el engarce de fórmula (III), $s = 0$.
8. El conjugado según la reivindicación 3, en el que en el engarce de fórmula (II), $n = 0$ y $m = 10$; y en el engarce de fórmula (III), $p = 2$, $s = 0$ y $r = 4$.
9. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que A es un birradical de platino (II) de fórmula (IV).
10. Un procedimiento para la preparación de un conjugado de fórmula (I) como se define en la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:
- a) hacer reaccionar una nanopartícula NP de oro, plata o platino con un exceso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en la fórmula (IIa), la fórmula (IIIa), un estereoisómero, y una sal de cualquiera de las fórmulas (IIa) y (IIIa), en una disolución acuosa dando lugar a un conjugado intermedio



- b) hacer reaccionar el conjugado intermedio obtenido en la etapa a) con una cantidad apropiada de un compuesto de platino (II) dando lugar a un conjugado de fórmula (I) que tiene estabilidad coloidal, en una disolución acuosa en presencia de una base, estando el compuesto de platino (II) seleccionado del grupo que consiste en la fórmula (IVa), la fórmula (Va), la fórmula (VIa), y una sal de cualquiera de las fórmulas (IVa), (Va) y (VIa), incluyendo cualquiera de los estereoisómeros de todos ellos.



11. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de fórmula (I) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9 junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
12. La composición según la reivindicación 11, para ser administrada por inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular.
13. Un conjugado de fórmula (I) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en el tratamiento de cáncer.
14. El conjugado para su uso según la reivindicación 13, en el que la nanopartícula es una nanoesfera de oro que tiene un diámetro de 4 a 20 nm.

15. El conjugado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 13-14, en el que en el engarce de fórmula (II) $m = 10$ y en el engarce de fórmula (III) $p = 2$ y $r = 4$.

16. El conjugado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en el que A es un birradical de platino (II) de fórmula (IV).

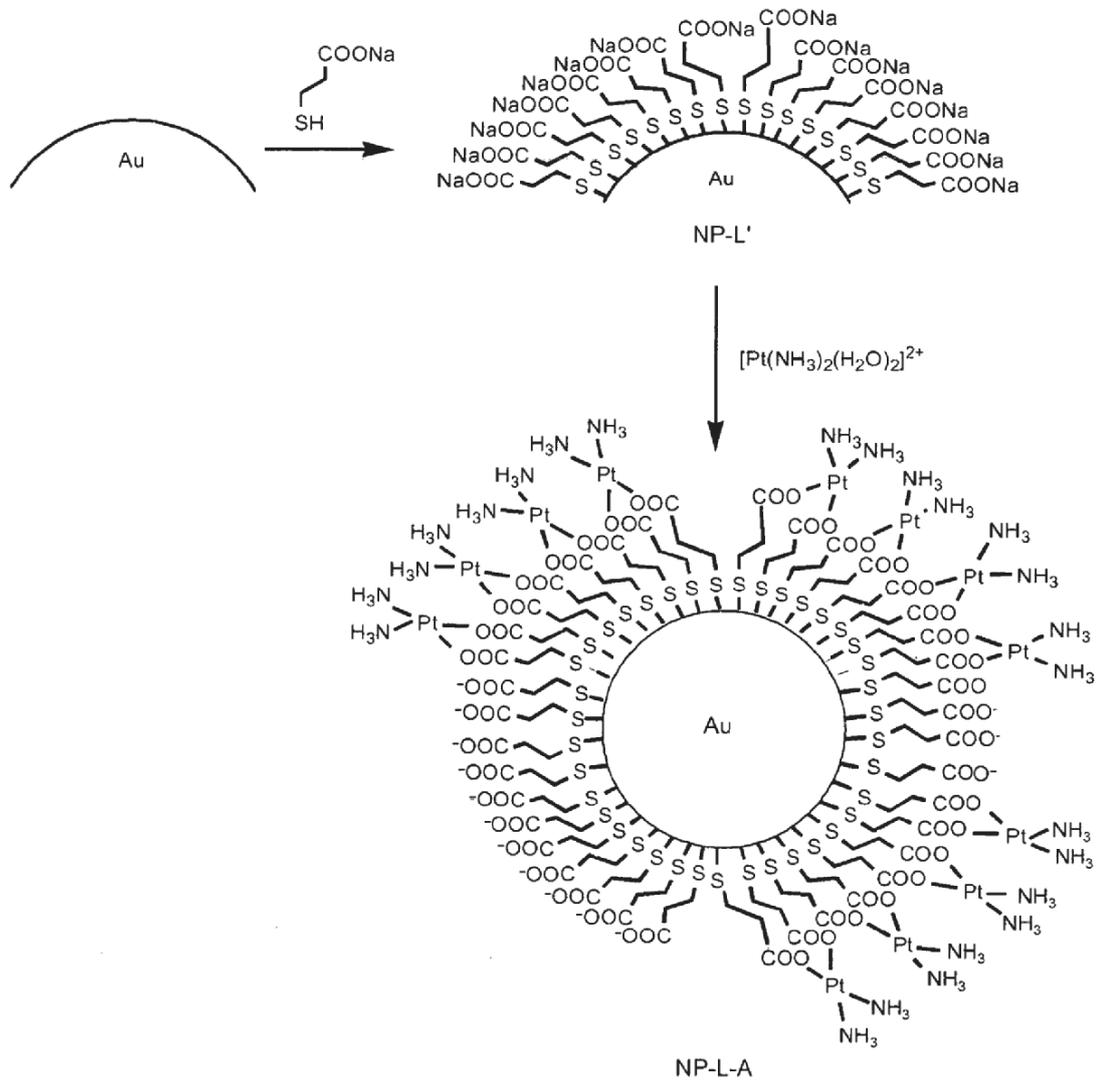


FIG.1

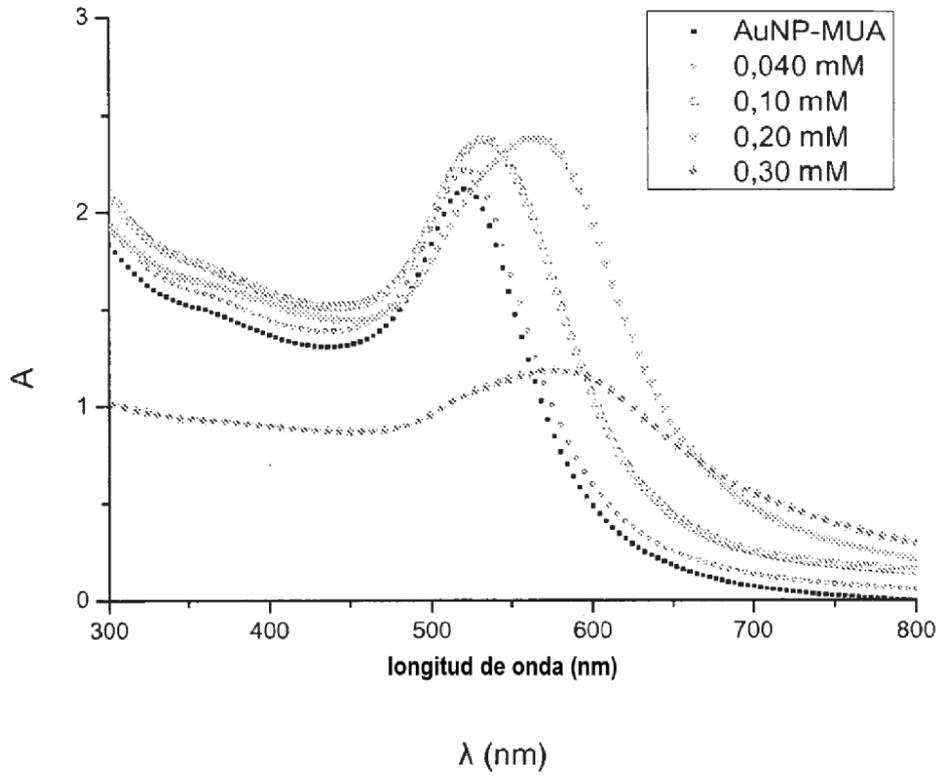


FIG. 2

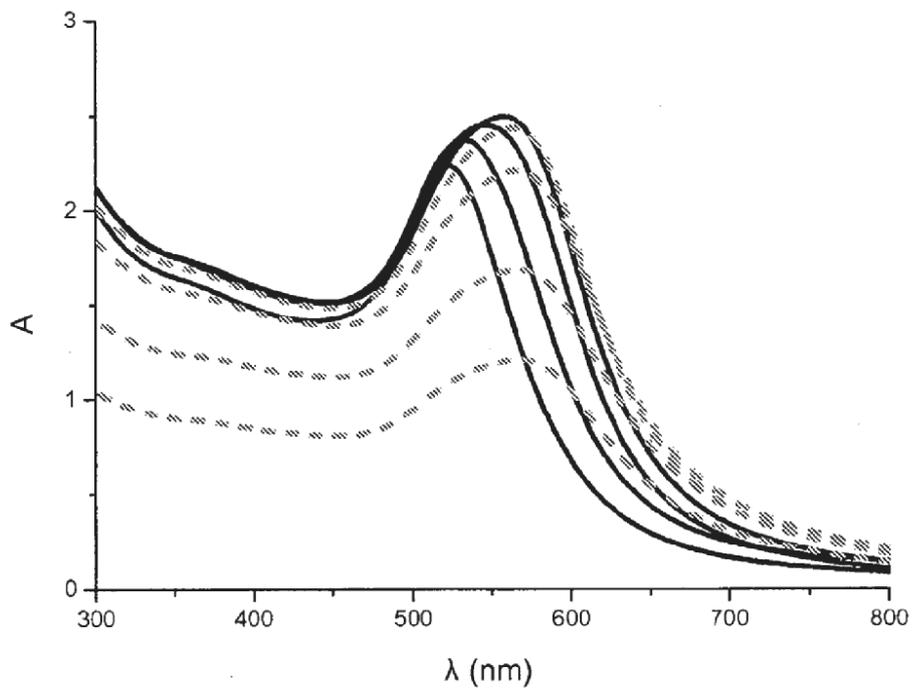


FIG. 3

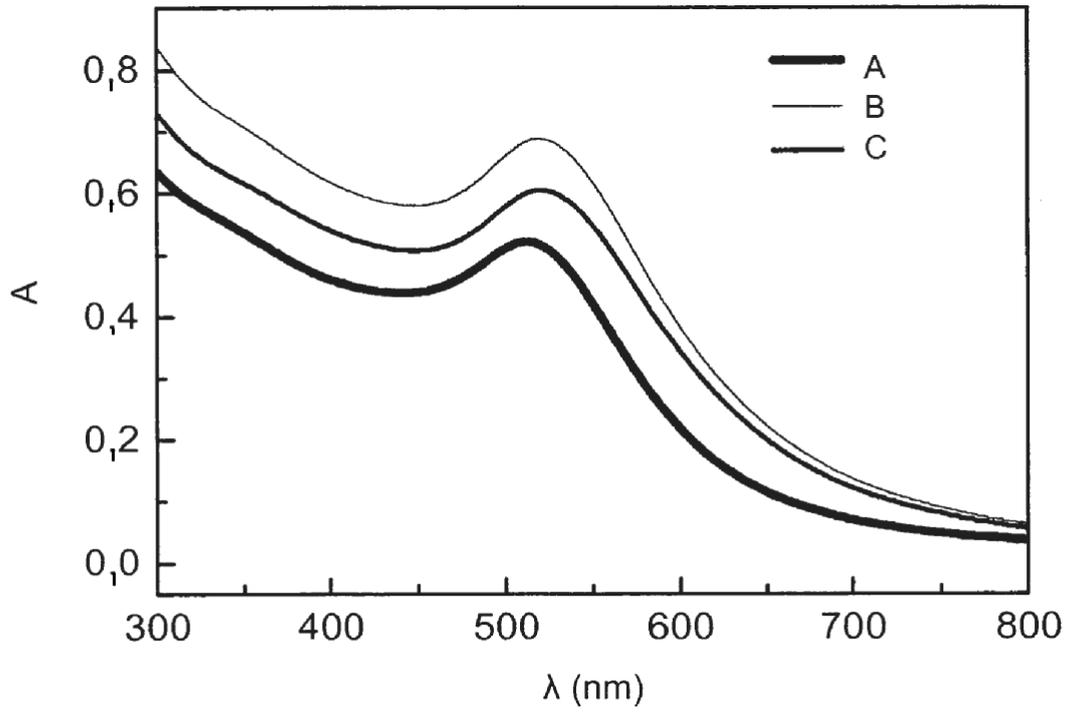


FIG. 4

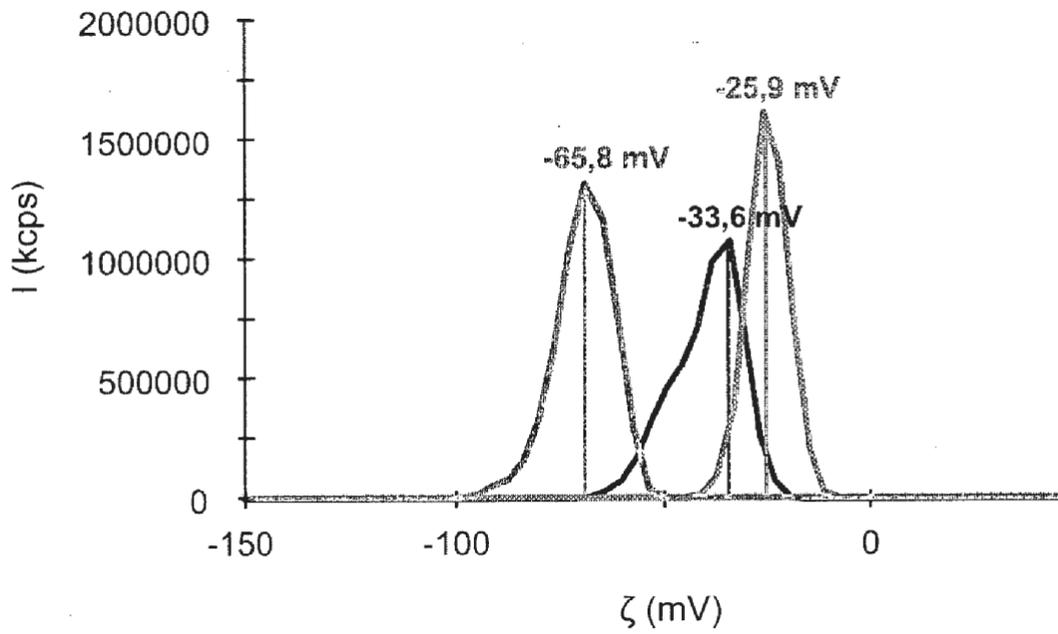


FIG. 5

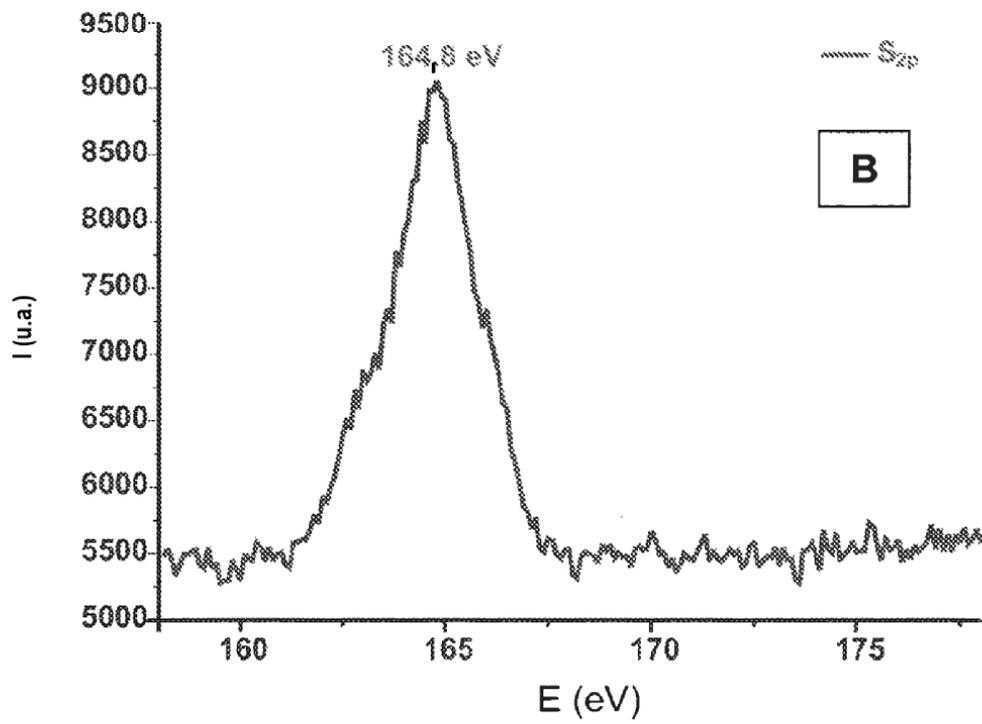
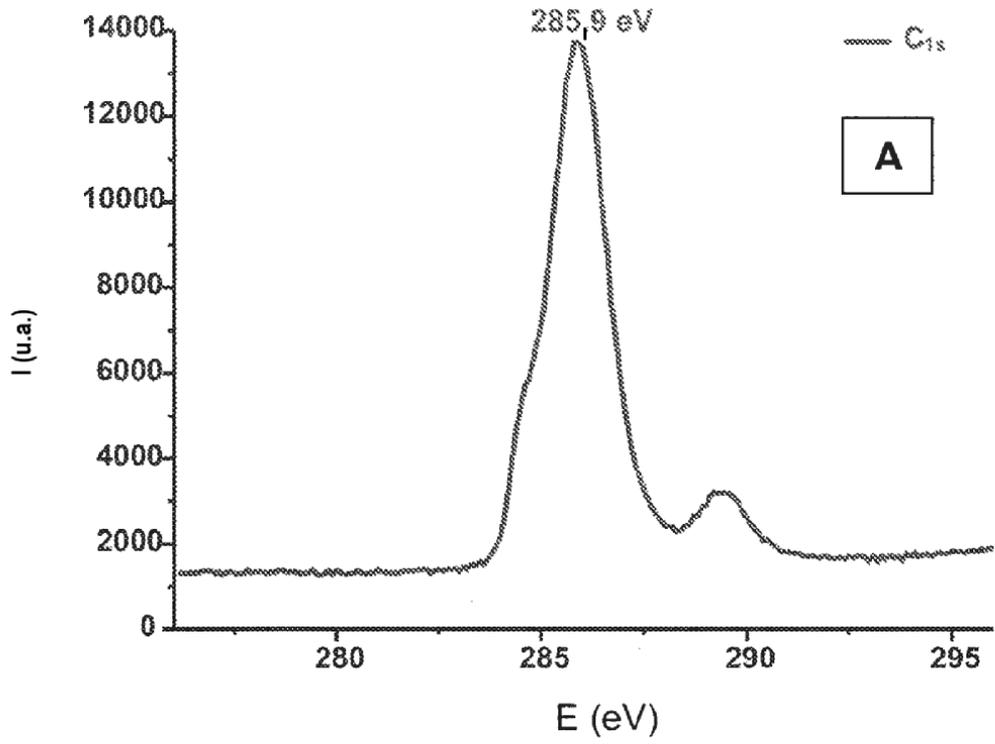


FIG. 6

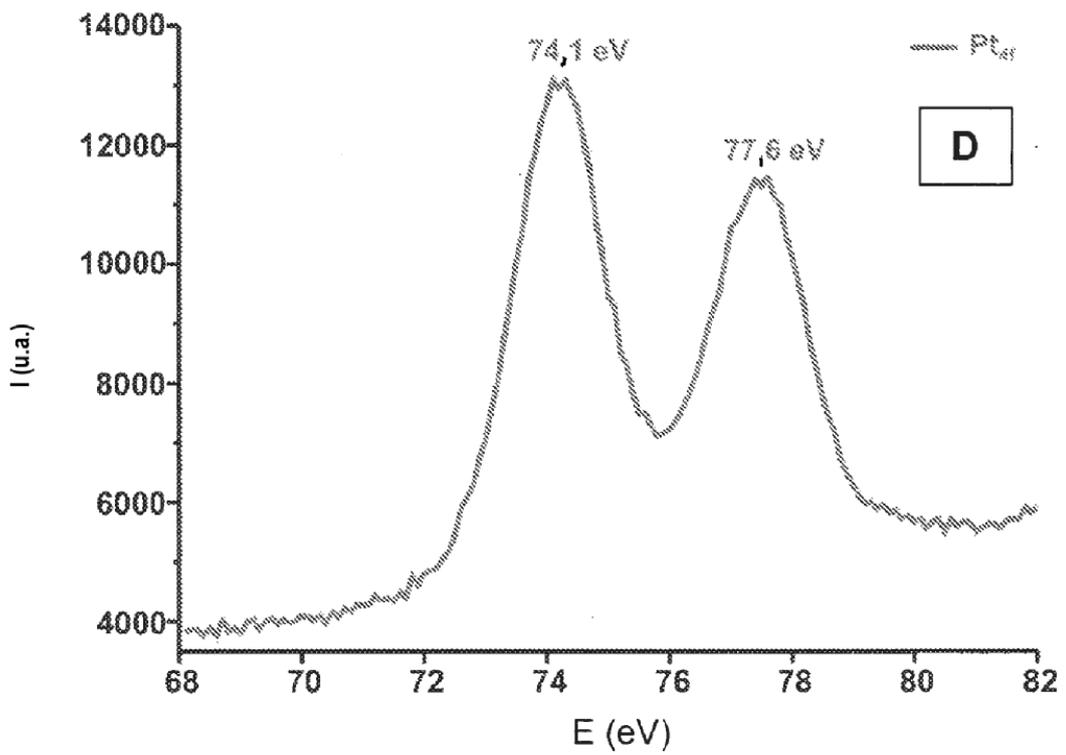
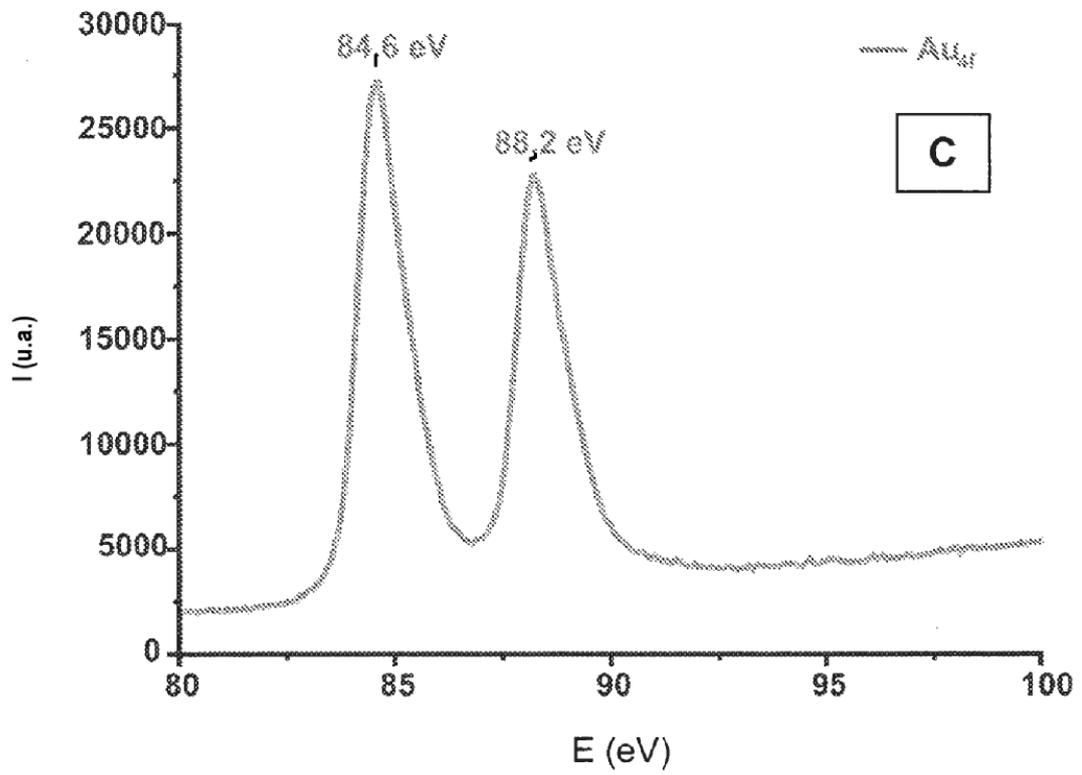


FIG. 6

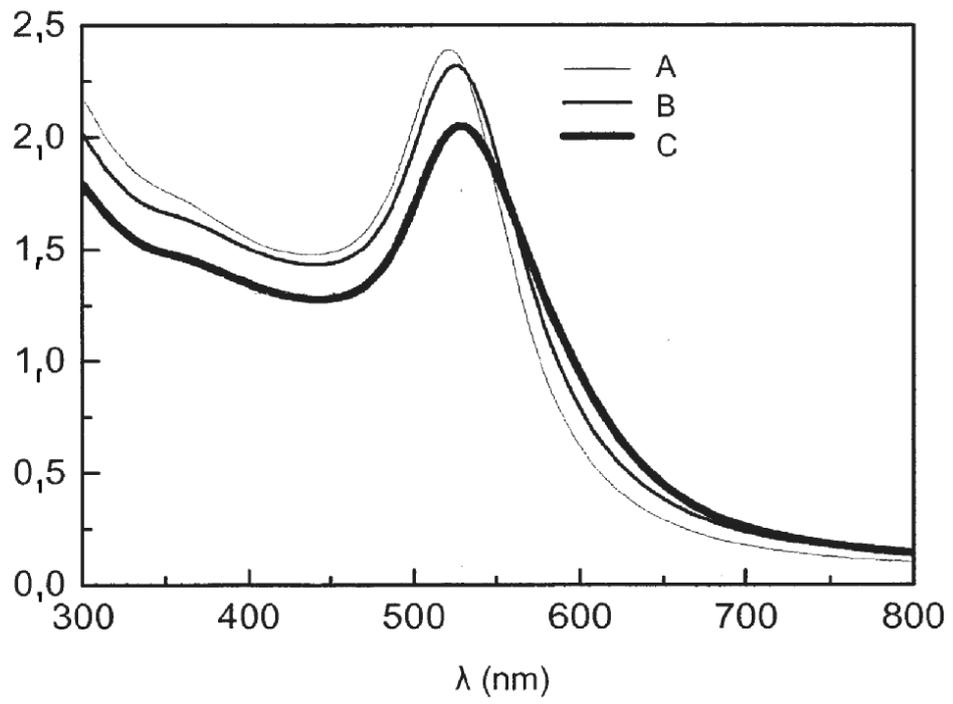


FIG. 7

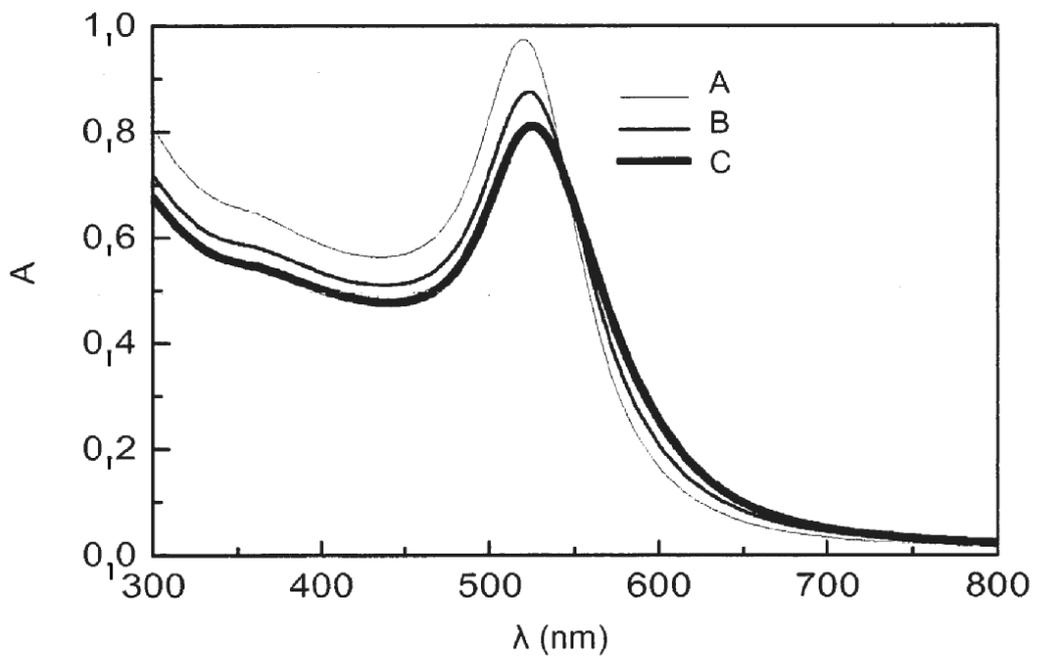


FIG. 8

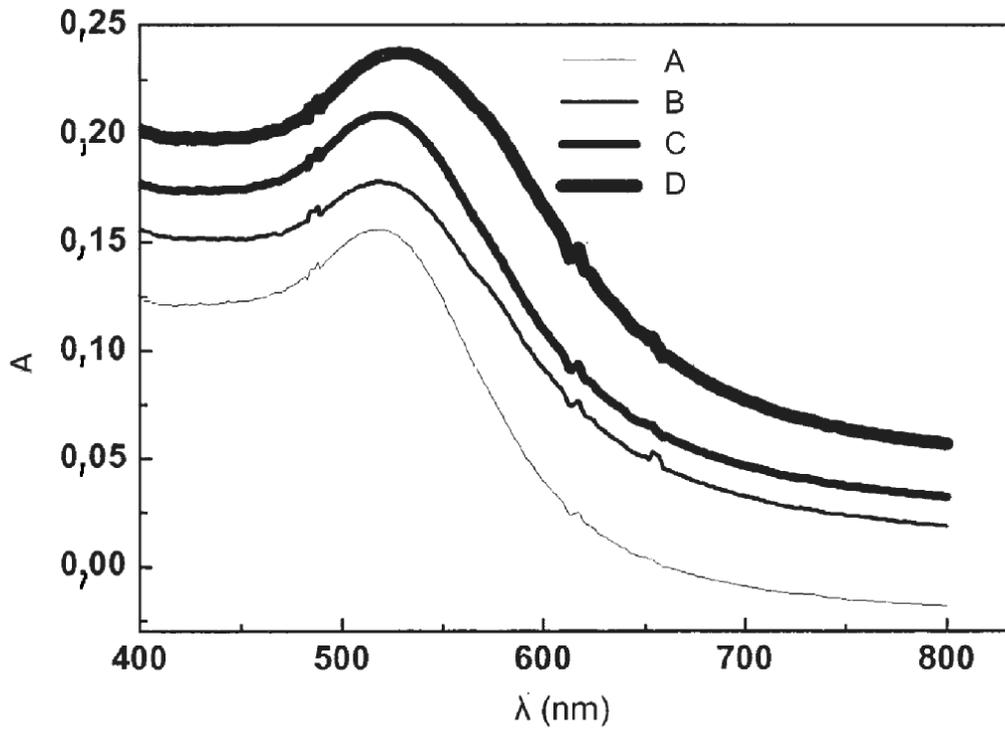


FIG. 9

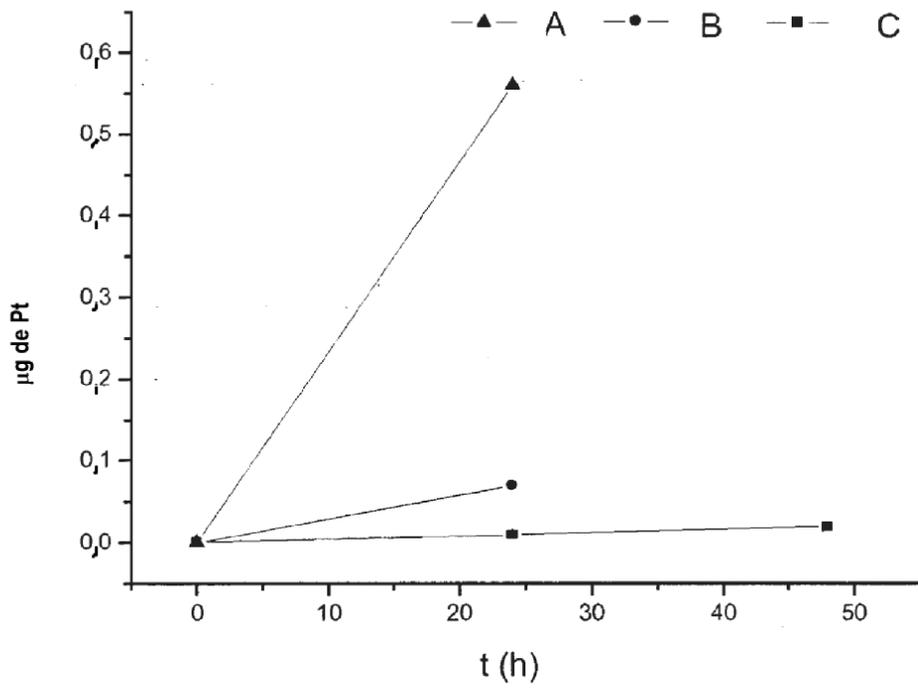


FIG. 10

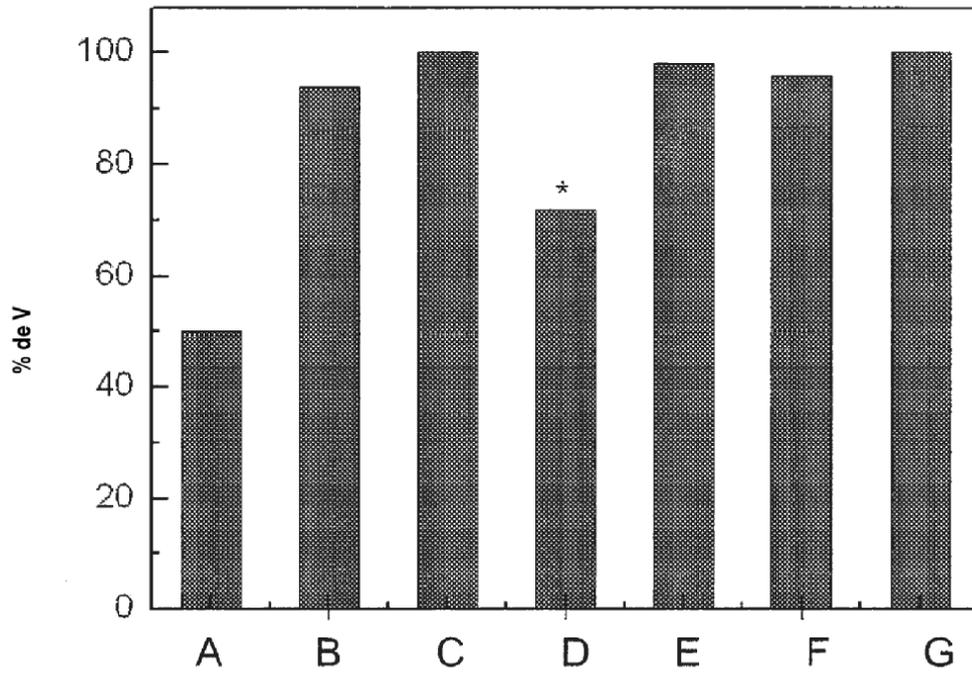


FIG. 11

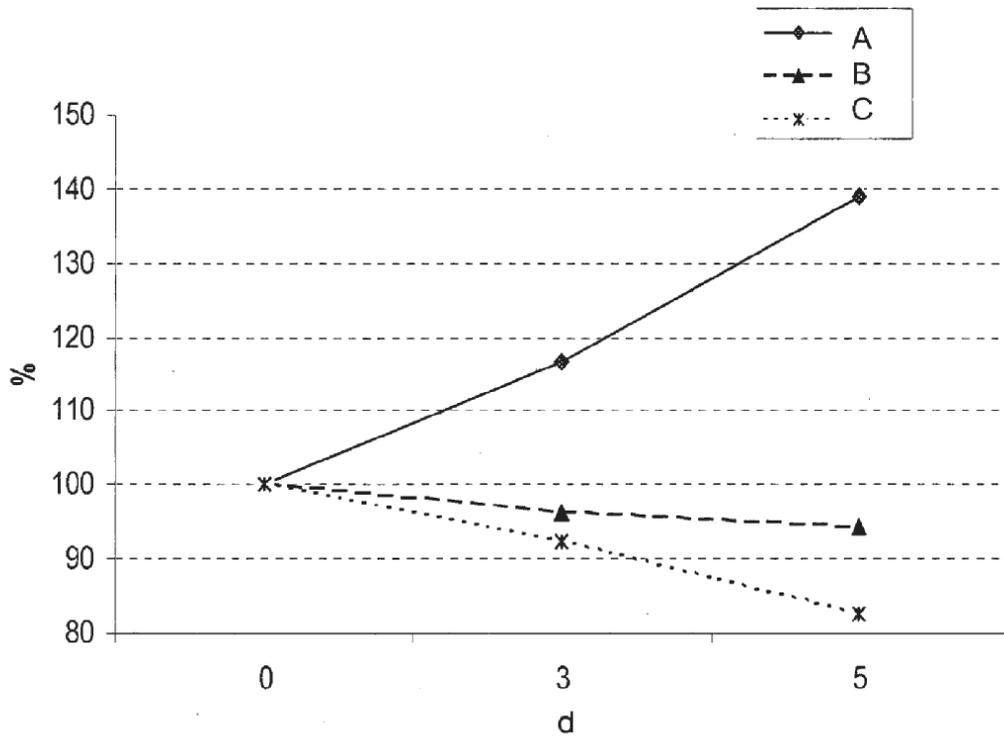


FIG. 12

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden 5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 2006099146 A [0006]

10

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- REN L. et al. *Mater. Sci. Eng. C*, 2003, vol. 23, 113-116 [0006]
- VÁZQUEZ-CAMPOS et al. Gold nanoparticles as carriers of cisplatin: A new approach for cancer treatment. *Trends in nanotechnology conference-TNT2008*, 01 September 2008 [0006]