

Un Nanocomplejo Micelar

Campo Técnico

5 La presente invención se refiere de manera general a nanocomplejos micelares para suministro de fármaco y un método de formación de los mismos. La presente invención se refiere también a un conjugado polímero-flavonoide que comprende un polímero enlazado al anillo B de un flavonoide y un método para formar el mismo.

10 Técnica Anterior

La quimioterapia es uno de los tratamientos más comunes para el cáncer, utiliza fármacos suministrados por medio de administración peroral y parenteral. El mayor desafío con la administración de los fármacos anticancerígenos convencionales es su distribución no específica en el cuerpo, lo que conduce a
15 toxicidad con graves efectos colaterales. Además, el efecto terapéutico de los fármacos orales está limitado por su baja biodisponibilidad debido a que los fármacos deben pasar a través de los ductos digestivos. Durante las décadas más recientes, los investigadores se han enfocado en desarrollar sistemas de suministro de fármaco para superar las limitaciones de la administración de
20 fármaco convencional a través del mejoramiento de la farmacocinética y la biodistribución e los fármacos.

En años recientes, se han estudiado de manera extensiva las catequinas del té verde debido a sus beneficios para la salud, que incluyen la prevención de enfermedades cardiovasculares y cánceres. Entre las catequinas del té, (-)-
25 epigalalocatequina-3-galato (EGCG) es la más abundante y se ha considerado que desempeña un rol principal en los efectos benéficos del té verde. Numerosos estudios han demostrado que EGCG posee efectos antioxidantes, antidiabéticos, antibacteriales, anti-inflamatorios e hipocolesterolémicos. Además, se ha demostrado que inhibe de manera efectiva el crecimiento tumoral
30 y la metástasis al dirigir múltiples vías de transducción de señal esenciales para la sobrevivencia de la célula cancerígena.

A pesar de estas actividades deseables, las aplicaciones clínicas de EGCG han estado limitadas por su escasa y reducida biodisponibilidad oral. Por ejemplo, EGCG es inestable y se descompone con facilidad bajo un ambiente fisiológico.
35 Se informó que EGCG tenía una vida media corta menor a 30 minutos en

solución salina regulada con fosfato 0.05 M (PBS) (pH 7.4) a 37°C. Además, la mayoría del EGCG ingerido experimenta una hidrólisis extensiva en el fluido gástrico, y degradación metabólica en el tracto gastrointestinal. Como resultado, es posible alcanzar las concentraciones en plasma de EGCG requeridas para lograr un efecto terapéutico deseado después de la administración oral.

Existe por lo tanto la necesidad de proporcionar un sistema de suministro de fármaco que supere o por lo menos mejore, una o más de las desventajas descritas con anterioridad. Existe también la necesidad de proporcionar un método para formar dicho sistema de suministro de fármaco.

10

Breve Descripción de la Invención

De acuerdo con un primer aspecto, se proporciona un nanocomplejo micelar que comprende una micela y un agente encapsulado dentro de dicha micela, la micela que comprende un conjugado polímero-flavonoide, en donde el polímero está enlazado al anillo B de dicho flavonoide.

De manera ventajosa, los nanocomplejos micelares pueden ser utilizados como sistemas de suministro de fármaco. Los nanocomplejos micelares tienen un tamaño pequeño y gran capacidad de carga de fármaco favorable para un sistema de suministro de fármaco dirigido a tumor. Como ventaja adicional, se puede lograr la liberación sostenida del agente utilizando nanocomplejos micelares en condiciones fisiológicas. De modo más ventajoso, los nanocomplejos pueden ser vehículos de suministro promisorios para una variedad de agentes anticancerígenos insolubles en agua. De forma ventajosa adicional, el nanocomplejo micelar puede suprimir de manera significativa el crecimiento del tumor, con toxicidad reducida asociada con la administración del agente. De modo ventajoso, los nanocomplejos micelares pueden representar un sistema de suministro de fármaco único y efectivo con efectos terapéuticos sinérgicos a partir del sistema de suministro de fármaco o el portador de micela y el agente.

El agente puede ser doxorubicina. De forma ventajosa, los nanocomplejos micelares que encapsulan doxorubicina pueden exhibir liberación de fármaco sostenida. Esta liberación de fármaco sostenida se puede deber a la fuerte interacción entre EGCG y doxorubicina dentro de los nanocomplejos micelares. De manera ventajosa adicional, en ciertas modalidades, sólo se observó una descarga de ráfaga marginal en la etapa inicial, sugiriendo que las moléculas de doxorubicina fueron encapsuladas de manera estable en los nanocomplejos micelares. Dicho pequeño derrame de fármaco puede ser esencial para asegurar

la eficacia terapéutica máxima con mínimos efectos colaterales, ya que las moléculas de fármaco encapsuladas en los nanocomplejos pueden no derramarse prematuramente durante la circulación en el torrente sanguíneo. De modo aún más ventajoso, los nanocomplejos micelares pueden ser aplicados para administración sistémica de doxorubicina para tratamiento del cáncer.

El agente puede ser Sunitinib (SU) y el flavonoide puede ser epigalocatequina-3-galato (EGCG). De forma ventajosa, los nanocomplejos micelares pueden exhibir una liberación sostenida de SU. De manera ventajosa adicional, en ciertas modalidades, difícilmente se observaría cualquier descarga de ráfaga, sugiriendo que las moléculas SU fueron encapsuladas de modo estable en los nanocomplejos micelares.

En una modalidad, el flavonoide puede ser un flavonoide monomérico. En otra modalidad, el flavonoide puede ser un flavonoide dimérico. De forma ventajosa, el nanocomplejo micelar que comprende el flavonoide monomérico puede mostrar liberación de SU más rápida y mayor en comparación con los nanocomplejos micelares que comprenden el flavonoide dimérico. De modo ventajoso, puede haber una interacción más fuerte entre SU y el flavonoide dimérico.

De manera ventajosa, los nanocomplejos micelares pueden reducir al mínimo los efectos colaterales adversos de agentes tales como SU al encapsular establemente el agente en su interior, y suministrarlos al sitio de objetivo. Por lo tanto, el nanocomplejo micelar puede proporcionar efectos sinérgicos benéficos entre SU y EGCG.

De forma ventajosa adicional, el nanocomplejo micelar que comprende SU puede tener efectos tumorales mejorados in vivo cuando se compara con SU libre. De modo más ventajoso, el nanocomplejo micelar que comprende SU puede tener menos efectos adversos in vivo cuando se compara con SU libre. De manera ventajosa adicional, se puede requerir menor dosificación del nanocomplejo micelar que comprende SU en comparación con SU libre para lograr los mismos efectos. De forma más ventajosa, el efecto inhibidor del nanocomplejo micelar que comprende SU se puede mantener durante un período sustancial incluso cuando se interrumpe la terapia.

De manera adicionalmente ventajosa, el nanocomplejo micelar que comprende SU puede conducir a concentraciones en plasma reducidas de SU libre, que resultan en menores efectos adversos de SU. De modo ventajoso adicional, esta reducción en la concentración en plasma se puede deber a la interacción entre el flavonoide y el SU, así como el efecto de permeabilidad y retención mejorado (EPR, por sus siglas en inglés) ofrecido por las nanopartículas micelares.

De acuerdo con un segundo aspecto, se proporciona un método para formar un nanocomplejo micelar que comprende una micela y un agente encapsulado dentro de la micela, el método que comprende las etapas de: (a) agregar el agente en un solvente adecuado a un conjugado polímero-flavonoide, en donde el polímero es enlazado al anillo B del flavonoide; y (b) permitir el auto-montaje de una micela que comprende el conjugado polímero-flavonoide y encapsulado del agente dentro de la micela para formar de esta manera el nanocomplejo micelar.

De manera ventajosa, el nanocomplejo es auto-montado en presencia del conjugado polímero-flavonoide y el agente. De forma ventajosa adicional, la formación del nanocomplejo se logró mediante la utilización de la propiedad de enlace del flavonoide con los agentes.

De acuerdo con un tercer aspecto, se proporciona un conjugado polímero-flavonoide que comprende un polímero enlazado al anillo B de un flavonoide.

De modo ventajoso, un flavonoide es conjugado a un polímero. En una modalidad, el polímero puede ser polietilen glicol (PEG, por sus siglas en inglés). De manera ventajosa, las nanopartículas en base a polímero evitan tanto la depuración renal como el atrapamiento mediante el sistema reticuloendotelial (RES), permitiendo la acumulación subsecuente dentro de los tejidos tumorales mediante el efecto EPR. De forma ventajosa, las micelas PEG-estabilizadas exhiben una prolongada vida media en plasma en comparación con las micelas no modificadas debido a que las cadenas de superficie PEG evitan el reconocimiento y la depuración mediante el RES en el cuerpo. De manera ventajosa adicional, se puede emplear para modificar la superficie de micelas poliméricas y nanopartículas a fin de producir superficies anti-incrustación.

De acuerdo con un cuarto aspecto, se proporciona un método para formar el conjugado de polímero-flavonoide como se definió con anterioridad, que comprende la etapa de conjugar el flavonoide con el polímero a través de la adición nucleofílica bajo condiciones básicas, en donde el polímero tiene un grupo nucleofílico libre.

De modo ventajoso, los conjugados de polímero-flavonoide pueden ser sintetizados mediante adición nucleofílica en pH básico. De forma ventajosa, la conjugación se puede lograr a través de adición nucleofílica de un grupo nucleofílico tal como un grupo tiol del polímero tal como PEG en la posición del anillo B del flavonoide bajo condiciones de pH controladas.

En una modalidad, el polímero es polietilen glicol (PEG) y el grupo nucleofílico libre es tiol. De manera ventajosa, la orto-quinona deficiente en electrones del

flavonoide tal como EGCG puede reaccionar con un grupo nucleofílico como los grupos tiol. Los grupos tiol están presentes en un variado rango de biomoléculas que incluyen cisteína, glutatión, y proteínas. EGCG puede enlazarse de manera covalente a residuos de cisteína en proteínas de membrana eritrocitaria humana y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH). Además, se pueden formar aductos covalentes de EGCG cuando se oxida en presencia de cisteína y glutatión. De modo ventajoso adicional, los conjugados de cisteína resultantes de EGCG pueden exhibir mayores actividades pro-oxidantes que EGCG, en tanto que mantiene sus actividades inhibitorias de crecimiento y anti-inflamatorias. De forma ventajosa, EGCG N-acetilcisteína-conjugado puede mejorar los efectos inhibidores de crecimiento e inductores de apoptosis del EGCG contra células de cáncer pulmonar de murino y humano.

De acuerdo con un quinto aspecto, se proporciona el uso de un nanocomplejo micelar que comprende una micela y un agente encapsulado dentro de esa micela como un vehículo de suministro de fármaco, en donde la micela comprende un conjugado polímero-flavonoide, y en donde el polímero está enlazado al anillo B de dicho flavonoide.

De acuerdo con un sexto aspecto, se proporciona un método para tratar un tumor que comprende la etapa de administrar el nanocomplejo micelar como se definió con anterioridad a un agente cancerígeno.

De manera ventajosa, el nanocomplejo micelar puede tener un mayor efecto anticancerígeno en comparación con el agente libre. De forma ventajosa adicional, los nanocomplejos micelares pueden reducir al mínimo los efectos colaterales adversos de agentes tales como Suhtinib (SU) mediante el encapsulamiento estable del agente en su interior, y suministrarlos hacia el sitio de objetivo. Dichos sistemas de suministro pueden proporcionar también efectos sinérgicos benéficos.

De acuerdo con un séptimo aspecto, se proporciona el nanocomplejo micelar como se definió con anterioridad para tratar un tumor.

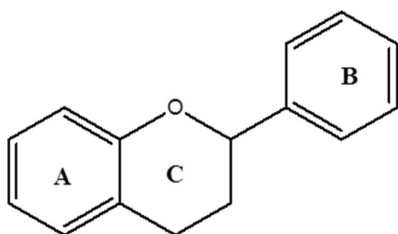
De acuerdo con un octavo aspecto, se proporciona el uso del nanocomplejo micelar como se definió con anterioridad en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor.

Definiciones

Las siguientes palabras y términos utilizados en la presente tendrán el significado indicado:

El “anillo B” de un flavonoide se refiere a un fenilo opcionalmente sustituido que es enlazado a una estructura bicíclica (la estructura bicíclica conformada por un anillo benceno (A) condensado con un anillo de seis miembros (C)). El fenilo opcionalmente sustituido es enlazado a la posición-2 del anillo C. para los
5 propósitos de esta descripción, los anillos están etiquetados como sigue:

[Chem. 1]



El término “galato de epigallocatequina” se refiere a un éster de epigallocatequina y ácido gálico, y se puede utilizar de manera intercambiable con
10 “epigallocatequina-3-galato” o EGCG.

Para los propósitos de esta aplicación, la frase “conjugados PEG-EGCG” se refiere tanto a conjugados PEG-mEGCG (EGCG monomérico) como a conjugados PEG-dEGCG (EGCG dimérico), a menos de que se especifique.

La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente” por ejemplo una
15 composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. cuando es necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse a partir de la definición de la invención.

A menos de que se especifique de otra manera, los términos "que comprende" y "comprende", y variaciones gramaticales de los mismos, están
20 destinados a representar lenguaje "abierto" o "inclusivo" de manera que incluyen los elementos citados aunque permiten también la inclusión de elementos adicionales, no citados.

Como se utiliza en la presente, el término "aproximadamente", en el contexto de concentraciones de componentes de las formulaciones, significa
25 comúnmente +/- 5% del valor establecido, de modo más común +/- 4% del valor establecido, de manera más común +/- 3% del valor establecido, de modo más común, +/- 2% del valor establecido, incluso de manera más común +/- 1% del valor establecido, y aún de forma más común +/- 0.5% del valor establecido.

30 A través de esta descripción, se pueden describir ciertas modalidades en un formato de rango. Se comprenderá que la descripción en formato de rango

es solamente por conveniencia y brevedad y no será interpretada como una limitación inflexible del alcance de los rangos descritos. En consecuencia, se considerará que la descripción de un rango ha descrito específicamente todos los sub-rangos posibles así como los valores numéricos dentro de ese rango. Por ejemplo, se considerará que la descripción de un rango como desde 1 hasta 6 ha descrito de manera específica los sub-rangos desde 1 hasta 3, desde 1 hasta 4, desde 1 hasta 5, desde 2 hasta 4, desde 2 hasta 6, desde 3 hasta 6 etcétera, así como los números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Esto aplica sin consideración de la amplitud del rango.

Ciertas modalidades pueden ser descritas de modo más amplio y genérico en la presente. Cada una de las especies más estrechas y agrupamientos subgenéricos que queden dentro de la descripción genérica también forman parte de la descripción. Esto incluye la descripción genérica de las modalidades con una salvedad o limitación negativa que elimina cualquier materia en cuestión del género, sin consideración de si el material eximido está o no citado de manera específica en la presente.

Descripción Detallada de las Modalidades

20

Se describirán ahora modalidades ilustrativas, no limitantes de un nanocomplejo micelar.

Un nanocomplejo micelar puede comprender una micela y un agente encapsulado dentro de dicha micela, la micela que comprende un conjugado de polímero-flavonoide, en donde el polímero está enlazado al anillo B de dicho flavonoide.

Por lo menos un flavonoide puede estar enlazado a dicho polímero. Por lo menos dos flavonoides pueden estar enlazados a dicho polímero.

El polímero puede estar enlazado a dicho flavonoide a través de un vinculador. El vinculador puede ser cualquier grupo químico que puede enlazar el polímero y el flavonoide. El vinculador puede ser seleccionado a partir del grupo que consta de un grupo tioéter, imina, amina, azo y 1,2,3-triazol. El vinculador puede ser un grupo alcano. El vinculador puede estar presente entre cualquier parte del polímero y cualquier parte del flavonoide. El vinculador puede estar presente entre un extremo del polímero y cualquier parte del flavonoide.

El flavonoide puede ser seleccionado a partir del grupo que consta de un flavonoide monomérico o un flavonoide dimérico. Un flavonoide monomérico puede comprender una molécula flavonoide. Un flavonoide dimérico puede comprender dos moléculas flavonoides enlazadas juntas por un vinculador. Una
 5 de las moléculas flavonoides del flavonoide dimérico puede ser enlazada al polímero. Ambas moléculas flavonoides del flavonoide dimérico pueden ser enlazadas de manera independiente al polímero. Cuando un flavonoide está presente en dicho conjugado, el flavonoide está enlazado al polímero a través del anillo B. cuando un flavonoide está enlazado al conjugado el flavonoide está
 10 enlazado a dicho polímero a través del anillo D.

Cuando más de un flavonoide está presente en dicho conjugado, por lo menos un flavonoide está enlazado al polímero a través del anillo B. El otro flavonoide está enlazado al polímero a través del anillo A. Cuando más de un flavonoide está presente en dicho conjugado, por lo menos un flavonoide está enlazado a
 15 dicho polímero a través del anillo B. El otro flavonoide está enlazado al polímero a través del anillo B. Cuando está presente más de un flavonoide en dicho conjugado, por lo menos uno de los flavonoides está enlazado al polímero mediante el anillo B. El otro de los flavonoides está enlazado al polímero a través del anillo D.

Cuando más de un flavonoide está presente en el conjugado, por lo menos un flavonoide está enlazado al polímero a través del anillo D. El otro flavonoide está enlazado al polímero a través del anillo A. Cuando más de un flavonoide está presente en dicho conjugado, por lo menos un flavonoide está enlazado a dicho
 20 polímero a través del anillo D. El otro flavonoide está enlazado al polímero a través del anillo B. Cuando está presente más de un flavonoide en dicho conjugado, por lo menos uno de los flavonoides está enlazado al polímero mediante el anillo D. El otro de los flavonoides está enlazado al polímero a través del anillo D.

El polímero puede ser un polímero hidrofílico. El polímero hidrofílico puede comprender monómeros seleccionados a partir del grupo que consta de
 30 acrilamidas, alquilos, oxazolinas, alquénilos, iminas, ácidos acrílicos, metacrilatos, dioles, oxiranos, alcoholes, aminas, anhídridos, ésteres, lactonas, carbonatos, ácidos carboxílicos, acrilatos, hidroxilos, fosfatos, tereftalato, amidas y éteres.

El polímero hidrofílico puede ser seleccionado a partir del grupo que consta de poliacrilamida, poli(N-isopropilacrilamida), poli(oxazolina), polietilenimina, ácido poli(acrílico), polimetacrilato, poli(etilen glicol), óxido de poli(etileno), alcohol poli(vinílico), poli(vinilpirrolidinona), poliéteres, poli(alilamina), polianhídridos, poli(β -amino éster), poli(butilen succinato), policaprolactona, policarbonato,
 40 polidioxanona, poli(glicerol), ácido poliglicólico, ácido poli(3-hidroxipropiónico),

poli(2-hidroxietil metacrilato), poli(*N*-(2-hidroxipropil)metacrilamida), ácido poliláctico, ácido poli(lactic-co-glicólico), poli(orto ésteres), poli(2-oxazolina), ácido poli(sebácico), poli(tereftalato-co-fosfato) y copolímeros de los mismos.

5 El polímero hidrofílico puede ser un polisacárido. El polímero puede ser un polisacárido seleccionado a partir del grupo que consta de ácido hialurónico, dextran, pululano, quitosano, celulosa, amilosa, almidón, gelatina, carragenano, ciclodextrina, sulfato de dextrano, Ficoll, gelano, goma guar, pectina, polisacarosa, pululano, escleroglucano, xantano, xiloglucano y alginato.

10 El polímero hidrofílico puede ser polietilen glicol (PEG). El PEG es un polímero sintético a que ha sido utilizado en aplicaciones biomédicas debido a su naturaleza hidrofílica, flexible y biocompatible. De manera específica, el PEG ha sido empleado para modificar la superficie de micelas poliméricas y nanopartículas a fin de producir superficies anti-incrustación.

15 De manera ventajosa, el polietilen glicol (PEG) fue seleccionado como el polímero a ser conjugado para el flavonoide. La conjugación se logró por medio de la adición nucleofílica de un grupo tiol del PEG en la posición C2' del anillo B del flavonoide bajo condiciones de pH controladas.

El flavonoide puede ser seleccionado a partir del grupo que consta de flavonas, isoflavonas, flavanos, proantocianidinas y antocianidinas.

20 Las flavonas pueden ser seleccionadas a partir del grupo que consta de apigenina, luteolina, tangeritina, crisina, 6-hidroxiavona, baicaleína, escutelaria, wogonina, diosmina, flavoxato y 7,8-dihidroxiavona.

25 Las isoflavonas pueden ser seleccionadas a partir del grupo que consta de genisteina, daidzeina, gliciteina, genistina, daidzina, glicitina, acetil-genistina, acetil-daidzina, acetil-glicitina, malonil genistina, malonil-daidzina y malonil-glicitina.

30 Los flavanos pueden ser seleccionados a partir del grupo que consta de (-)-epicatequina, (+)-epicatequina, (-)-catequina, (+)-catequina, galato de epicatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina, Fisetinidol, Galocatequina, galato de Galocatequina, Mesquitol y Robinetinidol, elagitanino, galotanino, oolongteanino, florotanino, tanino, teacitrina, teadibenzotropolona, teaflavina, teanaftoquinona, tearubiginas, teasinensina y mezclas de los mismos.

35 Las antocianidinas se pueden seleccionar a partir del grupo que consta de aurantinidina, capensinidina, cianidinga, delfinidina, europinidina, hirsutinidina, malvidina, pelargondina, peonidina, petunidina, pulchelidina y rosinidina.

- El agente puede ser un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico seleccionado a partir del grupo que consta de agentes alquilantes, antraciclinas, disruptores citoesqueléticos, epotilonas, inhibidores de histona deacetilasa, inhibidores de topoisomerasa I, inhibidores de topoisomerasa II, inhibidores de quinasa, anticuerpos monoclonales, conjugados de anticuerpo-fármaco, análogos de nucleótido, análogos de precursor, antibióticos de péptido, agentes en base a platino, retinoides, alcaloides de la vinca, citocinas, anti-metabolitos, y derivados de alcaloides de la vinca, y otros citotóxicos.
- El agente quimioterapéutico puede ser seleccionado a partir del grupo que consta de Actinomicina, Afatinib, ácido transretinoico total, Axitinib, Azacitidina, Azatioprina, Bevacizumab, Bleomicina, Bosutinib, Bortezomib, Carboplatino, Capecitabina, Cetuximab, Cisplatino, Clorambucilo, Crizotinib, Ciclofosfamida, Citarabina, Dasatinib, Daunorubicina, Docetaxel, Doxifluridina, Doxorubicina, Epirubicina, Epotilona A ($C_{26}H_{39}NO_6S$), Epotilona B ($C_{27}H_{41}NO_6S$), Epotilona C ($C_{26}H_{39}NO_5S$), Epotilona D ($C_{27}H_{41}NO_5S$), Epotilona E ($C_{26}H_{39}NO_7S$), Epotilona F ($C_{27}H_{41}NO_7S$), Erlotinib, Etopósido, Fluorouracilo, Fostamatinib, Gefitinib, Gemcitabina, Hidroxiurea, Idarubicina, Imatinib, Irinotecan, Lapatinib, Lenvatinib, Mecloretamina, Mercaptopurina, Metotrexato, Mitoxantrona, Nilotinib, Oxaliplatin, Paclitaxel, Panitumumab, Pazopanib, Pegaptanib, Pemetrexed, Ranibizumab, Regorafenib, Ruxolitinib, Sorafenib, Sunitinib, Trastuzumab, Tenipósido, Tioguanina, Tofacitinib, Topotecan, Valrubicina, Vemurafenib, Vinblastina, Vincristina, Vindesina, Vinorelbina.

El agente quimioterapéutico puede ser doxorubicina.

- El agente quimioterapéutico puede ser Sunitinib (SU). SU es un inhibidor de amplio espectro de la tirosin cinasa y un a terapia de primera línea para carcinoma de célula renal de célula clara (ccRCC). De manera específica, SU se dirige al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los cuales desempeñan un rol en la angiogénesis y proliferación tumoral, conduciendo a la reducción de la vascularización tumoral así como la muerte de célula cancerígena. Ha sido aprobado para uso en RCC avanzado, tumores de estroma gastrointestinal (GIST), y tumores pancreáticos neuroendócrinos (pNET). Se ha demostrado que también posee potencial para curar cáncer de mama metastásico, cáncer pulmonar de célula no pequeña avanzado, carcinoma hepatocelular avanzado, tumores neuroendócrinos, y leucemia. Sin embargo, puede ocasionar efectos colaterales adversos, tales como toxicidades hepática, cardíaca y gastrointestinal, hipertensión, problemas de la piel, y síndrome mano-pie.

- El nanocomplejo micelar puede tener un tamaño en el rango de 30 hasta 300 nm, 50 hasta 300 nm, 100 hasta 300 nm, 30 hasta 50 nm, 30 hasta 100 nm, 30

hasta 150 nm, 150 hasta 300 nm, 200 hasta 300 nm, 250 hasta 300 nm, 100 hasta 150 nm, 100 hasta 200 nm, 100 hasta 250 nm, 130 hasta 180 nm, o 130 hasta 250 nm.

- 5 El nanocomplejo micelar puede tener una eficiencia de carga del agente presente dentro de la micela que es mayor a 30%, mayor a 35%, mayor a 40%, mayor a 45%, mayor a 50%, mayor a 55%, mayor a 60%, mayor a 65%, mayor a 70%, mayor a 75%, o 80%.

- 10 El nanocomplejo micelar puede tener un contenido de carga del agente presente dentro de la micela en el rango de 1 hasta 10 % p/p, 5 hasta 25 % p/p, 20 hasta 45 % p/p, 30 hasta 50 % p/p, 35 hasta 50 % p/p, 40 hasta 50 % p/p, 45 hasta 50 % p/p, 30 hasta 35 % p/p, 30 hasta 40 % p/p o 30 hasta 45 % p/p.

Un método para formar un nanocomplejo micelar puede comprender una micela y un agente encapsulado dentro de la micela, el método que comprende las etapas de:

- 15 a. agregar el agente en un solvente adecuado a un conjugado polímero-flavonoide, en donde el polímero está enlazado al anillo B del flavonoide; y
- b. permitir el automontaje de una micela que comprende el conjugado polímero-flavonoide y el encapsulado del agente dentro de la micela para formar de esta manera el nanocomplejo micelar.
- 20 La etapa (a) puede comprender además las etapas de:
- a. remover el solvente para formar una película seca del agente y el conjugado polímero-flavonoide;
- b. hidratar la película seca con un solvente acuoso.

- 25 El método puede comprender además la etapa de aislar el nanocomplejo micelar formado mediante filtración o diálisis en un solvente adecuado.

Un conjugado polímero-flavonoide puede comprender un polímero enlazado al anillo B de un flavonoide.

- 30 El polímero del conjugado polímero-flavonoide puede ser seleccionado a partir del grupo que consta de a polisacárido, poliacrilamida, poli(N-isopropilacrilamida), poli(oxazolona), polietilenimina, ácido poli(acrílico), polimetacrilato, poli(etilen glicol), óxido de poli(etileno), alcohol poli(vinílico), poli(vinilpirrolidinona), poliéteres, poli(alilamina), polianhídridos, poli(β -amino éster), poli(butilen succinato), policaprolactona, policarbonato, polidioxanona, poli(glicerol), ácido poliglicólico, ácido poli(3-hidroxi propiónico), poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(N-(2-hidroxi propil)metacrilamida), ácido poliláctico, ácido
- 35

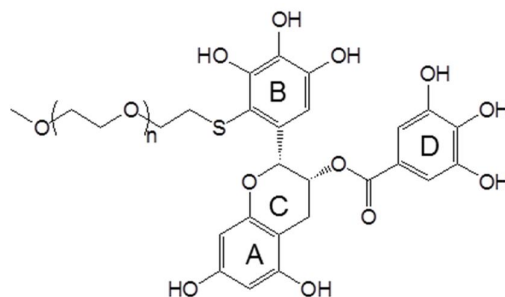
poli(lactic-co-glicólico), poli(orto ésteres), poli(2-oxazolína), ácido poli(sebacico), poli(tereftalato-co-fosfato) y copolímeros de los mismos.

- El flavonoide del conjugado polímero-flavonoide puede ser seleccionado a partir del grupo que consta de (-)-epicatequina, (+)-epicatequina, (-)-catequina, (+)-catequina, galato de epicatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina, Fisetinidol, Galocatequina, galato de Galocatequina, Mesquitol y Robinetinidol, elagitanino, galotanino, oolongteanino, florotanino, tanino, teacitrina, teadibenzotropolona, teaflavina, teanaftoquinona, tearubiginas, teasinensina y mezclas de los mismos.
- El polímero puede ser conjugado a un flavonoide en el conjugado polímero-flavonoide a través de un enlazador seleccionado a partir del grupo que consta de un grupo tioéter, imina, amina, azo y 1,2,3-triazol. El enlazador puede ser un grupo alcano. El enlazador puede estar presente en cualquier parte del polímero y cualquier parte del flavonoide. El enlazador puede estar presente entre un extremo del polímero y cualquier parte del flavonoide.

El polímero del conjugado polímero-flavonoide puede ser poli(etilen glicol), dicho flavonoide del conjugado polímero-flavonoide puede ser epigalocatequin-3-galato y el enlazador del conjugado polímero-flavonoide puede ser tioéter.

El polímero-flavonoide puede tener la siguiente fórmula

[Chem. 2]



en donde n está en el rango de 20 hasta 910.

- Un método para formar el conjugado polímero-flavonoide puede comprender la etapa de conjugar el flavonoide con el polímero a través de adición nucleofílica bajo condiciones básicas, en donde el polímero tiene un grupo nucleofílico libre.

El grupo nucleofílico puede ser seleccionado a partir del grupo que consta de un sulfhidrilo, amina, carbonil, ácido carboxílico, azida, halógeno, alquino y alqueno. El grupo nucleofílico puede ser seleccionado a partir del grupo que consta de un tiol, una amina, un diazoalcano y un azida.

- El grupo nucleofílico puede ser un tiol. EGCG puede experimentar oxidación en presencia de oxígeno para formar una *orto*-quinona a través de una vía que involucra radicales de semiquinona y especies de oxígeno reactivas. La *orto*-quinona deficiente en electrones del EGCG puede reaccionar con un grupo tiol nucleofílico presente en diversas biomoléculas que incluyen cisteína, glutatión, y proteínas. EGCG puede enlazarse de manera covalente a residuos de cisteína en proteínas de membrana eritrocitaria humana y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH). Además, se pueden formar aductos covalentes de EGCG cuando se oxida en presencia de cisteína y glutatión. Los conjugados de cisteína resultantes de EGCG pueden exhibir mayores actividades pro-oxidantes que EGCG, en tanto que mantiene sus actividades inhibitoras de crecimiento y anti-inflamatorias. Además, EGCG *N*-acetilcisteína-conjugado puede mejorar los efectos inhibitorios de crecimiento e inductores de apoptosis de EGCG contra células de cáncer pulmonar de murino y humano.
- Los conjugados de cisteína resultantes de EGCG pueden exhibir mayores actividades pro-oxidantes que EGCG, en tanto que mantiene sus actividades inhibitoras de crecimiento y anti-inflamatorias. De forma ventajosa, EGCG *N*-acetilcisteína-conjugado puede mejorar los efectos inhibitorios de crecimiento e inductores de apoptosis del EGCG contra células de cáncer pulmonar de murino y humano
- La etapa de conjugación se puede realizar en un tiempo de reacción de entre aproximadamente 1 hora hasta 24 horas, aproximadamente 1 hora hasta 2 horas, aproximadamente 1 hora hasta 4 horas, aproximadamente 1 hora hasta 8 horas, aproximadamente 1 hora hasta 12 horas, aproximadamente 2 horas hasta 4 horas, aproximadamente 2 horas hasta 8 horas, aproximadamente 2 horas hasta 12 horas, aproximadamente 2 horas hasta 24 horas, aproximadamente 4 horas hasta 8 horas, aproximadamente 4 horas hasta 12 horas, aproximadamente 4 horas hasta 24 horas, aproximadamente 8 horas hasta 12 horas, aproximadamente 8 horas hasta 24 horas o aproximadamente 12 horas hasta 24 horas.
- El método puede comprender además la etapa de conducir la etapa de conjugación en un solvente que evita de manera sustancial la agregación de dicho flavonoide.
- El método puede comprender además la etapa de agregar un agente depurador para evitar la oxidación H_2O_2 -mediada del grupo nucleofílico para incrementar de este modo la eficiencia de la etapa de conjugación.
- Las condiciones básicas pueden estar en el rango pH mayor a 7 hasta 10, mayor a 8 hasta 10, mayor a 9 hasta 10, mayor a 7 hasta 11, mayor a 8 hasta 11, mayor

a 9 hasta 11, mayor a 10 hasta 11, mayor a 7, mayor a 8, mayor a 9, mayor a 10 o mayor a 11.

- 5 El uso de un nanocomplejo micelar puede comprender una micela y un agente encapsulado dentro de la micela como un vehículo de suministro de fármaco, en donde la micela comprende un conjugado polímero-flavonoide, y en donde el polímero es enlazado al anillo B del flavonoide.

El nanocomplejo micelar puede suministrar el agente encapsulado a un sitio de tumor de objetivo *in vivo*.

- 10 Un método para tratar el cáncer puede comprender la etapa de administrar el nanocomplejo micelar a un paciente con cáncer. Un método para tratar un tumor puede comprender la etapa de administrar el nanocomplejo micelar a un paciente con cáncer.

- 15 El nanocomplejo micelar puede ser administrado por vía parenteral, mediante inhalación por aspersión, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal, a través de un depósito implantado, mediante inyección, por vía subdérmica, intraperitoneal, transmucosa, oral o en una preparación oftálmica.

La administración parenteral puede comprender subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesión y mediante inyección intracraneal o técnicas de infusión.

- 20 El agente presente en el nanocomplejo micelar puede ser administrado en una dosis de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 80 mg/kg por día, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2 mg/kg por día, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 mg/kg por día, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 mg/kg por día, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 mg/kg por día, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 50 mg/kg por día, aproximadamente 2 hasta aproximadamente 5 mg/kg por día, aproximadamente 2 hasta aproximadamente 10 mg/kg por día, aproximadamente 2 hasta aproximadamente 20 mg/kg por día, aproximadamente 2 hasta aproximadamente 50 mg/kg por día, aproximadamente 2 hasta aproximadamente 80 mg/kg por día, aproximadamente 5 hasta aproximadamente 10 mg/kg por día, aproximadamente 5 hasta aproximadamente 20 mg/kg por día, aproximadamente 5 hasta aproximadamente 50 mg/kg por día, aproximadamente 5 hasta aproximadamente 80 mg/kg por día, aproximadamente 10 hasta aproximadamente 20 mg/kg por día, aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 mg/kg por día, aproximadamente 10 hasta aproximadamente 80 mg/kg por día, aproximadamente 20 hasta aproximadamente 50 mg/kg por día,
- 25
- 30
- 35

aproximadamente 20 hasta aproximadamente 80 mg/kg por día o aproximadamente 50 hasta aproximadamente 80 mg/kg por día.

El paciente con cáncer puede estar padeciendo un cáncer seleccionado a partir del grupo que consta de carcinoma adrenocortical, linfoma relacionado con

5 SIDA, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma grado I (anaplásico), astrocitoma grado II, astrocitoma grado III, astrocitoma grado IV, tumor teratoideo/rabdoide del sistema nervioso central, carcinoma de célula basal, cáncer de vejiga, cáncer bronquial, carcinoma bronquioalveolar, linfoma de Burkitt, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer colorectal, craneofaringioma,

10 linfoma de célula T cutáneo, cáncer endometrial, cáncer uterino endometrial, ependimoblastoma, ependimoma, cáncer esofágico, estesioblastoma, sarcoma de Ewing, tumor de célula germinal extracraneal, tumor de célula germinal extragonadal, cáncer de ducto biliar extrahepático, histiocitoma fibroso, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal,

15 tumor del estroma gastrointestinal, tumor trofoblástico gestacional, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, cáncer hepatocelular, colangiocarcinoma de Hilar, linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, tumor de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, cáncer de labio, linfoma,

20 macroglobulinemia, histiocitoma fibroso maligno, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma, carcinoma de célula de Merkel, mesotelioma, neoplasia endócrina, mieloma múltiple, micosis fungoide, mielodisplasia, neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas, trastornos mieloproliferativos, cáncer de cavidad nasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no-

25 Hodgkin, cáncer oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, carcinoma de célula clara ovárico, cáncer epitelial ovárico, tumor de célula germinal de ovario, papilomatosis, cáncer de seno paranasal, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer faríngeo, tumor parenquimal pineal, pineoblastoma, tumor de pituitaria, neoplasma de célula plasmática, blastoma pleuropulmonar, linfoma de sistema

30 nervioso central primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de célula renal, cáncer del tracto respiratorio con cambios en cromosoma 15, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándula salival, síndrome de Sezary, cáncer de intestino delgado, carcinoma de tejido blando, carcinoma de células escamosas, cáncer escamoso de cuello, tumor neuroectodérmico

35 primitivo supratentorial, cáncer testicular, cáncer de garganta, carcinoma tímico, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de pelvis renal, cáncer uretral, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar, macroglobulinemia de Waldenstrom, y tumor de Wilms.

El paciente con tumor puede estar padeciendo un cáncer seleccionado a partir

40 del grupo que consta de carcinoma adrenocortical, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma grado I (anaplásico), astrocitoma grado II, astrocitoma

grado III, astrocitoma grado IV, tumor teratoideo/rabdoide atípico del sistema nervioso central, carcinoma de célula basal, cáncer de vejiga, cáncer bronquial, carcinoma bronquioalveolar, linfoma de Burkitt, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer colorectal, craneofaringioma, cáncer endometrial, cáncer uterino
 5 endometrial, ependimoblastoma, ependimoma, cáncer esofágico, estesioneuroblastoma, sarcoma de Ewing, tumor de célula germinal extracraneal, tumor de célula germinal extragonadal, cáncer de ducto biliar extrahepático, histiocitoma fibroso, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal, tumor
 10 trofoblástico gestacional, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, cáncer hepatocelular, colangiocarcinoma de Hilar, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, tumor de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, cáncer de labio, macroglobulinemia, histiocitoma fibroso maligno, meduloblastoma,
 15 meduloepitelioma, melanoma, carcinoma de célula de Merkel, mesotelioma, neoplasia endócrina, mieloma múltiple, micosis fungoide, mielodisplasia, neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas, trastornos mieloproliferativos, cáncer de cavidad nasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, carcinoma de célula clara ovárico, cáncer
 20 epitelial ovárico, tumor de célula germinal de ovario, papilomatosis, cáncer de seno paranasal, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer faríngeo, tumor parenquimal pineal, pineoblastoma, tumor de pituitaria, neoplasma de célula plasmática, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de célula renal, cáncer del tracto respiratorio con cambios en cromosoma 15,
 25 retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de glándula salival, síndrome de Sezary, cáncer de intestino delgado, carcinoma de tejido blando, carcinoma de células escamosas, cáncer escamoso de cuello, tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial, cáncer testicular, cáncer de garganta, carcinoma tímico, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de pelvis renal, cáncer uretral, sarcoma
 30 uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar, macroglobulinemia de Waldenstrom, y tumor de Wilms.

El nanocomplejo micelar puede ser para tratar el cáncer. El nanocomplejo micelar puede ser para tratar un tumor.

El uso del nanocomplejo micelar puede estar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer. Uso del nanocomplejo micelar
 35 puede estar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor.

Breve Descripción de los Dibujos

Los dibujos acompañantes ilustran una modalidad descrita y sirven para
 40 explicar los principios de la modalidad descrita. Sin embargo, se

comprenderá que los dibujos están diseñados solamente para fines de ilustración, y no como una definición de los límites de la invención.

Figura 1

La Figura 1 es un esquema sintético del conjugado PEG-mEGCG (108). El PEG (PEG-SH) (102) tiol-funcionalizado fue conjugado para EGCG (104) en una
5 mezcla 1:3 (v/v) de DMSO y agua en un pH básico pH (106).

Figura 2

La Figura 2 es un espectro UV-Vis del conjugado PEG-EGCG (202) y PEG (204) disuelto en agua desionizada a una concentración de 0.5 mg mL⁻¹.

10 **Figura 3**

La Figura 3 se refiere a cromatogramas HPLC de EGCG (302) y conjugado PEG-mEGCG (304). Las flechas indican los picos de muestras monitoreadas a 280 nm.

Figura 4

15 La Figura 4 es el grado de conjugación de conjugados PEG-mEGCG como una función del tiempo de reacción.

Figura 5

La Figura 5 es un espectro ¹H NMR del conjugado PEG-mEGCG disuelto en D₂O.

20 **Figura 6**

La Figura 6 es un esquema que muestra la formación de nanocomplejos micelares de doxorubicina/PEG-mEGCG.

Figura 7

La Figura 7 se refiere a gráficas que muestran el tamaño (A) y (B) potencial zeta de los nanocomplejos micelares de doxorubicina/PEG-mEGCG preparados en diferentes relaciones de peso de PEG-mEGCG:doxorubicina. El tamaño y potencial zeta de los nanocomplejos como se prepararon (barras de color negro, 702) se compararon con aquellos de los nanocomplejos reconstituidos (barras cruzadas, 704).
25

30 **Figura 8**

La Figura 8 se refiere a gráficas que muestran (A) eficiencia de carga de fármaco y (B) contenido de carga de los nanocomplejos micelares de doxorubicina/PEG-mEGCG preparados con diferentes relaciones en peso de PEG-mEGCG:doxorubicina.

5 **Figura 9**

La Figura 9 muestra el perfil de liberación de fármaco *in vitro* de los nanocomplejos micelares de doxorubicina/PEG-mEGCG en PBS (pH 7.3) a 37°C. Relación en peso de PEG-mEGCG:doxorubicina = 1:1.

Figura 10

10 La Figura 10 muestra una ilustración esquemática de la formación de nanocomplejos micelares SU/PEG-EGCG.

Figura 11

15 La Figura 11 se refiere a gráficas que muestran (A) tamaño, (B) PDI y (C) potencial zeta de los nanocomplejos micelares SU/PEG-EGCG en diferentes relaciones en peso de PEG-EGCG:SU.

Figura 12

La Figura 12 se refiere a gráficas que muestran (A) eficiencia de carga de fármaco y (B) contenido de carga de fármaco de nanocomplejos micelares SU/PEG-EGCG preparados a diferentes relaciones en peso de PEG-EGCG:SU.

20 **Figura 13**

La Figura 13 se refiere a gráficas que muestran el perfil de liberación de fármaco *in vitro* de (A) nanocomplejos micelares SU/PEG-mEGCG y (B) nanocomplejos micelares SU/PEG-dEGCG en diferentes relaciones en peso de PEG-EGCG:SU en PBS (pH 7.3) a 37°C.

25 **Figura 14**

La Figura 14 es una gráfica que muestra las mediciones semanales de peso corporal en ratones que reciben tratamiento de SU oral diario (60 mg/kg) en comparación con aquellos que reciben nanocomplejos micelares SU/PEG-EGCG (con las relaciones en peso de PEG-EGCG:SU especificadas) y el grupo
30 de control.

Figura 15

La Figura 15 se refiere a imágenes que muestran (A) tamaño de tumor (como fue cuantificado mediante señal luminiscente) y (B) imagen luminiscente de ratones con tratamiento de nanocomplejo micelar de SU/PEG-EGCG (con la relación en peso de PEG-EGCG:SU especificada), tratamiento SU oral, o sin tratamiento.

Figura 16

Figura 16 es una gráfica que muestra las mediciones de peso corporal en ratones que reciben tratamiento de SU oral diario (40 y 15 mg/kg) en comparación con aquellos que reciben nanocomplejo micelar de SU/PEG-mEGCG 8:1 y el grupo de control.

Figura 17

La Figura 17 es una gráfica que muestra el tamaño de tumor de ratones con tratamiento de nanocomplejo micelar de SU/PEG-mEGCG 8:1 oral, tratamiento SU oral, o sin tratamiento.

Ejemplos

Se describirán adicionalmente ejemplos no limitantes de la invención y un ejemplo comparativo con mayor detalle mediante referencia a Ejemplos específicos, los cuales no serán interpretados como forma alguna que limite el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Materiales y Cultivo Celular

Materiales

Se obtuvo metoxi-polietilen glicol con un terminal de extremo tiol (PEG-SH, M_w = 5000 Da) a partir de JenKem Technology (China). Se obtuvo metoxi-polietilen glicol con un terminal de extremo aldehído (PEG-CHO, M_w = 5000 Da) a partir de NOF Co. Se obtuvo (-)-Epigallocatequina-3-galato (EGCG, > 95% de pureza) a partir de Kurita Water Industries (Tokio, Japón). Se adquirió solución de piruvato sódico (100 mM) a partir de Invitrogen (Singapur). Se suministró PBS salina sin Ca^{2+} y Mg^{2+} (150 mM, pH 7.3) a través de la instalación preparación de medio en Biopolis, Singapur. Se adquirieron DMSO y trietilamina (TEA) a partir de Sigma-Aldrich (Singapur). Se adquirió clorhidrato de doxorubicina (DOX·HCl) a partir de Boryung Pharm. Inc. (Corea). Se adquirió SU (forma de base libre) a

partir de BioVision (EUA). Todos los demás agentes químicos fueron de grado analítico.

Cultivo celular

Se obtuvieron células de carcinoma de célula renal humana A498 a partir de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), y fueron cultivadas en Medio Eagle Modificado de Dulbecco complementado con suero bovino fetal al 10%, 1% penicilina-estreptomicina, 2 mM de glutamina y 0.1 mM de aminoácidos no-esenciales. Se generó el clon celular A498 estable que expresa el gen de luciferasa (A498-*luc*) como se describió. En resumen, las células A498 fueron sembradas en una placa de seis pozos a una densidad de 5×10^5 células/pozo y transfectadas con plásmido pRC-CMV2-luc utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Después de 1 día, las células transfectadas fueron transferidas a una placa de cultivo celular de 100-mm, y se agregó 1 mg ml^{-1} geneticina al medio para seleccionar las células resistentes. Después de 1 semana de selección, las células resistentes fueron sembradas en una placa de 96 pozos a una densidad de 1 célula/pozo para formar colonias. Se seleccionaron y expandieron un total de 10 colonias, y la actividad de luciferasa se midió con un Promega Kit (Madison, WI, USA) en un luminómetro de tubo individual (Berthold Lumat LB 9507, Bad Wildbad, Alemania). Se seleccionó un clon con la actividad de luciferasa más elevada y se mantuvo con 500 mg ml^{-1} geneticina.

Ejemplo 2: Los conjugados de PEG-EGCG

En este estudio, se utilizaron dos tipos de conjugados PEG-EGCG para formar nanocomplejos micelares, PEG-mEGCG y PEG-dEGCG, los cuales tienen una y dos porciones EGCG en un extremo del PEG, respectivamente.

Síntesis de conjugado de PEG-mEGCG

Los conjugados PEG-mEGCG fueron sintetizados mediante conjugación de EGCG para PEG que contiene una terminal de extremo tiol. De manera común, se disolvió EGCG (18.3 mg, 40 μmol) en 20 mL de una mezcla 1:1 (v/v) de PBS y DMSO. PEG-SH ($M_w = 5000 \text{ Da}$, JenKem Technology, China) (100 mg, 20 μmol) fue disuelto por separado en 20 mL de PBS. La solución de PEG-SH fue agregada mediante goteo a una solución sometida a agitación de EGCG. Como un experimento de control, se agregó solución de PEG no modificada a una solución sometida a agitación de EGCG en la misma concentración. La mezcla resultante tiene un pH de 8.4. La mezcla fue sometida a agitación durante 7 horas

a 25°C. A esta solución, se agregaron 1.6 mL de ácido acético al 10% para ajustar el pH a 4 para detener la reacción. La solución resultante fue transferida a tubos de diálisis con un corte de peso molecular (MWCO) de 1,000 Da. Los tubos fueron cializados contra agua desionizada. La solución purificada fue

5 liofilizada para obtener el conjugado de PEG-mEGCG. La estructura del conjugado de PEG-mEGCG se confirmó mediante espectroscopia ^1H NMR. El conjugado PEG-mEGCG seco fue disuelto en D_2O a una concentración de 20 mg mL^{-1} y después analizado con un espectrómetro Bruker AV-400 NMR que opera a 400 MHz. Rendimiento: 89%. ^1H NMR (D_2O): δ 2.9 (t, H- α a partir de PEG), 3.4 (s, H- γ a partir de PEG), 3.5-3.8 (m, protones de PEG), 5.5 (s, H-2 del anillo C), 5.85 (s, H-3 del anillo C), 6.15 (d, H-6 y H-8 del anillo A), 6.9 (s, H-6'

10 del anillo B), 7.05 (s, H-2" y H-6" del anillo D).

La Figura 1 ilustra el esquema sintético de los conjugados de PEG-mEGCG (108). El PEG (PEG-SH) (102) tiol-funcionalizado fue incubado con un exceso molar doble de EGCG (PEG-SH: EGCG = 1:2) (104) en una mezcla de 1:3 (v/v) DMSO y agua en pH básico (106). Se ha informado que el pH influye de manera crítica en el proceso de auto oxidación del EGCG. En el rango de pH básico de 7-9.5, la porción galilo en el anillo B es más susceptible a auto-oxidación que la porción galato en el anillo D. Como resultado, solamente la porción galilo en el

15 anillo B forma una *orto*-quinona. Bajo condición alcalina fuerte (pH > 10), la porción galato en el anillo D también puede auto-oxidarse para formar una *orto*-quinona. En el presente estudio, la reacción se condujo en pH 8.4 a fin de permitir la formación de una *orto*-quinona sólo en el anillo B de EGCG. La adición nucleofílica subsecuente de PEG-SH a la *orto*-quinona produjo conjugados de

20 PEG-mEGCG enlazados a través de un enlace tioéter covalente.

Cabe destacar que la reacción de conjugación procedió en presencia de dimetil sulfóxido (DMSO). Ya que EGCG experimentaría la agregación al contacto con PEG en solución acuosa, evitará la reacción durante la conjugación de EGCG a PEG-SH. Se encontró que DMSO previno de manera efectiva la agregación. Con

30 base en este hallazgo, la reacción de conjugación se efectuó en una mezcla de DMSO y agua. Además, se utilizó piruvato sódico como un depurador para el H_2O_2 generado durante la auto-oxidación de EGCG. Ya que el piruvato sódico protege a los grupos tiol libres contra la oxidación H_2O_2 -mediada, puede incrementar el número de moléculas PEG-SH disponibles para una reacción de

35 conjugación con EGCG. El conjugado PEG-mEGCG obtenido fue purificado mediante diálisis bajo una atmósfera de nitrógeno y después liofilizado para obtener un polvo de color blanco.

Caracterización UV-Vis del conjugado de PEG-mEGCG

Los conjugados de PEG-mEGCG fueron caracterizados utilizando espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) (Figura 2).

Los espectros UV-Vis de los conjugados de PEG-mEGCG se midieron en un espectrofotómetro Hitachi U-2810 (Japón). Para la espectroscopia UV-Vis, el conjugado PEG-mEGCG seco y PEG fueron disueltos en agua desionizada a una concentración de 0.5 mg mL⁻¹. A diferencia del PEG (204) no modificado, se mostró que los conjugados de PEG-mEGCG (202) tienen un intenso pico de absorción UV a 280 nm, indicativo de una conjugación exitosa de EGCG. Además, no se observó la banda de absorción UV a 425 nm que corresponde a dímeros de EGCG y otros productos oxidativos.

Caracterización HPLC del conjugado de PEG-mEGCG

El conjugado de PEG-mEGCG también fue evaluado a través de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (HPLC). La HPLC de fase inversa se realizó utilizando un módulo de separaciones Waters 2695 equipado con una columna orgánica Spirit™ C18 (5 µm, 4.6 × 250 mm i.d., AAPPTec). EGCG, la mezcla de PEG/EGCG y los conjugados de PEG-mEGCG se disolvieron en agua desionizada a una concentración de 1 mg mL⁻¹. Las muestras fueron eluidas con una mezcla de solvente de ácido acético al 1% en acetonitrilo y ácido acético al 1% en agua a una velocidad de flujo de 1 mL/minutos a 25°C. Para la fase móvil, la relación de volumen acetonitrilo:agua se incrementó gradualmente desde 3:7 a 0 minutos hasta 4:6 a 10 minutos. Las muestras eluidas fueron monitoreadas a 280 nm. El grado de conjugación de EGCG se determinó mediante comparación del área pico integrada con aquella obtenida a partir de una serie de soluciones estándar EGCG de varias concentraciones. Como se muestra en la Figura 3, EGCG (302) se eluyó en un tiempo de retención de 4.8 min, en tanto que el conjugado PEG-mEGCG (304) se eluyó en 8 min. Este drástico cambio en el tiempo de retención podría explicar por la unión de una cadena PEG hidrofílica a EGCG. En adición, no se observó pico EGCG en el cromatograma HPLC de los conjugados de PEG-mEGCG, sugiriendo que las moléculas EGCG sin reaccionar fueron removidas completamente mediante diálisis. El grado de conjugación de EGCG se incrementó desde ~ 63 hasta 98% ya que el tiempo de reacción incrementó de 6 hasta 7 horas (Figura 4). Sin embargo, cuando el tiempo de reacción fue de 8 h, el grado de conjugación se redujo ligeramente, debido presumiblemente a que empezaron a formarse dímeros de EGCG y otros productos oxidativos. Por tanto, el tiempo de reacción óptimo fue de 7 horas.

Caracterización ¹H NMR del conjugado de PEG-mEGCG

La estructura de los conjugados de PEG-mEGCG se determinó por medio de espectroscopia de resonancia magnética nuclear ¹H (NMR, por sus siglas en

inglés). Como se muestra en la Figura 5, los conjugados de PEG-mEGCG desplegaron señales de protón para el anillo A (H-6 y H-8 a $\delta = 6.15$), anillo C (H-2 a $\delta = 5.5$ y H-3 a $\delta = 5.85$), y el anillo D (H-2'' y H-6'' a $\delta = 7.1$). Las señales que surgen a partir de los anillos A, C y D fueron similares a aquellas del EGCG no modificado, sugiriendo que estas porciones se mantuvieron sin cambio durante la reacción de conjugación. En contraste, las señales de protón para el anillo B se desplazaron desde 6.5 hasta 6.9 ppm después de la reacción de conjugación. Este cambio significativo en las señales de protón fueron atribuidas probablemente a la unión de PEG-SH a la posición C2' del anillo B. Además, se mostró que el pico NMR para el anillo B tiene la mitad del área bajo el pico para el anillo D, indicando que un protón en el anillo B desapareció después de la reacción de conjugación. El fenómeno observado estuvo en concordancia con el informe previo, por lo que la formación de 2'-cisteinil EGCG ocasionó la desaparición del átomo H-2' del anillo B. los resultados anteriores revelaron que solamente una molécula PEG podría ser conjugada de manera específica para la posición C2' del anillo B de EGCG.

Síntesis del conjugado de PEG-dEGCG

Los conjugados de PEG-dEGCG fueron sintetizados mediante conjugación de EGCG a PEG con un grupo terminal aldehído (PEG-CHO). El PEG-CHO ($M_w = 5000$ Da, NOF Co., Japón) (1.75 g) y EGCG (3.25 g, 7.09 mmol) se disolvieron por separado en una mezcla de ácido acético, agua y DMSO. La reacción se inició con la adición mediante goteo de la solución PEG-CHO, y se condujo a 20°C durante 72 h. La solución resultante fue dializada (MWCO = 3500 Da) contra agua desionizada. La solución purificada fue liofilizada para obtener los conjugados de PEG-dEGCG.

Ejemplo 3: El conjugado de Doxorubicina/PEG-mEGCG

Para aplicaciones de terapias del cáncer, los conjugados de PEG-mEGCG fueron diseñados para formar nanocomplejos micelares capaces de transportar un gran número de fármacos anticancerígenos en el interior. En este estudio, los nanocomplejos micelares de PEG-mEGCG fueron utilizados como un vehículo de suministro para doxorubicina. La doxorubicina es uno de los agentes quimioterapéuticos más ampliamente utilizados y exhibe fuerte actividad citotóxica contra varios tipos de cánceres, tales como la leucemia, cánceres de mama, de ovarios y pulmonar. Sin embargo, puede ocasionar cardiotoxicidad grave e incrementa el riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva, arritmias cardíacas, hipotensión y otros efectos colaterales. Está contemplado que los nanocomplejos micelares de PEG-mEGCG puedan reducir al mínimo esos

efectos adversos al encapsular de manera estable las moléculas de fármaco en su interior y liberarlos de una manera sostenida.

Formación de nanocomplejos micelares de Doxorubicina/PEG-mEGCG

Los nanocomplejos micelares de Doxorubicina/PEG-mEGCG se prepararon utilizando un método de diálisis. En resumen, 5 mg de DOX·HCl se disolvieron en 4.5 mL de dimetilformamida. A esta solución, se agregó TEA en una relación molar TEA:DOX·HCl de 5:1. Esta mezcla fue sometida a agitación vorticial durante 30 minutos para formar la doxorubicina desprotonada (DOX). La solución DOX resultante fue mezclada con los conjugados de PEG-mEGCG disueltos en 0.5 mL de dimetilformamida en relaciones en peso PEG-mEGCG/ DOX variables. Esta mezcla fue sometida a agitación vorticial durante 90 minutos y después transferida a tubos de diálisis con un MWCO de 2,000 Da. Los tubos fueron dializados contra agua desionizada durante 24 horas para obtener los nanocomplejos micelares de doxorubicina/PEG-mEGCG.

Caracterización de nanocomplejos micelares de Doxorubicina/PEG-mEGCG

Se evaluaron los diámetros hidrodinámicos, índices de polidispersidad y los potenciales zeta de los nanocomplejos micelares de doxorubicina/PEG-mEGCG por medio de dispersión lumínica dinámica (Zetasizer Nano ZS, Malvern, RU). La medición se realizó por triplicado en agua a 25°C. Para medir la cantidad de carga de doxorubicina, 20 µL de los nanocomplejos dispersados en agua se mezclaron con 980 µL de dimetilformamida para extraer la doxorubicina. Se midió la absorbancia de la doxorubicina a 480 nm utilizando un espectrofotómetro Hitachi U-2810 (Japón). La eficiencia de carga de fármaco y el contenido de carga se determinaron mediante comparación de los valores de absorbancia con aquellos obtenidos a partir de una serie de soluciones estándar de doxorubicina con concentraciones variables.

La Figura 6 ilustra la formación de nanocomplejos micelares de doxorubicina/PEG-mEGCG. Los conjugados PEG-mEGCG (602) y doxorubicina (604) fueron co-disueltos en dimetilformamida (606). Esta mezcla fue dializada contra agua destilada (608). A medida que se removió el solvente orgánico desde los tubos de diálisis, las porciones de EGCG hidrofóbicas en los conjugados empezaron a auto-montarse para formar un núcleo micelar circundado por una cubierta de las cadenas PEG hidrofílicas PEG (610). De manera simultánea, las moléculas de doxorubicina también fueron particionadas dentro del núcleo micelar hidrofóbico. Se informó también que las moléculas de doxorubicina se apilaron juntas con facilidad en una solución acuosa debido a la interacción π - π entre los anillos planos de antraciclina. Ya que EGCG tiene una estructura de

polifenol capaz de interactuar con doxorubicina a través del apilamiento π - π , se anticipó que el EGCG enriquecido en el núcleo de los nanocomplejos micelares podría proporcionar un ambiente favorable para el atrapamiento de la doxorubicina dentro de ellos. Además, las cadenas PEG de superficie-expuesta
5 podrían formar una cubierta protectora alrededor de los nanocomplejos micelares para evitar la depuración a través del sistema reticuloendotelial, permitiendo de este modo la circulación prolongada en el torrente sanguíneo.

El tamaño y la carga de superficie de los nanocomplejos micelares de doxorubicina/PEG-mEGCG se caracterizaron a través de análisis de dispersión
10 lumínica dinámica (DLS, por sus siglas en inglés). La Figura 7 se refiere a gráficas que muestran (A) tamaño y (B) potencial zeta de los nanocomplejos micelares de doxorubicina/PEG-mEGCG.

La Figura 7A muestra el diámetro hidrodinámico de los nanocomplejos micelares preparados en diferentes relaciones en peso de PEG-mEGCG a doxorubicina.
15 En particular, los nanocomplejos se produjeron con un rango de tamaño de 130-180 nm. Dicho tamaño pequeño es favorable para lograr la circulación prolongada en el torrente sanguíneo y el tratamiento dirigido al tumor a través del efecto de permeabilidad y retención mejorado (EPR, por sus siglas en inglés). Los nanocomplejos micelares formados en una relación en peso PEG-mEGCG:doxorubicina de 0.5:1 tiene un mayor diámetro que aquellos formados
20 a 1:1. El atrapamiento de cantidades mayores de doxorubicina probablemente fue responsable de la formación de nanocomplejos micelares más grandes. Los nanocomplejos fueron altamente monodispersos, como es evidente a partir del pequeño valor del índice de polidispersidad (PDI, por sus siglas en inglés) que
25 queda en el rango de 0.1-0.2.

Como se muestra en la Figura 7B, los nanocomplejos micelares tienen un potencial zeta positivo en el rango de +15-25 mV. Esta carga de superficie catiónica fue atribuido al encapsulamiento de moléculas de doxorubicina con carga positiva dentro de los nanocomplejos. Se evaluó también si los
30 nanocomplejos micelares mantuvieron su integridad estructural durante un proceso de congelación-deshidratación. La congelación-deshidratación es una de las técnicas más populares empleadas para almacenamiento a largo plazo de nanopartículas coloidales. Los nanocomplejos fueron liofilizados y después dispersados de nuevo en agua desionizada a la misma concentración. Se
35 encontró que los nanocomplejos reconstituidos retienen el tamaño de partícula y la carga de superficie originales incluso sin lioprotectores. Dicha estabilidad coloidal elevada sería ventajosa en la transferencia clínica y comercialización de los nanocomplejos micelares.

La Figura 8 muestra la eficiencia de carga de fármaco y el contenido de carga de los nanocomplejos micelares de doxorubicina/PEG-mEGCG. La eficiencia de carga de fármaco fue superior al 75%, indicando que la doxorubicina fue incorporada de manera eficiente en los nanocomplejos PEG-mEGCG. Ya que la
 5 relación en peso de PEG-mEGCG:doxorubicina se redujo, tanto la eficiencia de carga de fármaco como el contenido de carga se incrementaron. El contenido de carga observado (35-50 % p/p) fue significativamente mayor que aquellos logrados con otros sistemas micelares poliméricos. El apilamiento π - π y/o las interacciones hidrofóbicas entre EGCG y doxorubicina podrían haber
 10 desempeñado un rol importante en la elevada capacidad de carga del fármaco de los nanocomplejos micelares PEG-mEGCG.

Estudio de liberación de Doxorubicina

Para los experimentos de liberación, 0.5 mL de nanocomplejos doxorubicina-cargados (2 mg mL^{-1}) fueron colocados en tubos de diálisis con un MWCO de
 15 2,000 Da. Los tubos fueron sumergidos en 25 mL de PBS en un incubador con agitación a 37°C. En un punto de tiempo determinado, se recolectó 1 mL del medio de liberación y después colocado con un volumen equivalente de PBS fresco. La cantidad de doxorubicina liberada dentro del medio se determinó al medir la absorbancia de doxorubicina a 480 nm utilizando un espectrofotómetro
 20 Hitachi U-2810 (Japón).

El perfil de liberación de fármaco de los nanocomplejos micelares de doxorubicina/PEG-mEGCG también fue investigado a temperatura y pH fisiológicos. Como se muestra en la Figura 9, los nanocomplejos micelares exhibieron una liberación sostenida de doxorubicina en PBS. Aproximadamente
 25 11% de la doxorubicina cargada fue liberada en un lapso de 7 días. La tasa de liberación observada es considerablemente menor que aquella de los otros sistemas de suministro de doxorubicina reportados previamente. Esta liberación de fármaco sostenida fue ocasionada probablemente por la fuerte interacción entre EGCG y doxorubicina dentro de los nanocomplejos micelares. Además,
 30 solamente se observó una liberación de ráfaga marginal en la etapa inicial, sugiriendo que las moléculas de doxorubicina fueron encapsuladas de manera estable en los nanocomplejos micelares. Dicha pequeña fuga de fármaco sería esencial para asegurar la máxima eficiencia terapéutica con efectos colaterales mínimos, ya que las moléculas de fármaco encapsuladas en los nanocomplejos
 35 no escaparían prematuramente durante la circulación en el torrente sanguíneo. En conjunto, estos resultados demostraron que los nanocomplejos micelares PEG-mEGCG podrían ser aplicados para administración sistémica de doxorubicina para el tratamiento del cáncer.

Ejemplo 4: Los conjugados SU/PEG-EGCG

Formación de nanocomplejos micelares SU/PEG-EGCG

La Figura 10 ilustra la formación de conjugados SU/PEG-EGCG utilizando el método de dispersión sólida. En resumen, se disolvieron 2 mg de SU (1006) en 1 mL de cloroformo. Después la solución SU fue agregada a los conjugados PEG-EGCG (ya sea PEG-mEGCG (1002) o PEG-dEGCG (1004) en envases de vidrio en relaciones en peso de PEG-EGCG:SU variables (1008) y sometidos a agitación vorticial. Después el cloroformo de la solución fue evaporado bajo presión reducida (1010). La película delgada resultante de PEG-EGCG y mezcla SU (1012) fue hidratada mediante la adición de 2 mL de agua a la superficie (1014), e incubada a temperatura ambiente durante 24 h. A media que la película sólida resultante fue hidratada, el PEG-EGCG auto-montado para formar nanocomplejos micelares mediante aislamiento de las porciones SU y EGCG a partir de las cadenas PEG hidratadas. La solución de nanocomplejos micelares SU/PEG-EGCG fue filtrada después (1016) a través de filtro de 0.8- μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Alemania) para remover cualesquiera fármacos libres residuales produciendo la solución de nanocomplejo micelar SU/PEG-EGCG transparente (1018). Para estudios *in vivo*, la solución de nanocomplejos micelares SU/PEG-EGCG fue filtrada de manera adicional utilizando un filtro de 0.2- μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Alemania).

Se observará que los conjugados PEG-EGCG se refieren tanto a PEG-mEGCG como a PEG-dEGCG a menos de que se especifique de otra manera.

Ya que EGCG tiene una estructura de polifenol capaz de interactuar con SU a través de la interacción hidrofóbica y el apilamiento π - π , se anticipó que el EGCG enriquecido en el núcleo de nanocomplejos micelares proporcionaría un ambiente favorable para el atrapamiento de SU. Además, las cadenas PEG de superficie expuesta formarían una cubierta altamente hidratada alrededor de los nanocomplejos micelares para evitar la depuración mediante el RES, permitiendo de este modo una circulación prolongada en el torrente sanguíneo y la reducción de los efectos colaterales.

Caracterización de los nanocomplejos micelares de SU/PEG-mEGCG

Los diámetros hidrodinámicos, distribución de tamaño y carga de superficie de los nanocomplejos micelares de SU/PEG-mEGCG fueron evaluados a través de dispersión lumínica dinámica (DLS) (Zetasizer Nano ZS, Malvern, RU). Las mediciones se condujeron por triplicado en agua a 25°C. La Figura 11A muestra

el diámetro hidrodinámico de los nanocomplejos micelares preparados en diferentes relaciones en peso de PEG-EGCG:SU. En particular, los nanocomplejos micelares fueron producidos en el rango de tamaño de 130-250 nm. El tamaño nanométrico sería favorable para prolongar la circulación y la focalización en el tumor a través del efecto EPR. Las características de los nanocomplejos micelares fueron controladas al variar las relaciones en peso de PEG-EGCG:SU. La Figura 11B muestra que los nanocomplejos micelares formados en relaciones de peso de PEG-EGCG:SU de 8 y 16 fueron elevadamente monodispersos. Los nanocomplejos micelares redujeron su carga positiva a medida que se incrementaba la relación en peso de PEG-EGCG:SU (Figura 11C). Su carga de superficie ligeramente positiva fue atribuida al encapsulamiento de moléculas SU con carga positiva.

Para medir la eficiencia y cantidad de carga de fármaco, 10 μ L de nanocomplejos micelares en agua fueron disueltos en 990 μ L de DMF, y se midió la absorbancia de SU a 431 nm utilizando un espectrofotómetro de ultravioleta-visible Hitachi U-2810 (UV-Vis) (Japón). La curva de calibración obtenida con las soluciones estándar SU fue utilizada para determinar la eficiencia y cantidad de carga.

La Figura 12 muestra la eficiencia de carga de fármaco y el contenido de carga de fármaco de los nanocomplejos micelares de SU/PEG-EGCG. A medida que se incrementó la relación en peso de PEG-EGCG:SU desde 1 hasta 16, la eficiencia de carga de fármaco se incrementó desde ~ 30% hasta ~ 80%. La eficiencia de carga de los nanocomplejos micelares SU/PEG-dEGCG fue superior que la de nanocomplejos micelares SU/PEG-mEGCG, indicando una mayor interacción de SU con PEG-dEGCG en comparación con PEG-mEGCG. Se encontró también que la eficiencia de carga de los nanocomplejos micelares estuvo relacionada con la cantidad de precipitado SU no cargado antes de la filtración. Cuando se incrementó la relación en peso de PEG-EGCG:SU hasta 8, no se encontraron precipitados SU. Como se esperaba, el contenido de carga de los nanocomplejos micelares se redujo a medida que se incrementó la relación en peso de PEG-EGCG:SU debido al mayor contenido de PEG-EGCG en los nanocomplejos micelares.

Estudio de liberación de SU

Se investigó de manera adicional el perfil de liberación de fármaco de los nanocomplejos micelares SU/PEG-EGCG bajo condición fisiológica (solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés), pH 7.3 a 37°C). Para los experimentos de liberación de SU, se colocaron 0.5 mL de nanocomplejos micelares SU/PEG-EGCG (0.4 mg mL⁻¹) en tubos de diálisis

(MWCO = 2,000 Da). Los tubos fueron sumergidos en 25 mL de PBS en un incubador de con agitación a 37°C. En un punto de tiempo determinado, se recolectó 1 mL del medio de liberación y fue remplazado después con un volumen equivalente de PBS fresco. La cantidad de SU liberada dentro del medio se determinó a través de la medición de la absorbancia a 431 nm utilizando un espectrofotómetro Hitachi U-2810.

Como se muestra en la Figura 13, los nanocomplejos micelares exhibieron una liberación sostenida de SU en PBS, lo cual podría atribuirse a la fuerte interacción entre EGCG y SU dentro de los nanocomplejos micelares. Además, difícilmente se observó cualquier liberación de ráfaga, sugiriendo que las moléculas de SU fueron encapsuladas de manera estable en los nanocomplejos micelares. Los nanocomplejos micelares SU/PEG-mEGCG mostraron una mayor y más rápida liberación de SU en comparación con los nanocomplejos micelares SU/PEG-dEGCG debido a la interacción más débil entre las porciones SU y mEGCG. La tasa y cantidad de liberación dependió también de la relación en peso de PEG-EGCG:SU. Para los nanocomplejos micelares SU/PEG-mEGCG, se redujo tanto la tasa como la cantidad de liberación a medida que se incrementó la relación en peso de PEG-EGCG:SU. La relación en peso de PEG-EGCG:SU no afectó de forma significativa la tasa y cantidad de liberación en los nanocomplejos micelares SU/PEG-dEGCG, excepto que una liberación menor y más lenta estuvo asociada con una relación en peso de PEG-EGCG:SU de 8.

Estudio terapéutico in vivo

Para estudiar la toxicidad y el efecto terapéutico, se condujeron estudios *in vivo* en los nanocomplejos micelares. Se estableció un modelo de carcinoma de célula renal subcutánea. Se utilizaron ratones hembra adultos desnudos inmunoincompetentes, atímicos, Balb/c (peso promedio = 19 g, edad = 6–8 semanas).

Para estudiar el efecto terapéutico de los nanocomplejos micelares SU/PEG-EGCG mediante inyección intravenosa, se estableció un modelo de xenoinjerto mediante inoculación de 6×10^6 células A498-*luc* por vía subcutánea dentro de la raíz del muslo izquierdo del ratón. En el día 6 después de la inoculación de tumor, los animales fueron divididos en cuatro grupos para inyección en la vena de la cola de varias soluciones ($n = 8$ por grupo) dos veces a la semana durante 5 semanas, en tanto que un grupo recibió 60 mg/kg de SU por sonda diariamente. Para la inyección en la vena de la cola, se utilizó un volumen de 200 μ L de la solución muestra.

Para monitorear las señales bioluminiscentes a partir de las células A498-*luc*, los animales anestesiados con gas isoflurano fueron inyectados por vía

intraperitoneal con 200 μ l de D-luciferina (5 mg ml⁻¹, Promega) en PBS, y colocados en una etapa con calentamiento (30°C) dentro de la caja interior de la cámara del sistema de imágenes IVIS (Xenogen, Alameda, CA, EUA) con una cámara CCD. Las imágenes luminiscentes fueron tomadas 20 minutos después de la inyección de luciferina como una toma de imagen de 30-s. La luz emitida desde las células A498-*luc* fue digitalizada y desplegada electrónicamente como una sobreposición de pseudocolor sobre una imagen en escala de grises del animal. Las imágenes y las mediciones de las señales luminiscentes se tomaron y analizaron con el software de procesamiento de imágenes Xenogen v3.2 y cuantificadas como fotones/s. se midieron el tamaño y el peso corporal del tumor de manera semanal. Todo el manejo y cuidado de los animales se realizó de acuerdo con las Guidelines on the Care and Use of Animals for Scientific Purposes publicadas por el National Advisory Committee for Laboratory Animal Research, Singapur.

Todos los datos fueron representados como media $\pm$ error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés). La importancia estadística de las diferencias entre los valores medios se determinó por medio de la prueba t de Student. Se evaluaron múltiples comparaciones mediante ANOVA con pruebas de comparación múltiple de Bonferroni utilizando SigmaStat 3.5. Se consideró el valor-A P de < 0.05 para que sea estadísticamente significativo.

Se seleccionaron nanocomplejos micelares SU/PEG-mEGCG (con relaciones en peso de PEG-EGCG:SU de 8 y 16) y los nanocomplejos micelares SU/PEG-dEGCG (con relación en peso de PEG-EGCG:SU de 8) para los estudios *in vivo* con base en el tamaño de nanocomplejo micelar, distribución de tamaño y carga de superficie. Los nanocomplejos micelares SU/PEG-mEGCG fueron inyectados por vía intravenosa dos veces por semana durante 5 semanas, y un grupo recibió 60 mg/kg de SU a través de sonda diariamente. La dosis de fármaco oral de 60 mg/kg por día se seleccionó en base a los informes previos que demostraron que la dosis preclínica óptima de SU para eficiencia antitumoral en ratones es de 40-80 mg/kg por día. Para nuestros estudios, la dosis de 60 mg/kg por día representó una dosis antitumoral eficaz, ya que otros estudios indicaron que una dosis de < 40 mg/kg por día es menos eficaz, y una dosis de 120 mg/kg por día probaría los efectos de la administración elevada adicional del fármaco.

La Figura 14 muestra una pérdida de peso significativa en el grupo que recibe SU libre oral una semana después del inicio del tratamiento. Esto no se observó en los otros grupos que reciben el tratamiento de nanocomplejo micelar de SU/PEG-EGCG. El efecto antitumoral se mejoró cuando los nanocomplejos micelares de SU/PEG-EGCG fueron administrados dos veces por semana, en comparación con la terapia oral de SU diaria (Figura 15). Este efecto antitumoral con los nanocomplejos micelares de SU/PEG-EGCG se logró a

aproximadamente un décimo de la concentración de la dosis oral. El efecto inhibitor del nanocomplejo micelar de SU/PEG-EGCG se mantuvo durante un período sustancial incluso cuando se interrumpió la terapia después de 5 semanas. La velocidad del nuevo crecimiento del tumor fue mucho mayor en el grupo que recibe tratamiento oral, en comparación con los grupos que reciben tratamiento de nanocomplejo micelar.

Para investigar el efecto terapéutico de SU/PEG-mEGCG MNC a través de la administración oral, se estableció un modelo tumoral de xenoinjerto mediante inoculación de 4×10^6 células ACHN suspendidas en 100 μ l de PBS y 100 μ l de Matrigel (BD Bioscience) por vía subcutánea dentro de la raíz del muslo derecho del ratón. Una vez que los tumores alcanzaron un volumen de 200 mm³, los animales fueron divididos en cuatro grupos para alimentación por sonda oral de varias soluciones (n = 8 por grupo) diariamente durante 5 semanas: control (solución reguladora de citrato pH5), SU/PEG-mEGCG 8:1 (SU a 15 mg/kg), SU a 15 y 40 mg/kg. Los tumores fueron medidos dos veces por semana con un calibrador digital, y se calcularon los volúmenes de tumor (mm³) a partir de la siguiente fórmula: volumen = (longitud $\times$ anchura²)/2 (Figuras 16 y 17).

Ya que se ha demostrado que la dosis de SU oral de 60 mg/kg por día es demasiado tóxica, la dosis de SU oral se redujo a 40 mg/kg por día en esta descripción. Esta dosis oral de 40 mg/kg por día es la dosis preclínica óptima para la eficacia antitumoral en ratones (40-80 mg/kg por día) con base en los informes previos. La Figura 16 muestra una pérdida de peso significativa en el grupo que recibe SU a 40 mg/kg durante el tratamiento. Esto no se observó en los otros grupos que reciben SU/PEG-mEGCG MNC 8:1 y SU en el tratamiento de 15 mg/kg. Con la misma dosis de SU a 15 mg/kg, SU/PEG-mEGCG MNC mostró un efecto terapéutico significativamente mayor cuando se comparó con SU solo (Figura 17). Este efecto antitumoral con SU/PEG-mEGCG MNC se logró a menos de la mitad de la concentración de la dosis de SU oral óptima a 40 mg/kg. El efecto inhibitor de SU/PEG-mEGCG MNC se mantuvo durante un período sustancial incluso cuando se interrumpió la terapia después de 5 semanas.

El efecto EPR considera la naturaleza anatómica-fisiológica de los vasos sanguíneos del tumor que facilitan el transporte de las macromoléculas de > 40 kDa que se filtran de manera selectiva desde los vasos del tumor y se acumulan en el tejido tumoral. Los tumores más sólidos tienen vasos sanguíneos con arquitectura defectuosa, lo cual resulta usualmente en cantidades importantes de permeabilidad vascular. Esto no ocurre en los tejidos normales. La presente invención describe el uso de nanocomplejos micelares de SU/PEG-mEGCG a través de administraciones tanto intravenosas como orales como una posible

terapia para ccRCC por primera vez. Se ha observado que EGCG interactuó con SU, y los estudios farmacocinéticos en rata mostraron la administración de EGCG redujo marcadamente las concentraciones en plasma de SU. La interacción reportada del té verde con SU y el efecto EPR de las nanopartículas micelares en varios tumores sugirió la posibilidad de emplear PEG-EGCG como un vehículo de nanopartícula para suministro de SU. En el glioblastoma, un tumor altamente angiogénico, la terapia anti-angiogénica ha demostrado una elevada aunque transitoria eficacia. Dicho tumor estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de los procesos impulsados principalmente por VEGF, aunque los vasos resultantes son estructural y funcionalmente anormales. El uso de los nanocomplejos micelares de SU/PEG-EGCG podría mejorar potencialmente la actividad anti-angiogénica en tales casos.

Aplicabilidad Industrial

Los nanocomplejos micelares pueden ser aplicados para uso en la administración sistémica de doxorubicina para el tratamiento del cáncer.

5 Los nanocomplejos micelares pueden ser utilizados como un vehículo de nanopartícula para suministro de SU. En el glioblastoma, un tumor altamente angiogénico, la terapia anti-angiogénica ha demostrado una elevada aunque transitoria eficacia. Dicho tumor estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de los procesos impulsados principalmente por VEGF, aunque los vasos resultantes son estructural y funcionalmente anormales. El uso
10 de los nanocomplejos micelares que comprenden SU podría mejorar potencialmente la actividad anti-angiogénica en tales casos.

Los nanocomplejos micelares pueden ser empleados para la liberación sostenida de agentes terapéuticos cuando son administrados de manera sistémica, o como un sistema de suministro para agentes terapéuticos en los
15 sitios de objetivo.

Los nanocomplejos micelares pueden ser usados para encapsulamiento de varios agentes terapéuticos para diferentes clases de tratamiento de cáncer.

Los nanocomplejos miscelares pueden ser utilizados también para encapsulamiento de varios agentes terapéuticos para tratamientos no
20 cancerosos. Esto puede incluir moléculas pequeñas para antibióticos y otras aplicaciones médicas.

Será obvio que muchas otras modificaciones y adaptaciones de la invención serán evidentes para la persona experimentada en la técnica después de leer la descripción anterior sin apartarse del espíritu y alcance de la invención y se
25 pretende que dichas modificaciones y adaptaciones estarán dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.