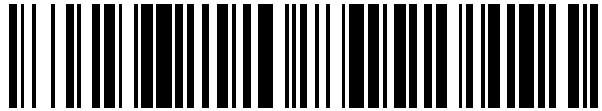


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 462 090**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/16** (2006.01)  
**A61K 47/34** (2006.01)  
**A61K 33/24** (2006.01)  
**A61K 31/337** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**C08G 63/668** (2006.01)  
**C08G 63/672** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2009 E 09794915 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 2309990**

54 Título: **Nanopartículas poliméricas cargadas de fármaco y métodos para preparar y usar las mismas**

30 Prioridad:

**15.04.2009 US 169519 29.05.2009 US 182300**  
**16.06.2008 US 61704 15.04.2009 US 169541**  
**04.05.2009 US 175219 16.06.2008 US 61760**  
**04.05.2009 US 175226 20.10.2008 US 106777**  
**16.10.2008 US 105916 04.05.2009 US 175209**  
**12.08.2008 US 88159 29.04.2009 US 173784 P**  
**16.06.2008 US 61697 15.04.2009 US 169514**  
**29.04.2009 US 173790**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.05.2014**

73 Titular/es:

**BIND THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**  
**325 Vassar Street**  
**Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**TROIANO, GREG;**  
**FIGA, MICHAEL y**  
**SABNIS, ABHIMANYU**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 462 090 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

Nanopartículas poliméricas cargadas de fármaco y métodos para preparar y usar las mismas

## 5 Aplicaciones relacionadas

## Antecedentes

10 Se ha reconocido que los sistemas que administran ciertos fármacos a un paciente (por ejemplo, dirigidos a un tipo particular de tejido o célula, o dirigidos a un tejido enfermo específico pero no al tejido normal), o que controlan la liberación de fármacos, son beneficiosos. WO 2003/086369 da a conocer nanoesferas biodegradables poliméricas furtivas y sus usuarios.

15 Por ejemplo, los productos terapéuticos que contienen un principio activo y que están dirigidos, por ejemplo, a un tipo particular de tejido o célula, o dirigidos a un tejido enfermo específico pero no al tejido normal, pueden reducir la cantidad de fármaco en los tejidos corporales que no son el objetivo. Esto es particularmente importante en el tratamiento de una enfermedad como el cáncer, donde es deseable la administración de una dosis citotóxica del fármaco a las células cancerosas sin destruir el tejido circundante no canceroso. La administración dirigida eficaz de los fármacos puede disminuir los efectos secundarios indeseables y a veces mortales, comunes en la terapia contra el cáncer. Además, dichos productos terapéuticos pueden permitir que los fármacos lleguen a ciertos tejidos que de lo contrario serían incapaces de alcanzar.

20 Los productos terapéuticos que ofrecen liberación controlada o terapia dirigida también deben ser capaces de administrar una cantidad eficaz de fármaco, que es una limitación conocida en otros sistemas de administración con nanopartículas. Por ejemplo, puede ser un desafío preparar sistemas de nanopartículas que tengan una cantidad apropiada de fármaco asociada a cada nanopartícula, manteniendo simultáneamente el tamaño de las nanopartículas lo suficientemente pequeño para que tengan propiedades de administración ventajosas. Sin embargo, si bien es deseable cargar una nanopartícula con una alta cantidad de un agente terapéutico, las preparaciones de nanopartículas que usan una carga de fármaco que es demasiado alta darán lugar a nanopartículas que son demasiado grandes para el uso terapéutico práctico.

25 En consecuencia, existe la necesidad de productos terapéuticos en nanopartículas y métodos de fabricación de dichas nanopartículas, que sean capaces de administrar niveles terapéuticos de fármacos para tratar enfermedades como el cáncer, reduciendo al mismo tiempo los efectos secundarios en el paciente.

## 35 Resumen

La invención proporciona un método de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas, que comprende:

40 combinar un agente terapéutico, un primer polímero y opcionalmente un segundo polímero, con un solvente orgánico para formar una primera fase orgánica que tenga 5 a 50% de sólidos; combinar la primera fase orgánica con una primera solución acuosa para formar una segunda fase; emulsionar la segunda fase para formar una fase en emulsión;

45 templar la fase en emulsión para formar una fase templada; donde el temple se realiza al menos parcialmente a una temperatura de 5 °C o menos;

agregar un solubilizante de fármacos a la fase templada para formar una fase solubilizada de un agente terapéutico no encapsulado; y filtrar la fase solubilizada para recuperar las nanopartículas furtivas específicas para el objetivo, formando así una lechada de nanopartículas terapéuticas con un diámetro de 80 nm a 150 nm.

50 Asimismo una nanopartícula terapéutica se puede preparar mediante:

la emulsión de una primera fase orgánica que comprende un primer polímero y un agente terapéutico, y una segunda fase que forma una fase en emulsión; donde la fase en emulsión se temple después a una temperatura entre 0 °C y 5 °C formando una fase templada; y

55 la filtración de la fase templada a una primera temperatura entre -5 °C y 10 °C; y la filtración de la fase templada a una segunda temperatura de 25 °C; formando así nanopartículas terapéuticas que son estables durante al menos 5 días a 25 °C.

60 En un aspecto, la invención proporciona nanopartículas terapéuticas que incluyen un principio activo o agente terapéutico, por ejemplo taxano, y uno, dos o tres polímeros biocompatibles. Por ejemplo, en este documento se da a conocer una nanopartícula terapéutica que comprende entre alrededor de 0.2 y alrededor de 35 por ciento en peso de un agente terapéutico; entre alrededor de 10 y alrededor de 99 por ciento en peso de copolímero de ácido poli(láctico)-bloque-poli(etilenglicol) o copolímero de ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-bloque-poli(etilenglicol); y

entre alrededor de 0 y alrededor de 50 por ciento en peso de ácido poli(láctico) o ácido poli(láctico)-co-ácido poli(glicólico). Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen antineoplásicos como taxanos, por ejemplo docetaxel y pueden incluir entre alrededor de 10 y alrededor de 30 por ciento en peso de un agente terapéutico, por ejemplo, un taxano.

5 En este documento se proporciona, en parte, un método de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas dadas a conocer, que comprende combinar un agente terapéutico, un primer polímero y opcionalmente un segundo polímero, con un solvente orgánico (por ejemplo, un solvente elegido entre: acetato de etilo, alcohol bencílico, cloruro de metileno, dimetilformamida, Tween 80 y Span 80 y las combinaciones de dos o más de éstos) para formar una primera fase orgánica que contenga de 5 a 50% de sólidos; combinar la primera fase orgánica con una primera solución acuosa (que puede, en algunas realizaciones, incluir un reactivo elegido entre: colato de sodio, acetato de etilo, alcohol bencílico o sus combinaciones) para formar una segunda fase; emulsionar la segunda fase para formar una fase en emulsión; templar la fase en emulsión para formar una fase templada; agregar un solubilizante de fármacos a la fase templada para formar una fase solubilizada de un agente terapéutico no encapsulado; y filtrar la fase solubilizada para recuperar las nanopartículas furtivas específicas para el objetivo, formando así una lechada de nanopartículas terapéuticas con un diámetro entre alrededor de 80 nm y alrededor de 150 nm. En algunas realizaciones, emulsionar la segunda fase puede implicar emulsionar la segunda fase para formar una emulsión gruesa y emulsionar la emulsión gruesa para formar una fase en emulsión fina. La emulsión de la segunda fase se puede realizar, por ejemplo, utilizando un homogeneizador de rotor y estator, una sonda de ultrasonidos, una barra de agitación o un mezclador de alta presión. La emulsión de la emulsión gruesa se puede realizar utilizando, por ejemplo, un homogeneizador de alta presión que puede tener múltiples cámaras de interacción (2, 3, 4 o más), y con, por ejemplo, una presión de alimentación entre alrededor de 2000 y alrededor de 8000, por ejemplo, entre alrededor de 2000 y alrededor de 6000, por cámara de interacción.

25 En algunas realizaciones, el temple se puede realizar al menos parcialmente a una temperatura de alrededor de 5 °C o menos, por ejemplo, entre alrededor de 0 °C y alrededor de 5 °C. Una relación medio para temple:emulsión puede ser de 8:1 y alrededor de 5:1, o entre alrededor de 2:1 y alrededor de 40:1.

30 Los ejemplos de solubilizantes de fármacos para usar en los métodos dados a conocer pueden incluir Tween 80, Tween 20, polivinilpirrolidona, ciclodextrano, dodecilsulfato de sodio o colato de sodio. En algunas realizaciones, un solubilizante de fármacos se elige del grupo que consiste en dietilnitrosamina, acetato de sodio, urea, glicerina, propilenglicol, glicofurol, poli(etilenglicol), bis(polioxietilenglicoldodecil)éter, benzoato de sodio y salicilato de sodio. La relación entre solubilizante de fármacos y agente terapéutico puede ser entre alrededor de 100:1 y alrededor de 10:1.

35 En una realización, un método puede incluir filtrar la fase solubilizada que contiene nanopartículas usando por ejemplo un sistema de filtración de flujo tangencial. La filtración se puede llevar a cabo, por ejemplo, a una primera temperatura entre alrededor de 0 °C y alrededor de 5 °C, y después a una segunda temperatura entre alrededor de 20 °C y alrededor de 30 °C. Alternativamente, la filtración se puede llevar a cabo por ejemplo, a una primera temperatura entre alrededor de 20 °C y alrededor de 30 °C, y después a una segunda temperatura entre alrededor de 0 °C y alrededor de 5 °C. En algunas realizaciones, la filtración comprende procesar entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 diavolúmenes a una temperatura entre alrededor de 0 °C y alrededor de 5 °C y procesar al menos un diavolumen a una temperatura entre alrededor de 20 °C y alrededor de 30 °C, por ejemplo, la filtración puede implicar procesar entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 diavolúmenes a una temperatura entre alrededor de 0 °C y alrededor de 5 °C y procesar entre aproximadamente 1 diavolumen y aproximadamente 15 diavolúmenes a una temperatura entre alrededor de 20 °C y alrededor de 30 °C. En una realización, la filtración puede implicar procesar diferentes diavolúmenes a diferentes temperaturas definidas. La fase solubilizada se puede purificar antes de dicha filtración para eliminar sustancialmente dicho solvente orgánico, agente terapéutico no encapsulado y/o solubilizante de fármacos.

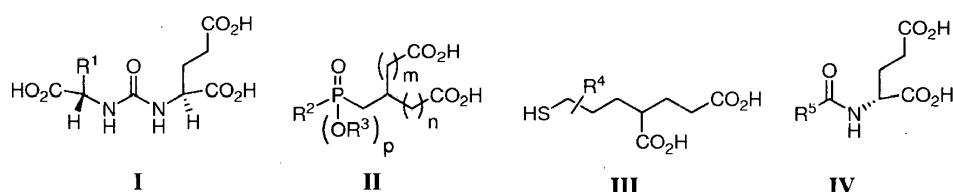
50 Los métodos dados a conocer pueden comprender la filtración esterilizante de la lechada de nanopartículas terapéuticas utilizando un tren de filtración a una velocidad controlada. Por ejemplo, se puede usar un tren de filtración que comprenda un filtro de profundidad y un filtro esterilizante.

55 También se da a conocer en este documento un método de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas que comprende combinar un agente terapéutico, un primer polímero, y opcionalmente un segundo polímero, con un solvente orgánico para formar una primera fase orgánica, combinar la primera fase orgánica con una primera solución acuosa para formar una segunda fase; emulsionar la segunda fase para formar una fase en emulsión; templar la fase en emulsión para formar una fase templada; agregar un solubilizante de fármacos a la fase templada para formar una fase solubilizada de agente terapéutico no encapsulado; y filtrar la fase solubilizada utilizando filtración de flujo tangencial con diafiltración de volumen constante donde al menos un diavolumen se expone a alrededor de 25 °C después de haber expuesto un diavolumen diferente a una temperatura entre alrededor de -5 °C y alrededor de 10 °C. Por ejemplo, filtrar puede implicar procesar entre aproximadamente 2 y

aproximadamente 5 diavolumenes a una temperatura entre alrededor de 0 °C y alrededor de 5 °C, y después procesar al menos un diavolumen a 25 °C durante al menos un período de tiempo.

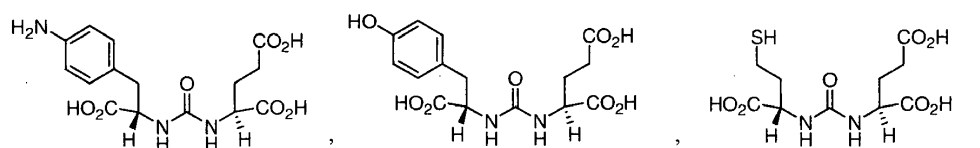
5 En este documento se proporcionan métodos para elaborar nanopartículas terapéuticas que pueden ser estables durante al menos 2 días a 25 °C a una concentración de alrededor de 10 mg/ml. Las nanopartículas terapéuticas formadas utilizando los métodos dados a conocer pueden liberar menos de 10% en peso de agente terapéutico en al menos 5 días a 25 °C. En algunas realizaciones, una nanopartícula terapéutica formada utilizando un método dado a conocer puede, por ejemplo, encapsular entre alrededor de 2 y alrededor de 30% del agente terapéutico.

10 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas dadas a conocer que comprenden combinar un agente terapéutico, un primer polímero (por ejemplo, copolímero en dibloque PLGA-PEG o dibloque PLA-PEG), un segundo polímero opcional (por ej., homopolímero PLA), y opcionalmente un tercer polímero (por ej., PLA) donde el primer polímero o el segundo polímero pueden estar unidos opcionalmente a un ligando con un peso molecular menor de alrededor de 1000 g/mol, por ejemplo, un ligando de bajo peso molecular como un ligando de PSMA. Dicho ligando de PSMA de bajo peso molecular se puede elegir del grupo formado por los compuestos I, II, III y IV:

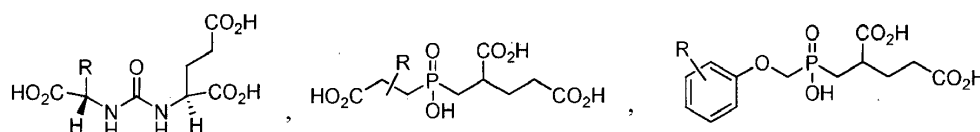


y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos; donde

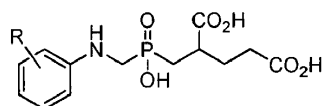
20 m y n cada uno, independientemente, es 0, 1, 2 o 3;  
 p es 0 o 1;  
 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> cada uno, independientemente, se elige del grupo que consiste en alquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, y cualquiera de sus combinaciones; y  
 25 R<sup>3</sup> es H o CH<sub>3</sub>;  
 donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> o R<sup>5</sup> comprenden un punto de unión covalente a la nanopartícula. Por ejemplo, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> puede ser cada uno, independientemente, C<sub>1-6</sub>-alquilo o fenilo, o cualquier combinación de C<sub>1-6</sub>-alquilo o fenilo, que están independientemente sustituidos una o más veces con OH, SH, NH<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>H, y donde el grupo alquilo puede estar interrumpido por N(H), S u O. En otra realización, por ejemplo, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> cada uno, independientemente, es CH<sub>2</sub>-Ph, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SH, CH<sub>2</sub>-SH, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(H)(NH<sub>2</sub>)CO<sub>2</sub>H, CH<sub>2</sub>C(H)(NH<sub>2</sub>)CO<sub>2</sub>H,  
 30 CH(NH<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(H)(SH)CO<sub>2</sub>H, CH<sub>2</sub>-N(H)-Ph, O-CH<sub>2</sub>-Ph o O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Ph, donde cada Ph puede estar independientemente sustituido una o más veces con OH, NH<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>H o SH. El ligando de PSMA de bajo peso molecular de ejemplo se puede elegir del grupo que consiste en



35 y  
  
 y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos; y donde los grupos NH<sub>2</sub>, OH o SH sirven como el punto de unión covalente a la primera partícula, o se pueden elegir del grupo que  
 40 consiste en

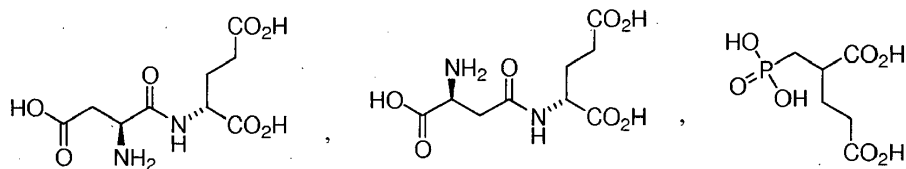


45 y

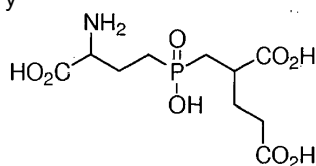


y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos; donde R se elige independientemente del grupo que consiste en NH<sub>2</sub>, SH, OH, CO<sub>2</sub>H, C<sub>1-6</sub>-alquilo que está sustituido con NH<sub>2</sub>, SH, OH o CO<sub>2</sub>H, y fenilo que está sustituido con NH<sub>2</sub>, SH, OH o CO<sub>2</sub>H,

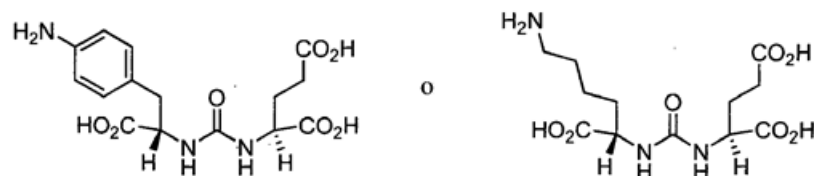
5 y donde R sirve como el punto de unión covalente al primer polímero. Los ejemplos de ligandos incluyen



y



10 y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos; cualquiera de los cuales puede estar sustituido además con NH<sub>2</sub>, SH, OH, CO<sub>2</sub>H, C<sub>1-6</sub>-alquilo que está sustituido con NH<sub>2</sub>, SH, OH o CO<sub>2</sub>H, o fenilo que está sustituido con NH<sub>2</sub>, SH, OH o CO<sub>2</sub>H, donde estos grupos funcionales sirven como el punto de unión covalente al primer polímero, por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular puede ser



15 y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos; donde los grupos NH<sub>2</sub> sirven como el punto de unión covalente al primer polímero.

20 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas dadas a conocer que comprenden combinar un agente terapéutico, un primer polímero (por ej., PLGA-PEG o PLA-PEG), y opcionalmente un segundo polímero (por ej. PLA, PLGA o PEG, o sus copolímeros) y un tercer polímero opcional (por ej. PLA o PLGA no unido a un ligando). En algunas realizaciones, el agente terapéutico es docetaxel. En otras realizaciones, el agente terapéutico se elige del grupo que consiste en antineoplásicos como doxorubicina (adriamicina), mitoxantrona, gemcitabina (gemzar), daunorrubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere),  
 25 aldesleucina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, camptotecina, 10-hidroxi-7-etilcamptotecina (SN38), dacarbazina, S-I capecitabina, ftorafur, 5'desoxiflurouridina, eniluracilo, desoxicitidina, 5-azacitosina, 5-azadesoxicitosina, alopurinol, 2-cloroadenosina, trimetrexato, aminopterina, metileno-10-deazaaminopterina (MDAM), oxaplatino, picoplatino, tetraplatino, satraplatino, platino-DACH, ormaplatino, y sus análogos, epirrubina, fosfato de etopósido, 9-aminocamptotecina, 10,11-metilenodioxycamptotecina, karenitecina, 9-nitrocampotecina, vindesina, mostaza de L-fenilalanina, ifosfamidamefosfamida, perfosfamida, trofosfamida, carmustina, semustina, epotilones A-E, tomudex, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, amsacrina, fosfato de etopósido, karenitecina, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir, amantadina, rimantadina, lamivudina, zidovudina, bevacizumab, trastuzumab, rituximab y 5-fluorouracilo, metotrexato, budesonida, sirolimus, vincristina y sus combinaciones, o el agente terapéutico puede ser  
 35 un ARNip.

También se proporcionan en este documento métodos para tratar el cáncer de próstata en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de la nanopartícula preparada por los métodos dados a  
 40 conocer.

En una realización, también se proporciona en este documento una nanopartícula terapéutica preparada mediante: la emulsión de una primera fase orgánica que comprende un primer polímero y un agente terapéutico, y una segunda fase que forma una fase en emulsión; donde la fase en emulsión se temple después a una temperatura entre 0 °C y 5 °C formando una fase templada; y la filtración de la fase templada a una primera temperatura entre -5

°C y 10 °C; y la filtración de la fase templada a una segunda temperatura de 25 °C; formando así nanopartículas terapéuticas que son estables durante al menos 5 días a 25 °C.

5 También se proporciona en una realización, un método de estabilización de nanopartículas terapéuticas que tienen un agente terapéutico que comprende: proporcionar una lechada que contenga un agente terapéutico encapsulado por nanopartículas y un solubilizante de fármacos; filtrar la lechada a una primera temperatura entre -5 °C y 10 °C; filtrar la lechada a una segunda temperatura de 25 °C.

#### Breve descripción de las figuras

10 La figura 1 describe una representación gráfica de una realización de una nanopartícula dada a conocer.  
 La figura 2 describe un esquema de síntesis de ejemplo para una nanopartícula dada a conocer.  
 La figura 3 es un flujograma para un proceso de emulsión para formar la nanopartícula dada a conocer.  
 La figura 4 es un diagrama de flujo para un proceso de emulsión dado a conocer.  
 15 La figura 5 describe el efecto de la preparación de la emulsión gruesa sobre el tamaño de la partícula templada. Se usó placebo orgánico con 30% de sólidos, emulsionado a 5:1 W:O usando fase acuosa estándar (colato de sodio al 1%, alcohol bencílico al 2%, acetato de etilo al 4%).  
 La figura 6 describe el efecto de la presión de alimentación sobre el tamaño de partícula resultante.  
 La figura 7 describe la dependencia del tamaño de partícula con la escala.  
 20 La figura 8 describe el efecto de la concentración de sólidos sobre el tamaño de la partícula.  
 La figura 9 describe el efecto de la concentración de sólidos sobre la carga de fármaco.  
 La figura 10 describe el efecto del homopolímero PLA con PLGA-PEG o PLA-PEG sobre la carga de DTXL (docetaxel).  
 La figura 11 describe el efecto del homopolímero PLA como parte de una nanopartícula sobre la velocidad de liberación del fármaco desde una nanopartícula.  
 25 La figura 12 describe el efecto del alcohol cetílico sobre la velocidad inicial de liberación del fármaco desde una nanopartícula.  
 La figura 13 describe la liberación in vitro de docetaxel desde las nanopartículas dadas a conocer en comparación con docetaxel convencional.  
 30 La figura 14 describe el efecto de la concentración de sólidos y el homopolímero poli(láctico) sobre el porcentaje de carga de sirolimus (rapamicina).  
 La figura 15 describe la liberación in vitro de sirolimus en el tiempo para las nanopartículas dadas a conocer.  
 La figura 16 describe los efectos del homopolímero poli(láctico) sobre el porcentaje de carga de temsirolimus.  
 La figura 17 describe el efecto de la concentración de sólidos sobre el tamaño de las partículas que contienen temsirolimus.  
 35 La figura 18 describe la liberación in vitro de temsirolimus en el tiempo para las nanopartículas dadas a conocer.  
 La figura 19 describe las propiedades de liberación in vitro de una nanopartícula dada a conocer de ejemplo que incluye vinorelbina.  
 La figura 20 describe las propiedades de liberación in vitro de las nanopartículas dadas a conocer que incluyen vincristina o docetaxel.  
 40 La figura 21 describe la farmacocinética de vincristina y vincristina PTNP en ratas.  
 La figura 22 describe el volumen promedio del tumor luego de la administración de las nanopartículas dadas a conocer que incluyen docetaxel en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama MX-1 en ratón.  
 La figura 23 describe la concentración de docetaxel en tumores de ratón en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama MX-1 en ratón, 24 horas después de una dosis intravenosa de las nanopartículas dadas a conocer que incluyen docetaxel.  
 45 La figura 24 describe la distribución en el tumor de próstata de las nanopartículas dadas a conocer que tienen docetaxel, luego de la administración a ratones inoculados con células LNCaP de cáncer de próstata humano.  
 La figura 25 muestra la supresión del crecimiento tumoral en ratones inoculados con células LNCaP de cáncer de próstata humano luego de la administración de las nanopartículas dadas a conocer con docetaxel.  
 50

#### Descripción detallada

55 La presente invención se refiere en general a nanopartículas poliméricas que incluyen un principio activo o agente terapéutico o fármaco, y a métodos para preparar y usar dichas nanopartículas terapéuticas. En general, una "nanopartícula" se refiere a cualquier partícula que tenga un diámetro menor de 1000 nm, por ejemplo entre alrededor de 10 nm y alrededor de 200 nm. Las nanopartículas terapéuticas dadas a conocer pueden incluir nanopartículas que tengan un diámetro entre alrededor de 60 y alrededor de 120 nm, o entre alrededor de 70 y alrededor de 130 nm, o entre alrededor de 60 y alrededor de 140 nm.

60 Las nanopartículas dadas a conocer pueden incluir entre alrededor de 0.2 y alrededor de 35% en peso, entre alrededor de 3 y alrededor de 40% en peso, entre alrededor de 5 y alrededor de 30% en peso, entre alrededor de 10 y alrededor de 30% en peso, entre alrededor de 15 y 25% en peso, o incluso entre alrededor de 4 y alrededor de 25% en peso de un principio activo, como un antineoplásico, por ej. un taxano (como docetaxel).

Las nanopartículas dadas a conocer en este documento incluyen uno, dos, tres o más polímeros biocompatibles y/o biodegradables. Por ejemplo, una nanopartícula contemplada puede incluir entre alrededor de 10 y alrededor de 99 por ciento en peso de uno o más copolímeros en bloque que incluyan un polímero biodegradable y polietilenglicol, y entre alrededor de 0 y alrededor de 50% en peso de un homopolímero biodegradable.

En una realización, las nanopartículas terapéuticas dadas a conocer pueden incluir un ligando para administración dirigida, por ej., un ligando de PSMA de bajo peso molecular eficaz para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno, como el cáncer de próstata, en un sujeto que lo necesita. En ciertas realizaciones, el ligando de bajo peso molecular se conjuga a un polímero, y la nanopartícula comprende una cierta relación entre polímero conjugado a ligando (por ej., PLA-PEG-Ligando) y polímero no funcionalizado (por ej. PLA-PEG o PLGA-PEG). La nanopartícula puede tener una relación optimizada de estos dos polímeros de modo que una cantidad eficaz de ligando se asocie a la nanopartícula para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno, como cáncer. Por ejemplo, una mayor densidad de ligando puede aumentar la unión al objetivo (unión a la célula/absorción por el objetivo) haciendo que la partícula sea "específica para el objetivo". Alternativamente, una cierta concentración de polímero no funcionalizado (por ej., copolímero PLGA-PEG no funcionalizado) en la nanopartícula puede controlar la inflamación y/o la inmunogenia (es decir, la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria), y permitir que la nanopartícula tenga una vida media de circulación que sea adecuada para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno (por ejemplo, cáncer de próstata). Además, el polímero no funcionalizado puede, en algunas realizaciones, reducir la velocidad de depuración del sistema circulatorio a través del sistema reticuloendotelial (RES). Por lo tanto, el polímero no funcionalizado puede proporcionar la nanopartícula con características que pueden permitir a la partícula desplazarse a través del organismo luego de su administración. En algunas realizaciones, un polímero no funcionalizado puede equilibrar la concentración de ligando, de lo contrario elevada, que de otra manera puede acelerar la depuración por el sujeto, lo que resulta en una menor administración a las células que son el objetivo.

Por ejemplo, en este documento se dan a conocer nanopartículas que pueden incluir polímeros funcionalizados conjugados a un ligando que constituye alrededor de 0.1 - 30, por ej., 0.1 - 20, por ej., 0.1 - 10 moles por ciento de toda la composición polimérica de la nanopartícula (es decir, polímero funcionalizado + no funcionalizado). También se dan a conocer en este documento, en otra realización, nanopartículas que incluyen un polímero conjugado (por ejemplo, covalentemente con (es decir a través de un enlazador (por ej. un enlazador alquileo) o un enlace) con uno o más ligandos de bajo peso molecular, donde el porcentaje en peso de ligando de bajo peso molecular con respecto al polímero total es entre alrededor de 0.001 y 5, por ej., entre alrededor de 0.001 y 2, por ej., entre alrededor de 0.001 y 1.

También se proporcionan en este documento nanopartículas poliméricas que incluyen entre alrededor de 2 y alrededor de 20 por ciento en peso de principio activo. Por ejemplo, una composición que comprende dichas nanopartículas puede ser capaz de administrar una cantidad eficaz por ejemplo al área corporal de un paciente que es el objetivo.

Por ejemplo, las partículas dadas a conocer pueden ser capaces de unirse eficazmente o asociarse de otra manera con una entidad biológica, por ejemplo, un componente de membrana particular o un receptor de superficie celular. La administración dirigida de un agente terapéutico (por ejemplo a un tipo de tejido o célula particular, a un tejido enfermo específico pero no al tejido normal, etc.) es deseable para el tratamiento de enfermedades tisulares específicas como cánceres de tumor sólido (por ej., cáncer de próstata). Por ejemplo, en contraste con la administración sistémica de un anticancerígeno citotóxico, las nanopartículas dadas a conocer en este documento pueden evitar en gran medida que el agente provoque la muerte de células sanas. Además, las nanopartículas dadas a conocer pueden permitir la administración de una dosis menor del agente (en comparación con una cantidad eficaz de un agente administrado sin las nanopartículas o formulaciones dadas a conocer) lo que puede reducir los efectos secundarios indeseables comúnmente asociados a la quimioterapia tradicional.

#### Polímeros

En algunas realizaciones, las nanopartículas de la invención comprenden una matriz de polímeros y un agente terapéutico. En algunas realizaciones, un agente terapéutico y/o un grupo para administración dirigida (targeting moiety), (es decir un ligando de PSMA de bajo peso molecular) se puede asociar con al menos parte de la matriz polimérica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un grupo para administración dirigida (por ejemplo un ligando) se puede asociar covalentemente con la superficie de una matriz polimérica. En algunas realizaciones, la asociación covalente es mediada por un enlazador. El agente terapéutico puede asociarse a la superficie de, ser encapsulado dentro de, ser rodeado por, y/o dispersarse en toda, la matriz polimérica.

Se conoce una amplia variedad de polímeros y métodos para elaborar partículas a partir de ellos en el área de la administración de fármacos. En algunas realizaciones, la divulgación apunta a nanopartículas con al menos dos macromoléculas, donde la primera macromolécula comprende un primer polímero unido a un ligando de bajo peso molecular (por ejemplo un grupo para administración dirigida); y la segunda macromolécula comprende un segundo

polímero que no está unido a un grupo para administración dirigida. La nanopartícula puede incluir opcionalmente uno o más polímeros no funcionalizados adicionales.

5 Se puede usar cualquier polímero de conformidad con la presente invención. Los polímeros pueden ser naturales o no naturales (sintéticos). Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros que comprenden dos o más monómeros. En términos de secuencia, los copolímeros pueden ser aleatorios, en bloque o comprender una combinación de secuencias aleatorias y en bloque. Generalmente, los polímeros según la presente invención son polímeros orgánicos.

10 El término "polímero" según se usa en este documento, tiene el significado corrientemente utilizado en el área, es decir, una estructura molecular que comprende una o más unidades repetidas (monómeros) conectadas por enlaces covalentes. Las unidades repetidas pueden ser todas idénticas, o en algunos casos, puede haber presente más de un tipo de unidades repetidas dentro del polímero. En algunos casos, el polímero se puede derivar biológicamente es decir, un biopolímero. Los ejemplos no limitantes incluyen péptidos o proteínas. En algunos casos, también  
15 pueden estar presentes en el polímero grupos adicionales, por ejemplo grupos biológicos como los descritos más adelante. Si está presente más de un tipo de unidades repetidas dentro del polímero, entonces se dice que el polímero es un "copolímero". Se debe entender que en cualquier realización que emplee un polímero, el polímero que se emplee puede ser, en algunos casos, un copolímero. Las unidades repetidas que forman el copolímero pueden estar dispuestas de cualquier manera. Por ejemplo, las unidades repetidas se pueden disponer en un orden  
20 aleatorio, en un orden alternante, o como un copolímero en bloque, es decir, que comprende una o más regiones, cada una de las cuales contiene una primera unidad repetida (por ejemplo un primer bloque), y una o más regiones que cada una contiene una segunda unidad repetida (por ejemplo un segundo bloque), etc. Los copolímeros en bloque pueden tener dos (copolímero en dibloque), tres (copolímero en tribloque), o mayor número de bloques diferentes.

25 Las partículas dadas a conocer pueden incluir copolímeros, los cuales, en algunas realizaciones, describen dos o más polímeros (como los descritos en este documento) que han sido asociados entre sí, generalmente mediante unión covalente de los dos o más polímeros. Por lo tanto, un copolímero puede comprender un primer polímero y un segundo polímero, que han sido conjugados para formar un copolímero en bloque donde el primer polímero puede  
30 ser un primer bloque del copolímero en bloque y el segundo polímero puede ser un segundo bloque del copolímero en bloque. Por supuesto, los expertos en el área entenderán que un copolímero en bloque puede, en algunos casos, contener múltiples bloques de polímero, y que un "copolímero en bloque" según se usa en este documento, no está limitado solo a copolímeros en bloque que tengan únicamente un primer bloque único y un segundo bloque único. Por ejemplo, un copolímero en bloque puede comprender un primer bloque que comprenda un primer polímero, un  
35 segundo bloque que comprenda un segundo polímero, y un tercer bloque que comprenda un tercer polímero o el primer polímero, etc. En algunos casos, los copolímeros en bloque pueden contener cualquier cantidad de primeros bloques de un primer polímero y segundos bloques de un segundo polímero (y en ciertos casos, terceros bloques, cuartos bloques, etc.). Además, se debe destacar que los copolímeros en bloque también se pueden formar, en algunos casos, a partir de otros copolímeros en bloque. Por ejemplo, un primer copolímero en bloque se puede  
40 conjugar con otro polímero (que puede ser un homopolímero, un biopolímero, otro copolímero en bloque, etc.), para formar un nuevo copolímero en bloque que contenga múltiples tipos de bloques y/o con otros grupos (por ejemplo, con grupos no poliméricos).

45 En algunas realizaciones, el polímero (por ej., copolímero, por ej., copolímero en bloque) puede ser anfifílico, es decir tener una porción hidrófila y una porción hidrófoba, o una porción relativamente hidrófila y una porción relativamente hidrófoba. Un polímero hidrófilo puede ser uno que generalmente atrae agua y un polímero hidrófobo puede ser uno que generalmente repele el agua. Se puede identificar un polímero hidrófilo o un polímero hidrófobo, por ejemplo, preparando una muestra del polímero y midiendo su ángulo de contacto con el agua (habitualmente, el polímero hidrófilo tendrá un ángulo de contacto menor de 60°, en tanto el polímero hidrófobo tendrá un ángulo de  
50 contacto mayor de alrededor de 60°). En algunos casos, la hidrofiliidad de dos o más polímeros se puede medir en uno con respecto al otro, es decir, un primer polímero puede ser más hidrófilo que un segundo polímero. Por ejemplo, el primer polímero puede tener un ángulo de contacto menor que el segundo polímero.

55 En un conjunto de realizaciones, un polímero (por ej. copolímero, por ej. copolímero en bloque) contemplado en este documento incluye un polímero biocompatible, es decir, el polímero que habitualmente no induce una respuesta adversa cuando se lo introduce o inyecta en un sujeto vivo, por ejemplo, sin una inflamación significativa y/o un rechazo agudo del polímero por el sistema inmunitario, por ejemplo, a través de la respuesta de los linfocitos T. Concordantemente, las partículas terapéuticas contempladas en este documento pueden ser no inmunógenas. La expresión no inmunógeno según se usa en este documento se refiere al factor de crecimiento endógeno en su  
60 estado nativo que normalmente no produce, o produce solo niveles mínimos de, anticuerpos circulantes, linfocitos T o células inmunorreactivas, y que normalmente no produce en el individuo una respuesta contra sí mismo.

Biocompatibilidad se refiere habitualmente al rechazo agudo de un material por al menos una porción del sistema inmunitario, es decir, un material no biocompatible implantado en un sujeto provoca una respuesta inmunitaria en el



sujeto que puede ser lo suficientemente grave para que el rechazo del material por el sistema inmunitario no pueda ser controlado adecuadamente, y a menudo es de tal magnitud que el material debe ser retirado del sujeto. Una prueba simple para determinar la biocompatibilidad puede ser exponer un polímero a las células in vitro; los polímeros biocompatibles son polímeros que generalmente no producen una muerte celular significativa a concentraciones moderadas, por ej., a concentraciones de 50 microgramos/10<sup>6</sup> células. Por ejemplo, un polímero biocompatible puede causar menos de alrededor de 20% de muerte celular cuando se expone a células como fibroblastos o células epiteliales, incluso si es fagocitado o absorbido de otra manera por dichas células. Los ejemplos no limitantes de polímeros biocompatibles que pueden ser útiles en diversas realizaciones de la presente invención incluyen polidioxanona (PDO), polihidroxiálcanoato, polihidroxi butirato, poli(sebacato de glicerol), poliglicólido, poliláctido, PLGA, policaprolactona o copolímeros o derivados que incluyen éstos y otros polímeros.

En ciertas realizaciones, los polímeros biocompatibles contemplados pueden ser biodegradables, es decir el polímero es capaz de degradarse, química y/o biológicamente en un ambiente fisiológico, como dentro del organismo. Según se usa en este documento, polímeros "biodegradables" son los que, cuando se introducen en las células, son escindidos por la maquinaria celular (biológicamente degradables) y/o por un proceso químico, como la hidrólisis, (químicamente degradables) en componentes que las células pueden reutilizar o desechar sin un efecto tóxico significativo sobre las células. En una realización, el polímero biodegradable y sus subproductos de degradación pueden ser biocompatibles.

Por ejemplo, un polímero contemplado puede ser uno que se hidrolice espontáneamente al exponerse al agua (por ej., dentro de un sujeto), el polímero se puede degradar al exponerse al calor (por ej., a temperatura entre alrededor de 37 °C). La degradación de un polímero puede ocurrir a diversas velocidades, dependiendo del polímero o copolímero utilizado. Por ejemplo, la vida media del polímero (el tiempo al cual 50% del polímero se puede degradar en monómeros y/u otros grupos no poliméricos) puede ser del orden de días, semanas, meses o años, dependiendo del polímero. Los polímeros pueden ser degradados biológicamente, es decir mediante actividad enzimática o la maquinaria celular, en algunos casos, por ejemplo, a través de la exposición a una lisozima (por ejemplo, que tengan un pH relativamente bajo). En algunos casos, los polímeros se pueden escindir en monómeros y/u otros grupos no poliméricos que las células pueden reutilizar o desechar sin efecto tóxico significativo sobre las células (por ejemplo, el poliláctido se puede hidrolizar para formar ácido láctico, el poliglicólido se puede hidrolizar para formar ácido glicólico, etc.).

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres, incluidos los copolímeros que comprenden unidades de ácido láctico y ácido glicólico, como poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) y poli(láctido-co-glicólido), designados colectivamente como "PLGA"; y homopolímeros que comprenden unidades de ácido glicólico, designados en este documento como "PGA," y unidades de ácido láctico, como ácido poli-L-láctico, ácido poli-D-láctico, ácido poli-D,L-láctico, poli-L-láctido, poli-D-láctido, y poli-D,L-láctido, designados colectivamente en este documento como "PLA". En algunas realizaciones, los ejemplos de poliésteres incluyen, por ejemplo, polihidroxiácidos; polímeros PEGilados y copolímeros de láctido y glicólido (por ej., PLA PEGilado, PGA PEGilado, PLGA PEGilado y sus derivados. En algunas realizaciones, los poliésteres incluyen, por ejemplo, polianhídridos, poli(orto éster), poli(orto éster) PEGilado, poli(caprolactona), poli(caprolactona) PEGilada, polilisina, polilisina PEGilada, poli(etilenimina), poli(etilenimina) PEGilada, poli(L-láctido-co-L-lisina), poli(éster serina), poli(éster 4-hidroxi-L-prolina), poli[ácido α-(4-aminobutil)-L-glicólico], y sus derivados.

En algunas realizaciones, un polímero puede ser PLGA. PLGA es un copolímero biocompatible y biodegradable de ácido láctico y ácido glicólico, y diversas formas de PLGA se pueden caracterizar mediante la relación ácido láctico:ácido glicólico. El ácido láctico puede ser ácido L-láctico, ácido D-láctico, o ácido D,L-láctico. La velocidad de degradación de PLGA se puede ajustar alterando la relación ácido láctico-ácido glicólico. En algunas realizaciones, el PLGA que se va a usar según la presente invención se puede caracterizar por una relación ácido láctico:ácido glicólico de aproximadamente 85:15, de aproximadamente 75:25, aproximadamente 60:40, aproximadamente 50:50, aproximadamente 40:60, de aproximadamente 25:75 o de aproximadamente 15:85. En algunas realizaciones, la relación entre los monómeros de ácido láctico y ácido glicólico en el polímero de la partícula (por ej., el copolímero en bloque PLGA o copolímero en bloque PLGA-PEG), se puede elegir para optimizar diversos parámetros como la absorción de agua; se pueden optimizar la liberación del agente terapéutico y/o la cinética de degradación del polímero.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser uno o más polímeros acrílicos. En ciertas realizaciones, los polímeros acrílicos incluyen, por ejemplo, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de amino alquil metacrilato, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), copolímero de ácido metacrílico alquilamida, poli(metacrilato de metilo), poli(ácido metacrílico poliacrilamida, copolímero de amino alquil metacrilato, copolímeros de metacrilato de glicidilo, policianoacrilatos y combinaciones que comprenden uno o más de los polímeros anteriores. El polímero acrílico puede comprender copolímeros totalmente polimerizados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un bajo contenido de grupos amonio cuaternario.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser polímeros catiónicos. En general, los polímeros catiónicos son capaces de condensar y/o proteger hebras de ácidos nucleicos cargadas negativamente (por ej., ADN, ARN o sus derivados). Polímeros que contienen amina como poli(lisina), polietileno imina (PEI), y dendrímeros poli(amidoamina) se consideran para usar, en algunas realizaciones, en una partícula dada a conocer.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres degradables que tienen cadenas laterales catiónicas. Los ejemplos de estos poliésteres incluyen poli(L-láctido-co-L-lisina), poli(éster serina), poli(éster 4-hidroxi-L-prolina).

Las partículas dadas a conocer en este documento pueden, o no, contener PEG. Además, ciertas realizaciones pueden apuntar a copolímeros que contienen varios poli(éster-éter), por ej., polímeros que tienen unidades repetidas unidas por enlaces éster (por ej., enlaces R-C(O)-O-R') y enlaces éter (por ej., enlaces R-OR'). En algunas realizaciones de la invención, un polímero biodegradable, como un polímero hidrolizable que contiene grupos ácido carboxílico, se puede conjugar con unidades repetidas de poli(etilenglicol) para formar un poli(éster-éter). Un polímero (por ej., copolímero, como un copolímero en bloque) que contiene unidades repetidas poli(etilenglicol) también se puede denominar un polímero "PEGilado".

Se contempla que PEG puede incluir un grupo en el extremo terminal, por ejemplo, cuando PEG no está conjugado a un ligando. Por ejemplo, PEG puede terminar en un hidroxilo, un metoxi u otro grupo alcoxilo, un grupo metilo u otro grupo alquilo, un grupo arilo, un ácido carboxílico, una amina, una amida, un grupo acetilo, un grupo guanidino o un imidazol. Otros grupos finales contemplados incluyen grupos azida, alquino, maleimida, aldehído, hidrazida, hidroxilamina, alcoxiamina o tiol.

Los expertos en el área conocerán métodos y técnicas para PEGilar un polímero, por ejemplo, utilizando EDC clorhidrato de (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y NHS (N-hidroxisuccinimida) para hacer reaccionar un polímero con un grupo PEG que termina en una amina, mediante técnicas de polimerización de apertura del anillo (ROMP), o análogos.

En una realización, el peso molecular de los polímeros se puede optimizar para el tratamiento eficaz como el dado a conocer en este documento. Por ejemplo, el peso molecular de un polímero puede influir en la velocidad de degradación de la partícula (como cuando el peso molecular de un polímero biodegradable se puede ajustar), la solubilidad, la absorción de agua y la cinética de liberación del fármaco. Por ejemplo, el peso molecular del polímero se puede ajustar de modo que la partícula se biodegrade en el sujeto en tratamiento en un período razonable de tiempo (que varíe desde unas pocas horas hasta 1-2 semanas, 3-4 semanas, 5-6 semanas, 7-8 semanas, etc.). Una partícula dada a conocer puede, por ejemplo, comprender un copolímero en dibloque de PEG y PL(G)A, donde por ejemplo, la porción PEG puede tener un peso molecular promedio en número entre alrededor de 1000-20 000, por ej., entre alrededor de 2000-20 000, por ej., entre alrededor de 2 y alrededor de 10 000, y la porción PL(G)A puede tener un peso molecular promedio en número entre alrededor de 5000 y alrededor de 20 000, o entre alrededor de 5000 y 100 000, por ej., entre alrededor de 20 000 y 70 000, por ej., entre alrededor de 15 000 y 50 000.

Por ejemplo, en este documento se da a conocer una nanopartícula terapéutica de ejemplo que incluye entre alrededor de 10 y alrededor de 99 por ciento en peso de copolímero de ácido poli(láctico)-bloque-poli(etilenglicol) o copolímero de ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-bloque-poli(etilenglicol), o entre alrededor de 20 y alrededor de 80 por ciento en peso, entre alrededor de 40 y alrededor de 80 por ciento en peso, o entre alrededor de 30 y alrededor de 50 por ciento en peso, o entre alrededor de 70 y alrededor de 90 por ciento en peso de copolímero de ácido poli(láctico)-poli(etilenglicol) o copolímero de ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-poli(etilenglicol). Los ejemplos de copolímeros ácido poli(láctico)-poli(etilenglicol) pueden incluir un peso molecular promedio en número entre alrededor de 15 y alrededor de 20 kDa, o entre alrededor de 10 y alrededor de 25 kDa de ácido poli(láctico) y un peso molecular promedio en número entre alrededor de 4 y alrededor de 6, o entre alrededor de 2 kDa y alrededor de 10 kDa de poli(etilenglicol).

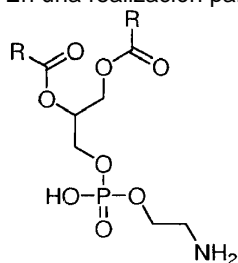
Las nanopartículas dadas a conocer pueden incluir opcionalmente entre alrededor de 1 y alrededor de 50 por ciento en peso de ácido poli(láctico) o ácido poli(láctico)-co-ácido poli(glicólico) (que no incluya PEG), o pueden opcionalmente incluir entre alrededor de 1 y alrededor de 50 por ciento en peso, o entre alrededor de 10 y alrededor de 50 por ciento en peso o entre alrededor de 30 y alrededor de 50 por ciento en peso de ácido poli(láctico) o ácido poli(láctico)-co-ácido poli(glicólico). Por ejemplo, el ácido poli(láctico) o el ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico) puede tener un peso molecular promedio en número entre alrededor de 5 y alrededor de 15 kDa, o entre alrededor de 5 y alrededor de 12 kDa. El PLA de ejemplo puede tener un peso molecular promedio en número entre alrededor de 5 y alrededor de 10 kDa. El PLGA de ejemplo puede tener un peso molecular promedio en número entre alrededor de 8 y alrededor de 12 kDa.

En ciertas realizaciones, los polímeros de las nanopartículas pueden estar conjugados a un lípido. El polímero puede ser, por ejemplo, PEG terminado en lípido. Según se describe antes, la porción lipídica del polímero se puede usar para el autoensamblaje con otro polímero, facilitando la formación de una nanopartícula. Por ejemplo, se podría conjugar un polímero hidrófilo con un lípido que se autoensamblará con un polímero hidrófobo.

En algunas realizaciones, los lípidos son aceites. En general, cualquier aceite conocido en el área se puede conjugar con los polímeros utilizados en la invención. En algunas realizaciones, un aceite puede comprender uno o más grupos ácido graso o sales de éstos. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede comprender, hidrocarburos digeribles de cadena larga (por ej., C<sub>8</sub>-C<sub>50</sub>), sustituidos o sin sustituir. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser un ácido graso C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub> o una de sus sales. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser un ácido graso C<sub>15</sub>-C<sub>20</sub> o una de sus sales. En algunas realizaciones, un ácido graso puede ser insaturado. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser monoinsaturado. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser poliinsaturado. En algunas realizaciones, un doble enlace de un grupo ácido graso insaturado puede estar en la conformación *cis*. En algunas realizaciones, un doble enlace de un grupo ácido graso insaturado puede estar en la conformación *trans*.

En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser uno más entre ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico o lignocérico. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser uno o más entre ácido palmitoleico, oleico, vaccénico, linoleico, alfa-linolénico, gamma-linoleico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico o erúxico.

En una realización particular, el lípido tiene la fórmula V:



(V)

y sus sales, donde cada R es, independientemente, alquilo C<sub>1-30</sub>. En una realización de fórmula V, el lípido es 1,2 diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), y sus sales, por ej. la sal de sodio.

En una realización, grupos para administración dirigida de molécula pequeña opcionales están unidos, por ej., enlazados covalentemente, al componente lipídico de la nanopartícula. Por ejemplo, en este documento se proporciona una nanopartícula que comprende un agente terapéutico, una matriz polimérica que comprende polímeros funcionalizados y no funcionalizados, y lípido, y un ligando de PSMA para administración dirigida de bajo peso molecular, donde el ligando para administración dirigida está unido, por ej., enlazado covalentemente, al componente lipídico de la nanopartícula. En una realización, el componente lipídico que está enlazado al grupo para administración dirigida de bajo peso molecular tiene la fórmula V. En otra realización, la invención proporciona una nanopartícula específica para el objetivo que comprende un agente terapéutico, una matriz polimérica, DSPE, y un ligando de PSMA para administración dirigida de bajo peso molecular, donde el ligando está unido, por ej., enlazado covalentemente, a DSPE. Por ejemplo, la nanopartícula de la invención puede comprender una matriz polimérica constituida por PLGA-DSPE-PEG-Ligando.

Una nanopartícula contemplada puede incluir una relación entre polímero unido a ligando y polímero no funcionalizado eficaz para el tratamiento del cáncer de próstata, donde el polímero hidrófilo unido al ligando, se conjuga a un lípido que se autoensamblará con el polímero hidrófobo, de modo que los polímeros hidrófobo e hidrófilo que constituyen la nanopartícula no estén enlazados covalentemente. "Autoensamblaje" se refiere a un proceso de ensamblaje espontáneo de una estructura de orden superior que depende de la atracción natural de los componentes de la estructura de orden superior (por ej., moléculas) entre sí. Se produce típicamente a través de movimientos aleatorios de las moléculas y la formación de enlaces basados en el tamaño, la forma, la composición o las propiedades químicas. Por ejemplo, dicho método consiste en proporcionar un primer polímero que se hace reaccionar con un lípido para formar un conjugado polímero/lípido. El conjugado polímero/lípido se hace reaccionar después con el ligando de bajo peso molecular para preparar un conjugado polímero unido a ligando/lípido; y se mezcla el conjugado polímero unido a ligando/lípido con un segundo polímero no funcionalizado y el agente terapéutico; de modo que se forme la nanopartícula. En ciertas realizaciones, el primer polímero es PEG, de modo que se forma un PEG terminado en lípido. En una realización, el lípido tiene la fórmula V, por ej., 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), y sus sales, como la sal de sodio. Después el PEG terminado en lípido se puede, por ejemplo, mezclar con PLGA para formar una nanopartícula.

Grupos para administración dirigida

En este documento se proporcionan nanopartículas que pueden incluir un grupo para administración dirigida opcional, es decir un grupo capaz de unirse o asociarse de otra manera a una entidad biológica, por ejemplo, un

componente de membrana, un receptor de superficie celular, un antígeno prostático específico de membrana o similares. Un grupo para administración dirigida presente en la superficie de la partícula puede permitir que la partícula se localice en un sitio particular que es el objetivo, por ejemplo, un tumor, un sitio de enfermedad, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. Como tal, la nanopartícula puede ser entonces "específica para el objetivo". El fármaco, o carga útil, puede después, en algunos casos, ser liberado de la partícula y habilitado a interactuar localmente con el sitio particular que es el objetivo.

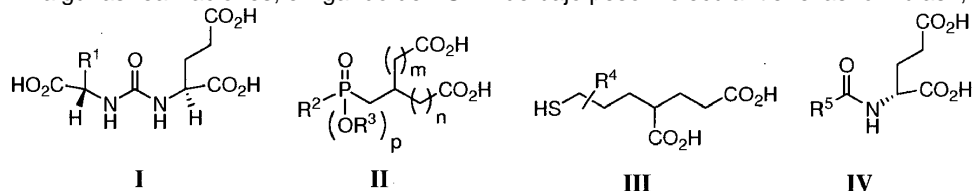
En una realización, una nanopartícula dada a conocer incluye un grupo para administración dirigida que es un ligando de bajo peso molecular, por ej., un ligando de PSMA de bajo peso molecular. El término "unirse" o "que se une", según se usa en este documento, se refiere a la interacción entre un par correspondiente de moléculas o sus porciones que tienen afinidad mutua o capacidad de unión, típicamente debido a una unión o interacción específica o no específica, incluidas, pero no exclusivamente, las interacciones bioquímicas, fisiológicas y/o químicas. "Unión biológica" define un tipo de interacción que se produce entre pares de moléculas que incluyen proteínas, ácidos nucleicos, glucoproteínas, carbohidratos, hormonas o similares. La expresión "contraparte de la unión" se refiere a una molécula que puede unirse a otra molécula particular. "Unión específica" se refiere a moléculas, como polinucleótidos, que son capaces de unirse o reconocer a una contraparte de unión (o a un número limitado de contrapartes de unión) en mayor medida que a otras entidades biológicas similares. En un conjunto de realizaciones, el grupo para administración dirigida tiene una afinidad (medida a través de la constante de desasociación) menor de alrededor de 1 micromolar, al menos de alrededor de 10 micromolar, o al menos de alrededor de 100 micromolar.

Por ejemplo, una porción para administración dirigida puede hacer que las partículas se localicen en un tumor (por ejemplo un tumor sólido), un sitio de enfermedad, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. en el organismo de un sujeto, dependiendo del grupo para administración dirigida utilizado. Por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular se puede localizar en un tumor sólido, por ej., tumores de mama o próstata, o células cancerosas. El sujeto puede ser un humano o un animal no humano. Los ejemplos de sujetos incluyen, pero no exclusivamente, un mamífero como un perro, un gato, un caballo, un burro, un conejo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, una rata, un ratón, un cobayo, un hámster, un primate, un humano o análogos.

Los grupos para administración dirigida contemplados incluyen moléculas pequeñas. En ciertas realizaciones, la expresión "molécula pequeña" se refiere a compuestos orgánicos, ya sean naturales o creados artificialmente (por ej., por síntesis química) que tienen peso molecular relativamente bajo y que no son proteínas, polipéptidos ni ácidos nucleicos. Las moléculas pequeñas tienen habitualmente múltiples enlaces carbono-carbono. En ciertas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen menos de alrededor de 2000 g/mol de tamaño. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen menos de alrededor de 1500 gramos/mol o menos de alrededor de 1000 g/mol. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen menos de alrededor de 800 g/mol o menos de alrededor de 500 g/mol, por ejemplo entre alrededor de 100 g/mol y alrededor de 600 g/mol, o entre alrededor de 200 g/mol y alrededor de 500 g/mol.

Por ejemplo un grupo para administración dirigida puede dirigirse a tumores de cáncer prostático, por ejemplo un grupo para administración dirigida puede ser el inhibidor de la peptidasa PSMA. Éstos grupos también se denominan en este documento "ligandos de PSMA de bajo peso molecular". Cuando se compara con la expresión en tejidos normales, la expresión del antígeno prostático específico de membrana (PSMA) está al menos sobreexpresada 10 veces en el tumor de próstata con respecto al tejido normal, y el nivel de expresión de PSMA aumenta aún más a medida que la enfermedad progresa a las fases metastásicas (Silver et al. 1997, Clin. Cancer Res., 3:81).

En algunas realizaciones, el ligando de PSMA de bajo peso molecular tiene las fórmulas I, II, III o IV:



y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos;

donde m y n cada uno, independientemente, es 0, 1, 2 o 3; p es 0 o 1;

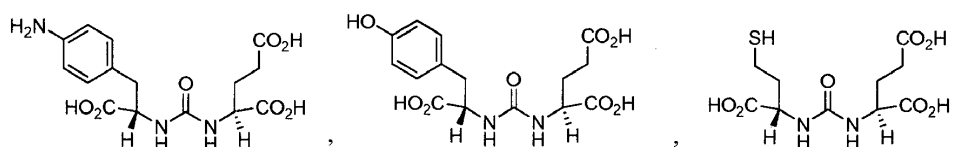
R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup>, cada uno, independientemente, se elige del grupo que consiste en alquilo sustituido o sin sustituir (por ej., C<sub>1-10</sub>-alquilo, C<sub>1-6</sub>-alquilo o C<sub>1-4</sub>-alquilo), arilo sustituido o sin sustituir (por ej., fenilo o piridinilo), y cualquiera de sus combinaciones; y R<sup>3</sup> es H o C<sub>1-6</sub>-alquilo (por ej., CH<sub>3</sub>).

Para los compuestos de fórmulas I, II, III y IV, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> o R<sup>5</sup> comprenden puntos de unión a la nanopartícula, por ej., un punto de unión a un polímero que forma parte de una nanopartícula dada a conocer, como PEG. El punto de unión puede estar formado por un enlace covalente, un enlace iónico, un enlace de hidrógeno, un enlace formado por adsorción incluidas la adsorción química y la adsorción física, un enlace formado a partir de enlaces de van der

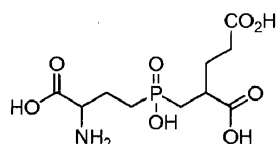
Waals, o fuerzas de dispersión. Por ejemplo, si  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^4$  o  $R^5$  se definen como una anilina o un grupo  $C_{1-6}$ -alquil- $NH_2$ , cualquier hidrógeno (por ej., un hidrógeno amino) de esos grupos funcionales podría ser eliminado de forma que el ligando de PSMA de bajo peso molecular se una covalentemente a la matriz polimérica (por ej., el bloque PEG de la matriz polimérica) de la nanopartícula. Según se usa en este documento, la expresión "enlace covalente" se refiere a un enlace entre dos átomos formado compartiendo al menos un par de electrones.

En realizaciones particulares de las fórmulas I, II, III o IV,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^4$  y  $R^5$  cada uno, independientemente, es  $C_{1-6}$ -alquilo o fenilo, o cualquier combinación de  $C_{1-6}$ -alquilo o fenilo, que están independientemente sustituidos una o más veces con OH, SH,  $NH_2$  o  $CO_2H$ , y donde el grupo alquilo puede estar interrumpido por N(H), S o O. En otra realización, por ejemplo,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^4$  y  $R^5$  cada uno, independientemente, es  $CH_2$ -Ph,  $(CH_2)_2$ -SH,  $CH_2$ -SH,  $(CH_2)_2C(H)(NH_2)CO_2H$ ,  $CH_2C(H)(NH_2)CO_2H$ ,  $CH(NH_2)CH_2CO_2H$ ,  $(CH_2)_2C(H)(SH)CO_2H$ ,  $CH_2-N(H)$ -Ph, O- $CH_2$ -Ph o O- $(CH_2)_2$ -Ph, donde cada Ph puede estar independientemente sustituido una o más veces con OH,  $NH_2$ ,  $CO_2H$  o SH. Para estas fórmulas, los grupos  $NH_2$ , OH o SH sirven como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por ej., -N(H)-PEG, -O-PEG o -S-PEG).

Aún en otra realización, el ligando de PSMA de bajo peso molecular se elige del grupo que consiste en

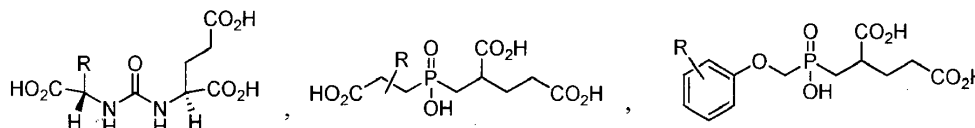


y

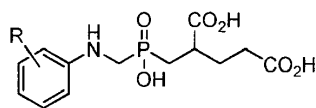


y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos, y donde los grupos  $NH_2$ , OH o SH sirven como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por ej., -N(H)-PEG, -O-PEG o -S-PEG).

En otra realización, el ligando de PSMA de bajo peso molecular se elige del grupo que consiste en

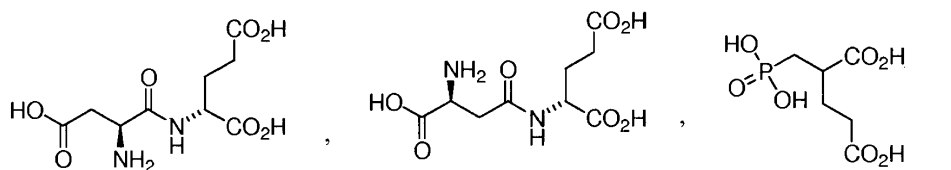


y

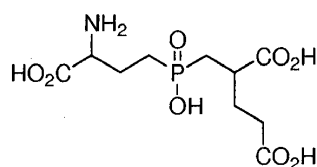


y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos; donde R se elige independientemente del grupo que consiste en  $NH_2$ , SH, OH,  $CO_2H$ ,  $C_{1-6}$ -alquilo que está sustituido con  $NH_2$ , SH, OH o  $CO_2H$ , y fenilo que está sustituido con  $NH_2$ , SH, OH o  $CO_2H$ , y donde R sirve como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por ej., -N(H)-PEG, -S-PEG, -O-PEG o  $CO_2$ -PEG).

En otra realización, el ligando de PSMA de bajo peso molecular se elige del grupo que consiste en

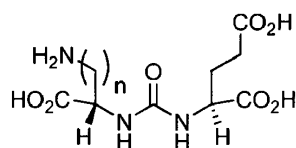


y



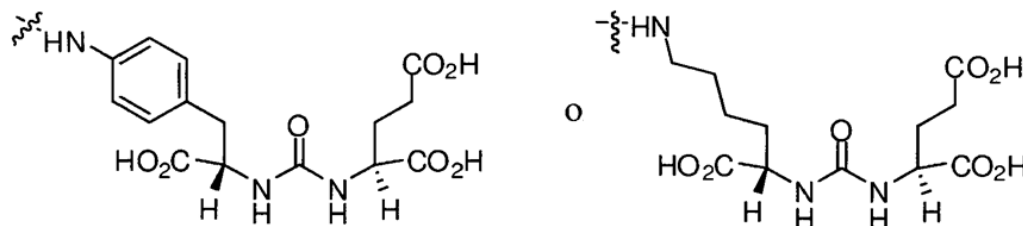
5 y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos, y donde los grupos NH<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>H sirven como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por ej., -N(H)-PEG o CO<sub>2</sub>-PEG). Estos compuestos se pueden sustituir además con NH<sub>2</sub>, SH, OH, CO<sub>2</sub>H, C<sub>1-6</sub>-alquilo que está sustituido con NH<sub>2</sub>, SH, OH o CO<sub>2</sub>H, o fenilo que está sustituido con NH<sub>2</sub>, SH, OH o CO<sub>2</sub>H, donde estos grupos funcionales pueden también servir como el punto de unión covalente a la nanopartícula.

En otra realización, el ligando de PSMA de bajo peso molecular es



10 y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos, y donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Para este ligando, el grupo NH<sub>2</sub> sirve como punto de unión covalente a la nanopartícula (por ej., -N(H)-PEG).

15 Aún en otra realización, el ligando de PSMA de bajo peso molecular es



20 y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos. Particularmente, el compuesto butilamina tiene la ventaja de una síntesis fácil, especialmente debido a la falta de un anillo benceno. Además, sin querer vernos restringidos por una teoría, el compuesto butilamina se escindiría probablemente en las moléculas naturales (es decir, lisina y ácido glutámico) minimizando así los problemas de toxicidad.

25 En algunas realizaciones, los grupos para administración dirigida de molécula pequeña que se pueden usar para tratar células asociadas a tumores sólidos como los tumores del cáncer de próstata o mama incluyen inhibidores de la peptidasa PSMA como 2-PMPA, GPI5232, VA-033, fenilalquilfosfonamidatos y/o sus análogos y derivados. En algunas realizaciones, los grupos para administración dirigida de molécula pequeña que se pueden usar para tratar células asociadas a tumores de cáncer prostático incluyen tiol y derivados indol tiol, como 2-MPPA y derivados del ácido 3-(2-mercaptoetil)-1H-indol-2-carboxílico. En algunas realizaciones, los grupos para administración dirigida de molécula pequeña que se pueden usar para tratar células asociadas a tumores de cáncer prostático incluyen derivados de hidroxamato. En algunas realizaciones, los grupos para administración dirigida de molécula pequeña que se pueden usar para tratar células asociadas a tumores de cáncer prostático incluyen inhibidores a base de urea y PBDA, como ZJ 43, ZJ 11, ZJ 17, ZJ 38 y/o sus análogos y derivados, agentes dirigidos a receptores de andrógenos (ARTA), poliaminas, como putrescina, espermina y espermidina e inhibidores de la enzima glutamato carboxilasa II (GCPII), también conocida como peptidasa NAAG o NAALADasa.

35 En otra realización de la invención actual, el grupo para administración dirigida puede ser un ligando dirigido a Her2, EGFR o receptores toll.

40 Por ejemplo, los grupos para administración dirigida contemplados pueden incluir un ácido nucleico, un polipéptido, una glucoproteína, un carbohidrato o un lípido. Por ejemplo, un grupo para administración dirigida puede ser un grupo para administración dirigida ácido nucleico (por ej., un aptámero, como el aptámero A10) que se une a un marcador específico de un tipo de células. En general, un aptámero es un oligonucleótido (por ej., ADN, ARN o uno de sus análogos o derivados) que se une a un objetivo particular, como un polipéptido. En algunas realizaciones, un grupo para administración dirigida puede ser un ligando natural o sintético para un receptor de la superficie celular, por ej., un factor de crecimiento, una hormona, LDL, transferrina, etc. Un grupo para administración dirigida puede ser un anticuerpo, término que pretende incluir fragmentos de anticuerpo, porciones características de anticuerpos,

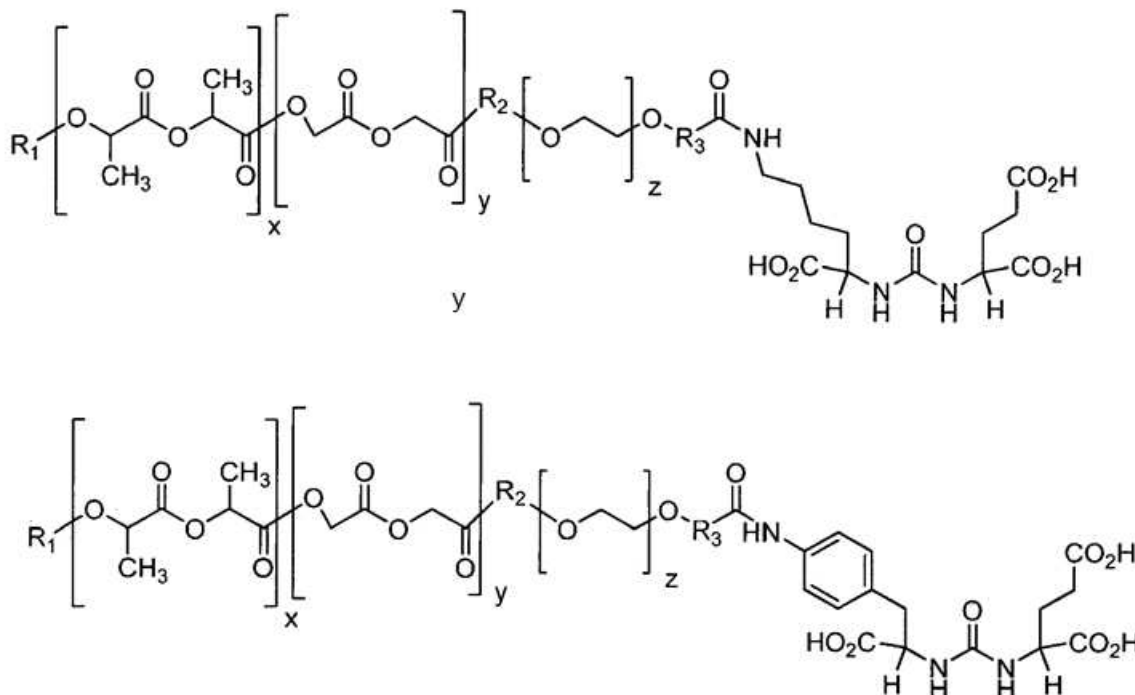
los grupos para administración dirigida de una sola cadena se pueden identificar, por ej., usando procedimientos como presentación en fago.

5 Los grupos para administración dirigida que pueden ser un péptido para administración dirigida o un peptidomimético para administración dirigida tienen una longitud de hasta alrededor de 50 residuos. Por ejemplo, un grupo para administración dirigida puede incluir la secuencia de aminoácidos AKERC, CREKA, ARYLQKLN o AXYLZZLN, donde X y Z son aminoácidos variables, o sus variantes conservadoras o peptidomiméticos. En realizaciones particulares, el grupo para administración dirigida es un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos AKERC, 10 CREKA, ARYLQKLN o AXYLZZLN, donde X y Z son aminoácidos variables, y tiene una longitud de menos de 20, 50 o 100 residuos. El péptido CREKA (Cys Arg Glu Lys Ala) o un péptidomimético de éste o el octapéptido AXYLZZLN también se contemplan como grupos para administración dirigida, así como los péptidos, o variantes conservadoras o peptidomiméticos de éste, que se unen o forman un complejo con colágeno IV, o la membrana basal de los tejidos objetivo (por ej., la membrana basal de un vaso sanguíneo), se puede usar como un grupo para administración dirigida. Los ejemplos de grupos para administración dirigida incluyen péptidos que se dirigen a ICAM (molécula de 15 adhesión intercelular, por ej. ICAM-1).

Los grupos para administración dirigida dados a conocer en este documento se conjugan típicamente con un polímero o copolímero dado a conocer (por ej. PLA-PEG), y dicho conjugado polimérico puede formar parte de una nanopartícula dada a conocer. Por ejemplo, una nanopartícula terapéutica dada a conocer puede incluir 20 opcionalmente entre alrededor de 0.2 y alrededor de 10 por ciento en peso de un PLA-PEG o PLGA-PEG, donde el PEG está funcionalizado con un ligando para administración dirigida (por ej. PLA-PEG-Ligando). Las nanopartículas terapéuticas contempladas pueden incluir, por ejemplo, entre alrededor de 0.2 y alrededor de 10 moles por ciento de PLA-PEG-GL2 o ácido poli(láctico)-co-ácido poli(glicólico)-PEG-GL2. Por ejemplo, PLA-PEG-GL2 puede incluir un peso molecular promedio en número entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 20 kDa un peso molecular promedio en número entre alrededor de 4000 y alrededor de 8000.

Dicho ligando para administración dirigida puede estar, en algunas realizaciones, unido covalentemente al PEG, por ejemplo, unido al PEG a través de un enlazador alquileo, por ej. PLA-PEG-alquileo-GL2. Por ejemplo, una nanopartícula dada a conocer puede incluir entre alrededor de 0.2 y alrededor de 10 moles por ciento de PLA-PEG-GL2 o ácido poli(láctico)-co-ácido poli(glicólico)-PEG-GL2. Se debe entender que la referencia a PLA-PEG-GL2 o PLGA-PEG-GL2 se refiere a grupos que pueden incluir un enlazador alquileo (por ej. C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, por ej., (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>) que 30 una un PLA-PEG o PLGA-PEG a GL2.

Los ejemplos de conjugados poliméricos incluyen:

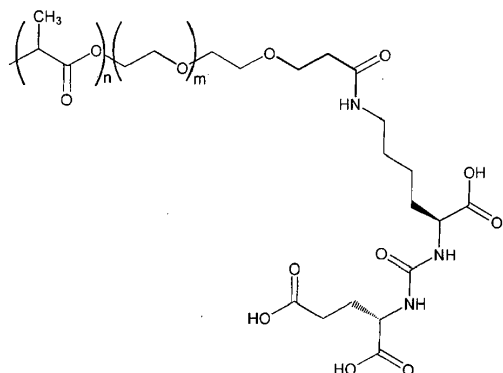


35 donde R<sub>1</sub> se elige del grupo que consiste en H, y un grupo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>alquilo opcionalmente sustituido con uno, dos, tres o más halógenos;  
 R<sub>2</sub> es un enlace, una unión éster o una unión amida;  
 R<sub>3</sub> es un C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>alquileo o un enlace;

x es entre 50 y alrededor de 1500, o entre alrededor de 60 y alrededor de 1000;  
 y es entre 0 y alrededor de 50; y  
 z es entre alrededor de 30 y alrededor de 200, o entre alrededor de 50 y alrededor de 180.

- 5 En una realización diferente, x representa entre 0 y alrededor de 1 fracción molar; e y puede representar entre alrededor de 0 y alrededor de 0.5 fracción molar. En una realización de ejemplo, x+y puede ser entre alrededor de 20 y alrededor de 1720, y/o z puede ser entre alrededor de 25 y alrededor de 455.

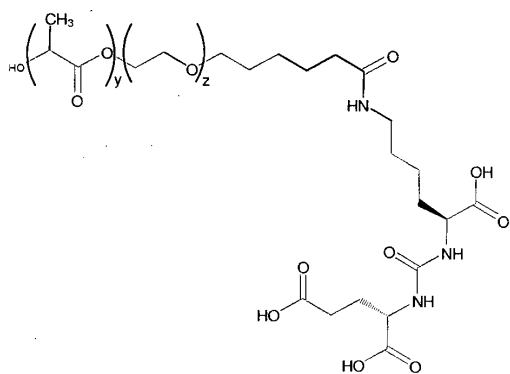
- 10 Por ejemplo, una nanopartícula dada a conocer puede incluir un grupo polimérico para administración dirigida representado por la fórmula VI:



- 15 donde n es entre alrededor de 200 y alrededor de 300, por ej., de alrededor de 222, y m es entre alrededor de 80 y alrededor de 130, por ej. de alrededor de 114. Las nanopartículas dadas a conocer, en ciertas realizaciones, pueden incluir entre alrededor de 0.1 y alrededor de 4% en peso de, por ejemplo, un conjugado polimérico de fórmula VI, o entre alrededor de 0.1 y alrededor de 2% o entre alrededor de 0.1 y alrededor de 1%, o entre alrededor de 0.2% y alrededor de 0.8% en peso de, por ejemplo, un conjugado polimérico de fórmula VI.

- 20 En un ejemplo de realización, una nanopartícula dada a conocer consiste en una nanopartícula que tiene un conjugado PLA-PEG-alkileno-GL2, donde, por ejemplo, PLA tiene un peso molecular promedio en número de alrededor de 16 000 Da, PEG tiene un peso molecular promedio en número de alrededor de 5000 Da, y por ej., El enlazador alquileo es un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, por ej. (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>.

- 25 Por ejemplo, una nanopartícula dada a conocer puede incluir un conjugado representado por:



- 30 donde y es alrededor de 222 y z es alrededor de 114.

- 35 Un conjugado polimérico dado a conocer se puede formar usando cualquier técnica de conjugación adecuada. Por ejemplo, dos compuestos como un grupo para administración dirigida y un polímero biocompatible, un polímero biocompatible y un poli(etilenglicol), etc., se pueden conjugar entre sí usando técnicas como química de EDC-NHS clorhidrato de (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida) o una reacción que involucre una maleimida o un ácido carboxílico, que se pueden conjugar a un extremo de un tiol, una amina o un poliéter similarmente funcionalizado. La conjugación de dichos polímeros, por ejemplo, la conjugación de un poli(éster) y un poli(éter) para formar un poli(éster-éter), se puede llevar a cabo en un solvente orgánico, como, pero no exclusivamente, diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida, tetrahidrofurano, acetona o análogos. Las



condiciones de reacción específicas pueden ser determinadas por los expertos en el área utilizando simplemente la experimentación de rutina.

En otro conjunto de realizaciones, se puede llevar a cabo una reacción de conjugación haciendo reaccionar un polímero que comprende un grupo funcional ácido carboxílico (por ej., un compuesto poli(éster-éter)) con un polímero u otro grupo (como un grupo para administración dirigida) que comprenda una amina. Por ejemplo, un grupo para administración dirigida, como un ligando de PSMA de bajo peso molecular, se puede hacer reaccionar con una amina para formar un grupo que contenga amina, que después se puede conjugar al ácido carboxílico del polímero. Dicha reacción se puede producir como una reacción de un solo paso, es decir, la conjugación se realiza sin utilizar productos intermedios como N-hidroxisuccinimida o una maleimida. La reacción de conjugación entre el grupo que contiene amina y el polímero terminado en ácido carboxílico (como un compuesto poli(éster-éter)) se puede lograr, en un conjunto de realizaciones, agregando el grupo que contiene amina solubilizado en un solvente orgánico como (pero no exclusivamente) diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, tetrahidrofurano, acetona, formamida, dimetilformamida, piridinas, dioxano o dimetilsulfóxido, a una solución que contiene el polímero terminado en ácido carboxílico. El polímero terminado en ácido carboxílico puede estar contenido en un solvente orgánico como, pero no exclusivamente, diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida, tetrahidrofurano o acetona. La reacción entre el grupo que contiene amina y el polímero terminado en ácido carboxílico puede, en algunos casos, producirse espontáneamente. Los reactivos no conjugados se pueden eliminar por lavado después de dichas reacciones, y el polímero se puede precipitar en solventes como, por ejemplo, éter etílico, hexano, metanol o etanol.

Como ejemplo específico, un ligando de PSMA de bajo peso molecular se puede preparar como un grupo para administración dirigida en una partícula de la manera siguiente. Se puede conjugar poli(láctido-co-glicólido) (PLGA-COOH) modificado con ácido carboxílico a un poli(etilenglicol) ( $\text{NH}_2$ -PEG-COOH) heterobifuncional modificado con amina para formar un copolímero de PLGA-PEG-COOH. Utilizando un ligando de PSMA de bajo peso molecular modificado con amina ( $\text{NH}_2$ -Lig), se puede formar un polímero en tribloque de PLGA-PEG-Lig conjugando el extremo ácido carboxílico del PEG al grupo funcional amina del ligando. El polímero multibloque se puede usar después, por ejemplo, como se trató antes, por ej., para aplicaciones terapéuticas.

Según se usa en este documento, el término "alquilo" comprende grupos alifáticos saturados, incluidos grupos alquilo de cadena lineal (por ej., metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, etc.), grupos alquilo de cadena ramificada (isopropilo, tert-butilo, isobutilo, etc.), grupos cicloalquilo (alíciclicos) (ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo), grupos cicloalquilo alquil sustituidos, y grupos alquilo cicloalquil sustituidos.

El término "arilo" comprende grupos, incluidos grupos aromáticos de un solo anillo de 5 y 6 miembros que pueden tener de cero a cuatro heteroátomos, por ejemplo, fenilo, pirrol, furano, tiofeno, tiazol, isotiazol, imidazol, triazol, tetrazol, pirazol, oxazol, isoxazol, piridina, pirazina, piridazina, pirimidina y análogos. Además, el término "arilo" incluye grupos arilo multicíclicos, por ejemplo, tricíclicos, bicíclicos, como naftaleno, benzoxazol, benzodioxazol, benzotiazol, bencimidazol, benzotiofeno, metilendioxiifenilo, quinolina, isoquinolina, antrilo, fenantrilo, naftridina, indol, benzofurano, purina, benzofurano, deazapurina o indolizina. Los grupos arilo que tienen heteroátomos en la estructura del anillo también se pueden denominar "aril heterociclos", "heterociclos", "heteroarilos" o "heteroaromáticos". El anillo aromático puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo con sustituyentes como los descritos antes, por ejemplo, alquilo, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcocarbonilo, ariloxicarbonilo, carboxilato, alquilcarbonilo, alquilaminocarbonilo, aralquilaminocarbonilo, alquenilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, aralquilcarbonilo, alquenilcarbonilo, alcocarbonilo, aminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluidos alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluidos alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarbonilato, sulfatos, alquilsulfino, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo, o un grupo aromático o heteroaromático. Los grupos arilo también se pueden fusionar o unir por puentes anillos alíciclicos o heterocíclicos que no sean aromáticos para formar un policiclo (por ej., tetralina).

Los grupos para administración dirigida pueden estar, por ejemplo, sustituidos adicionalmente con un grupo funcional que se puede hacer reaccionar con un polímero de la invención (por ej., PEG) para producir un polímero conjugado a un grupo para administración dirigida. Los grupos funcionales incluyen cualquier grupo que se pueda usar para crear un enlace covalente con un polímero (por ej., PEG), como amino, hidroxilo y tio. En una realización particular, las moléculas pequeñas pueden estar sustituidas con  $\text{NH}_2$ , SH u OH, los cuales están unidos directamente a la molécula pequeña, o unidos a la molécula pequeña a través de un grupo adicional, por ej., alquilo o fenilo. En un ejemplo no limitante, las moléculas pequeñas dadas a conocer en las patentes, solicitudes de patentes y la bibliografía que no es de patentes citada en este documento, se pueden unir a anilina, alquil- $\text{NH}_2$  (por ej.,  $(\text{CH}_2)_{1-6}\text{NH}_2$ ), o alquil-SH (por ej.,  $(\text{CH}_2)_{1-6}\text{NH}_2$ ), donde los grupos  $\text{NH}_2$  y SH se pueden hacer reaccionar con un polímero (por ej., PEG), para formar un enlace covalente con ese polímero, es decir, formar un conjugado polimérico.

Por ejemplo, en este documento se da a conocer una partícula que tiene un agente terapéutico; y una primera macromolécula que comprende un copolímero PLGA-PEG o un copolímero PLA-PEG conjugado a un ligando que tiene un peso molecular entre alrededor de 100 g/mol y 500 g/mol donde el copolímero PLGA-PEG o el copolímero PLA-PEG que está conjugado al ligando, representa entre alrededor de 0.1 y alrededor de 30 moles por ciento del contenido total de polímero, o entre alrededor de 0.1 y alrededor de 20 moles por ciento, o entre alrededor de 0.1 y alrededor de 10 moles por ciento o entre alrededor de 1 y alrededor de 5 moles por ciento del contenido total de polímero de una nanopartícula. Dicha nanopartícula puede incluir además una segunda macromolécula que comprenda un copolímero PLGA-PEG o un copolímero PLA-PEG, donde el copolímero no está unido a un grupo para administración dirigida; y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el primer copolímero puede tener entre alrededor de 0.001 y 5 por ciento en peso del ligando con respecto al contenido total de polímero.

Las nanopartículas de ejemplo pueden incluir un agente terapéutico; y una composición polimérica, donde la composición polimérica comprende una primera macromolécula que comprende un primer polímero unido a un ligando; y una segunda macromolécula que comprende un segundo polímero no unido a un grupo para administración dirigida; donde la composición polimérica contiene entre alrededor de 0.001 y alrededor de 5.0 por ciento en peso de dicho ligando. Dichos ligandos pueden tener un peso molecular entre alrededor de 100 g/mol y alrededor de 6000 g/mol, o menos de alrededor de 1000 g/mol, por ej. entre alrededor de 100 g/mol y alrededor de 500 g/mol. En otra realización, se proporciona en este documento una composición farmacéutica, que comprende una pluralidad de nanopartículas poliméricas específicas para el objetivo que cada una comprende un agente terapéutico; y una composición polimérica, donde la composición polimérica contiene entre alrededor de 0.1 y alrededor de 30 moles por ciento, o entre alrededor de 0.1 y alrededor de 20 moles por ciento, o entre alrededor de 0.1 y alrededor de 10 moles por ciento de una primera macromolécula que comprende un primer polímero unido a un ligando; y una segunda macromolécula que comprende un segundo polímero no unido a un grupo para administración dirigida; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

#### Nanopartículas

Las nanopartículas dadas a conocer pueden tener una configuración sustancialmente esférica (es decir las partículas parecen en general ser esféricas), o no esférica. Por ejemplo, las partículas, luego de hinchadas o encogidas, pueden adoptar una configuración no esférica. En algunos casos, las partículas pueden incluir mezclas poliméricas. Por ejemplo, se puede formar una mezcla polimérica de modo que incluya un primer polímero que comprenda un grupo para administración dirigida (es decir, un ligando de PSMA de bajo peso molecular) y un polímero biocompatible, y un segundo polímero que comprenda un polímero biocompatible pero no comprenda el grupo para administración dirigida. Controlando la relación entre el primer y segundo polímeros en el polímero final, la concentración y la ubicación del grupo para administración dirigida en el polímero final pueden ser fácilmente controladas hasta cierta medida.

Las nanopartículas dadas a conocer pueden tener una dimensión característica de menos de alrededor de 1 micrómetro, donde la dimensión característica de la partícula es el diámetro de una esfera perfecta que tiene el mismo volumen que una partícula. Por ejemplo, la partícula puede tener una dimensión característica de partícula que puede ser menos de alrededor de 300 nm, menos de alrededor de 200 nm, menos de alrededor de 150 nm, menos de alrededor de 100 nm, menos de alrededor de 50 nm, menos de alrededor de 30 nm, menos de alrededor de 10 nm, menos de alrededor de 3 nm o menos de alrededor de 1 nm en algunos casos. En realizaciones particulares, la nanopartícula de la presente invención tiene un diámetro entre alrededor de 80 nm y 200 nm, entre alrededor de 60 nm y alrededor de 150 nm o entre alrededor de 70 nm y alrededor de 200 nm.

En un conjunto de realizaciones, las partículas pueden tener un interior y una superficie, donde la superficie tiene una composición diferente del interior, es decir, puede haber al menos un compuesto presente en el interior que no está presente en la superficie (o vice versa), y/o al menos un compuesto está presente en el interior y en la superficie a concentraciones diferentes. Por ejemplo, en una realización, un compuesto como un grupo para administración dirigida (es decir, un ligando de bajo peso molecular) de un conjugado polimérico de la presente invención, puede estar presente tanto en el interior como en la superficie de la partícula, pero a una concentración mayor en la superficie que en el interior de la partícula, aunque en algunos casos, la concentración en el interior de la partícula puede ser esencialmente distinta de cero, es decir, que hay una cantidad detectable del compuesto presente en el interior de la partícula.

En algunos casos, el interior de la partícula es más hidrófobo que la superficie de la partícula. Por ejemplo, el interior de la partícula puede ser relativamente hidrófobo con respecto a la superficie de la partícula, y un fármaco, u otra carga útil, puede ser hidrófobo, y asociarse fácilmente con el centro relativamente hidrófobo de la partícula. El fármaco, u otra carga útil, puede entonces estar contenido en el interior de la partícula, que la puede resguardar del entorno externo que rodea la partícula (o vice versa). Por ejemplo, un fármaco u otra carga útil contenida en la partícula administrada a un sujeto estará protegida del organismo del sujeto, y el sujeto también estará aislado del fármaco. Aún otro aspecto de la invención apunta a partículas poliméricas que tienen más de un polímero o una

macromolécula presente, y colecciones que involucran dichos polímeros o macromoléculas. Por ejemplo, en un conjunto de realizaciones, las partículas pueden contener más de un polímero distinguible (por ej., copolímeros como copolímeros en bloque), y las relaciones entre los dos (o más) polímeros puede ser controlada independientemente, lo que permite controlar las propiedades de la partícula. Por ejemplo, un primer polímero puede ser un conjugado polimérico que comprenda un grupo para administración dirigida y una porción biocompatible, y un segundo polímero puede comprender una porción biocompatible pero no contener el grupo para administración dirigida, o el segundo polímero puede contener una porción biocompatible distinguible del primer polímero. El control de las cantidades de estos polímeros dentro de la partícula polimérica se puede usar entonces para controlar diversas propiedades físicas, biológicas o químicas de la partícula, por ejemplo, el tamaño de la partícula (por ej., variando los pesos moleculares de uno o ambos polímeros), la carga superficial (por ej., controlando las relaciones entre los polímeros si los polímeros tienen cargas o grupos terminales diferentes), la hidrofiliidad superficial (por ej., si los polímeros tienen pesos moleculares y/o hidrofiliidades diferentes), la densidad superficial del grupo para administración dirigida (por ej., controlando las relaciones entre los dos o más polímeros), etc.

Como ejemplo específico, una partícula puede comprender un primer polímero en dibloque que comprenda un poli(etilenglicol) y un grupo para administración dirigida conjugado al poli(etilenglicol), y un segundo polímero que comprenda el poli(etilenglicol) pero no el grupo para administración dirigida, o comprender tanto el poli(etilenglicol) como el grupo para administración dirigida, donde el poli(etilenglicol) del segundo polímero tiene una longitud diferente (o número de unidades repetidas) que el poli(etilenglicol) del primer polímero. Como otro ejemplo, una partícula puede comprender un primer polímero que comprenda una primera porción biocompatible y un grupo para administración dirigida, y un segundo polímero que comprenda una segunda porción biocompatible diferente de la primera porción biocompatible (por ej., que tenga una composición diferente, un número sustancialmente diferente unidades repetidas, etc.) y el grupo para administración dirigida. Como aún otro ejemplo, un primer polímero puede comprender una porción biocompatible y un primer grupo para administración dirigida, y un segundo polímero puede comprender una porción biocompatible y un segundo grupo para administración dirigida diferente del primer grupo para administración dirigida.

Por ejemplo, en este documento se da a conocer una nanopartícula polimérica terapéutica capaz de unirse a un objetivo, que comprende un primer polímero no funcionalizado; un segundo polímero no funcionalizado opcional; un polímero funcionalizado que comprende un grupo para administración dirigida; y un agente terapéutico; donde dicha nanopartícula comprende entre alrededor de 15 y alrededor de 300 moléculas de polímero funcionalizado, o entre alrededor de 20 y alrededor de 200 moléculas, o entre alrededor de 3 y alrededor de 100 moléculas de polímero funcionalizado.

En una realización particular, el polímero de la primera o segunda macromoléculas de la nanopartícula de la invención es PLA, PLGA o PEG, o sus copolímeros. En una realización específica, el polímero de la primera macromolécula es un copolímero PLGA-PEG, y la segunda macromolécula es un copolímero PLGA-PEG o un copolímero PLA-PEG. Por ejemplo, una nanopartícula de ejemplo puede tener una corona de PEG con una densidad de alrededor de  $0.065 \text{ g/cm}^3$ , o entre alrededor de 0.01 y alrededor de  $0.10 \text{ g/cm}^3$ .

Las nanopartículas dadas a conocer pueden ser estables (por ej. retener sustancialmente todo el principio activo) por ejemplo en una solución que puede contener un sacárido, durante al menos 3 días, alrededor de 4 días o al menos alrededor de 5 días a temperatura ambiente, o a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

En algunas realizaciones, las nanopartículas dadas a conocer también pueden incluir un alcohol graso, que puede aumentar la velocidad de liberación del fármaco. Por ejemplo, las nanopartículas dadas a conocer pueden incluir un alcohol  $\text{C}_8\text{-C}_{30}$  como alcohol cetílico, octanol, alcohol estearílico, alcohol araquidílico, docosonal u octosonal.

Las nanopartículas pueden tener propiedades de liberación controlada, por ej., pueden ser capaces de administrar una cantidad de principio activo a un paciente, por ej., a un sitio específico del paciente, durante un período de tiempo prolongado, como durante 1 día, 1 semana, o más. En algunas realizaciones, las nanopartículas dadas a conocer liberan casi inmediatamente (por ej. entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 30 minutos) menos de alrededor de 2%, menos de alrededor de 5% o menos de alrededor de 10% de un principio activo (por ej. un taxano), por ejemplo cuando están colocados en una solución tampón de fosfato a temperatura ambiente y/o a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Por ejemplo, las nanopartículas dadas a conocer que incluyen un agente terapéutico, pueden, en algunas realizaciones, liberar el agente terapéutico cuando están colocadas en una solución acuosa, por ej. a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  con una velocidad que corresponde sustancialmente a: a) entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 20% del agente terapéutico total se libera después de alrededor de 1 hora; b) entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60% del agente terapéutico se libera después de alrededor de 8 horas; c) entre aproximadamente 30 y aproximadamente 80% del agente terapéutico total se libera después de alrededor de 12 horas; y d) no menos de aproximadamente 75% del total se libera después de alrededor de 24 horas.

En algunas realizaciones, después de la administración a un sujeto o paciente de una nanopartícula dada a conocer o una composición que incluye una nanopartícula dada a conocer, la concentración plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) del agente terapéutico en el paciente es sustancialmente mayor en comparación con la  $C_{m\acute{a}x}$  del agente terapéutico si se administra sólo (por ej., no como parte de una nanopartícula).

5 En otra realización, una nanopartícula dada a conocer que incluye el agente terapéutico, cuando se administra a un sujeto, puede tener un  $t_{m\acute{a}x}$  del agente terapéutico sustancialmente más prolongado en comparación con el  $t_{m\acute{a}x}$  del agente terapéutico administrado solo.

10 También se pueden formar colecciones de dichas partículas. Por ejemplo, variando las relaciones entre los dos (o más) polímeros en la partícula, estas colecciones pueden ser útiles para pruebas de cribado, ensayos de alto rendimiento o similares. Las entidades de la colección pueden variar en propiedades como las descritas antes, y en algunos casos, más de una propiedad de las partículas puede variar dentro de la colección. Concordantemente, una  
15 realización de la invención apunta a una colección de nanopartículas que tienen diferentes relaciones entre polímeros con propiedades distintas. La colección puede incluir cualquier relación adecuada entre los polímeros.

La figura 1 ilustra que se pueden producir colecciones usando polímeros como los descritos antes. Por ejemplo, en la figura 1, se pueden usar partículas poliméricas que comprenden una primera macromolécula que comprende un polímero hidrófobo biocompatible, un polímero hidrófilo biocompatible y un ligando de PSMA de bajo peso molecular, y una segunda macromolécula que comprende un polímero hidrófobo biocompatible y un polímero hidrófilo biocompatible para crear una colección de partículas con diferentes relaciones entre la primera y la segunda macromoléculas.

20 Dicha colección puede ser útil para lograr partículas que tengan cualquier número de propiedades deseables, por ejemplo propiedades como funcionalidad superficial, carga superficial, tamaño, potencial zeta ( $\xi$ ), hidrofobicidad, capacidad para controlar la inmunogenia, o análogos.

Como ejemplos específicos, en algunas realizaciones de la presente invención, la colección incluye partículas que comprenden conjugados poliméricos de un polímero biocompatible y un ligando de bajo peso molecular, como se trató en este documento. Refiriéndonos ahora a la figura 1, se muestra una de dichas partículas como un ejemplo no limitante. En esta figura, un conjugado polimérico de la divulgación se usa para formar una partícula 10. El polímero que forma la partícula 10 incluye un ligando de bajo peso molecular 15, presente en la superficie de la partícula, y una porción biocompatible 17. En algunos casos, como se muestra en este documento, el grupo para administración dirigida 15 se puede conjugar a la porción biocompatible 17. Sin embargo, no toda la porción biocompatible 17 se muestra conjugada al grupo para administración dirigida 15. Por ejemplo, en algunos casos, las partículas como la partícula 10 se pueden formar usando un primer polímero que comprenda una porción biocompatible 17 y un ligando de bajo peso molecular 15, y un segundo polímero que comprenda la porción biocompatible 17 pero no el grupo para administración dirigida 15. Controlando la relación entre el primer y el segundo polímeros, se pueden formar partículas con propiedades diferentes, y en algunos casos, se pueden formar colecciones de dichas partículas. Además, contenido en el centro de la partícula 10 se encuentra el fármaco 12. En algunos casos, el fármaco 12 puede estar contenido dentro de la partícula debido a efectos hidrófobos. Por ejemplo, el interior de la partícula puede ser relativamente hidrófobo con respecto a la superficie de la partícula, y el fármaco puede ser un fármaco hidrófobo, que se asocia con el centro relativamente hidrófobo de la partícula. En una realización, el agente terapéutico se asocia a la superficie de, se encapsula dentro de, es rodeado por, o está dispersado en toda, la nanopartícula. En otra realización, el agente terapéutico está encapsulado dentro del centro hidrófobo de la nanopartícula.

50 Como un ejemplo específico, la partícula 10 puede contener polímeros que incluyen un polímero biocompatible relativamente hidrófobo y un grupo para administración dirigida relativamente hidrófilo 15, de modo que, durante la formación de la partícula, una mayor concentración del grupo para administración dirigida hidrófilo se expone en la superficie y una mayor concentración del polímero biocompatible hidrófobo está presente en el interior de la partícula.

55 En algunas realizaciones, el polímero biocompatible es un polímero hidrófobo. Los ejemplos no limitantes de polímeros biocompatibles incluyen poliláctido, poliglicólido y/o poli(láctido-co-glicólido).

60 En una realización diferente, esta divulgación proporciona una nanopartícula que comprende 1) una matriz polimérica; 2) opcionalmente, un compuesto, o capa, anfífilo que rodea o está disperso dentro de la matriz polimérica formando una coraza continua o discontinua para la partícula; 3) un polímero no funcionalizado que puede formar parte de la matriz polimérica, y 4) un ligando de PSMA de bajo peso molecular unido covalentemente a un polímero que puede formar parte de la matriz polimérica. Por ejemplo, una capa anfífilica puede reducir la penetración de agua en la nanopartícula, aumentando la eficiencia de encapsulación del fármaco y retardando la liberación del mismo.

Según se usa en este documento, el término “anfifílico” se refiere a una propiedad en que la molécula tiene tanto una porción polar como una porción no polar. A menudo, un compuesto anfifílico tiene una cabeza polar unida a una cola hidrófoba larga. En algunas realizaciones, la porción polar es soluble en agua en tanto la no polar es insoluble en agua. Además, la porción polar puede tener una carga positiva formal o una carga negativa formal. Alternativamente, la porción polar puede tener tanto una carga positiva formal como una carga negativa formal, y ser un zwitterion o sal interna. A los efectos de la invención, el compuesto anfifílico puede ser, pero no exclusivamente, uno o varios de los siguientes: lípidos derivados naturalmente, tensioactivos o compuestos sintetizados con grupos tanto hidrófilos como hidrófobos.

Los ejemplos específicos de compuestos anfifílicos incluyen, pero no exclusivamente, fosfolípidos, como 1,2 diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), diaraquidoilfosfatidilcolina (DAPC), dibehenoilfosfatidilcolina (DBPC), ditricosanoilfosfatidilcolina (DTPC) y dilignoceroilfosfatidilcolina (DLPC), incorporado en una relación entre 0.01 y 60 (peso de lípido/peso de polímero), más preferentemente entre 0.1 y 30 (peso de lípido/peso de polímero). Los fosfolípidos que se pueden usar incluyen, pero no exclusivamente, ácidos fosfatídicos, fosfatidilcolinas tanto con lípidos saturados como insaturados, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilgliceroles, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, derivados lisofosfatidilo, cardiolipina y  $\beta$ -acil-y-alkil fosfolípidos. Los ejemplos de fosfolípidos incluyen, pero no exclusivamente, fosfatidilcolinas como dioleoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipentadecanoilfosfatidilcolina, dilauroilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), diaraquidoilfosfatidilcolina (DAPC), dibehenoilfosfatidilcolina (DBPC), ditricosanoilfosfatidilcolina (DTPC), dilignoceroilfosfatidilcolina (DLPC); y fosfatidiletanolaminas como dioleoilfosfatidiletanolamina o 1-hexadecil-2-palmitoilglicerofosfoetanolamina. También se pueden utilizar fosfolípidos sintéticos con cadenas acilo asimétricas (por ej., con una cadena acilo de 6 carbonos y otra cadena acilo de 12 carbonos).

En una realización particular, un componente anfifílico que se puede usar para formar una capa anfifílica es lecitina, y en particular, fosfatidilcolina. La lecitina es un lípido anfifílico, y como tal, forma una bicapa fosfolipídica que tiene las cabezas hidrófilas (polares) enfrentando sus alrededores, que la mayor parte de las veces son acuosos, y las colas hidrófobas enfrentándose entre sí. La lecitina tiene la ventaja de ser un lípido natural que se encuentra, por ej., en la soja, y que ya tiene la aprobación de la FDA para usar en otros dispositivos de administración. Además, una mezcla de lípidos como lecitina es más ventajosa que un único lípido puro.

En ciertas realizaciones una nanopartícula dada a conocer tiene una monocapa anfifílica, lo que significa que la capa no es una bicapa fosfolipídica, sino que existe como una única capa continua o discontinua alrededor, o dentro, de la nanopartícula. La capa anfifílica está “asociada a” la nanopartícula de la invención, lo que significa que está ubicada en la proximidad de la matriz polimérica, como rodeando el exterior de la carcasa polimérica o dispersa en los polímeros que constituyen la nanopartícula.

#### Preparación de las nanopartículas

Otro aspecto de esta divulgación apunta a sistemas y métodos para elaborar las nanopartículas dadas a conocer. En algunas realizaciones, utilizando dos o más polímeros diferentes (por ej., copolímeros, como copolímeros en bloque) en diferentes proporciones y produciendo partículas a partir de los polímeros (por ej., copolímeros, como copolímeros en bloque), se pueden controlar las propiedades de las partículas. Por ejemplo, un polímero (por ej., copolímero, como copolímeros en bloque) puede, o no, incluir un ligando de PSMA de bajo peso molecular, en tanto se puede elegir otro polímero opcional (por ej., copolímero, como copolímero en bloque) por su biocompatibilidad y/o su capacidad para controlar la inmunogenia de la partícula resultante.

En un conjunto de realizaciones, las partículas se forman proporcionando una solución que contiene uno más polímeros y poniendo en contacto la solución con un polímero no solvente para producir la partícula. La solución puede ser miscible o inmisible con el polímero no solvente. Por ejemplo, un líquido miscible con agua como acetonitrilo puede contener los polímeros, y las partículas se forman a medida que el acetonitrilo se pone en contacto con agua, un polímero no solvente, por ej., vertiendo el acetonitrilo en el agua a una velocidad controlada. El polímero contenido en la solución, luego del contacto con el polímero no solvente, se puede entonces precipitar para formar partículas como las nanopartículas. Se dice que dos líquidos son “inmiscibles” o no miscibles, entre sí cuando uno no es soluble en el otro en una medida de hasta al menos 10% en peso a presión y temperatura ambientes. Típicamente, una solución orgánica (por ej., diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, tetrahidrofurano, acetona, formamida, dimetilformamida, piridinas, dioxano, dimetilsulfóxido, etc.) y un líquido acuoso (por ej., agua o agua que contenga sales disueltas u otras especies, medios celulares o biológicos, etanol, etc.) son inmiscibles entre sí. Por ejemplo, la primera solución se puede verter en la segunda solución (a una velocidad adecuada). En algunos casos, se pueden formar partículas como nanopartículas a medida que la primera solución se pone en contacto con el segundo líquido inmisible, por ej., la precipitación del polímero luego del contacto causa que el polímero forme nanopartículas mientras la primera solución se vierte en el segundo líquido, y en algunos casos, por ejemplo, cuando la velocidad de introducción es cuidadosamente controlada y mantenida a una velocidad

relativamente lenta, se pueden formar nanopartículas. El control de dicha formación de partículas puede ser fácilmente optimizada por un experto en el área usando simplemente la experimentación de rutina.

5 Propiedades como funcionalidad superficial, carga superficial, tamaño, potencial zeta ( $\xi$ ), hidrofobicidad, capacidad para controlar la inmunogenia, y similares; pueden ser altamente controladas usando un proceso dado a conocer. Por ejemplo, se puede sintetizar una colección de partículas y cribar para identificar las partículas que tienen una relación particular entre los polímeros que permita que las partículas tengan una densidad específica de grupos (por ej., ligandos de PSMA de bajo peso molecular) presentes en la superficie de la partícula. Esto permite preparar partículas que tengan una o más propiedades específicas, por ejemplo, un tamaño específico y una densidad superficial específica de grupos, sin un esfuerzo indebido. Concordantemente, ciertas realizaciones de la invención apuntan a técnicas de cribado utilizando dichas colecciones, así como a todas las partículas identificadas utilizando dichas colecciones. Además, la identificación se puede realizar mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, la identificación puede ser directa o indirecta, o proceder cuantitativa o cualitativamente.

15 En algunas realizaciones, se funcionalizan nanopartículas ya formadas con un grupo para administración dirigida utilizando procedimientos análogos a los descritos para producir conjugados ligando-polímero funcionalizado. Por ejemplo, se mezcla un primer copolímero (PLGA-PEG, poli(láctido-co-glicólido) y poli(etilenglicol)) con un agente terapéutico para formar partículas. Después las partículas se asocian a un ligando de bajo peso molecular para formar nanopartículas que se puedan usar para el tratamiento del cáncer. Las partículas se pueden asociar a diversas cantidades de ligando de bajo peso molecular para controlar la densidad superficial de ligando de la nanopartícula, alterando de ese modo las características terapéuticas de dicha nanopartícula. Además, por ejemplo, controlando parámetros como el peso molecular, el peso molecular de PEG, y la carga superficial de la nanopartícula, se pueden obtener partículas controladas muy precisamente.

25 En otra realización, se proporciona un proceso de nanoemulsión, que está representado en las figuras 3 y 4. Por ejemplo, un agente terapéutico, un primer polímero (por ejemplo, un copolímero en dibloque como PLA-PEG o PLGA-PEG, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente unido a un ligando, por ej., GL2) y un segundo polímero opcional (por ej. (PL(G)A-PEG o PLA), con una solución orgánica para formar una primera fase orgánica. Dicha primera fase puede incluir entre alrededor de 5 y alrededor de 50% de sólidos en peso, entre alrededor de 5 y alrededor de 40% de sólidos o entre alrededor de 10 y alrededor de 30% de sólidos. La primera fase orgánica se puede combinar con una primera solución acuosa para formar una segunda fase. La solución orgánica puede incluir, por ejemplo, tolueno, metil etil cetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetato de etilo, alcohol isopropílico, acetato de isopropilo, dimetilformamida, cloruro de metileno, diclorometano, cloroformo, acetona, alcohol bencílico, Tween 80, Span 80, o análogos, y sus combinaciones. En una realización, la fase orgánica puede incluir alcohol bencílico, acetato de etilo y sus combinaciones. La segunda fase puede tener entre alrededor de 1 y 50% en peso, por ejemplo, entre alrededor de 5 y 40% en peso de sólidos. La solución acuosa puede ser agua, opcionalmente en combinación con uno o más entre: colato de sodio, acetato de etilo, acetato de polivinilo y alcohol bencílico.

40 Por ejemplo, la fase oleosa u orgánica puede utilizar solvente que sea solo parcialmente miscible con el no solvente (agua). Por consiguiente, cuando se mezcla en proporciones suficientemente bajas y/o cuando se usa agua presaturada con los solventes orgánicos, la fase oleosa permanece líquida. La fase oleosa se puede emulsionar en una solución acuosa y, como gotas líquidas, cizallar en nanopartículas utilizando, por ejemplo, sistemas de dispersión de alta energía, como homogeneizadores o sondas de ultrasonido. La porción acuosa de la emulsión, conocida también como "fase acuosa", puede ser una solución tensioactiva consistente en colato de sodio y presaturada con acetato de etilo y alcohol bencílico.

50 La emulsión de la segunda fase para formar una fase en emulsión se puede llevar a cabo en uno o dos pasos de emulsión. Por ejemplo, se puede preparar una emulsión primaria y después emulsionar para formar una emulsión fina. La emulsión primaria se puede formar, por ejemplo, utilizando mezcla simple, un homogeneizador de alta presión, una sonda de ultrasonido, una barra de agitación o un homogeneizador de rotor y estator. La emulsión primaria se puede convertir en una emulsión fina a través del uso, por ejemplo, de una sonda de ultrasonido o un homogeneizador de alta presión, por ej., usando 1, 2, 3 o más pasos a través de un homogeneizador. Por ejemplo, cuando se usa un homogeneizador de alta presión, la presión puede ser entre alrededor de 1000 y alrededor de 8000 psi, entre alrededor de 2000 y alrededor de 4000 psi, entre alrededor de 4000 y alrededor de 8000 psi, o entre alrededor de 4000 y alrededor de 5000 psi, por ej., de alrededor de 2000, 2500, 4000 o 5000 psi.

60 Puede ser necesaria la evaporación del solvente o la dilución para completar la extracción del solvente y solidificar las partículas. Para un mayor control de la cinética de extracción y un proceso más escalable, se puede usar una dilución del solvente a través de medio para temple acuoso. Por ejemplo, la emulsión se puede diluir en agua fría hasta una concentración suficiente para disolver todo el solvente orgánico para formar una fase templada. El temple se puede realizar al menos parcialmente a una temperatura de alrededor de 5 °C o menos. Por ejemplo, el agua utilizada en el temple puede estar a una temperatura menor que la temperatura ambiente (por ej., entre alrededor de 0 y alrededor de 10 °C, o entre alrededor de 0 y al rededor de 5 °C).

En algunas realizaciones, no todo el agente terapéutico (por ejemplo docetaxel) se encapsula en las partículas en esta etapa, y se agrega un solubilizante de fármacos a la fase templada para formar una fase solubilizada. El solubilizante de fármacos puede ser, por ejemplo Tween 80, Tween 20, polivinilpirrolidona, ciclodextrano, dodecilsulfato de sodio o colato de sodio. Por ejemplo, se puede agregar Tween 80 a la suspensión de nanopartículas templada para solubilizar el fármaco libre y evitar la formación de cristales de fármaco. En algunas realizaciones, una relación entre solubilizante de fármaco y agente terapéutico (por ej. docetaxel) es entre alrededor de 100:1 y alrededor de 10:1.

La fase solubilizada se puede filtrar para recuperar las nanopartículas. Por ejemplo, se pueden utilizar membranas de ultrafiltración para concentrar la suspensión de nanopartículas y eliminar sustancialmente el solvente orgánico, el fármaco libre y otros auxiliares del proceso (tensioactivos). Un ejemplo de filtración se puede llevar a cabo usando un sistema de filtración de flujo tangencial. Por ejemplo, utilizando una membrana con un tamaño de poro adecuado para retener nanopartículas mientras se permite pasar solutos, micelas y solvente orgánico, las nanopartículas se pueden separar selectivamente. Se pueden usar ejemplos de membranas con pesos moleculares de corte de alrededor de 300-500 kDa (~5-25 nm).

Se puede realizar una diafiltración usando un método de volumen constante, lo que significa que el diafiltrado (agua desionizada fría, por ej. entre alrededor de 0 y alrededor de 5 °C, o entre 0 y alrededor de 10 °C) se puede agregar a la suspensión de alimentación a la misma velocidad que se retira el filtrado de la suspensión. En algunas realizaciones, el filtrado puede incluir una primera filtración utilizando una primera temperatura entre alrededor de 0 y alrededor de 5 °C, o entre 0 y alrededor de 10 °C, y una segunda temperatura entre alrededor de 20 y alrededor de 30 °C, o entre 15 y alrededor de 35 °C. Por ejemplo, el filtrado puede incluir procesar entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 diavolumenes a una temperatura entre alrededor de 0 y alrededor de 5 °C, y procesar al menos un diavolumen (por ej. entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3 o entre aproximadamente 1 y 2 diavolumenes) a una temperatura entre alrededor de 20 y alrededor de 30 °C.

Después de purificar y concentrar la suspensión de nanopartículas, las partículas se pueden pasar a través de uno, dos o más filtros esterilizantes y/o de profundidad, por ejemplo, usando un prefiltro de profundidad de ~0.2 µm.

En otra realización de preparación de nanopartículas, se forma una fase orgánica compuesta por una mezcla de un agente terapéutico, por ej. docetaxel y un polímero (homopolímero, copolímero y copolímero con ligando). La fase orgánica se mezcla con una fase acuosa a una relación de aproximadamente 1:5 (fase oleosa:fase acuosa, (O:W)) donde la fase acuosa está compuesta por un tensioactivo y algo de solvente disuelto. La emulsión primaria se forma combinando las dos fases por mezcla simple o mediante el uso de un homogeneizador de rotor y estator. La emulsión primaria se convierte después en una emulsión fina mediante el uso de un homogeneizador de alta presión. La emulsión fina se temple después agregando agua desionizada mientras se mezcla. La relación medio para temple:emulsión (Q:E) es aproximadamente 8.5:1. Después se agrega una solución de Tween (por ej., Tween 80) al medio para temple para obtener aproximadamente 2% de Tween total. Esto sirve para disolver el fármaco libre no encapsulado. Después las nanopartículas se aíslan por centrifugación o ultrafiltración/diafiltración.

Se comprenderá que las cantidades de polímero y agente terapéutico o principio activo que se usan en la preparación de la formulación pueden diferir de una formulación final. Por ejemplo, algo de principio activo puede no quedar completamente incorporado en una nanopartícula y dicho agente terapéutico libre puede ser, por ej., eliminado por filtración. Por ejemplo, en una realización, se puede usar alrededor de 20% de principio activo (como docetaxel) y alrededor de 80% de polímero (por ej. el polímero puede incluir alrededor de 2.5 moles por ciento de PLA-PEG-GL2 y se puede usar alrededor de 97.5 moles por ciento de PLA-PEG), en la preparación de una formulación que resulte por ej. en una nanopartícula final que comprenda alrededor de 10 por ciento en peso del principio activo (por ej. docetaxel) y alrededor de 90 por ciento en peso de polímero (donde el polímero puede incluir alrededor de 1.25 moles por ciento de PLA-PEG-GL2 y alrededor de 98.75 moles por ciento de PLA-PEG). Dichos procesos pueden proporcionar nanopartículas finales adecuadas para la administración a un paciente que contengan entre alrededor de 2 y alrededor de 20 por ciento en peso de agente terapéutico, por ejemplo, alrededor de 5, alrededor de 8, alrededor de 10, alrededor de 15 por ciento en peso de agente terapéutico.

#### Agentes terapéuticos

De acuerdo con la presente invención, todos los agentes, incluidos, por ejemplo, agentes terapéuticos (por ej. anticancerígenos), agentes de diagnóstico (por ej. agentes de contraste; radionúclidos y grupos fluorescentes, luminiscentes y magnéticos), agentes profilácticos (por ej. vacunas), y/o agentes nutracéuticos (por ej. vitaminas, minerales, etc.) se pueden administrar mediante las nanopartículas dadas a conocer. Los ejemplos de agentes que se pueden administrar de conformidad con la presente invención incluyen, pero no exclusivamente, moléculas pequeñas (por ej. citotóxicos), ácidos nucleicos (por ej., ARNip, ARNi y micro ARN), proteínas (por ej. anticuerpos), péptidos, lípidos, carbohidratos, hormonas, metales, elementos y compuestos radiactivos, fármacos, vacunas, agentes inmunológicos, etc., y/o sus combinaciones. En algunas realizaciones, el agente que se va administrar es un agente útil en el tratamiento del cáncer (por ej., cáncer de próstata).

Por ejemplo, un grupo para administración dirigida, si se usa, se puede dirigir a, o hacer que la partícula se localice en, porciones específicas dentro de un sujeto, y la carga útil puede ser administrada a esas porciones. En una realización particular, el fármaco, u otra carga útil, se libera de manera controlada desde una partícula y se permite que interaccione localmente con el sitio particular que es el objetivo (por ej., un tumor). La expresión “liberación controlada” (y sus variantes) según se usa en este documento (por ej., en el contexto de “sistema de liberación controlada”) pretende abarcar en general la liberación de una sustancia (por ejemplo un fármaco) en un sitio seleccionado, o de lo contrario controlable en la velocidad, el intervalo y/o la cantidad. La liberación controlada abarca, pero no está necesariamente limitada a, sustancialmente la administración continua, la administración según un patrón (por ej., administración intermitente en un período de tiempo que es interrumpida a intervalos regulares o irregulares), y la administración de un bolo de una sustancia seleccionada (por ejemplo, como una cantidad discreta, predeterminada, si es una sustancia durante un período de tiempo relativamente corto (por ej, unos pocos segundos o minutos)).

El principio activo o fármaco puede ser un agente terapéutico como un antineoplásico como los inhibidores de mTor (por ej., sirolimus, temsirolimus, o everolimus), alcaloides de la vinca como vincristina, un derivado diterpénico o un taxano como paclitaxel (o sus derivados como DHA-paclitaxel o PG-paclitaxel) o docetaxel.

En un conjunto de realizaciones, la carga útil es un fármaco o una combinación de más de un fármaco. Dichas partículas pueden ser útiles, por ejemplo, en realizaciones en las que un grupo para administración dirigida se puede usar para dirigir una partícula que contenga un fármaco a una ubicación localizada particular dentro de un sujeto, por ej., para permitir que se produzca la administración localizada del fármaco. Los agentes terapéuticos de ejemplo incluyen antineoplásicos como doxorubicina (adriamicina), gemcitabina (gemzar), daunorrubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, vinorelbina, 5-fluorouracilo (5-FU), alcaloides de la vinca como vinblastina o vincristina; bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleucina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, camptotecina, 10-hidroxi-7-etilcamptotecina (SN38), dacarbazina, S-I capecitabina, ftorafur, 5'desoxiflurouridina, eniluracilo, desoxicidina, 5-azacitosina, 5-azadesoxicitosina, alopurinol, 2-cloroadenosina, trimetrexato, aminopterina, metileno-10-deazaaminopterina (MDAM), oxaplatino, picoplatino, tetraplatino, satraplatino, platino-DACH, ormaplatino, y sus análogos, epirubicina, fosfato de etopósido, 9-aminocamptotecina, 10,11-metilenodioxycamptotecina, karenitecina, 9-nitrocampotecina, vindesina, mostaza de L-fenilalanina, ifosfamidamefosfamida, perfosfamida, trofosfamida, carmustina, semustina, eptilonos A-E, tomudex, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, amsacrina, fosfato de etopósido, karenitecina, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir, amantadina, rimantadina, lamivudina, zidovudina, bevacizumab, trastuzumab, rituximab, 5-fluorouracilo y sus combinaciones.

Los ejemplos no limitantes de fármacos potencialmente adecuados incluyen anticancerígenos, como por ejemplo, docetaxel, mitoxantrona y clorhidrato de mitoxantrona. En otra realización, la carga útil puede ser un anticancerígeno como 20-epi-1, 25 dihidroxivitamina D3, 4-ipomeanol, 5-etniluracilo, 9-dihidrotaxol, abiraterona, acivicina, aclarrubicina, clorhidrato de acodazol, acronina, acilfiilveno, adecipenol, adozelesina, aldesleucina, todos los antagonistas de tk, altretamina, ambamustina, ambomicina, acetato de ametantrona, amidox, amifostina, aminoglutetimida, ácido aminolevulínico, amrubicina, amsacrina, anagrelida, anastrozol, andrografolida, inhibidores de la angiogénesis, antagonista D, antagonista G, antarelix, antramcina, proteína morfogenética-1 anti-dorsalización, antiestrógeno, antineoplastón, oligonucleótidos antisentido, glicinato de afidicolina, moduladores del gen de la apoptosis, reguladores de la apoptosis, ácido apurínico, ARA-CDP-DL-PTBA, arginina desaminasa, asparaginasa, asperlina, asulacrina, atamestano, atrimustina, axinastatina 1, axinastatina 2, axinastatina 3, azacitidina, azasetrón, azatocina, azatirosina, azetepa, azotomicina, derivados de la bacatina III, balanol, batimastat, benzoclorinas, benzodepa, benzoilestaurosporina, derivados de la beta lactama, beta-aletina, betaclamina B, ácido betulínico, inhibidor de BFGF, bicalutamida, bisantreno, clorhidrato de bisantreno, bisazuidinilespermina, bisnafida, dimesilato de bisnafida, bistrateno A, bizelesina, bleomicina, sulfato de bleomicina, antagonistas de BCR/ABL, breflato, brequinar sódico, bropirimina, budotitano, busulfán, butionina sulfoximina, cactinomicina, calcipotriol, calfostina C, calusterona, derivados de camptotecina, canaripox IL-2, capecitabina, caraceraide, carbetimero, carboplatino, carboxamida-amino-triazol, carboxiamidotriazol, carest M3, carmustina, earn 700, inhibidor derivado del cartílago, clorhidrato de carrubicina, carzelesina, inhibidores de la caseína cinasa, castanoespermina, cecropina B, cedefingol, cetorelix, clorambucilo, clorinas, cloroquinoxalina sulfonamida, cicaprost, cirolemicina, cisplatino, cisporfirina, cladribina, análogos de clomifeno, clotiriazol, colismicina A, colismicina B, combretastatina A4, análogos de combretastatina, conagenina, crambescidina 816, crisnatol, mesilato de crisnatol, criptoficina 8, derivados de criptoficina A, curacina A, ciclopentaantraquinonas, ciclofosfamida, cicloplatam, cicloplatam, cipemicina, citarabina, ocfosfato de citarabina, factor citolítico, citostatina, dacarbazina, dactinomicina, clorhidrato de daunorrubicina, decitabina, deshdrodidemnina B, deslorelina, dexifosfamida, dexormaplatino, dexrazoxano, dexverapamilo, dezaguanina, mesilato de dezaguanina, diaziquna, didemnina B, didox, dietihorspermina, dihidro-5-azacitidina, dioxamicina, difenil espiromustina, docetaxel, docosanol, dolasetrón, doxiluridina, doxorubicina, clorhidrato de doxorubicina, droloxifeno, citrato de droloxifeno, propionato de dromostanolona, dronabinol, duazomicina, duocanicina SA, ebseleno, ecomustina, edatrexato, edelfosina, edrecolomab, eflomitina, clorhidrato de eflomitina, elemeno, elsamitrucina, emitefur, enloplatino, enpromato, epipropidina, epirubicina, clorhidrato de epirubicina,



epristerida, erbulozol, sistema vector de terapia génica de eritrocitos, clorhidrato de esorubicina, estramustina, análogos de estramustina, fosfato sódico de estramustina, agonistas de estrógenos, antagonistas de estrógenos, etanidazol, etopósido, fosfato de etopósido, etoprina, exemestano, fadrozol, clorhidrato de fadrozol, fazarabina, fenretinida, filgrastim, finasterida, flavopiridol, flezelastina, floxuridina, fluasterona, fludarabina, fosfato de fludarabina, clorhidrato de fluorodaunorrubicina, fluorouracilo, flurocitabina, forfenimex, formestano, fosquidona, fostriecina, fostriecina sódica, fotemustina, texafirina de gadolinio, nitrato de galio, galocitabina, ganirelix, inhibidores de la gelatinasa, gemcitabina, clorhidrato de gemcitabina, inhibidores del glutatión, hepsulfam, heregulina, bisacetamida de hexametileno, hidroxiourea, hipericina, ácido ibandrónico, idarrubicina, clorhidrato de idarrubicina, idoxifeno, idramantona, ifosfamida, ihnofosina, ilomastat, imidazoacridonas, imiquimod, péptidos inmunoestimulantes, inhibidor del receptor de factor de crecimiento-1 semejante a la insulina, agonistas del interferón, interferón alfa-2A, interferón alfa-2B, interferón alfa-N1, interferón alfa-N3, interferón beta-1A, interferón gamma-1B, interferones, interleucinas, iobenguano, yododoxorrubicina, ioproplam, irinotecán, clorhidrato de irinotecán, iroplact, irsogladina, isobengazol, isohomohalicondrina B, itasetrón, jasplakinolida, kahalalida F, triacetato de lamelarina-N, lanreotida, acetato de lanreotida, leinamicina, lenograstim, sulfato de lentinano, leptolestatina, letrozol, factor de inhibición de la leucemia, interferón alfa de leucocito, acetato de leuprolida, leuprolida/estrógeno/progesterona, leuprorelina, levamisol, liarozol, clorhidrato de liarozol, análogos lineales de poliamina, péptido disacárido lipófilo, compuestos de platino lipófilos, lisoclinamida, lobaplatino, lombricina, lometrexol, lometrexol sódico, lomustina, lonidamina, losoxantrona, clorhidrato de losoxantrona, lovastatina, loxoribina, lurtotecán, texafirina de lutecio, lisofilina, péptidos líticos, maitansina, manostatina A, marimastat, masoprocól, maspina, inhibidores de matrilisina, inhibidores de metaloproteína de matriz, maitansina, clorhidrato de mecloretamina, acetato de megestrol, acetato de melengestrol, melfalán, menogaril, merbarona, mercaptopurina, meterelina, metioninasa, metotrexato, metotrexato sódico, metoclopramida, metoprina, meturedopa, inhibidores de la proteína cinasa C microalgal, inhibidor de MIF, mifepristona, miltefosina, mirimostim, ARN bicatenario mal apareado, mitindomida, mitocarcina, mitocromina, mitogilina, mitoguazona, mitolactol, mitomalcina, mitomicina-saporina, análogos de mitomicina, mitonafida, mitosper, mitotano, mitotoxina, factor de crecimiento de fibroblastos, mitoxantrona, clorhidrato de mitoxantrona, mofaroteno, molgramostim, anticuerpo monoclonal, gonadotrofina coriónica humana, monofosforil lípido del esqueleto de la pared celular de micobacteria, mopidamol, inhibidor del gen de multiresistencia a fármacos, terapia a base de supresor tumoral múltiple 1, anticancerígeno de mostaza, micaperoxida B, extracto de pared celular micobacteriana, ácido micofenólico, miriaporona, n-acetilidinalina, nafarelina, nagrestip, naloxona/pentazocina, napavina, nafterpina, nartograstim, nedaplatino, nemorrubicina, ácido neridróico, endopeptidasa neutra, nilutamida, nisamicina, moduladores del óxido nítrico, antioxidante nitróxico, nitrulina, nocodazol, nogalamicina, benzamidas n-sustituidas, O6-benzilguanina, octreotida, oquiicenona, oligonucleótidos, onapristona, ondansetrón, oracina, inductor de citosina oral, ormaplatino, osaterona, oxaliplatino, oxaunomicina, oxisurano, paclitaxel, análogos de paclitaxel, derivados de paclitaxel, palauamina, palmitoilirizoxina, ácido pamidróico, panaxitriol, panomifeno, parabactina, pazeliptina, pegaspargasa, peldesina, peliomicina, pentamustina, polisulfato sódico de pentosano, pentostatina, pentrozol, sulfato de peplomicina, perflubrón, perfosfamida, alcohol perilífico, fenazinomicina, fenilacetato, inhibidores de la fosfatasa, picibanilo, clorhidrato de pilocarpina, pipobromano, pipsulfano, pirarrubicina, piritrexim, clorhidrato de piroxantrona, placetina A, placetina B, inhibidor del activador de plasminógeno, complejo de platino, compuestos de platino, complejo platino-triamina, plicamicina, plomestano, porfímero sódico, porfiromicina, prednimustina, clorhidrato de procarbazona, propil bis-acridona, prostaglandina J2, antiandrógeno de carcinoma prostático, inhibidores del proteasoma, modulador inmunitario a base de proteína A, inhibidor de la proteína cinasa C, inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa, inhibidores de la purina-nucleósido fosforilasa, puromicina, clorhidrato de puromicina, purpurinas, pirazorurina, pirazoloacridina, conjugado de hemoglobina piridoxilada-polióxetileno, antagonistas de RAF, raltitrexed, ramosetrón, inhibidores de la proteína farnesil transferasa RAS, inhibidores de RAS, inhibidor de RAS-GAP, reteliptina desmetilada, etidronato de renio RE 186, rizoxina, riboprina, ribozimas, RH retinamida, ARNi, rogletimida, rohituquina, romurtida, roquinimex, rubiginona B1, ruboxil, safingol, clorhidrato de safingol, saintopina, sarcnu, sarcotil A, sargramostim, miméticos de SD11, semustina, derivado del inhibidor 1 de la senescencia, oligonucleótidos sentido, inhibidores de la transducción de señales, moduladores de la transducción de señales, simtrazeno, proteína de unión al antígeno de una sola cadena, sizofirano, sobuzoxano, borocaptato de sodio, fenilacetato de sodio, solverol, proteína de unión a somatomedina, sonermina, esparfosato sódico, ácido esparfósico, esparsomicina, espicamicina D, clorhidrato de espirogermanio, espiromustina, espiroplatino, esplenopentina, espongiestatina 1, escualamina, inhibidor de células madre, inhibidores de la división de células madre, estipiamida, estreptonigrina, estreptozocina, inhibidores de la estromelina, sulfinosina, sulofenur, antagonistas del péptido intestinal vasoactivo superactivo, suradista, suramina, swainsonina, glucosaminoglucanos sintéticos, talisomicina, talimustina, metyoduro de tamoxifeno, taumomustina, tazaroteno, tecogalán sódico, tegafur, telurapirilio, inhibidores de la telomerasa, clorhidrato de teloxantrona, temporfina, temozolomida, tenipósido, teroxirona, testolactona, tetraclorodecaóxido, tetrazomina, taliblastina, talidomida, tiamiprina, tiocoralina, tioguanina, tiotepa, trombopoyetina, miméticos de trombopoyetina, timalfasina, agonista del receptor de timopoyetina, timotrinano, hormona estimulante de la tiroides, tiazofurina, etiopurpurina de etilo de estaño, tirapazamina, dicloruro de titanoceno, clorhidrato de topotecán, topsentina, toremifeno, citrato de toremifeno, factor de células madre totipotentes, inhibidores de la traducción, acetato de trestolona, tretinoína, triacetiluridina, triciribina, fosfato de triciribina, trimetrexato, trimetrexato glucuronato, triptorelina, tropisetrón, clorhidrato de tubulozol, turosterida, inhibidores de la tirosina cinasa, tirstofinas, inhibidores de UBC, ubenimex, mostaza de uracilo, uredepa, factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital, antagonistas del receptor de urocina, vapreotida, variolina

B, velaresol, veramina, verdinas, verteporfina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, vindesina, sulfato de vindesina, sulfato de vinepidina, sulfato de vinglicinato, sulfato de vinleurosina, vinorelbina o tartrato de vinorelbina, sulfato de vinrosidina, vinxaltina, sulfato de vinzolidina, vitaxina, vorozol, zanoterona, zeniplatino, zilascorb, zinostatina, zinostatina, estimalamero o clorhidrato de zorrubicina.

5

#### Formulaciones farmacéuticas

Las nanopartículas dadas a conocer en este documento se pueden combinar con portadores farmacéuticamente aceptables para formar una composición farmacéutica, de acuerdo otro aspecto de la invención. Como apreciarán los expertos en el área, los portadores se pueden elegir basándose en la vía de administración como se describe más adelante, la ubicación del problema que es el objetivo, el fármaco que se va administrar, el tiempo de administración del fármaco, etc.

10

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar a un paciente mediante cualquier medio conocido en el área incluidas las vías oral y parenteral. El término "paciente", según se usa en este documento, se refiere a humanos y no humanos, incluidos, por ejemplo, mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. Por ejemplo, los no humanos pueden ser mamíferos (como un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, un primate o un cerdo). En ciertas realizaciones las rutas parenterales son deseables puesto que evitan el contacto con las enzimas digestivas que se encuentran en el canal alimentario. De acuerdo con dichas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden administrar mediante inyección (por ej., inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular o peritoneal), por vía rectal, vaginal, tópica (por ejemplo mediante polvos, cremas, pomadas o gotas), o por inhalación (por ejemplo mediante aerosoles).

15

20

En una realización particular, las nanopartículas de la presente invención se administran a un sujeto que lo necesita sistémicamente, por ej., mediante infusión o inyección IV.

25

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, las suspensiones estériles inyectables acuosas u oleosas se pueden formular de acuerdo con las técnicas conocidas usando dispersantes o humectantes y suspensivos adecuados. La preparación estéril inyectable también puede ser una solución, suspensión o emulsión estéril inyectable en un diluyente o solvente atóxico aceptable para uso parenteral, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el agua, la solución de Ringer U.S.P. y la solución de cloruro de sodio isotónica. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como solvente o medio de suspensión. Para este propósito se puede utilizar cualquier aceite fijo blando incluidos los mono o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables se usan ácidos grasos como el ácido oleico. En una realización, el conjugado de la invención se suspende en un líquido portador que comprende 1% (p/v) de carboximetilcelulosa de sodio y 0.1% (v/v) de TWEEN™ 80. Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro que retenga bacterias, o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril o cualquier otro medio inyectable estéril antes de usarlas.

30

35

40

Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, pastillas, polvos y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el conjugado encapsulado o no encapsulado se mezcla con al menos un excipiente o portador inerte, farmacéuticamente aceptable como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o (a) rellenos o diluyentes como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes como por ejemplo carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y acacia, (c) humectantes como glicerol, (d) desintegrantes como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (e) retardadores de la solución como parafina; (f) aceleradores de la absorción como compuestos de amonio cuaternario, (g) humectantes como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) absorbentes como caolín y bentonita, y (i) lubricantes como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, y sus mezclas. En el caso de las cápsulas, los comprimidos y las pastillas, las formas farmacéuticas también pueden contener tampones.

45

50

Se apreciará que la dosis exacta de la partícula dirigida al PSMA es elegida por el médico individual a la vista del paciente que se va a tratar; en general, la dosis y la administración se ajustan para proporcionar una cantidad eficaz de la partícula dirigida al PSMA al paciente en tratamiento. Según se usa en este documento, la "cantidad eficaz" de una partícula dirigida al PSMA se refiere a la cantidad necesaria para producir una respuesta biológica deseada. Como apreciarán los expertos en el área, la cantidad eficaz de partícula dirigida al PSMA puede variar dependiendo de factores como el criterio de valoración biológico deseado, el fármaco a ser administrado, el tejido que es el objetivo, la vía de administración, etc. Por ejemplo, la cantidad eficaz de partícula dirigida al PSMA que contiene un anticancerígeno podría ser la cantidad que produzca una reducción en el tamaño del tumor en una cantidad deseada en un determinado período de tiempo. Otros factores que se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad del estado patológico; la edad, el peso y el género del paciente en tratamiento; la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración; las combinaciones de fármacos; las reacciones de sensibilidad; y la tolerancia/respuesta al tratamiento.

55

60

Las nanopartículas de la invención se pueden formular en formas farmacéuticas unitarias para facilitar la administración y la uniformidad de dosis. La expresión "forma farmacéutica unitaria" según se usa en este documento se refiere a una unidad físicamente discreta de nanopartícula apropiada para el paciente que se va a tratar. Se comprenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones de la presente invención será decidido por el médico tratante según su criterio profesional. Para cualquier nanopartícula, la dosis terapéuticamente eficaz se puede calcular inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, generalmente en ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también se usa para lograr un rango de concentración y una vía de administración deseables. Dicha información se puede usar después para determinar las dosis y las vías útiles para la administración en los seres humanos. La eficacia terapéutica y la toxicidad de las nanopartículas se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ej.,  $DE_{50}$  (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población) y  $DL_{50}$  (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como el cociente,  $DL_{50}/DE_{50}$ . Las composiciones farmacéuticas que tienen índices terapéuticos grandes pueden ser útiles en algunas realizaciones. Los datos obtenidos de esos ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosis para usar en humanos.

En una realización, las composiciones dadas a conocer en este documento pueden incluir menos de alrededor de 10 ppm de paladio, o menos de alrededor de 8 ppm, o menos de alrededor de 6 ppm de paladio. Por ejemplo, en este documento se proporciona una composición que incluye nanopartículas que tienen un conjugado polimérico PLA-PEG-GL2 donde la composición tiene menos de alrededor de 10 ppm de paladio.

En una realización de ejemplo, se da a conocer una composición farmacéutica que incluye una pluralidad de nanopartículas cada una de las cuales comprende un agente terapéutico; entre alrededor de 0.1 y alrededor de 30 moles por ciento del contenido total de polímero, o entre alrededor de 0.1 y alrededor de 20 moles por ciento, o entre alrededor de 0.1 y alrededor de 10 moles por ciento, o entre alrededor de 1 y alrededor de 5 moles por ciento del contenido total de polímero de una nanopartícula de una primera macromolécula que comprende un copolímero PLGA-PEG o un copolímero PLA-PEG conjugado a un ligando que tiene un peso molecular promedio entre alrededor de 100 g/mol y 500 g/mol; y una segunda macromolécula que comprende un copolímero PLGA-PEG o un copolímero PLA-PEG, donde el copolímero no está unido a un grupo para administración dirigida; y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el primer copolímero puede tener entre alrededor de 0.001 y 5 por ciento en peso del ligando con respecto al contenido total de polímero.

En algunas realizaciones, se considera una composición adecuada para congelación, que incluye nanopartículas dadas a conocer en este documento y una solución adecuada para congelación, por ej., se agrega una solución de sacarosa a la suspensión de nanopartículas. La sacarosa puede actuar, por ejemplo, como crioprotector para evitar que las partículas se agreguen al congelarlas. Por ejemplo, en este documento se proporciona una formulación de nanopartículas que comprenden una pluralidad de nanopartículas dadas a conocer, sacarosa y agua; donde la relación nanopartículas/sacarosa/agua es de alrededor de 3-30%/10-30%/50-90% (p/p/p) o alrededor de 5-10%/10-15%/80-90% (p/p/p).

#### Métodos de tratamiento

En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de conformidad con la presente invención se pueden usar para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio de, inhibir el avance de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de, uno o más síntomas o características de una enfermedad, un trastorno y/o una afección. En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención se pueden usar para tratar tumores sólidos por ejemplo cáncer y/o células cancerosas. En ciertas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención se pueden usar para tratar cualquier cáncer donde se exprese el PSMA sobre la superficie de células cancerosas o la neovasculatura del tumor en un sujeto que lo necesita, incluida la neovasculatura de tumores sólidos de próstata o no prostáticos. Los ejemplos de indicaciones relacionadas con PSMA incluyen, pero no exclusivamente, cáncer de próstata, cáncer de mama, carcinoma pulmonar no microcítico, carcinoma colorrectal y glioblastoma.

El término "cáncer" incluye cánceres premalignos así como malignos. Los cánceres incluyen, pero no exclusivamente, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de piel, por ejemplo, melanomas o carcinomas de células basales, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cánceres de cabeza y cuello, cáncer bronquial, cáncer pancreático, cáncer de vejiga urinaria, cáncer cerebral o del sistema nervioso central, cáncer de sistema nervioso periférico, cáncer esofágico, cáncer de la cavidad oral o la faringe, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer testicular, cáncer del tracto biliar, cáncer de intestino delgado o apéndice, cáncer de glándula salival, cáncer de glándula tiroides, cáncer de glándula suprarrenal, osteosarcoma, condrosarcoma, cáncer de tejidos hematológicos, y similares. Las "células cancerosas" pueden estar en forma de un tumor, existir solas en un sujeto (por ej. células de leucemia), o ser líneas celulares derivadas de un cáncer.

El cáncer se puede asociar a diversos síntomas físicos. Los síntomas del cáncer dependen generalmente del tipo y la ubicación del tumor. Por ejemplo, el cáncer de pulmón puede causar tos, falta de aliento y dolor torácico, mientras que el cáncer de colon a menudo causa diarrea, estreñimiento y sangre en las heces. Sin embargo, para dar unos pocos ejemplos, los síntomas siguientes se asocian en general, a menudo, con muchos tipos de cáncer: fiebre, escalofríos, sudoración nocturna, tos, disnea, pérdida de peso, pérdida del apetito, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, anemia, ictericia, hepatomegalia, hemoptisis, fatiga, malestar general, disfunción cognitiva, depresión, trastornos hormonales, neutropenia, dolor, úlceras que no cicatrizan, ganglios linfáticos agrandados, neuropatía periférica y disfunción sexual.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para el tratamiento del cáncer (por ej. el cáncer de próstata o de mama). En algunas realizaciones, el tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de las partículas dirigidas de la invención a un sujeto que lo necesita, en tales cantidades y durante tal tiempo como sea necesario para lograr el resultado deseado. En ciertas realizaciones de la presente invención una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una partícula dirigida de la invención es la cantidad eficaz para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio de, inhibir el avance de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de, uno o más síntomas o características del cáncer.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para administrar composiciones de la invención a un sujeto que sufre de cáncer (por ej. de cáncer de próstata). En algunas realizaciones, se proporcionan partículas a un sujeto en tales cantidades y por tal tiempo como sea necesario para lograr el resultado deseado (es decir, el tratamiento del cáncer). En ciertas realizaciones de la presente invención una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una partícula dirigida de la invención es la cantidad eficaz para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio de, inhibir el avance de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de, uno o más síntomas o características del cáncer.

Los protocolos terapéuticos de la invención implican administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula dirigida de la invención a un individuo sano (es decir, un sujeto que no presenta ningún síntoma de cáncer y/o al que no se le ha diagnosticado cáncer). Por ejemplo, los individuos sanos pueden ser "vacunados" con una partícula dirigida de la invención antes de padecer cáncer y/o el inicio de los síntomas del cáncer; los individuos que corren riesgo (por ej., pacientes que tienen antecedentes familiares de cáncer; pacientes que tienen una o más mutaciones genéticas asociadas a la aparición de cáncer; pacientes que tienen un polimorfismo genético asociado a la aparición de cáncer; pacientes infectados por un virus asociado a la aparición de cáncer; pacientes con hábitos y/o estilos de vida asociados a la aparición de cáncer; etc.) se pueden tratar en buena medida contemporáneamente con (por ej., dentro de las 48 horas, dentro de las 24 horas o dentro de las 12 horas ) el inicio de los síntomas del cáncer. Por supuesto los individuos que se sabe que padecen cáncer pueden recibir el tratamiento de la invención en cualquier momento.

En otras realizaciones, las nanopartículas de la presente invención se pueden usar para inhibir el crecimiento de células cancerosas, por ej. de células de cáncer prostático. Según se usa en este documento, la expresión "inhibe el crecimiento de células cancerosas" o "inhibir el crecimiento de células cancerosas" se refiere a reducir la velocidad de la proliferación y/o la migración de células cancerosas, detener la proliferación y/o la migración de células cancerosas, o causar la muerte de las células cancerosas, de modo que la velocidad de crecimiento de las células cancerosas se reduzca en comparación con la velocidad observada o prevista de crecimiento de células cancerosas de control sin tratar. La expresión "inhibe el crecimiento" también se puede referir una reducción en el tamaño o a la desaparición de una célula cancerosa o un tumor, así como a la reducción de su potencial metastásico. Preferentemente, dicha inhibición a nivel celular puede reducir el tamaño, impedir el crecimiento, reducir la agresividad, o prevenir o inhibir las metástasis de un cáncer en un paciente. Los expertos en el área pueden determinar fácilmente, mediante cualquiera de diversos indicios adecuados, si el crecimiento de las células cancerosas es inhibido.

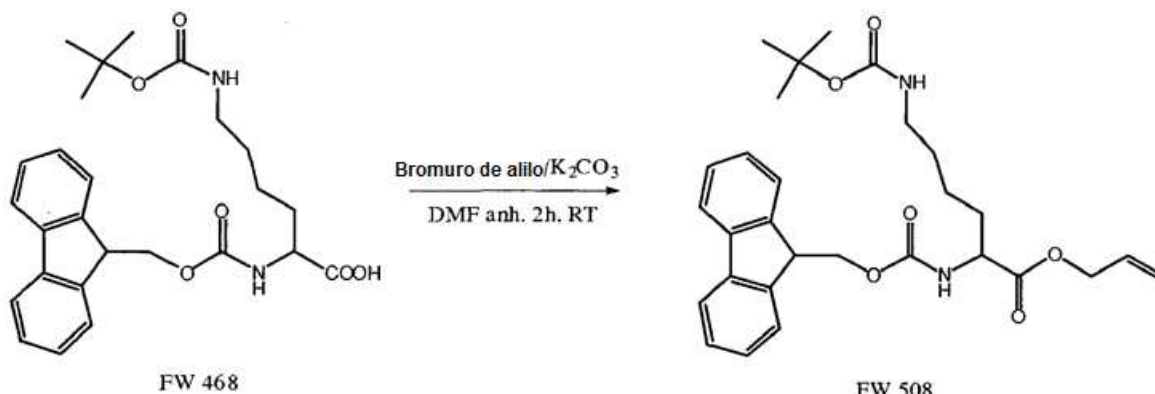
La inhibición del crecimiento de células cancerosas puede ser evidenciada, por ejemplo, por detención de las células cancerosas en una fase particular del ciclo celular, por ej., detener en la fase G2/M del ciclo celular. La inhibición del crecimiento de células cancerosas también se puede evidenciar por medición directa o indirecta del tamaño de las células cancerosas o el tumor. En pacientes humanos con cáncer, dichas mediciones se hacen generalmente usando métodos de imagenología muy conocidos como resonancia magnética, tomografía computarizada axial y radiografías. El crecimiento de células cancerosas también se puede determinar indirectamente, determinando los niveles circulantes de antígeno carcinoembrionario, antígeno prostático específico u otros antígenos específicos del cáncer que se correlacionan con el crecimiento de células cancerosas. La inhibición del crecimiento del cáncer también se correlaciona generalmente con una supervivencia prolongada y/o mayor salud y bienestar del sujeto.

También se proporcionan en este documento métodos para administrar a un paciente una nanopartícula dada a conocer que incluye un principio activo, donde, luego de la administración al paciente, dichas nanopartículas reducen en gran medida el volumen de distribución y/o reducen sustancialmente la  $C_{\text{máx}}$  libre, en comparación con la administración del principio activo solo (es decir, no como una nanopartícula dada a conocer).

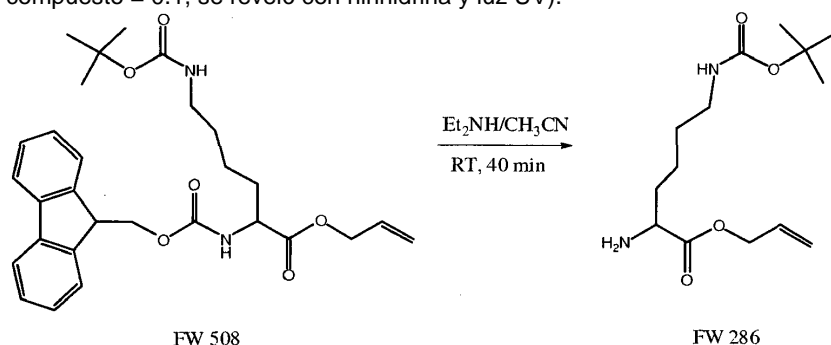
**Ejemplos**

5 La invención se describirá ahora en general, se comprenderá más fácilmente por referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen meramente con fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención en modo alguno.

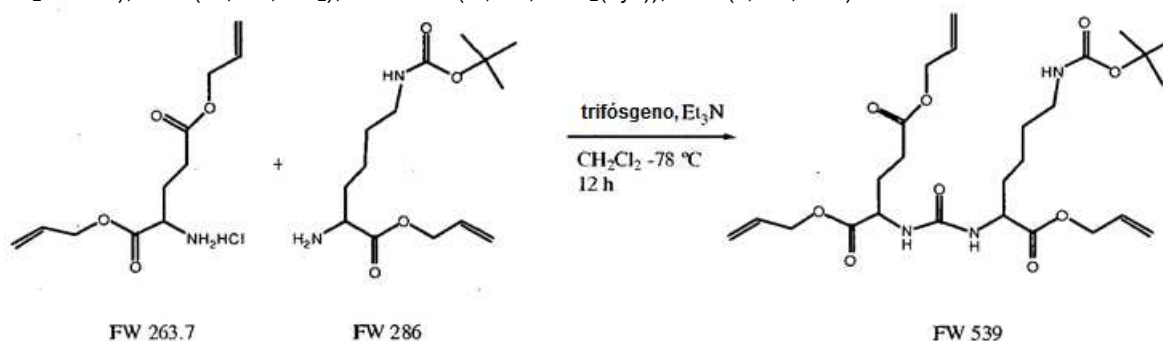
Ejemplo 1: Síntesis de un ligando de PSMA de bajo peso molecular (GL2)



10 Se disolvieron 5 g (10.67 mmol) del compuesto de partida en 150 mL de DMF anhidra. A esta solución se le agregó bromuro de alilo (6.3 mL, 72 mmol) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.47 g, 10.67 mmol). La reacción se agitó durante 2 h, se eliminó el solvente, el material crudo se disolvió en AcOEt y se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$  hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  (anhidro) y se evaporó para dar 5.15 g (95%) del material. (TLC en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 20:1  $R_f$  = 0.9, comenzó  $R_f$  compuesto = 0.1, se reveló con ninhidrina y luz UV).



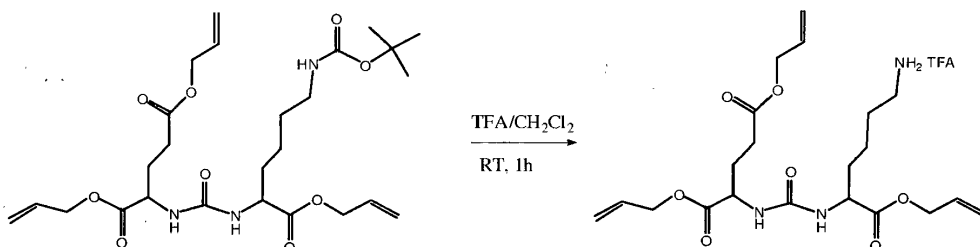
15 A una solución del compuesto (5.15 g, 10.13 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (50 mL) se le agregó  $\text{Et}_2\text{NH}$  (20 mL, 0.19 mol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. El solvente se eliminó y el compuesto se purificó por cromatografía en columna (hexano:AcOEt 3:2) para dar 2.6 g (90%). (TLC en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 10:1  $R_f$  = 0.4, se reveló con ninhidrina (el compuesto tiene color violeta).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  5.95-5.85 (m, 1H,  $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 5.36-5.24 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 4.62-4.60 (m, 3H,  $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ,  $\text{NH Boc}$ ), 3.46 (t, 1H,  $\text{CH(Lys)}$ ), 3.11-3.07 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 1.79 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 1.79-1.43 (m, 6H,  $3\text{CH}_2(\text{Lys})$ ), 1.43 (s, 9H, Boc).



25 A una solución en agitación de glutamato de dialilo (3.96 g, 15 mmol) y trifósgeno (1.47 g, 4.95 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (143 mL) a  $-78^\circ\text{C}$  se le agregó  $\text{Et}_3\text{N}$  (6.4 mL, 46 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (28 mL). Se permitió que la mezcla de reacción se calentara hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1.5 h. Después se agregó el derivado de lisina (2.6 g,

9.09 mmol) en una solución de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (36 mL) a -78 °C y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La solución se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se lavó dos veces con H<sub>2</sub>O, se secó en MgSO<sub>4</sub> (anh.) y se purificó por cromatografía en columna (hexano:AcOEt 3:1→2:1→AcOEt) para dar 4 g (82%) (TLC en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 20:1 R<sub>f</sub> = 0.3, se reveló con ninhidrina). <sup>1</sup>H-NMR (EDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 5.97-5.84 (m, 3H, 3-CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 5.50 (bt, 2H, 2NHurea), 5.36-5.20 (m, 6H, 3-CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 4.81 (bs, 1H, NHBoc), 4.68-4.40 (m, 8H, 3-CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>, CH(Lys), CH(glu)), 3.09-3.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NHBoc), 2.52-2.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(glu.)), 2.25-2.14 y 2.02-1.92 (2m, 2H, CH<sub>2</sub>(glu.)), 1.87-1.64 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>(Lys)), 1.51-1.35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(Lys)), 1.44 (s, 9H, Boc).

5



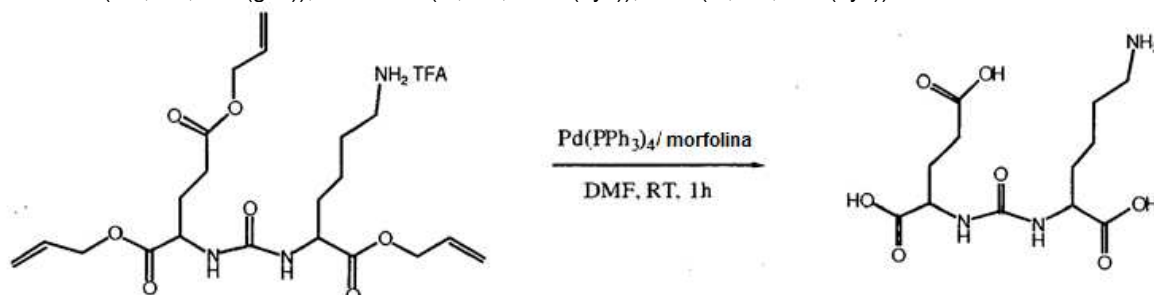
FW 539

FW 553

10

A una solución del compuesto (4 g, 7.42 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (40 mL) se le agregó TFA (9 mL) a 0 °C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El solvente se eliminó al vacío hasta sequedad total para dar 4.1 g (cuantitativo). (TLC en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 20:1 R<sub>f</sub> = 0.1, se reveló con ninhidrina). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 6.27-6.16 (2d, 2H, 2NHurea), 5.96-5.82 (m, 3H, 3-CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 5.35-5.20 (m, 6H, 3-CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 4.61-4.55 (m, 6H, 3-CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 4.46-4.41 (m, 2H, CH(Lys), CH(glu)), 2.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NHBoc), 2.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(glu.)), 2.23-2.11 y 2.01-1.88 (2m, 2H, CH<sub>2</sub>(glu.)), 1.88-1.67 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>(Lys)), 1.45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(Lys)).

15



FW 553

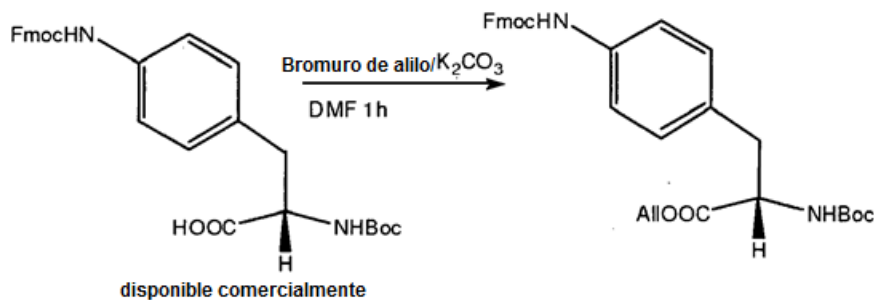
FW 319

A una solución del compuesto (2 g, 3.6 mmol) en DMF (anh.) (62 mL) en atmósfera de argón se le agregó Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.7 g, 0.6 mmol) y morfolina (5.4 mL, 60.7 mmol) a 0 °C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El solvente se eliminó. Después el producto crudo se lavó dos veces con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y después se llevó a solución en H<sub>2</sub>O. A esta solución se le agregó una solución diluida de NaOH (0.01 N) hasta que el pH fue muy básico. El solvente se eliminó a presión reducida. El sólido se volvió a lavar con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, y una mezcla de MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), se llevó a solución en H<sub>2</sub>O y se neutralizó con resina Amberlite IR-120 H<sup>+</sup>. El solvente se evaporó y el compuesto se precipitó con MeOH, para dar 1 g (87 %) de GL2. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) δ 4.07 (m, 2H, CH(Lys), CH(glu)), 2.98 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(glu.)), 2.08-2.00 (m, 1H, CH<sub>2</sub>(glu.)), 1.93-1.60 (m, 5H, CH<sub>2</sub>(glu.)), 2CH<sub>2</sub>(Lys)), 1.41 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(Lys)). Masa ESI: 320.47 [M + H<sup>+</sup>], 342.42 [M + Na<sup>+</sup>].

20

25

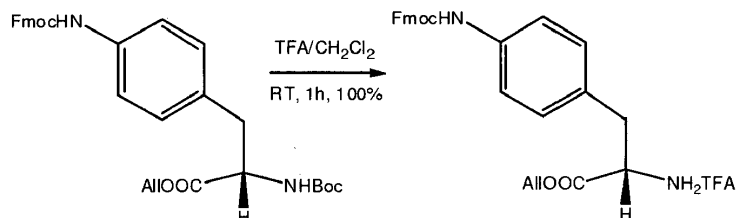
Ejemplo 2: Síntesis de un ligando de PSMA de bajo peso molecular (GL1)



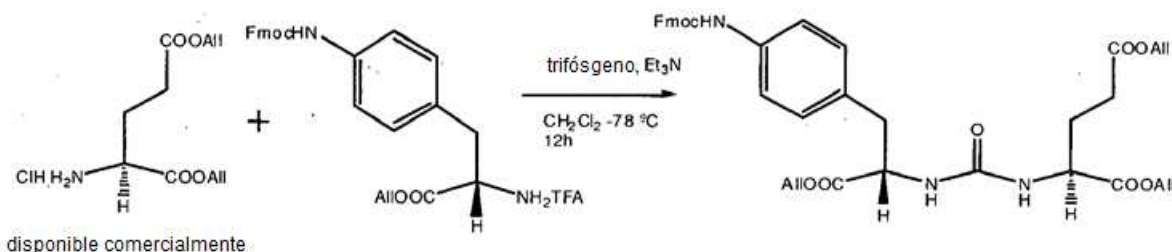
disponible comercialmente

30

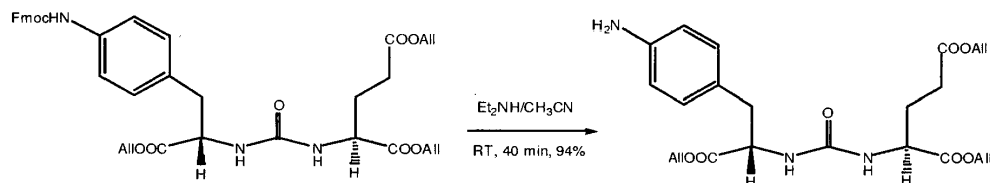
Se disolvieron 130 mg (0.258 mmol) del compuesto de partida en 3 mL de DMF anhidra. A esta solución se le agregó bromuro de alilo (150  $\mu$ L, 1.72 mmol) y  $K_2CO_3$  (41 mg, 0.3 mmol). La reacción se agitó durante 1 h, se eliminó el solvente, el producto crudo se disolvió en AcOEt y se lavó con  $H_2O$  hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con  $MgSO_4$  (anhidro) y se evaporó para dar 130 mg (93%). (TLC en  $CH_2Cl_2$ :MeOH 20:1  $R_f$  = 0.9, comenzó  $R_f$  compuesto = 0.1, se reveló con ninhidrina y luz UV).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.81-7.05 (12H, aromáticos), 6.81 (bs, 1H, *NH*Fmoc), 5.93-5.81. (m, 1H,  $-CH_2CHCH_2$ ), 5.35-5.24 (m, 2H,  $-CH_2CHCH_2$ ), 5.00 (bd, 1H, *NH*boc), 4.61-4.53 (m, 5H,  $-CH_2CHCH_2$ ,  $CH_2$ (Fmoc),  $CH$ (pheala.)), 4.28 (t, 1H,  $CH$ (Fmoc)), 3.12-2.98 (m, 2H,  $CH_2$ (pheala.)), 1.44 (s, 9H, Boc).



15 A una solución del compuesto (120 mg, 0.221 mmol) en  $CH_2Cl_2$  seco (2 mL) se le agregó TFA (1 mL) a 0  $^{\circ}C$ . La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El solvente se eliminó al vacío, se agregó agua y se volvió a eliminar, se agregó  $CH_2Cl_2$  y se volvió a eliminar hasta sequedad total para dar 120 mg (cuantitativo). (TLC en  $CH_2Cl_2$ :MeOH 20:1  $R_f$  = 0.1, se reveló con ninhidrina y luz UV).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.80-7.00 (13H, aromáticos, *NH*Fmoc), 5.90-5.75 (m, 1H,  $-CH_2CHCH_2$ ), 5.35-5.19 (m, 3H,  $-CH_2CHCH_2$ , *NH*boc), 4.70-4.40 (2m, 5H,  $-CH_2CHCH_2$ ,  $CH_2$ (Fmoc),  $CH$ (pheala.)), 4.20 (t, 1H,  $CH$ (Fmoc)), 3.40-3.05 (m, 2H,  $CH_2$ (pheala.)).

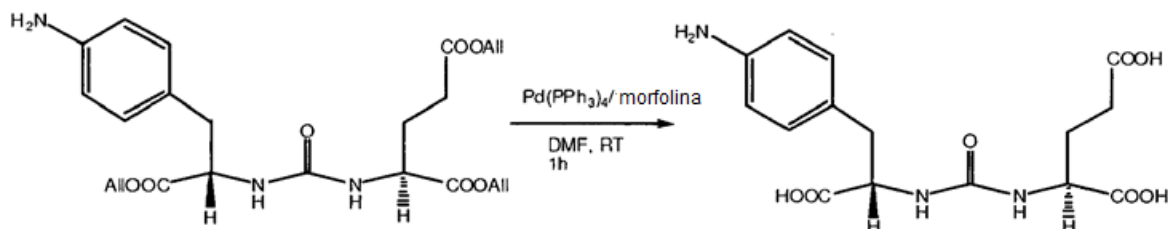


25 A una solución en agitación de glutamato de dialilo (110 mg, 0.42 mmol) y trifosgeno (43 mg, 0.14 mmol) en  $CH_2Cl_2$  (4 mL) a -78  $^{\circ}C$  se le agregó  $Et_3N$  (180  $\mu$ L, 1.3 mmol) en  $CH_2Cl_2$  (0.8 mL). Se permitió que la mezcla de reacción se calentara hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1.5 h. Después se agregó el derivado de fenilalanina (140 mg, 0.251 mmol) en una solución de  $CH_2Cl_2$  (1 mL) y  $Et_3N$  (70  $\mu$ L, 0.5 mmol) a -78  $^{\circ}C$  y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La solución se diluyó con  $CH_2Cl_2$ , se lavó dos veces con  $H_2O$ , se secó en  $MgSO_4$  (anh.) y se purificó por cromatografía en columna (hexano:AcOEt 3:1) para dar 100 mg (57%) (TLC en  $CH_2Cl_2$ :MeOH 20:1  $R_f$  = 0.3, se reveló con ninhidrina y luz UV).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.80-6.95 (13H, aromáticos, *NH*Fmoc), 5.98-5.82 (m, 3H, 3- $CH_2CHCH_2$ ), 5.54 (bd, 1H, *NH*urea), 5.43-5.19 (m, 7H, 3- $CH_2CHCH_2$ , *NH*urea), 4.85-4.78 (m, 1H,  $CH$ (pheala.)), 4.67-4.50 (m, 9H, 3- $CH_2CHCH_2$ ,  $CH_2$ (Fmoc),  $CH$ (glu.)), 4.28 (t, 1H,  $CH$ (Fmoc)), 3.05 (d, 2H,  $CH_2$ (pheala.)), 2.53-2.33 (m, 2H,  $CH_2$ (glu.)), 2.25-2.11 y 1.98-1.80 (2m, 2H,  $CH_2$ (glu.)).



35 A una solución del compuesto de partida (60 mg, 0.086 mmol) en  $CH_3CN$  (1 mL) se le agregó  $Et_2NH$  (1 mL, 10 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. El solvente se eliminó y el compuesto se purificó por cromatografía en columna (hexano:AcOEt 2:1) para dar 35 mg (85%). (TLC en  $CH_2Cl_2$ :MeOH 1,0:1  $R_f$  = 0.5, comenzó  $R_f$  compuesto = 0.75, se reveló con ninhidrina (el compuesto tiene color violeta) y luz UV).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 300 MHz)  $\delta$  6.85 y 6.55 (2d, 4H, aromáticos), 5.98-5.82 (m, 3H, 3- $CH_2CHCH_2$ ), 5.56 (bd, 1H, *NH*urea), 5.44-5.18 (m, 7H, 3- $CH_2CHCH_2$ , *NH*urea), 4.79-4.72 (m, 1H,  $CH$ (pheala.)), 4.65-4.49 (m, 7H, 3- $CH_2CHCH_2$ ,  $CH$ (glu.)), 3.64 (bs, 2H,  $NH_2$ ), 3.02-2.89 (m, 2H,  $CH_2$ (pheala.)), 2.49-2.31 (m, 2H,  $CH_2$ (glu.)), 2.20-2.09 y 1.91-1.78 (2m, 2H,  $CH_2$ (glu.)).

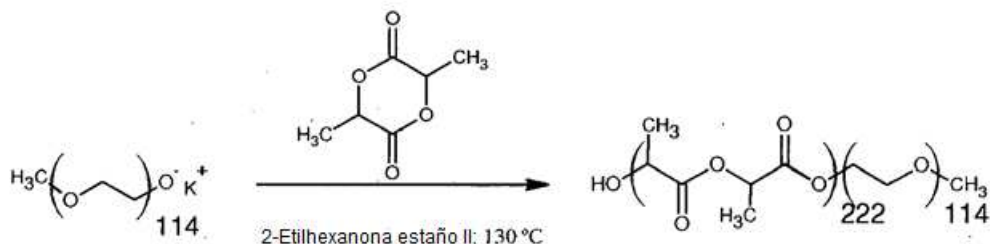




A una solución del compuesto (50 mg, 0.105 mmol) en DMF (anh., 1.5 mL) en atmósfera de argón se le agregó Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (21 mg, 0.018 mmol) y morfolina (154 μL, 1.77 mmol) a 0 °C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se eliminó el solvente. El material crudo se lavó dos veces con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y después se disolvió en H<sub>2</sub>O. A esta solución se le agregó una solución diluida de NaOH (0.01 N) hasta que el pH fue muy básico. El solvente se eliminó a presión reducida. El sólido se volvió a lavar con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, y mezcla de MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), se llevó a solución en H<sub>2</sub>O y se neutralizó con resina Amberlite IR-120 H<sup>+</sup>. El solvente se evaporó y el compuesto se precipitó con MeOH, para dar 25 mg (67%) de GL1. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) δ 7.08 y 6.79 (2d, 4H, aromáticos), 4.21 (m, 1H, CH(pheala.)), 3.90 (m, 1H, CH(glu.)), 2.99 y 2.82 (2dd, 2H, CH<sub>2</sub>(pheala.)), 2.22-2.11 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(glu.)), 2.05-1.70 (2m, 2H, CH<sub>2</sub>(glu.)). <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 75 MHz) δ 176.8, 174.5, 173.9 (3 COO), 153.3 (NHCONH), 138.8 (H<sub>2</sub>N-C(Ph)), 124.5, 122.9, 110.9 (aromáticos), 51.3 (CH(pheala.)), 49.8 (CH(glu.)), 31.8 (CH<sub>2</sub>(pheala.)), 28.4 y 23.6 (2CH<sub>2</sub>-glu.). Masa ESI: 354,19 [M + H<sup>+</sup>], 376,23 [M + Na<sup>+</sup>].

### Ejemplo 3: Preparación de PLA-PEG

La síntesis se llevó a cabo mediante polimerización de apertura del anillo de d,1-láctido con α-hidroxi-ω-metoxipoli(etilenglicol) como el iniciador macro, y se realizó a una temperatura elevada usando 2-etilhexanoato de estaño (II) como catalizador, como se muestra a continuación (PEG Mn (peso molecular promedio en número) ≈ 5000 Da; PLA Mn ≈ 16 000 Da; PEG-PLA Mn ≈ 21 000 Da)



El polímero se purificó disolviéndolo en diclorometano y precipitándolo en una mezcla de hexano y éter dietílico. El polímero recuperado de este paso se debe secar en una estufa.

### Ejemplo 4: Preparación de PLA-PEG-Ligando

La síntesis que se muestra en la figura 2, comienza con la conversión de Fmoc, BOC lisina a Fmoc, BOC, alil lisina haciendo reaccionar Fmoc, BOC lisina con bromuro de alilo y carbonato de potasio en dimetilformamida, seguido de tratamiento con dietilamina en acetonitrilo. Después se hace reaccionar BOC, alil lisina con trifósgeno y glutamato de dialilo, seguido de tratamiento con ácido trifluoroacético en cloruro de metileno para dar el compuesto "GL2P".

La cadena lateral amina de la lisina en GL2P se pega después mediante adición de hidroxil-PEG-ácido carboxílico con EDC y NHS. La conjugación de GL2P a PEG es a través de una unión amida. La estructura de este compuesto resultante es etiquetada "HO-PEG-GL2P". Luego de la pegilación, se usa polimerización de apertura del anillo (ROP) de d,1-láctido con el grupo hidroxilo de HO-PEG-GL2P como iniciador para unir un polímero en bloque de poliláctido a HO-PEG-GL2P a través de un enlace éster para dar "PLA-PEG-GL2P". Se usa 2-etilhexanoato de estaño (II) como catalizador para la polimerización de apertura del anillo.

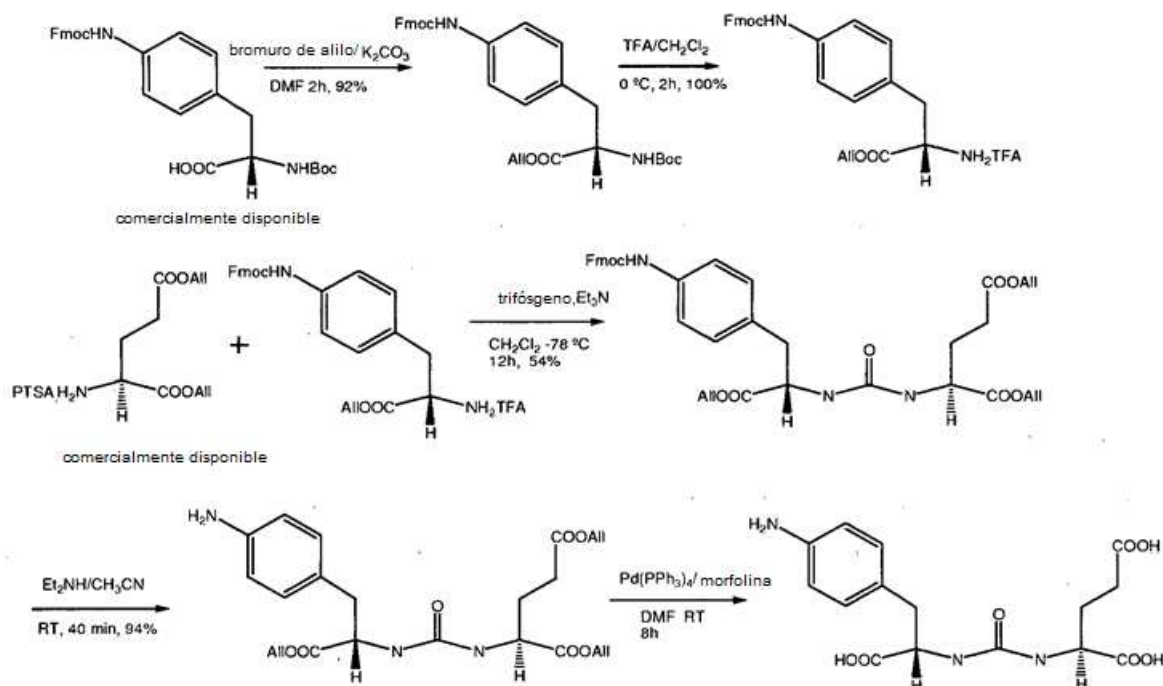
Finalmente, se eliminan los grupos alilo de PLA-PEG-GL2P usando morfolina y tetrakis(trifenilfosfina)paladio (como catalizador) en diclorometano, para dar el producto final PLA-PEG-Ligando. El compuesto final se purifica por precipitación en éter dietílico/hexano 30/70% (v/v).

### Ejemplo 5: Preparación de nanopartículas - Nanoprecipitación

Se pueden preparar nanopartículas utilizando ligando GL1 o GL2. El inhibidor de PSMA a base de urea GL2, que tiene un grupo amino libre ubicado en una región no crítica para la unión de PSMA, se sintetiza a partir de materiales de partida comerciales Boc-Phe(4NHfmoc)-OH y ácido dialil glutámico de acuerdo con el procedimiento que se



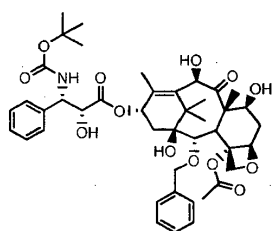
- 5 muestra en el esquema 1. Las nanopartículas se forman usando nanoprecipitación. El conjugado polímero-ligando se disuelve en un solvente orgánico miscible con agua junto con un fármaco u otro agente para seguir la absorción de la partícula. Se puede incluir un polímero no funcionalizado adicional para modular la densidad superficial del ligando. La solución de polímero se dispersa en una fase acuosa y las partículas resultantes se recogen por filtración. Las partículas se pueden secar o analizar inmediatamente con relación a la absorción celular in vitro o la actividad antitumor prostático in vivo.



Esquema 1

Ejemplo 6: Preparación de nanopartículas - Proceso de emulsión

- 10 Se forma una fase orgánica compuesta por 5% de sólidos (% en peso) que incluye 2% de copolímero en dibloque poli(láctido-co-glicólico)-poli(etilenglicol) (PLGA-PEG; 45 kDa-5 kDa), 2% de poli(D,L-láctido) (PLA; 8.5 kDa) y 1% de docetaxel (DTXL) donde el docetaxel tiene la estructura



- 15 Los solventes orgánicos son acetato de etilo (EA) y alcohol bencílico (BA) donde BA constituye 20% (% en peso) de la fase orgánica. BA se usa en parte para solubilizar el docetaxel. La fase orgánica se mezcla con una fase acuosa en una relación de aproximadamente 1:5 (fase oleosa:fase acuosa) donde la fase acuosa está compuesta por 0.5% de colato de sodio, 2% de BA y 4% de EA (% en peso) en agua. La emulsión primaria se forma combinando las dos fases por mezcla simple o mediante el uso de un homogeneizador de rotor y estator. La emulsión primaria se convierte después en una emulsión fina mediante el uso de una sonda de ultrasonido o un homogeneizador de alta presión.
- 20 Luego la emulsión fina se temple agregando un temple enfriado (0-5 °C) de agua desionizada mientras se mezcla. La relación medio para temple:emulsión es aproximadamente 8.5:1. Después se agrega una solución de 25% (% en peso) de Tween 80 al medio para temple para obtener aproximadamente 2% de Tween 80 total. Después las nanopartículas se aíslan por centrifugación o ultrafiltración/diafiltración. Posteriormente, la suspensión de nanopartículas se puede congelar con un crioprotector, como sacarosa al 10% en peso.

30

Se encontró que la adición de PLA además del copolímero PLGA-PEG aumentaba significativamente la carga de fármaco. Es posible el uso de BA, él mismo también sirve para aumentar la eficiencia de la encapsulación, aumentando la eficiencia de la encapsulación aun cuando el BA no fuera necesario para solubilizar el DTXL. Se encontró que la temperatura del medio para temple tenía un papel fundamental en la carga de fármaco. El uso de un medio para temple frío (generalmente mantenido a 0-5 °C) aumentó significativamente la carga de fármaco en comparación con la carga de fármaco cuando se usó un medio para temple a temperatura ambiente.

El DTXL tiene una solubilidad muy baja en agua, y se encontró que el DTXL no encapsulado a menudo formaba cristales que eran difíciles de aislar de las nanopartículas formadas. Se agregó solubilizante de fármaco (Tween 80) luego de haber temple la emulsión fina. El Tween 80 es capaz de solubilizar eficazmente los cristales de DTXL y permitir el aislamiento de nanopartículas de DTXL no encapsulado evitando la formación de cristales de DTXL, y/o solubilizando eficazmente todos los cristales de DTXL que se formaron cuando se templó la emulsión fina. Un conjunto de condiciones de nanoemulsión estándar fueron las siguientes:

Control:

Atributo	Valor
Copolímero en bloque (tipo/cantidad)	45/5 PLGA (50/50 L:G)-PEG (5 Kda), 80%
Homopolímero (tipo/cantidad)	Ninguno
Fármaco (cantidad de DTXL)	10%
Solvente orgánico (tipo/cantidad)	Acetato de etilo (EA)
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Ninguno
Fase acuosa	1% de PVA con 6.5% de EA
Temperatura del medio para temple	~5 °C
<b>RESULTADOS</b>	
Atributo	Valor
Tamaño de partícula	191 nm
Carga de fármaco	0.8%
Liberación in vitro (24 horas a 37 °C)	No determinado (ND)
Otro	NA

La adición de homopolímero como un aditivo produjo una mayor carga de fármaco si bien el tamaño de partícula es menor, como se muestra a continuación:

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Copolímero en bloque (tipo/cantidad)	45/5 PLGA (50/50 L:G)-PEG (5 Kda), 90%	45/5 PLGA (50/50 L:G)-PEG (5 Kda), 45%
Homopolímero (tipo/cantidad)	Ninguno	8.5 kDa PLA, 45%
Fármaco (cantidad de DTXL)	10%	10%
Solvente orgánico (tipo/cantidad)	EA	EA, 80%
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Ninguno	Alcohol bencílico (BA), 20%
Fase acuosa	1% de PVA con 6.5% de EA	1% de PVA con 6.5% de EA
Temperatura del medio para temple	~5 °C	~5 °C
<b>RESULTADOS</b>		
Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Tamaño de partícula	191 nm	134 nm
Carga de fármaco	0.8%	2.4%
Liberación in vitro (24 horas a 37 °C)	No determinado (ND)	No determinado (ND)

## ES 2 462 090 T3

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
°C)		
Otro	NA	NA

Temperatura del medio para temple

- 5 Aquí el control utilizado para comparación es diferente del control anterior, porque esos ya se habían realizado a temperatura de temple fría.

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Copolímero en bloque (tipo/cantidad)	45/5 PLGA (50/50 L:G)-PEG 47,5%	45/5 PLGA (50/50 L:G), 47.5%
Homopolímero (tipo/cantidad)	~30 kDa PLGA (50/50 L:G), 47.5%	~30 kDa PLGA (50/50 L:G), 47.5%
Fármaco (cantidad de DTXL)	5%	5%
Solvente orgánico (tipo/cantidad)	Diclorometano (DCM)	Diclorometano (DCM)
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Ninguno	Ninguno
Fase acuosa	0.5% de colato de sodio	0.5% de colato de sodio
Temperatura del medio para temple	~25 °C	~5 °C

### RESULTADOS

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Tamaño de partícula	210 nm	214 nm
Carga de fármaco	1.2%	3.6%
Liberación in vitro (24 horas a 37 °C)	No determina do (ND)	No determinado (ND)
Otro	NA	NA

Ejemplos de parámetros

Atributo	Valor
Copolímero en bloque (tipo/cantidad)	45/5 PLA-PEG, 40% (5 moles % que contienen PLA-PEG-GL2)
Homopolímero (tipo/cantidad)	8.5 kDa PLA, 40%
Fármaco (cantidad de DTXL)	20%
Solvente orgánico (tipo/cantidad)	EA, 80%
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	BA, 20%
Fase acuosa	0.5% de colato de sodio, 4% de EA, 2% de BA
Temperatura del medio para temple	~5 °C
Resultados	
Atributo	Valor
Tamaño de partícula	98.5 nm
Carga de fármaco	3.0%
Liberación in vitro (24 horas a 37 °C)	~60%

10

Ejemplo 7: Proceso de emulsión

- 15 El proceso descrito a continuación usa un aumento en el contenido de sólidos de la fase oleosa. Un flujograma general del proceso se describe en la figura 3 y un diagrama de flujo del proceso se describe en la figura 4. Reduciendo el contenido de solvente de la fase oleosa emulsionada, se pierde menos fármaco en el líquido de temple cuando las nanopartículas se endurecen. Se elige un sistema de sólidos y solvente para evitar que sea

5 excesivamente viscoso, que puede limitar la capacidad de emulsionarse en gotitas de ~100 nm. El uso de un copolímero de peso molecular relativamente bajo (PLA-PEG de ~16 kDa-5 kDa) y homopolímero de bajo peso molecular (PLA de ~7 kDa) permite que la formulación mantenga una viscosidad suficientemente baja a un elevado contenido de sólidos. Se elige un sistema solvente que tenga un poder de solvatación adecuado para mantener el fármaco en solución a concentraciones altas. El uso de un sistema cosolvente (típicamente acetato de etilo:alcohol bencílico 79:21) permite una solución continua hasta 50% de sólidos con una mezcla polímero:docetaxel 80:20.

10 Se forma una fase orgánica compuesta por una mezcla de docetaxel (DTXL) y polímero (homopolímero, copolímero y copolímero con ligando). La fase orgánica se mezcla con una fase acuosa a una relación de aproximadamente 1:5 (fase oleosa:fase acuosa) donde la fase acuosa está compuesta por un tensioactivo y algo de solvente disuelto. Para lograr una carga de fármaco elevada, se usa alrededor de 30% de sólidos en la fase orgánica.

15 Se forma una fase orgánica compuesta por una mezcla de docetaxel (DTXL) y polímero (homopolímero, copolímero y copolímero con ligando). Las composiciones y solventes orgánicos se listan en la tabla. La fase orgánica se mezcla con una fase acuosa a una relación de aproximadamente 1:5 (fase oleosa:fase acuosa) donde la fase acuosa está compuesta por un tensioactivo y algo de solvente disuelto. La emulsión primaria se forma combinando las dos fases por mezcla simple o mediante el uso de un homogeneizador de rotor y estator. La emulsión primaria se convierte después en una emulsión fina mediante el uso de un homogeneizador de alta presión. Después la emulsión fina se temple agregando agua desionizada a una temperatura dada (listada en la tabla) mientras se mezcla. La relación medio para temple:emulsión es aproximadamente 8.5:1. Después se agrega una solución de 25% (% en peso) de Tween 80 al medio para temple para obtener aproximadamente 2% de Tween 80 total. Esto sirve para disolver el fármaco libre, no encapsulado, y hace factible el proceso de aislamiento de la nanopartícula. Después las nanopartículas se aíslan por centrifugación o ultrafiltración/diafiltración.

25 Control

A continuación se proporcionan un conjunto estándar de condiciones de nanoemulsión. Se forman partículas que no contienen ligando (nanopartículas no dirigidas).

Atributo	Valor
Nº de Lote	15-157 D
Homopolímero (tipo/cantidad)	6.5 kDa PLA
Copolímero (tipo/cantidad)	16/5 PLA-PEG, 40%
Fármaco (cantidad de DTXL)	20%
Solvente orgánico (tipo/cantidad)	Acetato de etilo (EA), 79%
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Alcohol bencílico (BA), 21%
Fase acuosa	0.5% de colato de sodio, 2% de BA, 4% de EA en agua
[sólidos] en fase oleosa	5% en peso
<b>RESULTADOS</b>	
Atributo	Valor
Tamaño de partícula	114.7 nm
Carga de fármaco	3.97%

30 10% de sólidos

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Nº de Lote	15-157 D	15-157 C
Homopolímero (tipo/cantidad)	6.5 kDa PLA	6.5 kDa PLA
Copolímero (tipo/cantidad)	16/5 PLA-PEG, 40%	16/5 PLA-PEG, 40%
Fármaco (cantidad de DTXL)	20%	20%
Solvente orgánico (tipo/cantidad)	Acetato de etilo (EA), 79%	Acetato de etilo (EA), 79%
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Alcohol bencílico (BA), 21%	Alcohol bencílico (BA), 21%

ES 2 462 090 T3

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Fase acuosa	0.5% de colato de sodio, 2% de BA, 4% de EA en agua	0.5% de colato de sodio, 2% de BA, 4% de EA en agua
[sólidos] en fase oleosa	5% en peso	10% en peso
Resultados		
Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Tamaño de partícula	114.7 nm	11.5.1 nm
Carga de fármaco	3.97%	13.36%

20% de sólidos

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Nº de Lote	15-157 D	15-157A
Homopolímero (tipo/cantidad)	6.5 kDa PLA	6.5 kDa PLA
Copolímero (tipo/cantidad)	16/5 PLA-PEG, 40%	16/5 PLA-PEG, 40%
Fármaco (cantidad de DTXL)	20%	20%
Solvente orgánico (tipo/cantidad)	Acetato de etilo (EA), 79%	Acetato de etilo (EA), 79%
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Alcohol bencílico (BA), 21%	Alcohol bencílico (BA), 21%
Fase acuosa	0.5% de colato de sodio, 2% de BA, 4% de EA en agua	0.5% de colato de sodio, 2% de BA, 4% de EA en agua
[sólidos] en fase oleosa	5% en peso	20% en peso
Resultados		
Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Tamaño de partícula	114.7 nm	130.3 nm
Carga de fármaco	3.97%	16.15%

5 40% de sólidos

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Nº de Lote	15-157 D	15-171A
Homopolímero (tipo/cantidad)	6.5 kDa PLA	6.5 kDa PLA
Copolímero (tipo/cantidad)	16/5 PLA-PEG, 40%	16/5 PLA-PEG, 40%
Fármaco (cantidad de DTXL)	20%	20%
Solvente orgánico (tipo/cantidad)	Acetato de etilo (EA), 79%	Acetato de etilo (EA), 79%
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Alcohol bencílico (BA), 21%	Alcohol bencílico (BA), 21%
Fase acuosa	0.5% de colato de sodio, 2% de BA, 4% de EA en agua	0.5% de colato de sodio, 2% de BA, 4% de EA en agua
[sólidos] en fase oleosa	5% en peso	40% en peso
Resultados		
Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Tamaño de partícula	114.7 nm	130 nm
Carga de fármaco	3.97%	14.07%

30% de sólidos con mayor concentración de tensioactivo para reducción del tamaño de la partícula; lote de nanopartícula dirigida.

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Nº de Lote	15-157 D	35-03 A
Homopolímero (tipo/cantidad)	6.5 kDa PLA	8,2 kDa PLA
Copolímero (tipo/cantidad)	16/5 PLA-PEG, 40%	16/5 PLA-PEG, 40%, con 1% en peso como GL2-PEG-PLA
Fármaco (cantidad de DTXL)	20%	20%
Solvente orgánico (tipo/cantidad)	Acetato de etilo (EA), 79%	Acetato de etilo (EA), 79%
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Alcohol bencílico (BA), 21%	Alcohol bencílico (BA), 21%
Fase acuosa	0.5% de colato de sodio, 2% de BA, 4% de EA en agua	1% de colato de sodio, 2% de BA, 4% de EA en agua
[sólidos] en fase oleosa	5% en peso	30% en peso
Resultados		
Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Tamaño de partícula	114.7 nm	114.1 nm
Carga de fármaco	3.97%	11.85%

5

#### Ejemplo 8: Preparación de nanopartículas - Proceso de emulsión 2

10 Se forma una fase orgánica compuesta por una mezcla de docetaxel (DTXL) y polímero (homopolímero, copolímero y copolímero con ligando). La fase orgánica se mezcla con una fase acuosa a una relación de aproximadamente 1:5 (fase oleosa:fase acuosa) donde la fase acuosa está compuesta por un tensioactivo y algo de solvente disuelto. Para lograr una carga de fármaco elevada, se usa alrededor de 30% de sólidos en la fase orgánica.

15 La emulsión gruesa primaria se forma combinando las dos fases por mezcla simple o mediante el uso de un homogeneizador de rotor y estator. El rotor/estator produjo una solución lechosa homogénea, mientras que la barra de agitación produjo una emulsión gruesa visiblemente más grande. Se observó que el método de la barra de agitación dio lugar a que significativas gotas de fase oleosa se adhirieran al costado del recipiente de alimentación, lo que sugiere que si bien el tamaño de la emulsión gruesa no es un parámetro crítico del proceso para la calidad, se debe hacer suficientemente fina para evitar pérdidas de rendimiento o separación de fase. Por consiguiente el rotor y estator se usa como el método estándar de formación de la emulsión gruesa, aunque un mezclador de alta velocidad puede ser adecuado a una escala mayor.

20 La emulsión primaria se convierte después en una emulsión fina mediante el uso de un homogeneizador de alta presión. El tamaño de la emulsión gruesa no afecta significativamente al tamaño de partícula luego de los pasajes sucesivos (103) a través del homogeneizador. M-110-EH (Figura 5).

25 Se encontró que la presión de alimentación del homogeneizador tenía un impacto significativo sobre el tamaño de partícula resultante. Tanto en los homogeneizadores neumáticos como eléctricos M-110EH, se encontró que reducir la presión de alimentación también reducía el tamaño de partícula (Figura 6). Por consiguiente la presión operativa estándar utilizada para el M-110EH es 4000-5000 psi por cámara de interacción, que es la presión de procesamiento mínima de la unidad. El M-110EH también tiene la opción de una o dos cámaras de interacción. Viene con una cámara Y restrictiva, en serie con una cámara Z menos restrictiva de 200 µm. Se encontró que el tamaño de partícula se redujo realmente cuando se retiró la cámara Y y se la reemplazó con una cámara de blanco. Además, retirar la cámara Y aumentó significativamente la velocidad de flujo de emulsión durante el procesamiento.

30

Después de 2-3 pasajes el tamaño de partícula no se redujo significativamente, y los pasajes sucesivos incluso pueden causar un aumento del tamaño de partícula. Los resultados se resumen en la figura 7, donde la fase orgánica placebo constó de 25.5% de polímero combinado de 50:50 16.5/5 PLA/PEG:8.2 PLA. La fase orgánica se emulsionó 5:1 O:W con fase acuosa estándar, y se realizaron múltiples pasajes discretos, templando una pequeña porción de la emulsión después de cada pasaje. La escala indicada representa los sólidos totales de la formulación.

El efecto de la escala sobre el tamaño de partícula mostró una sorprendente dependencia de la escala. La tendencia muestra que en el rango de tamaño del lote de 2-10 g, los lotes más grandes producen partículas más pequeñas. Se demostró que esta dependencia de la escala se elimina al considerar lotes a escala superior a 10 g. La cantidad de sólidos utilizados en la fase oleosa fue de alrededor de 30%. Las figuras 8 y 9 describen los efectos de la concentración de sólidos sobre el tamaño de partícula y la carga de fármaco; con la excepción de las series 15-175, todos los lotes son placebo. Para los lotes de placebo el valor de % de sólidos representa el % de sólidos cuando el fármaco está presente en el 20% p/p estándar.

La tabla A resume los parámetros del proceso de emulsión.

Tabla A

Parámetro	Valor	Observación
Formación de la emulsión gruesa	Homogeneizador de rotor y estator	El tamaño de la emulsión gruesa no afecta el tamaño final de partícula, pero la emulsión gruesa grande puede causar una mayor retención de la fase oleosa en el recipiente de alimentación
Presión de alimentación del homogeneizador	4000-5000 psi por cámara	Menores presiones reducen el tamaño de partícula
Cámara(s) de interacción	Cámara Z 2 x 200 µm	La cámara Z de 200 µm produce el menor tamaño de partícula, y permite el rendimiento más alto del homogeneizador
Número de pasajes por el homogeneizador	2-3 pasajes	Los estudios demostraron que el tamaño de partícula no se reduce significativamente después de 2 pasajes discretos, y el tamaño puede incluso aumentar con los pasajes sucesivos
Fase acuosa [colato de sodio]	0.1%	[colato de sodio] puede alterar eficazmente el tamaño de partícula; el valor se optimiza para un proceso y una formulación determinados
Relación W:O	5:1	La relación más baja sin un aumento significativo del tamaño de partícula es ~5:1
[Sólidos] en fase oleosa	30%	Mayor eficiencia del proceso, mayor encapsulación del fármaco, viscosidad que se puede trabajar

Después la emulsión fina se temple agregando agua desionizada a una temperatura dada mientras se mezcla. En la operación de la unidad de temple, la emulsión se agrega a un medio para temple acuoso frío en agitación. Esto sirve para extraer una porción significativa de los solventes de la fase oleosa, endureciendo eficazmente las nanopartículas para la filtración posterior. Enfriar el medio para temple mejoró significativamente la encapsulación del fármaco. La relación medio para temple:emulsión es aproximadamente 5:1.

Se agrega una solución de 35% (% en peso) de Tween 80 al medio para temple para lograr aproximadamente 2% de Tween 80 total. Una vez que se temple la emulsión se agrega una solución de Tween 80 que actúa como solubilizante del fármaco, permitiendo la eliminación eficaz del fármaco no encapsulado durante la filtración. La tabla B indica cada uno de los parámetros del proceso de temple.

Tabla B Resumen de los parámetros del proceso de temple

Parámetro	Valor	Observación
Temperatura inicial del temple	<5 °C	La baja temperatura produce mayor encapsulación del fármaco
Solución de [Tween 80]	35%	Mayor concentración que se puede preparar y dispersar fácilmente en el medio para temple



## ES 2 462 090 T3

Parámetro	Valor	Observación
Relación Tween 80:fármaco	25:1	Cantidad mínima de Tween 80 necesaria para eliminar eficazmente el fármaco no encapsulado
Relación Q:E	5:1	Mínima relación Q:E que mantiene una elevada encapsulación del fármaco
Mantenimiento del temple/temperatura procesamiento	del de $\leq 5$ °C (con relación Q:E 5:1, relación Tween-80:fármaco 25:1)	Temperatura que evita una lixiviación significativa del fármaco durante el tiempo de mantenimiento del temple y el paso de concentración inicial

5 La temperatura debe mantenerse suficientemente fría con una suspensión suficientemente diluida (concentración suficientemente baja de solventes) para mantenerse debajo de Tg de las partículas. Si la relación Q:E no es suficientemente alta, entonces la mayor concentración de solvente plastifica las partículas y permite la lixiviación del fármaco. A la inversa, temperaturas menores permiten una elevada encapsulación del fármaco a bajas relaciones Q:E (~3:1), haciendo posible que el proceso tenga lugar más eficientemente.

10 Luego las nanopartículas se aíslan a través de un proceso de filtración de flujo tangencial para concentrar la suspensión de nanopartículas y el intercambio de los solventes, el fármaco libre y el solubilizante de fármacos de la solución de temple al agua. Se usa una membrana de celulosa regenerada con un peso molecular de corte (MWCO) de 300.

15 Se realiza una diafiltración de volumen constante (DF) para eliminar los solventes del medio para temple, el fármaco libre y el Tween-80. Para realizar una DF de volumen constante, se agrega tampón al recipiente del retenido a la misma velocidad que se retira el filtrado. Los parámetros del proceso para las operaciones TFF se resumen en la tabla C. La velocidad de flujo cruzado se refiere a la velocidad de flujo de la solución a través de los canales de alimentación y a través de la membrana. Este flujo proporciona la fuerza para barrer las moléculas que pueden ensuciar la membrana y restringir el flujo de filtrado. La presión transmembrana es la fuerza que conduce las moléculas permeables a través de la membrana.

20 Tabla C: parámetros de TFF

Parámetro	Valor optimizado	Efecto
Material de membrana	Celulosa regenerada - Membrana de malla gruesa	No hay diferencia en el comportamiento entre RC y PES, pero la compatibilidad del solvente es superior para RC.
Peso molecular de corte	300 kDa	No hay diferencia en las características NP (es decir Tween residual) se observa un aumento en la velocidad de flujo con membrana de 500 kDa pero no se dispone de 500 kDa para RC
Velocidad de flujo cruzado	11 L/min/m <sup>2</sup>	Mayor velocidad de flujo cruzado condujo a mayor flujo
Presión transmembrana	20 psid	Las membranas de canal abierto tienen velocidades de flujo máximas entre 10 y 30 psid. Las membranas de canal grueso tienen velocidades de flujo con TMP min (~20 psid).
Concentración de la suspensión de nanopartículas por diafiltración	30 mg/ml	La diafiltración es más eficiente a [NP] ~50 mg/ml con membranas TFF de canal abierto basándose en velocidades de flujo y rendimiento. Con membranas de canal grueso la velocidad de flujo se optimiza a ~30 mg/ml en el tampón de partida.
Número de diavolumenes	$\geq 15$ (basándose en el aumento del flujo)	Se necesitan alrededor de 15 diavolumenes para eliminar eficazmente el Tween 80. El punto final de la diafiltración se determina mediante control en proceso (meseta del aumento de flujo).
Área de la membrana	~1 m <sup>2</sup> /kg	Las membranas se dimensionaron basándose en las velocidades de flujo anticipadas y los volúmenes requeridos.

25 La lechada de nanopartículas filtrada se cicla térmicamente a una temperatura elevada durante el tratamiento. Una porción pequeña (habitualmente 5-10%) del fármaco encapsulado se libera desde las nanopartículas muy rápidamente luego de su exposición a 25 °C. Debido a este fenómeno, los lotes que se mantienen fríos durante todo el tratamiento son susceptibles de liberar fármaco o cristales de fármaco que se forman durante la administración o



- 5 cualquier porción del almacenamiento no congelado. Exponiendo la lechada de nanopartículas a temperatura elevada durante el tratamiento, se puede eliminar este fármaco “encapsulado flojamente” y mejorar la estabilidad del producto a expensas de una gota más pequeña al cargar el fármaco. La tabla D resume dos ejemplos de procesamiento a 25 °C. Otros experimentos demostraron que el producto es suficientemente estable después de ~2-4 diavolumenes para exponerlo a 25 °C sin perder la mayor parte del fármaco encapsulado. Se usan 5 diavolumenes como la cantidad para el procesamiento en frío antes del tratamiento a 25 °C.

Tabla D

		Lotes A	Lotes B
Carga de fármaco	Tratamiento en frío	11.3%	9.7%
	Tratamiento a 25 °C <sup>1</sup>	8.7-9.1%	9.0-9.9%
Estabilidad <sup>2</sup>	Tratamiento final en frío	<1 día	<1 día
	Tratamiento a 25 °C <sup>1</sup>	5-7 días	2-7 días
Aceleración <i>in vitro</i> <sup>3</sup>	Tratamiento en frío	~10%	No se realizó
	Tratamiento a 25 °C <sup>1</sup>	~2%	

<sup>1</sup>Los sublotos del tratamiento a 25 °C se expusieron a 25 °C luego de al menos 5 diavolumenes durante diversos periodos de tiempo. Se informan los rangos porque hubo múltiples sublotos con exposición a 25 °C.  
<sup>2</sup>Los datos de estabilidad representan el tiempo que el producto final pudo ser mantenido a 25 °C a concentraciones de nanopartículas de 10-50 mg/ml antes de la formación de cristales en la lechada (visible por microscopía)  
<sup>3</sup>La aceleración *in vitro* representa el fármaco liberado en el primer tiempo (casi inmediatamente)

- 10 Después del proceso de filtración la suspensión de nanopartículas se pasa a través de un filtro de grado esterilizante (0.2 µm absoluto). Se usan prefiltros para proteger el filtro de grado esterilizante a fin de usar una relación área de filtración/tiempo razonable para el proceso. Los valores se resumen en la tabla E.

Tabla E

Parámetro	Valor O	Efecto
Concentración de la suspensión de nanopartículas	50 mg/ml	A mayor [NP], las pérdidas de rendimiento son mayores pero la capacidad de filtrar a 50 mg/ml obvia la necesidad de concentrar asépticamente luego de la filtración
Velocidad de flujo de filtración	~1.3 L/min/m <sup>2</sup>	La capacidad de filtración disminuye a medida que aumenta la velocidad de flujo

- 15 El tren de filtración es Ertel Alsop Micromedia XL filtro de profundidad M953P membrana (0.2 µm Nominal); Pall SUPRAcap con Seitz EKSP medio de filtración en profundidad (0.1 - 0.3 µm Nominal); Pall Life Sciences Supor EKV 0.65/ 0.2 micrómetros filtro PES de grado esterilizante.
- 20 Se pueden usar 0.2 m<sup>2</sup> de superficie de filtración por kg de nanopartículas para los filtros de profundidad y 1.3 m<sup>2</sup> de superficie de filtración por kg de nanopartículas para los filtros de grado esterilizante.

Ejemplo 9

- 25 Se pueden preparar nanopartículas específicas para el objetivo que incluyan un conjugado de polímero biocompatible con, por ej., PEG, los antineoplásicos descritos en este documento, y opcionalmente conjugado con GL1 o GL2. Los ejemplos de nanopartículas se muestran en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1			
Nanopartículas que tienen un agente terapéutico listado y un conjugado polimérico que comprende: polímero biocompatible-polímero-(grupo para administración dirigida)			
Agente terapéutico	Polímero biocompatible	Polímero	Grupo para administración dirigida (opcional)
vincristina	PLGA	PEG	GL1
vincristina	PLA	PEG	GL1
vincristina	PGA	PEG	GL1

Tabla 1			
Nanopartículas que tienen un agente terapéutico listado y un conjugado polimérico que comprende: polímero biocompatible-polímero-(grupo para administración dirigida)			
Agente terapéutico	Polímero biocompatible	Polímero	Grupo para administración dirigida (opcional)
vincristina	PLGA	PEG	GL2
vincristina	PLA	PEG	GL2
vincristina	PGA	PEG	GL2
vincristina	PLGA	PEG-DSPE	GL1
vincristina	PLA	PEG-DSPE	GL1
vincristina	PGA	PEG-DSPE	GL1
vincristina	PLGA	PEG-DSPE	GL2
vincristina	PLA	PEG-DSPE	GL2
vincristina	PGA	PEG-DSPE	GL2
docetaxel	PLGA	PEG	GL1
docetaxel	PLA	PEG	GL1
docetaxel	PGA	PEG	GL1
docetaxel	PLGA	PEG	GL2
docetaxel	PLA	PEG	GL2
docetaxel	PGA	PEG	GL2
docetaxel	PLGA	PEG-DSPE	GL1
docetaxel	PLA	PEG-DSPE	GL1
docetaxel	PGA	PEG-DSPE	GL1
docetaxel	PLGA	PEG-DSPE	GL2
docetaxel	PLA	PEG-DSPE	GL2
docetaxel	PGA	PEG-DSPE	GL2
sirolimus	PLGA	PEG	GL1
sirolimus	PLA	PEG	GL1
sirolimus	PGA	PEG	GL1
sirolimus	PLGA	PEG	GL2
sirolimus	PLA	PEG	GL2
sirolimus	PGA	PEG	GL2
sirolimus	PLGA	PEG-DSPE	GL1
sirolimus	PLA	PEG-DSPE	GL1
sirolimus	PGA	PEG-DSPE	GL1
sirolimus	PLGA	PEG-DSPE	GL2
sirolimus	PLA	PEG-DSPE	GL2
sirolimus	PGA	PEG-DSPE	GL2
gemcitabina	PLGA	PEG	GL1
gemcitabina	PLA	PEG	GL1
gemcitabina	PGA	PEG	GL1

Tabla 1			
Nanopartículas que tienen un agente terapéutico listado y un conjugado polimérico que comprende: polímero biocompatible-polímero-(grupo para administración dirigida)			
Agente terapéutico	Polímero biocompatible	Polímero	Grupo para administración dirigida (opcional)
gemcitabina	PLGA	PEG	GL2
gemcitabina	PLA	PEG	GL2
gemcitabina	PGA	PEG	GL2
gemcitabina	PLGA	PEG-DSPE	GL1
gemcitabina	PLA	PEG-DSPE	GL1
gemcitabina	PGA	PEG-DSPE	GL1
gemcitabina	PLGA	PEG-DSPE	GL2
gemcitabina	PLA	PEG-DSPE	GL2
gemcitabina	PGA	PEG-DSPE	GL2
5-fluorouracilo	PLGA	PEG	GL1
5-fluorouracilo	PLA	PEG	GL1
5-fluorouracilo	PGA	PEG	GL1
5-fluorouracilo	PLGA	PEG	GL2
5-fluorouracilo	PLA	PEG	GL2
5-fluorouracilo	PGA	PEG	GL2
5-fluorouracilo	PLGA	PEG-DSPE	GL1
5-fluorouracilo	PLA	PEG-DSPE	GL1
5-fluorouracilo	PGA	PEG-DSPE	GL1
5-fluorouracilo	PLGA	PEG-DSPE	GL2
5-fluorouracilo	PLA	PEG-DSPE	GL2
5-fluorouracilo	PGA	PEG-DSPE	GL2
paclitaxel	PLGA	PEG	GL1
paclitaxel	PLA	PEG	GL1
paclitaxel	PGA	PEG	GL1
paclitaxel	PLGA	PEG	GL2
paclitaxel	PLA	PEG	GL2
paclitaxel	PGA	PEG	GL2
paclitaxel	PLGA	PEG-DSPE	GL1
paclitaxel	PLA	PEG-DSPE	GL1
paclitaxel	PGA	PEG-DSPE	GL1
paclitaxel	PLGA	PEG-DSPE	GL2
paclitaxel	PLA	PEG-DSPE	GL2
paclitaxel	PGA	PEG-DSPE	GL2
daunorrubicina	PLGA	PEG	GL1
daunorrubicina	PLA	PEG	GL1
daunorrubicina	PGA	PEG	GL1

Tabla 1			
Nanopartículas que tienen un agente terapéutico listado y un conjugado polimérico que comprende: polímero biocompatible-polímero-(grupo para administración dirigida)			
Agente terapéutico	Polímero biocompatible	Polímero	Grupo para administración dirigida (opcional)
daunorrubicina	PLGA	PEG	GL2
daunorrubicina	PLA	PEG	GL2
daunorrubicina	PGA	PEG	GL2
daunorrubicina	PLGA	PEG-DSPE	GL1
daunorrubicina	PLA	PEG-DSPE	GL1
daunorrubicina	PGA	PEG-DSPE	GL1
daunorrubicina	PLGA	PEG-DSPE	GL2
daunorrubicina	PLA	PEG-DSPE	GL2
daunorrubicina	PGA	PEG-DSPE	GL2

## Ejemplo 10

- 5 Las nanopartículas que se muestran en la tabla 2 se preparan utilizando el procedimiento del ejemplo 8. Las nanopartículas que comprenden macromoléculas de PLGA-PEG y macromoléculas de PLGA-PEG-ligando de molécula pequeña (SML) se prepararon como se muestra en los estudios 1 y 2, a continuación. En los estudios 3 y 4, se prepararon nanopartículas que comprenden macromoléculas de PLA-PEG, macromoléculas de PLGA-PEG-SML y macromoléculas de PLA (DB = copolímero en dibloque).
- 10 La relación entre macromoléculas funcionalizadas con grupos para administración dirigida de molécula pequeña y macromoléculas no funcionalizadas se puede ajustar, y usando el estudio 1, se pueden preparar nanopartículas con composiciones poliméricas que son aproximadamente 0.94 moles %, 4.63 moles % y 9.01 moles % de macromoléculas funcionalizadas (véase "mol% DB-GL2 del Poli total"). Además, usando esos métodos, se pueden preparar nanopartículas que comprenden aproximadamente 0.015, 0.073 y 0.143% en peso de ligando de molécula
- 15 con respecto al polímero total (véase "% en peso de GL2 polim. wrt ").
- También se pueden preparar nanopartículas con polímeros funcionalizados que constituyen aproximadamente 0.1 - 30, por ej., 0.1 - 20, por ej., 0.1 - 10 moles por ciento de toda la composición polimérica de la nanopartícula, así como nanopartículas que tienen un porcentaje en peso de ligando de bajo peso molecular respecto al polímero total
- 20 entre 0.001 y 5, por ej., entre 0.001 y 2, por ej., entre 0.001 y 1.

Tabla 2				
	% en peso de sólidos	% en peso de polímero	% en peso de DB-GL2 en PLA-PEG	mol% de DB-GL2 de Polím. total
Estudio 1	0.362	0.381052632	NA	0.947217483
	1.81	1.905263158	NA	4.630814102
	3.62	3.810526316	NA	9.011251618
Estudio 2	0.181	0.190526316	NA	0.474958408
	0.362	0.381052632	NA	0.947217483
	0.543	0.571578947	NA	1.416800171
	1.81	1.905263158	NA	4.630814102
Estudio 3	0.362	0.4525	NA	0.178974269
	1.81	2.2625	NA	0.891043972
Estudio 4	0.080241	0.100300903	0.200601805	0.079390136
<i>Calc. para 45K-5K PLA-PEG</i>	0.161616	0.202020202	0.404040404	0.159825753
	0.842105	1.052631579	2.105263158	0.829427309
	1.702128	2.127659574	4.255319149	1.668024361
Estudio 4 <i>Calc. para 16K-5K PLA-PEG</i>	0.190522	0.238151941	0.476303882	0.16998719
	0.381134	0.476417342	0.952834683	0.340027827
	1.909308	2.386634845	4.77326969	1.702280075
	3.827751	4.784688995	9.56937799	3.409927685
<b>NO PLA</b>	0.323232	0.404040404	0.404040404	0.159825753

<b>Tabla 2 (continuación)</b>			
	<b>Mol % de GL2</b>	<b>% en peso GL2 polím. wrt</b>	<b>Contenido de GL2 ppm</b>
Estudio 1	0.947217483	0.015108	151.0812
	4.630814102	0.073861	738.6148
	9.011251618	0.143729	1437.295
Estudio 2	0.474958408	0.007576	75.75587
	0.947217483	0.015108	151.0812
	1.416800171	0.022598	225.9796
	4.630814102	0.073861	738.6148
Estudio 3	0.178974269	0.002855	28.5464
	0.891043972	0.014212	142.1215
<b>Estudio 4 Calc. para 45K-5K PLA-PEG</b>	0.079390136	0.001266	12.66273
	0.159825753	0.002549	25.49221
	0.829427309	0.013229	132.2937
	1.668024361	0.026605	266.0499
<b>Estudio 4 Calc. para 16K-5K PLA-PEG</b>	0.16998719	0.002711	27.11296
	0.340027827	0.005423	54.23444
	1.702280075	0.027151	271.5137
	3.409927685	0.054388	543.8835
<b>NO PLA</b>	0.159825753	0.002549	25.49221

Ejemplo 11

- 5 Varias formulaciones de nanopartículas se preparan usando el procedimiento del ejemplo 8 como se describe y compara en la tabla F:

Tabla F:

Formulación	Tipo de polímero	% de sólidos	Carga y tamaño de partícula
Relación polímero-PEG:PLA (80:0; 60:20;40:40 (al inicio), 20:60)	Relación 16-5 PLA-PEG:PLA	5%	
	Relación 45-5 PLGA-PEG:PLA	5%	
Peso molecular de PLA = 1.9, 4, 6.5 (al inicio), 8.5 kDa	16-5 PLA-PEG:PLA (40:40)	5%	1.9 y 4 kDa tuvieron menor carga = 2.5%



Formulación	Tipo de polímero	% de sólidos	Carga y tamaño de partícula
15-5 Vs 16-5 PLA-PEG: PLA (40:40)	15-5 PLA-PEG:PLA (40:40)	5%	Tanto 15-5 PLA-PEG como 16-5 PLA-PEG son iguales en carga y tamaño de partícula
% de sólidos totales 5% Vs. 15%	16-5 PLA-PEG:PLA (40:40)	5% o 15%	Cuando se usa 15% de sólidos; 3X mayor eficiencia de encapsulación
16-5 PLGA-PEG Vs. PLA-PEG (al inicio) con PLA (40:40)	16-5 PLGA-PEG:PLA (40:40)	15%	Tanto 16-5 PLGA-PEG como 16-5 PLA-PEG son equivalentes en porcentaje de carga y tamaño de partícula
Polímero alternativo: PLGA-PEG	28-5 PLGA-PEG:PLA (40:40)	15%	28-5 PLGA-PEG = mayor tamaño de partícula en comparación con los otros
	45-5 PLGA-PEG:PLA (40:40)	15%	45-5 PLGA-PEG = mayor tamaño de partícula
Relación entre alcohol bencílico y acetato de etilo: 11:89, 21:79 (al inicio), 32:68 BA:EA	16-5 PLA-PEG:PLA (40:40)	15%	Relación = 21:79 (10.8% de carga); 32:68 y 11:89 resultó en 9.4 y 8.8% de carga, respectivamente.
Solvente comparado a alcohol bencílico: heptanol o hexanol	16-5 PLA-PEG:PLA (40:40)	15%	Solvente = alcohol bencílico (10.8% de carga); heptanol y hexanol ambos resultaron en ~2% de carga
Carga buscada 10, 20 (al inicio), 30%	16-5 PLA-PEG:PLA (40:40)	15%	La carga aumentó con la carga buscada: % de carga = 5.8%, 9%, 13.3%, respectivamente

Se puede lograr un tamaño de partícula óptimo sin usar homopolímero PLA y sin sacrificar significativamente la carga de fármaco, como se muestra en la figura 10. Los lotes con homopolímero PLA liberan el fármaco significativamente más rápido que los lotes fabricados usando copolímero solo (Figura 11). Los diversos tipos de polímero y pesos moleculares no agregaron valor adicional en la optimización de la carga de fármaco y el tamaño de partícula. Al contrario, en los tipos de 15% de sólidos totales con "polímero alternativo" los tamaños de partícula fueron típicamente más grandes que un tamaño buscado de 100-120 nm. La incorporación de alcohol cetílico al 5% en peso aumentó generalmente la velocidad de liberación in vitro (Figura 12).

#### 10 Ejemplo 12: Crioprotector

La congelación de una suspensión de una nanoemulsión de nanopartículas en agua desionizada sola da lugar a la agregación de partículas. Se cree que esto se debe a la cristalización y enredo de las cadenas de PEG en la superficie de las nanopartículas (Jaeghere et al; Pharmaceutical Research 16(6), p 859-852). Los excipientes a base de azúcar (sacarosa, trehalosa o manitol) pueden actuar como crioprotectores de las nanopartículas en condiciones de congelación/descongelación, a una concentración tan baja como 1% en peso para suspensiones de nanopartículas diluidas (~10 mg/ml). Una formulación incluye 10% en peso de sacarosa, que contiene sacarosa en exceso a la requerida y es la misma osmolalidad que la solución salina fisiológica

20 La tabla G muestra que el copolímero 16/5 PLA-PEG es menos susceptible a la agregación por congelación-descongelación.

Tabla G

Descripción	Mediana original PSD / PD	Mediana PS cong./descong(nm)	post	Poli-dispersidad post C/D	Índice al inicio post C/D
1:1 45/5 y PLA (al inicio)	143.4, 0.124	358.9		0.358	0.0/23.16%
16/5 PLA-PEG y PLA (1:1)	186.7, 0.080	189.5		0.126	9.7/91.57%
2:1:1 16/5:PLA:cetilo	174.1, 0.084	232.7		0.146	0.0/61.19%
2:1:1 45/5:PLA:cetilo	111.0, 0.182	0		0	0.0/1.55%
16/5 PLA-PEG solo	218.8, 0.098	226.9		0.03	7.3/60.56%
16/5 PLA-PEG y PLA	222.2, 0.126	230.7		0.065	4.1/35.36%

Descripción	Mediana original PSD / PD	Mediana PS cong./descong(nm)	post	Poli-dispersidad post C/D	Índice al inicio post C/D
(3:1)					
45/5 PLGA-PEG y PLA (3:1)	162.7, 0.099	178.6		0.091	7.7/95.41%
2:1:1 45/5 PLA-PEG:PLA:cetilo	115.9, 0.154	734.6		0.392	0.0/13.27%

Ejemplo 13: Eliminación de paladio

5 Basándose en un nivel de dosis ( $\mu\text{g}/\text{día}$ ) en ensayos clínicos humanos, un nivel máximo aceptable de paladio en una composición PLA-PEG-GL2 es aproximadamente 10 ppm. Se cargaron soluciones de polímero (PLA-PEG-GL2) (20 o 35 mg/mL) en diclorometano (DCM) en columnas de 5 g de resina (presolvatadas con 10 mL de DCM) y a continuación se eluyeron usando 30 mL de DCM por gravedad. El polímero se recuperó mediante eliminación del solvente usando evaporación rotatoria seguida de secado al vacío a temperatura ambiente. La recuperación del polímero se determinó gravimétricamente y el contenido de paladio residual se determinó por espectroscopía con plasma inductivamente acoplado (ICP) en Galbraith Laboratories Inc.

10

Tabla H

Resina utilizada	PLA-PEG-GL2 solución y rendimiento				Contenido de paladio (ppm)		
	Solvente	mg/mL	mg/5 g de resina	% en peso de recuperación	Prueba 1	Prueba 2	Promedio
Guanidina	DCM	20	220	23	337	347	342
Tiol	DCM	20	220	62	39	30	34.5
TMT	DCM	20	220	92	11	7	9
Urea	DCM	20	220	60	4470	NA	4470
Tiourea	DCM	20	220	45	40	36	38
Control	DCM	20	NA	NA	4060	3980	4020
TMT	DCM	35	335	91	9	7	8
Urea	DCM	35	335	60	5360	4920	5140
Control	DCM	NA	NA	NA	4240	4300	4270
TMT	DCM	35	1050	92	3.8	2.7	3.25
Control	DCM	NA	NA	NA	3780	3880	3830

15 Como se ve en la tabla H, las funcionalidades tiol, TMT, urea y tiourea llevaron los niveles de paladio por debajo de 50 ppm, a la carga de polímero por unidad de peso de resina evaluada. Sin embargo, solo la resina TMT (trimecaptotriazina) produjo una buena recuperación del polímero (>90%). Además, la resina TMT también produjo contenidos de paladio por debajo del umbral de aceptación de 10 ppm. Pareció haber alguna variabilidad de los resultados dependiendo de las condiciones experimentales utilizadas. En particular, la eliminación de paladio fue más eficaz cuando la columna de 5 g de resina TMT se cargó con 1050 mg de polímero. Esto puede deberse al mayor tiempo de residencia de la especie polimérica y el catalizador de paladio en esas condiciones experimentales.

20

Ejemplo 14: Formulación

25 Una formulación que incluya nanopartículas de PLA-PEG-ligando, PLA, PLA-PEG y docetaxel, en una composición de sacarosa/agua está formada por:

Componente	Concentración nominal (mg/mL)
<i>Docetaxel</i>	5
<i>PLA-PEG-Ligando</i>	1.1



Componente	Concentración nominal (mg/mL)
PLA-PEG	21.4
PLA	22.5
Sacarosa	100
Agua	c.s.

## Ejemplo 15: Liberación in vitro

5 Se usa un método de liberación in vitro para determinar la fase de aceleración inicial de la liberación desde esas nanopartículas, tanto a temperatura ambiente como a 37 °C. Para mantener las condiciones de libre saturación y evitar que las nanopartículas ingresen en las muestras de liberación, se diseñó un sistema de diálisis. Después de obtener una ultracentrífuga capaz de sedimentar partículas de 100 nm, se eliminaron las membranas de diálisis y se usó centrifugación para separar el fármaco liberado del fármaco encapsulado.

10 El sistema de diálisis es el siguiente: se colocan mediante pipeta 3 mL de lechada de nanopartículas de docetaxel (aprox 250 µg/mL de nanopartículas de fármaco/PLGA/PLA, correspondientes a 2.5 mg/mL de concentración de sólido) en agua DI, en un tubo interior de un dializador MWCO de 300 kDa. La nanopartícula se suspende en este medio. El dializador se coloca en frascos de vidrio que contienen 130 ml de medio de liberación (2.5% de hidroxil beta ciclodextrina en PBS), que es continuamente agitado a 150 rpm usando un agitador para evitar la formación de una capa de agua sin agitar en la interfaz membrana/solución externa. A tiempos predeterminados, se extraen alícuotas de las muestras (1 mL) de la solución externa (dializado) y se analizan para determinar la concentración de docetaxel por HPLC.

20 El sistema centrífugo se opera usando condiciones similares, a menores volúmenes de suspensión, sin bolsas de diálisis. Las muestras se centrifugan a 60 000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se analiza para determinar el contenido de fármaco respecto al fármaco liberado medido.

## Ejemplo 16: Liberación in vitro de nanopartículas de docetaxel

25 Una suspensión de nanopartículas de docetaxel preparada según el ejemplo 8 (10% en peso de docetaxel y 90% en peso de polímero (1.25% en peso de PLA-PEG-GL2 y 98.75% en peso de PLA-PEG, Mn PLA = 16 Da; Mn PEG = 5 Da) se colocó en un cassette de diálisis y se incubó en un depósito de PBS a 37 °C con agitación. Se recogieron muestras del dializado y se analizaron para determinar docetaxel utilizando HPLC de fase reversa. A efectos comparativos, se sometió docetaxel convencional al mismo procedimiento. La figura 13 se describe el perfil de liberación in vitro de las nanopartículas en comparación con el docetaxel convencional. La liberación de docetaxel encapsulado de la matriz polimérica fue esencialmente lineal en las primeras 24 horas siendo el resto liberado gradualmente de las partículas en un período de alrededor de 96 horas.

## Ejemplo 17: Nanopartículas de sirolimus

35 Se prepararon lotes de nanopartículas usando el procedimiento general del ejemplo 8, con 80% (p/p) de polímero-PEG o polímero-PEG con homopolímero PLA a 40% (p/p) cada uno, con un lote de porcentaje total de sólidos de 5%, 15% y 30%. Los solventes utilizados fueron: alcohol bencílico al 21% y acetato de etilo al 79% (p/p). Para cada lote de 2 g de tamaño, se usaron 400 mg de fármaco y 1.6 g de 16-5 polímero-PEG o 0.8 g de 16-5 polímero-PEG + 0.8 g de PLA (homopolímero) de 10 kDa. Se usó polímero en dibloque 16-5 PLA-PEG o PLGA-PEG (50:50 L:G), y cuando se usó, el homopolímero: PLA con un Mn = 6.5 kDa, Mw (peso molecular promedio en masa) = 10 kDa, y Mw/Mn = 1.55.

45 La fase orgánica (fármaco y polímero) se preparó en lotes de 2 g: un vial de centelleo de 20 mL agregar fármaco y polímero(s). La masa de solventes necesaria a la concentración de % de sólidos, se muestra a continuación:

- i. 5% de sólidos: 7.98 g de alcohol bencílico + 30.02 g de acetato de etilo
- ii. 15% de sólidos: 2.38 g de alcohol bencílico + 8.95 g de acetato de etilo
- iii. 30% de sólidos: 0.98 g de alcohol bencílico + 3.69 g de acetato de etilo

50 Se prepara una solución acuosa con colato de sodio al 0.5%, alcohol bencílico al 2% y acetato de etilo al 4% en agua. A un frasco de 2 L agregar 7.5 g de colato de sodio, 1402.5 g de agua DI, 30 g de alcohol bencílico y 60 g de acetato de etilo, y mezclar sobre placa de agitación hasta disolución.

55 Para formar la emulsión, se usa una relación entre fase acuosa y fase oleosa de 5:1. La fase orgánica se vierte en la solución acuosa y se homogeniza usando IKA durante 10 segundos a temperatura ambiente para formar una

emulsión gruesa. La solución se introduce a través del homogeneizador (110S) a 9 Kpsi (45 psi de manómetro) por 2 pasajes discretos para formar la nanoemulsión.

5 La emulsión se vierte en el medio para temple (agua D.I.) a <5 °C mientras se agita sobre la placa de agitación. La relación entre medio para temple y emulsión es 8:1. Se agrega 35% (p/p) de Tween 80 en agua al medio para temple en una relación de 25:1 entre Tween 80 y fármaco. Las nanopartículas se concentran a través de TFF y el medio para temple se concentra en TFF con casete Pall de 500 kDa (membrana 2) hasta ~100 mL. Se usa diafiltración utilizando ~20 diavolumenes (2 litros) de agua DI fría, y el volumen se reduce hasta un volumen mínimo y después se recoge la lechada final, ~100 mL. Se determina la concentración de sólidos de la lechada final sin filtrar, usando un vial de centelleo de 20 mL tarado, agregando 4 mL de lechada final y secando al vacío en liofilizador/estufa, y se determina el peso de las nanopartículas en los 4 mL de lechada seca. Se agrega sacarosa concentrada (0.666 g/g) a la muestra de lechada final para alcanzar 10% de sacarosa.

15 La concentración de sólidos de la lechada final filtrada por 0.45 µm se determinó filtrando alrededor de 5 mL de muestra de lechada final antes de agregar la sacarosa a través de un filtro de jeringa de 0.45 µm; a un vial de centelleo de 20 ml tarado agregar 4 mL de muestra filtrada y secar al vacío en liofilizador/estufa.

La muestra restante de la lechada final sin filtrar se congeló con sacarosa. Formulaciones de rapamicina (sirolimus):

Nombre	Polímero	Tamaño (nm)	Carga de fármaco	Liberación de fármaco (t = h)			
				T = 0	T = 2	T = 4	T = 24
5% de sólidos	16/5 PLA/PEG	123.1	3.61%	ND	ND	ND	ND
	16/5 PLA/PEG + PLA	119.7	4.49%	ND	ND	ND	ND
15% de sólidos	16/5 PLA/PEG	82.1	4.40%	ND	ND	ND	ND
	16/5 PLA/PEG+PLA	120.6	11.51%	ND	ND	ND	ND
23% de sólidos	16/5 PLA/PEG	88.1	7.40%	ND	ND	ND	ND
	16/5 PLA/PEG + PLA	118.3	7.8%	ND	ND	ND	ND
30% de sólidos	16/5 PLA/PEG	88.5	10.26%	8.5	17.3	22.4	64.2
	16/5 PLA/PEG + PLA	118.3	10.18%	9.3	30.4	44.7	98.2

20 El efecto del contenido de sólidos y las inclusiones de homopolímero de ácido poli(láctico) se muestran en la figura 14.

25 Se estudian experimentos de liberación in vitro dispersando nanopartículas en PBS que contienen 10%(p/p) de Tween 20 (T20) a 37 °C. Se usó T20 para aumentar la solubilidad de la rapamicina en PBS hasta niveles bien detectables por HPLC así como manteniendo las condiciones de libre saturación. Se redispersaron 3 mL de nanopartículas cargadas de fármaco en 130 mL de medio de liberación en un frasco a una concentración conocida (aproximadamente 250 µg/mL). Estos volúmenes se eligieron para asegurar que la máxima concentración del fármaco en el medio de liberación siempre sería menor del 10% de la solubilidad máxima es decir, las condiciones de libre saturación. El medio y la suspensión de nanopartículas se agitaron a 150 rpm. A tiempos predeterminados, se centrifugaron alícuotas de 4 ml a 50 000 rpm (236 000 g) durante 1 h para separar las nanopartículas del medio de elución. El medio de elución se inyectó en un HPLC para determinar el fármaco liberado de las nanopartículas. La liberación de rapamicina mostró una liberación lenta y sostenida, como se muestra en la figura 15.

35 Ejemplo 18: Tamsirolimus

Se prepararon nanopartículas como en los ejemplos 17 y 8, excepto que se usó tamsirolimus con 30% de contenido de sólidos en la fase orgánica antes de la emulsión:

Nombre	Polímero	Tamaño (nm)	Carga de fármaco	Liberación de fármaco (t = h)			
				T = 0	T = 2	T = 4	T = 24
30% de sólidos	16/5 PLA/PEG	97.5	9.9%	11.5	15.6	17.9	40.9
	16/5 PLA/PEG + PLA	112.8	14.2%	9.8	22.3	29.9	88.0
	16/5 PLCA/PEG + PLA	150.3	4.6	ND	ND	ND	ND
	16/5 PLGA/PEG + PLA	ND	6.9	10.6	35.7	45.8	87.0

La figura 16 describe el % en peso de temsirolimus y la figura 17 describe la nanopartícula para las diferentes nanopartículas poliméricas que tienen temsirolimus. Los resultados de un experimento de liberación in vitro como en el ejemplo 17 muestran la liberación lenta y sostenida de temsirolimus como se muestra en la figura 18.

5

Ejemplo 19: Nanopartículas de vinorelbina

Se prepararon lotes de nanopartículas usando el procedimiento general del ejemplo 8, con 80% (p/p) de polímero-PEG o polímero-PEG con homopolímero PLA a 40% (p/p) cada uno, con un lote de % total de sólidos de 5%, 15% y 30%. Los solventes utilizados fueron: alcohol bencílico al 21% y acetato de etilo al 79% (p/p). Para cada lote de 2 g de tamaño, se usaron 400 mg de vinorelbina y 1.6 g de 16-5 polímero-PEG o 0.8 g de 16-5 polímero-PEG + 0.8 g de PLA (homopolímero) de 10 kDa. Se usó el polímero en dibloque 16-5 PLA-PEG o PLGA-PEG (50:50 L:G), y cuando se usó, el homopolímero: PLA con un Mn = 6.5 kDa, Mw=10 kDa, y Mw/Mn=1.55.

La fase orgánica (fármaco y polímero) se preparó en lotes de 2 g: a un vial de centelleo de 20 mL agregar fármaco y polímero(s). La masa de solventes necesaria a la concentración de % de sólidos se muestra a continuación:

- i. 5% de sólidos: 7.98 g de alcohol bencílico + 30.02 g de acetato de etilo
- ii. 15% de sólidos: 2.38 g de alcohol bencílico + 8.95 g de acetato de etilo
- iii. 30% de sólidos: 0.98 g de alcohol bencílico + 3.69 g de acetato de etilo

Se prepara una solución acuosa con colato de sodio al 0.5%, alcohol bencílico al 2% y acetato de etilo al 4% en agua. Agregar al frasco 7.5 g de colato de sodio, 1402.5 g de agua DI, 30 g de alcohol bencílico y 60 g de acetato de etilo, y mezclar sobre placa de agitación hasta disolución.

Para la formación de la emulsión, se usa una relación entre fase acuosa y fase oleosa de 5:1. La fase orgánica se vierte en la solución acuosa y se homogeniza usando IKA durante 10 segundos a temperatura ambiente para formar una emulsión gruesa. La solución se introduce a través del homogeneizador (110S) a 9 Kpsi (45 psi de manómetro) por 2 pasajes discretos para formar la nanoemulsión.

La emulsión se vierte en el medio para temple (agua D.I.) a <5 °C mientras se agita sobre la placa de agitación. La relación entre medio para temple y emulsión es 8:1. Se agrega 35% (p/p) de Tween 80 en agua al medio para temple en una relación de 25:1 entre Tween 80 y fármaco. Las nanopartículas se concentran a través de TFF y el medio para temple se concentra en TFF con cassette Pall de 500 kDa (membrana 2) hasta ~100 mL. Se usa diafiltración utilizando ~20 diavolumenes (2 litros) de agua DI fría, el volumen se reduce hasta un volumen mínimo y después se recoge la lechada final, ~100 mL. La concentración de sólidos de la lechada final sin filtrar, se determina usando un vial de centelleo de 20 mL tarado y agregando 4 mL de lechada final y secando al vacío en liofilizador/estufa y se determina el peso de las nanopartículas en los 4 mL de lechada seca. Se agrega sacarosa concentrada (0,666 g/g) a la muestra de lechada final para alcanzar 10% de sacarosa.

Se determinó la concentración de sólidos de lechada final filtrada por 0.45 µm, filtrando alrededor de 5 mL de muestra de lechada final antes de agregar la sacarosa a través de un filtro de jeringa de 0.45 µm; a un vial de centelleo de 20 ml tarado agregar 4 mL de muestra filtrada y secar al vacío en liofilizador/estufa.

La muestra restante de la lechada final sin filtrar se congeló con sacarosa. Formulaciones de vinorelbina:

% de sólidos	Liberación in vitro conducida	Tipo de polímero:	% de carga de vinorelbina (HPLC)	Tamaño de partícula (nm)
5%		16-5 PLA-PEG	4.27	143.3
		16-5 PLA-PEG + PLA	3.39	105.7
15%		16-5 PLA-PEG	6.2	100.3
		16-5 PLA-PEG + PLA	15.95	141.3
30%		16-5 PLA-PEG (n = 3)	10.41	90.8
			10.31	84.4
	*		12.01	95
	*	16-5 PLA-PEG + PLA	15.03	125.5

% de sólidos	Liberación in vitro conducida	Tipo de polímero:	% de carga de vinorelbina (HPLC)	Tamaño de partícula (nm)
	*	16-5 PLGA-PEG + PLA	14.66	120.3

\* = liberación in vitro hecha en las muestras

La liberación in vitro se llevó a cabo en tres formulaciones con 30% de sólidos totales: 16-5 PLA-PEG; 16-5 PLA-PEG + PLA; y 16-5 PLGA-PEG + PLA, y los datos de liberación in vitro se recogieron a 37 °C en una cámara de aire utilizando 10% de urea en solución de PBS como medio de liberación. La tabla siguiente y la figura 19 describen los resultados:

5

	16-5 PLAPEG	16-5 PLA-PEG + 10 kDa PLA	16-5 PLGA-PEG + 10 kDa PLA
Tiempo (horas)			
0	5.62	0.84	4.79
2	35.29	35.35	67.63
5	41.28	49.58	87.05
24	65.20	91.81	101.62
48	73.02	88.63	89.57
144	81.08	84.98	91.46

Ejemplo 20 - Vincristina

10 Las formulaciones de nanopartículas que incluyen vincristina se prepararon usando el procedimiento general del ejemplo 8.

Formulaciones de vincristina:

Nº de ref.	Componentes	Composición % en peso
50-103-3-5	mPEG(5k)-/PLA(16K) /Vincristina	96/4
50-117-1-5	mPEG(5k)-/PLA(16K) /Vincristina	95/5
50-117-2-5	mPEG(5k)-/PLA(16K) /Vincristina	96/4
50-103-4	mPEG(5k)-/PLA(16K) / /PLA(16K) /Vincristina	46/46/8
50-103-2	mPEG(5k)-/PLA(16K) / /PLA(16K) /Vincristina	47/47/6

15

Caracterización analítica de las formulaciones de vincristina:

Nº de ref.	Tamaño (nm)	Carga de fármaco (%)	Eficiencia de la encapsulación (%)
50-103-3-5	103	4.4	21.8
50-117-1-5	110	4.6	22.8
50-117-2-5	115	4.2	20.8
50-103-4	146	8.3	41.6
50-103-2	98	6.0	30.0

20

Se llevó a cabo la liberación in vitro en las formulaciones de vincristina y se obtuvieron los datos de liberación in vitro a 37 °C en una cámara de aire, usando 10% de urea en solución de PBS como medio de liberación. La figura 20 describe la liberación in vitro para varios de los lotes a los que se hace referencia.

Ejemplo 21: Farmacocinética

Se determinó la farmacocinética (PK) de las nanopartículas que tienen vincristina preparadas como en el ejemplo 20 y que tienen docetaxel preparadas como en el ejemplo 8 en ratas Sprague-Dawley (SD). Se administró a las ratas (Sprague Dawley machos, de aproximadamente 300 g con cánula yugular) una única dosis intravenosa de 0.5 mg/kg de fármaco libre o nanopartículas dirigidas pasivamente que encapsulaban fármaco (10% en peso de fármaco, 90% en peso de polímero (PLA-PEG, Mn PLA=16 Da; Mn PEG=5 Da, PTNP) con 5 mg/kg y PTNP en el tiempo = 0. Se extrajeron muestras de sangre de la cánula yugular, a diversos tiempos luego de la administración, en tubos que contenían heparina de litio y se preparó el plasma. Los niveles plasmáticos se determinaron mediante extracción de los fármacos del plasma seguida de análisis LCMS.

La figura 21 describe los perfiles farmacocinéticos de vincristina y vincristina PTNP, y de docetaxel y docetaxel PTNP.

Ejemplo 22: Análisis del tamaño de partícula

El tamaño de partículas se analiza por dos técnicas: dispersión dinámica de la luz (DLS) y difracción láser. La DLS se lleva a cabo utilizando un instrumento Brookhaven ZetaPals a 25 °C en suspensión acuosa diluida utilizando un láser de 660 nm dispersado a 90° y se analiza utilizando los métodos Cumulants y NNLS (TP008). La difracción láser se realiza con un instrumento Horiba LS950 en suspensión acuosa diluida utilizando tanto un láser de HeNe a 633 nm como un LED a 405 nm, dispersados a 90° y se analiza usando el método óptico Mie (TP009). El resultado de la DLS se asocia con el radio hidrodinámico de las partículas, que incluye la 'corona' de PEG, mientras que el instrumento de difracción láser está más estrechamente asociado al tamaño geométrico del 'centro' de la partícula de PLA.

Ejemplo 23: Densidad de ligando

Suponiendo que el diámetro general de partícula es equivalente al diámetro hidrodinámico medido con el dimensionador de partículas Brookhaven, las nanopartículas son esferas perfectas, y todo el PEG hidrófilo y el ligando se expresan sobre la superficie así como todo el PEG está totalmente hidratado, se puede construir un modelo de la superficie de la partícula como se muestra en la tabla I:

Tabla I: Modelo de la superficie de la nanopartícula para partículas de 100 nm de 16/5 copolímero y homopolímero de 6.5 kDa

% de ligando	Polímero (moléculas o SA/partícula)			Cobertura de ligando		
	<i>mol% de copolímero</i>	<i>Homopolímero</i>	<i>Copolímero</i>	<i>nm<sup>2</sup>/PEG</i>	<i>mol/g de NP</i>	<i>Moléculas/partícula</i>
0% (NTNP)	7050	2182	14.40	0	0	NA
1% de GL2	7049	2183	14.39	1.72 x 10 <sup>-07</sup>	22	1439
5% de GL2	7047	2187	14.37	8.63 x 10 <sup>-07</sup>	109	287
10% de GL2	7043	2191	14.34	1.73 x 10 <sup>-07</sup>	219	143

Ejemplo 24: Terapia dirigida al tumor de cáncer de mama

Se evaluó la capacidad de las nanopartículas administradas por vía intravenosa preparadas como en el ejemplo 8 (10% en peso de docetaxel, 90% en peso de polímero (~1.25% en peso de PLA-PEG-GL2; y ~98.75% de PLA-PEG, Mn PLA = 16 Da; Mn PEG = 5 Da) (etiquetadas como BIND-14) para inhibir el crecimiento de tumor no prostático en comparación con docetaxel convencional y partículas de control no dirigidas que tenían la misma composición fármaco/polímero (PTNP) en ratones a los que se les implantaron xenoinjertos de MX-1. Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de 300 mm<sup>3</sup>, a los ratones se les administraron los artículos de prueba (sacarosa, docetaxel, PTNP, BIND-14) cada 4 días por 3 dosis. Los volúmenes tumorales promedio con el paso del tiempo para cada grupo de tratamiento se muestran en la figura 22.

Se evaluó la capacidad de las partículas dirigidas (BIND-14) para potenciar la administración de docetaxel a los tumores luego de la administración intravenosa en ratones que tenían xenoinjertos de cáncer de mama humano MX-1, con un volumen promedio de tumor de 1700 mm<sup>3</sup>. Se analizaron las concentraciones de docetaxel (ng/mg) en tumores extirpados 24 horas después de la dosis IV, de animales a los que se les administró BIND-14, PTNP y docetaxel convencional, para determinar el contenido de docetaxel utilizando LC/MS/MS, y se presentan en la figura 23.

## Ejemplo 25: Terapia dirigida al tumor de cáncer de próstata

Se evaluó la administración de nanopartículas de docetaxel utilizando nanopartículas preparadas como en el ejemplo 8 (10% en peso de docetaxel, 90% en peso de polímero (~1.25% en peso de PLA-PEG-GL2; y ~98.75% de PLA-PEG, Mn PLA = 16 Da; Mn PEG = 5 Da; BIND-14) a tumores, luego de la administración intravenosa en ratones SCID machos con xenoinjertos de LNCaP de cáncer de próstata humano. Los ratones SCID machos se inocularon por vía subcutánea con células LNCaP de cáncer de próstata humano. Tres a cuatro semanas luego de la inoculación, se administró una única dosis IV de 5 mg/kg de docetaxel como BIND-014 o como docetaxel convencional. Los ratones se sacrificaron 2 h o 12 h post administración. Se extirparon y analizaron los tumores de cada grupo para determinar docetaxel mediante un método LC-MS.

Doce horas después de una única dosis de 50 mg/kg de BIND-14, la concentración de docetaxel en el tumor en animales que recibieron BIND-014 fue aproximadamente 7 veces mayor que en los animales que recibieron DTXL convencional, lo que indica que las nanopartículas dirigidas a PSMA de circulación prolongada administran más DTXL al sitio del tumor como se muestra la figura 24.

También se evaluó la capacidad de dosis repetidas de BIND-014 para suprimir el crecimiento del tumor en el modelo de xenoinjerto de tumor LNCaP como se muestra en la figura 25. Los ratones SCID machos se inocularon por vía subcutánea con células LNCaP de cáncer prostático humano. Tres a cuatro semanas luego de la inoculación, los ratones se trataron día por medio por cuatro dosis con BIND-014, docetaxel (DTXL) convencional, DTXL encapsulado en nanopartículas no dirigidas (PTNP), y vehículo (Control). Después de las cuatro dosis de 5 mg/kg, la reducción del volumen del tumor fue mayor en los animales que recibieron BIND-014 en comparación con el docetaxel convencional o las partículas no dirigidas (PTNP). El aumento en la concentración de docetaxel en el tumor resultó en un efecto citotóxico más pronunciado.

En un aspecto, la invención proporciona nanopartículas terapéuticas que incluyen un principio activo o agente terapéutico, por ej. taxano, y uno, dos o tres polímeros biocompatibles. Por ejemplo, en este documento se da a conocer una nanopartícula terapéutica que comprende entre alrededor de 0.2 y alrededor de 35 por ciento en peso de un agente terapéutico; entre alrededor de 10 y alrededor de 99 por ciento en peso de copolímero de ácido poli(láctico)-poli(etilenglicol) o copolímero de ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-poli(etilenglicol); y entre alrededor de 0 y alrededor de 50 por ciento en peso de ácido poli(láctico) o ácido poli(láctico)-co-ácido poli(glicólico). Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen antineoplásicos como taxanos, por ej. docetaxel y pueden incluir entre alrededor de 10 y alrededor de 30 por ciento en peso de un agente terapéutico, por ej., un taxano.

En este documento se proporciona, en parte, un método para preparar una pluralidad de nanopartículas terapéuticas dadas a conocer, que comprende combinar un agente terapéutico, un primer polímero y un segundo polímero, con un solvente orgánico (por ejemplo, un solvente elegido entre: acetato de etilo, alcohol bencílico, cloruro de metileno, dimetilformamida, Tween 80 y Span 80, y combinaciones de dos o más de éstos) para formar una primera fase orgánica que tenga entre alrededor de 5 y alrededor de 50% de sólidos; combinar la primera fase orgánica con una primera solución acuosa (que en algunas realizaciones, puede incluir un reactivo elegido entre: colato de sodio, acetato de etilo, alcohol bencílico o sus combinaciones) para formar una segunda fase; emulsionar la segunda fase para formar una fase en emulsión; templar la fase en emulsión para formar una fase templada; agregar un solubilizante de fármaco a la fase templada para formar una fase solubilizada de agente terapéutico no encapsulado; y filtrar la fase solubilizada para recuperar las nanopartículas furtivas específicas para el objetivo, formando así una lechada de nanopartículas terapéuticas con un diámetro entre alrededor de 80 nm y alrededor de 150 nm. En algunas realizaciones, emulsionar la segunda fase puede implicar emulsionar la segunda fase para formar una emulsión gruesa y emulsionar la emulsión gruesa para formar una fase en emulsión fina. La emulsión de la segunda fase se puede realizar, por ejemplo, utilizando un homogeneizador de rotor y estator, una sonda de ultrasonidos, una barra de agitación o un mezclador de alta presión. La emulsión de la emulsión gruesa se puede realizar utilizando, por ejemplo, un homogeneizador de alta presión que puede tener múltiples cámaras de interacción (2, 3, 4 o más) y con, por ejemplo, una presión de alimentación entre alrededor de 4000 y alrededor de 8000 psi por cámara de interacción.

En algunas realizaciones, el temple se puede realizar por lo menos parcialmente a una temperatura de alrededor de 5 °C o menos, por ejemplo, entre alrededor de 0 °C y alrededor de 5 °C. Una relación medio para temple :emulsión puede ser entre alrededor de 8:1 y alrededor de 5:1, o entre alrededor de 2:1 y alrededor de 40:1.

Los ejemplos de solubilizantes de fármacos para usar en los métodos dados a conocer pueden incluir Tween 80, Tween 20, polivinilpirrolidona, ciclodextrano, dodecilsulfato de sodio o colato de sodio. En algunas realizaciones, un solubilizante de fármacos se selecciona del grupo que consiste en dietilnitrosamina, acetato de sodio, urea, glicerina, propilenglicol, glicofurol, poli(etilenglicol), bis(polioxietilenglicoldodecil) éter, benzoato de sodio y salicilato de sodio. La relación entre solubilizante de fármacos y agente terapéutico puede ser entre alrededor de 100:1 y alrededor de 10:1.

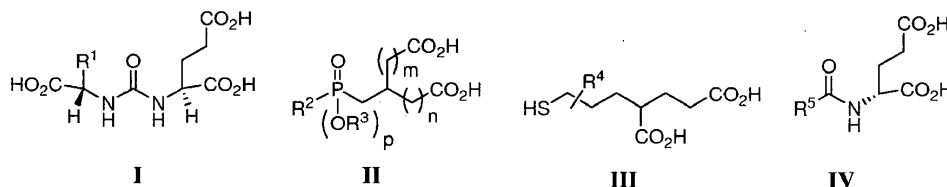
En una realización, un método puede incluir filtrar la fase solubilizada que contiene nanopartículas usando por ejemplo un sistema de filtración de flujo tangencial. La filtración se puede llevar a cabo, por ejemplo, a una primera temperatura entre alrededor de 0 °C y alrededor de 5 °C, y después a una segunda temperatura entre alrededor de 20 °C y alrededor de 30 °C. Alternativamente, la filtración se puede llevar a cabo por ejemplo, a una primera temperatura entre alrededor de 20 °C y alrededor de 30 °C, y después a una segunda temperatura entre alrededor de 0 °C y alrededor de 5 °C. En algunas realizaciones, la filtración comprende procesar aproximadamente 1 a aproximadamente 6 diavolumenes a una temperatura entre alrededor de 0 °C y alrededor de 5 °C y procesar al menos un diavolumen a una temperatura entre alrededor de 20 °C y alrededor de 30 °C, por ejemplo, filtrar puede implicar procesar entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 diavolumenes a una temperatura entre alrededor de 0 °C y alrededor de 5 °C y procesar entre aproximadamente 1 diavolumen y aproximadamente 15 diavolumenes a una temperatura entre alrededor de 20 °C y alrededor de 30 °C. En una realización, filtrar puede implicar procesar diferentes diavolumenes a diferentes temperaturas definidas. La fase solubilizada se puede purificar antes de dicha filtración para eliminar sustancialmente dicho solvente orgánico, agente terapéutico no encapsulado y/o solubilizante de fármacos.

Los métodos dados a conocer pueden comprender la filtración esterilizante de la lechada de nanopartículas terapéuticas utilizando un tren de filtración a una velocidad controlada. Por ejemplo, se puede usar un tren de filtración que comprenda un filtro de profundidad y un filtro esterilizante.

También se da a conocer en este documento un método de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas que comprende combinar un agente terapéutico, un primer polímero, y un segundo polímero, con un solvente orgánico para formar una primera fase orgánica, combinar la primera fase orgánica con una primera solución acuosa para formar una segunda fase; emulsionar la segunda fase para formar una fase en emulsión; templar la fase en emulsión para formar una fase templada; agregar un solubilizante de fármacos a la fase templada para formar una fase solubilizada de agente terapéutico no encapsulado; y filtrar la fase solubilizada utilizando filtración de flujo tangencial con diafiltración de volumen constante donde al menos un diavolumen se expone a alrededor de 25 °C después de haber expuesto un día volumen diferente a una temperatura entre alrededor de -5 °C y alrededor de 10 °C. Por ejemplo, filtrar puede implicar procesar aproximadamente 2 a aproximadamente 5 diavolumenes a una temperatura entre alrededor de 0 °C y alrededor de 5 °C, y después procesar al menos un diavolumen a 25 °C durante al menos un período de tiempo.

En este documento se proporcionan métodos para preparar nanopartículas terapéuticas que pueden ser estables durante al menos 2 días a 25 °C a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml. Las nanopartículas terapéuticas formadas utilizando los métodos dados a conocer, pueden liberar menos de 10% en peso de agente terapéutico en al menos 5 días a 25 °C. En algunas realizaciones, una nanopartícula terapéutica formada utilizando un método dado a conocer puede, por ejemplo, encapsular entre alrededor de 2 y alrededor de 30 por ciento de agente terapéutico.

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas dadas a conocer que comprenden combinar un agente terapéutico, un primer polímero (por ej., copolímero PLGA-PEG o PLA), y un segundo polímero (por ej. PLA, PLGA o PEG, o sus copolímeros), y opcionalmente un tercer polímero (por ej. PLA o PLGA no unido a un ligando) donde el primer polímero está unido a un ligando que tiene un peso molecular de menos de alrededor de 1000 g/mol, por ejemplo, un ligando de bajo peso molecular, como un ligando de PSMA. Dicho ligando de PSMA de bajo peso molecular se puede elegir del grupo formado por los compuestos I, II, III y IV:



y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos; donde

m y n cada uno, independientemente, es 0, 1, 2 o 3;

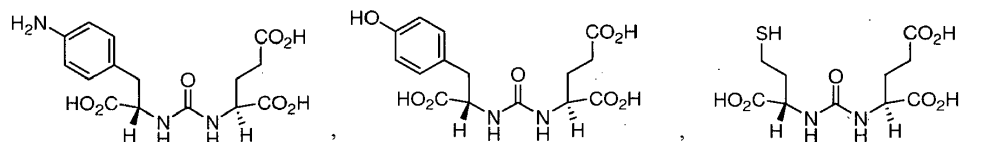
p es 0 o 1;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> cada uno, independientemente, se elige del grupo que consiste en alquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, y cualquiera de sus combinaciones; y

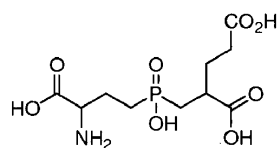
R<sup>3</sup> es H o CH<sub>3</sub>;

donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> o R<sup>5</sup> comprenden un punto de unión covalente a la nanopartícula. Por ejemplo, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> puede ser cada uno, independientemente, C<sub>1-6</sub>-alquilo o fenilo, o cualquier combinación de C<sub>1-6</sub>-alquilo o fenilo,

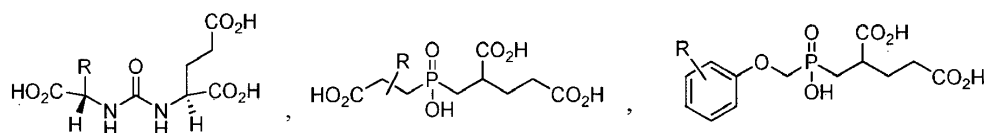
que están independientemente sustituidos una o más veces con OH, SH, NH<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>H, y donde el grupo alquilo puede estar interrumpido por N(H), S u O. En otra realización, por ejemplo, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> cada uno, independientemente, es CH<sub>2</sub>-Ph, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SH, CH<sub>2</sub>-SH, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(H)(NH<sub>2</sub>)CO<sub>2</sub>H, CH<sub>2</sub>C(H)(NH<sub>2</sub>)CO<sub>2</sub>H, CH(NH<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(H)(SH)CO<sub>2</sub>H, CH<sub>2</sub>-N(H)-Ph, O-CH<sub>2</sub>-Ph o O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Ph, donde cada Ph puede estar independientemente sustituido una o más veces con OH, NH<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>H o SH. El ligando de PSMA de bajo peso molecular de ejemplo se puede elegir del grupo que consiste en



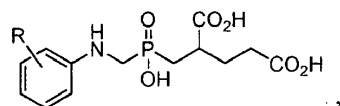
y



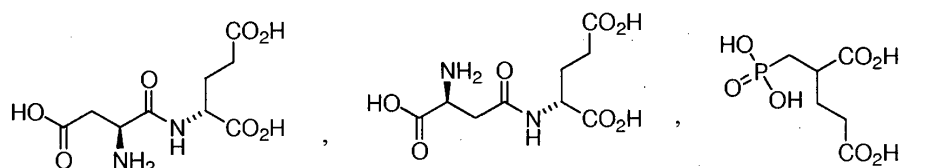
y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos; y donde los grupos NH<sub>2</sub>, OH o SH sirven como el punto de unión covalente a la primera partícula, o se pueden elegir del grupo que consiste en



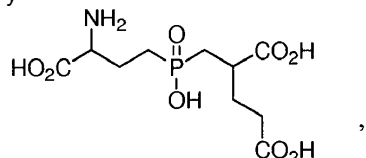
y



y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos; donde R se elige independientemente del grupo que consiste en NH<sub>2</sub>, SH, OH, CO<sub>2</sub>H, C<sub>1-6</sub>-alquilo que está sustituido con NH<sub>2</sub>, SH, OH o CO<sub>2</sub>H, y fenilo que está sustituido con NH<sub>2</sub>, SH, OH o CO<sub>2</sub>H, y donde R sirve como el punto de unión covalente al primer polímero. Los ligandos de ejemplo incluyen

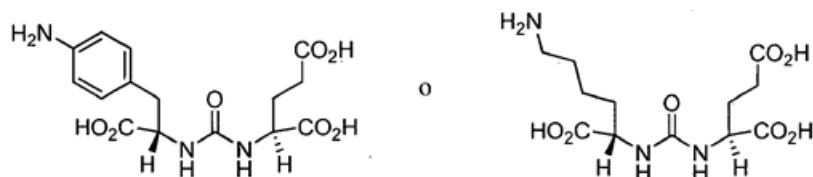


y



y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos; cualquiera de los cuales puede estar sustituido además con NH<sub>2</sub>, SH, OH, CO<sub>2</sub>H, C<sub>1-6</sub>-alquilo que está sustituido con NH<sub>2</sub>, SH, OH o CO<sub>2</sub>H, o fenilo que está sustituido con NH<sub>2</sub>, SH, OH o CO<sub>2</sub>H, donde estos grupos funcionales sirven como el punto de unión covalente al primer polímero, por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular puede ser





y sus enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos; donde los grupos  $\text{NH}_2$  sirven como el punto de unión covalente al primer polímero.

5

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas dadas a conocer que comprenden combinar un agente terapéutico, un primer polímero (por ejemplo, copolímero PLGA-PEG o PLA), y un segundo polímero (por ejemplo PLA, PLGA o PEG, o sus copolímeros) y opcionalmente un tercer polímero (por ejemplo PLA o PLGA no unido a un ligando). En algunas realizaciones, el agente terapéutico es docetaxel. En otras realizaciones, el agente terapéutico se elige del grupo que consiste en antineoplásicos como doxorubicina (adriamicina), mitoxantrona, gemcitabina (gemzar), daunorrubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleucina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, camptotecina, CTP-11, 10-hidroxi-7-etilcamptotecina (SN38), dacarbazina, S-I capecitabina, ftorafur, 5'desoxiflouridina, UFT, eniluracilo, desoxicitidina, 5-azacitosina, 5-azadesoxicitosina, alopurinol, 2-cloroadenosina, trimetrexato, aminopterina, metileno-10-deazaaminopterina (MDAM), oxaplatino, picoplatino, tetraplatino, satraplatino, platino-DACH, ormaplatino, CI-973, JM-216, y sus análogos, epirubicina, fosfato de etopósido, 9-aminocamptotecina, 10,11-metilenodioxycamptotecina, karenitecina, 9-nitrocampaototecina, TAS 103, vindesina, mostaza de L-fenilalanina, ifosfamidamefosfamida, perfosfamida, trofosfamida, carmustina, semustina, epotilonas A-E, tomudex, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, amsacrina, fosfato de etopósido, karenitecina, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir, amantadina, rimantadina, lamivudina, zidovudina, bevacizumab, trastuzumab, rituximab y 5-fluorouracilo, metotrexato, budesonida, sirolimus, vincristina y sus combinaciones, o el agente terapéutico puede ser un ARNip.

10

15

20

25

También se proporcionan en este documento métodos para tratar el cáncer de próstata en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de la nanopartícula preparada por los métodos dados a conocer.

30

En una realización, también se proporciona en este documento una nanopartícula terapéutica preparada mediante: la emulsión de una primera fase orgánica que comprende un primer polímero y un agente terapéutico y una segunda fase que forma una fase en emulsión; donde la fase en emulsión se temple después a una temperatura entre alrededor de  $0\text{ }^\circ\text{C}$  y alrededor de  $5\text{ }^\circ\text{C}$  formando una fase templada; y la filtración de la fase templada a una primera temperatura entre alrededor de  $-5\text{ }^\circ\text{C}$  y alrededor de  $10\text{ }^\circ\text{C}$ ; y la filtración de la fase templada a una segunda temperatura de alrededor de  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ; formando así nanopartículas terapéuticas que son estables durante al menos 5 días a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

35

También se proporciona en una realización, un método de estabilización de nanopartículas terapéuticas que tienen un agente terapéutico que comprende: proporcionar una lechada que comprenda un agente terapéutico encapsulado por nanopartículas y un solubilizante de fármacos; filtrar la lechada a una primera temperatura entre alrededor de  $-5\text{ }^\circ\text{C}$  y alrededor de  $10\text{ }^\circ\text{C}$ ; y filtrar la lechada a una segunda temperatura de alrededor de  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

40

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas, que comprende:  
 5 combinar un agente terapéutico, un primer polímero, y opcionalmente un segundo polímero, con un solvente orgánico para formar una primera fase orgánica que tenga 5 a 50% de sólidos;  
 combinar la primera fase orgánica con una primera solución acuosa para formar una segunda fase;  
 10 emulsionar la segunda fase para formar una fase en emulsión;  
 10 templar la fase en emulsión para formar una fase templada, donde el temple se realiza al menos parcialmente a una temperatura de 5 °C o menos;  
 agregar un solubilizante de fármacos a la fase templada para formar una fase solubilizada del agente terapéutico no encapsulado; y  
 15 filtrar la fase solubilizada para recuperar las nanopartículas furtivas específicas para el objetivo, formando así una lechada de nanopartículas terapéuticas con un diámetro de 80 nm a 150 nm.
2. El método de la reivindicación 1, donde emulsionar la segunda fase comprende:  
 20 emulsionar la segunda fase para formar una fase en emulsión gruesa, y  
 emulsionar la emulsión gruesa para formar una fase en emulsión fina.
3. El método de la reivindicación 1, donde:  
 25 a) el solvente orgánico comprende un solvente elegido entre: acetato de etilo, alcohol bencílico, cloruro de metileno, cloroformo, tolueno, metil etil cetona, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, acetona, acetonitrilo, ácido acético, Tween 80 y Span 80, y combinaciones de dos o más de éstos; y/o  
 b) la solución acuosa comprende un reactivo elegido entre: colato de sodio, acetato de etilo, alcohol bencílico o sus combinaciones.
- 30 4. El método de la reivindicación 2, donde emulsionar la segunda fase comprende utilizar un homogeneizador de rotor y estator, una sonda de ultrasonido, una barra de agitación o un homogeneizador de alta presión.
5. El método de la reivindicación 2 o 4, donde emulsionar la emulsión gruesa comprende usar un homogeneizador de alta presión, donde opcionalmente emulsionar la primera emulsión comprende 2 o 3 pasajes a través del  
 35 homogeneizador.
6. El método de la reivindicación 5, donde:  
 40 a) la presión de alimentación del homogeneizador es 2000 a 8000 psi por cámara de interacción, y/o  
 b) el homogeneizador comprende múltiples cámaras de interacción.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el temple se realiza entre 0 °C y 5 °C.
- 45 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la relación medio para temple:emulsión es:  
 a) 8:1 a 5:1, o  
 b) 2:1 a 40:1.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde filtrar comprende usar un sistema de filtración de  
 50 flujo tangencial.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde filtrar comprende filtrar a una primera temperatura entre 0 °C y 5 °C.
- 55 11. El método de la reivindicación 10, que comprende además filtrar a una segunda temperatura entre 20 °C y 30 °C, donde opcionalmente filtrar comprende:  
 a) procesar 1 a 6 diavolumenes a una temperatura entre 0 °C y 5 °C y procesar al menos un diavolumen a una  
 60 temperatura entre 20 °C y 30 °C, o  
 b) procesar 1 a 6 diavolumenes a una temperatura entre 0 °C y 5 °C y procesar de 1 a 15 diavolumenes a una temperatura entre 20 °C y 30 °C.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde:  
 a) el primer o segundo polímero se elige el grupo que consiste en:

- (i) ácido poli-L-láctico, ácido poli-D-láctico, ácido poli-D,L-láctico, poli-L-láctido, poli-D-láctido y poli-D,L-láctido (designados colectivamente "PLA");  
 (ii) poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) y poli(láctido-co-glicólido) (designados colectivamente "PLGA"); y  
 (iii) poli(etilenglicol) ("PEG");

o sus copolímeros; y/o

b) el primer polímero es un copolímero PLGA-PLA o PLA, y el segundo polímero es un copolímero PLGA-PLA-PEG, un copolímero PLGA-bloque-PEG, o un copolímero PLA-bloque-PEG.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el agente terapéutico es:

a) docetaxel; o

b) se elige del grupo que consiste en antineoplásicos como doxorrubicina (adriamicina), mitoxantrona, gemcitabina (gemzar), daunorrubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleucina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, camptotecina, 10-hidroxi-7-etilcamptotecina (SN38), dacarbazina, S-I capecitabina, ftorafur, 5'-desoxifluorouridina, eniluracilo, desoxicidina, 5-azacitosina, 5-azadesoxicitosina, alopurinol, 2-cloroadenosina, trimetrexato, aminopterina, metileno-10-deazaaminopterina (MDAM), oxaplatino, picoplatino, tetraplatino, satraplatino, platino-DACH, ormaplatino, y sus análogos, epirubicina, fosfato de etopósido, 9-aminocamptotecina, 10,11-metilenodioxycamptotecina, karenitecina, 9-nitrocampotecina, vindesina, mostaza de L-fenilalanina, ifosfamidamefosfamida, perfosfamida, trofosfamida, carmustina, semustina, eptilonos A-E, tomudex, 6-mercaptipurina, 6-tioguanina, amsacrina, fosfato de etopósido, karenitecina, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir, amantadina, rimantadina, lamivudina, zidovudina, bevacizumab, trastuzumab, rituximab y 5-fluorouracilo, metotrexato, budesonida, sirolimus, vincristina y sus combinaciones, o

c) un ARNip.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde filtrar la fase solubilizada comprende la concentración, la diafiltración y la filtración terminal de la fase solubilizada.

15. Una nanopartícula terapéutica preparada mediante:

la emulsión de una primera fase orgánica que comprende un primer polímero y un agente terapéutico, y una segunda fase que forma una fase en emulsión; donde la fase en emulsión se temple después a una temperatura de 0 °C a 5 °C formando una fase templada; y

la filtración de la fase templada a una temperatura entre -5 °C y 10 °C; y

la filtración de la fase templada a una segunda temperatura de 25 °C; formando así nanopartículas terapéuticas que son estables durante al menos 5 días a 25 °C.

FIGURA 1

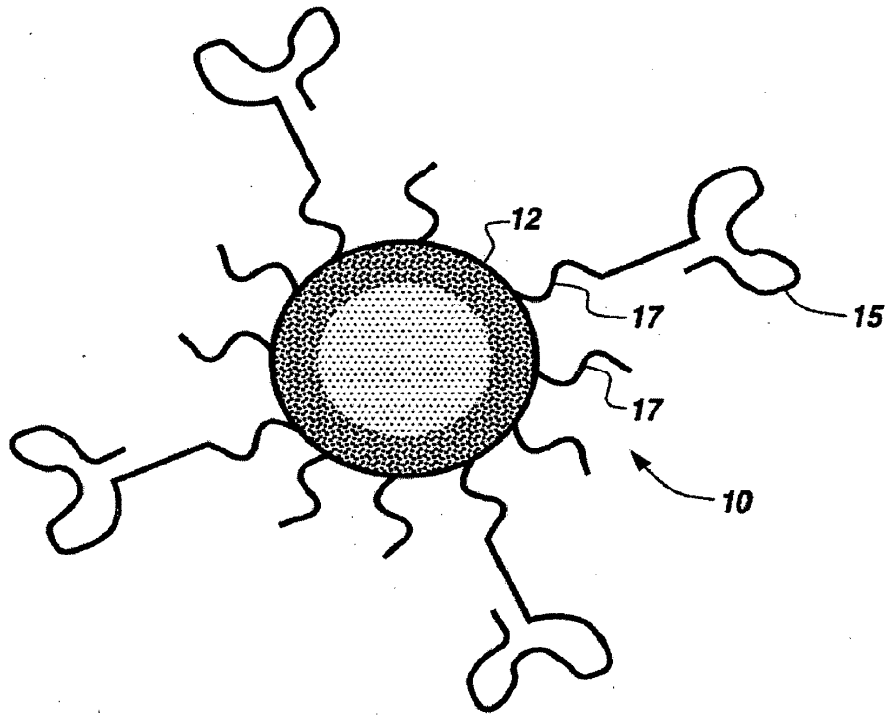


FIGURA 2

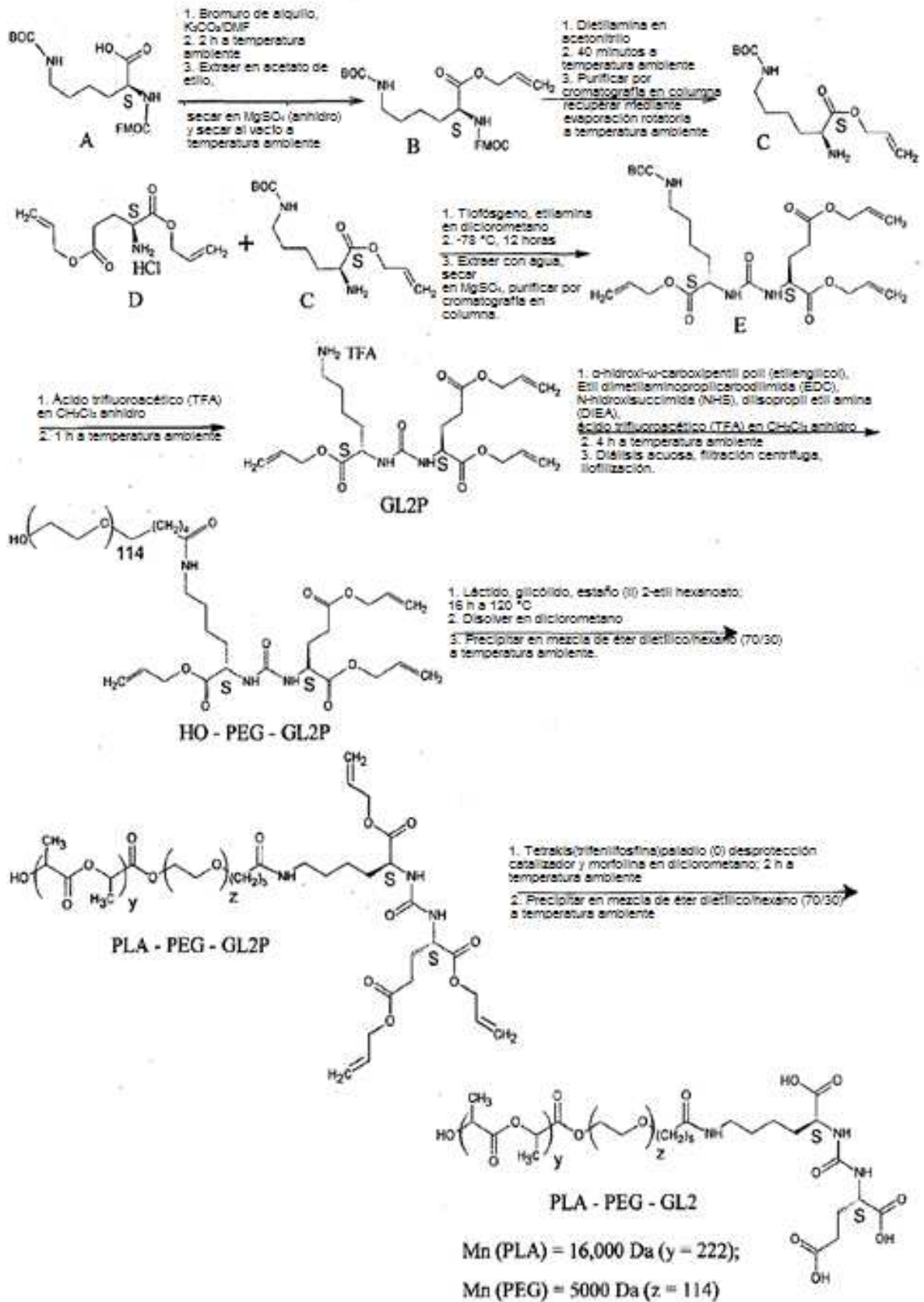


FIGURA 3

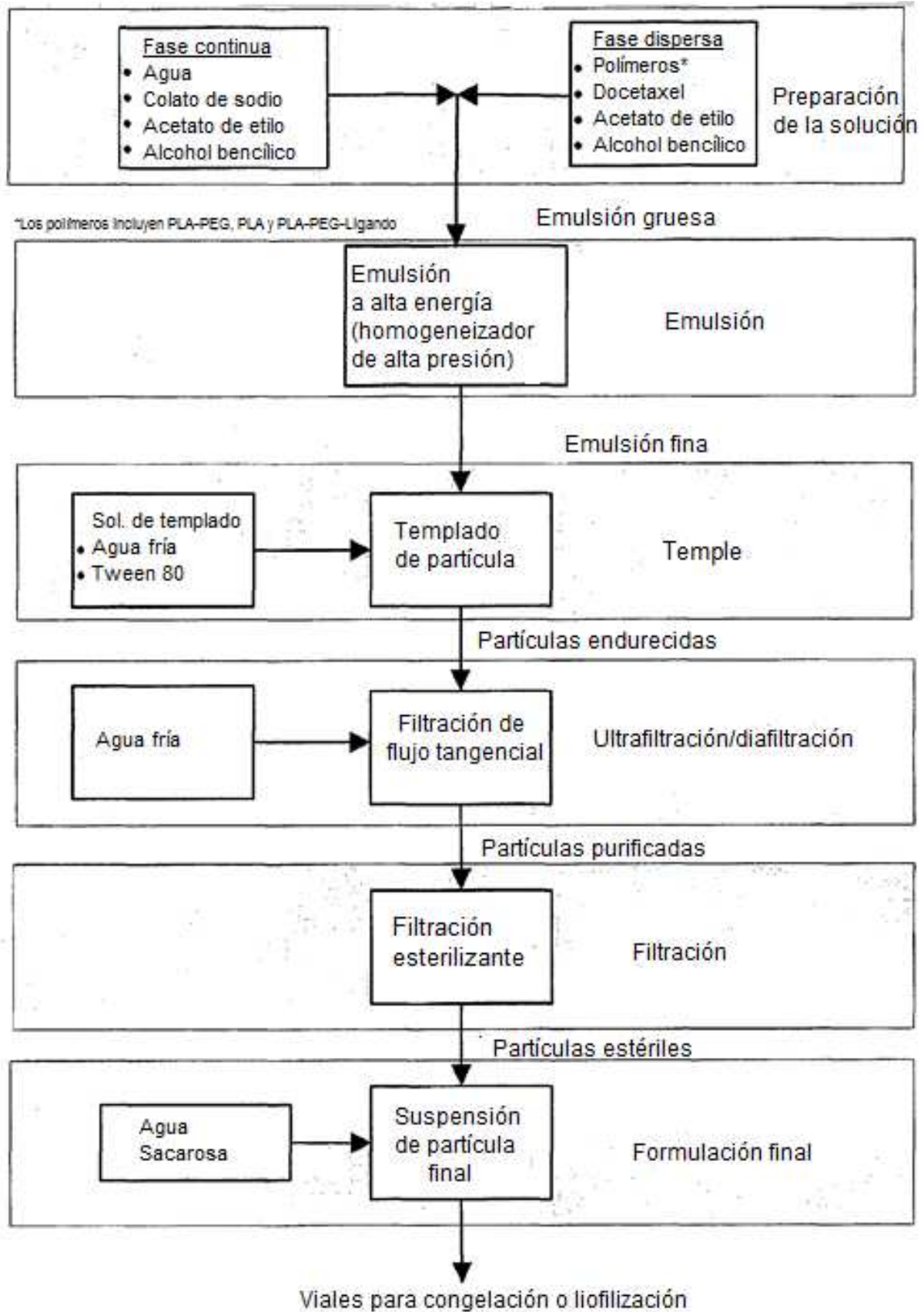
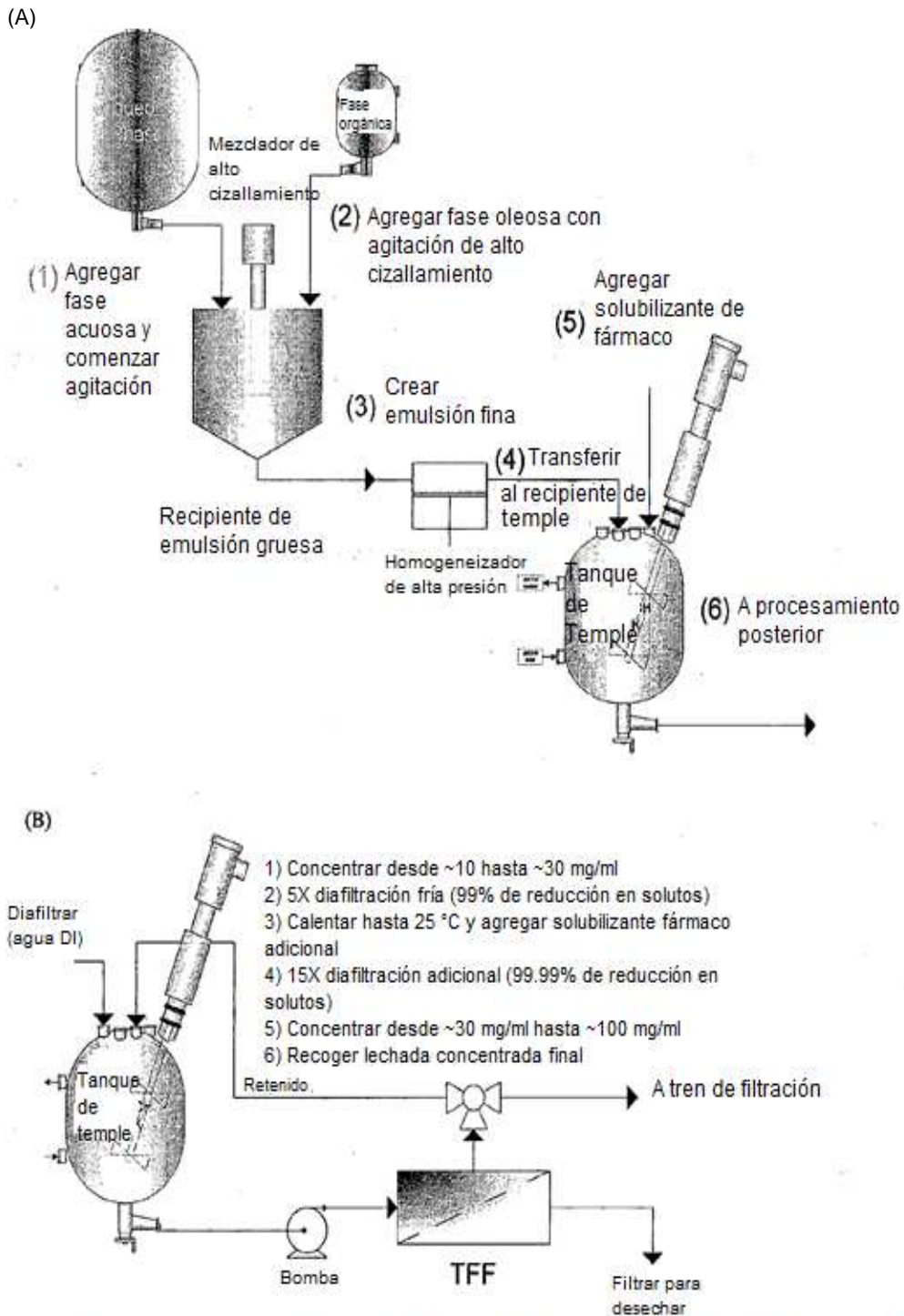


FIGURA 4



(A) Formación y endurecimiento de partícula (proceso anterior); (B) tratamiento final de la partícula y purificación (proceso posterior)

FIGURA 5

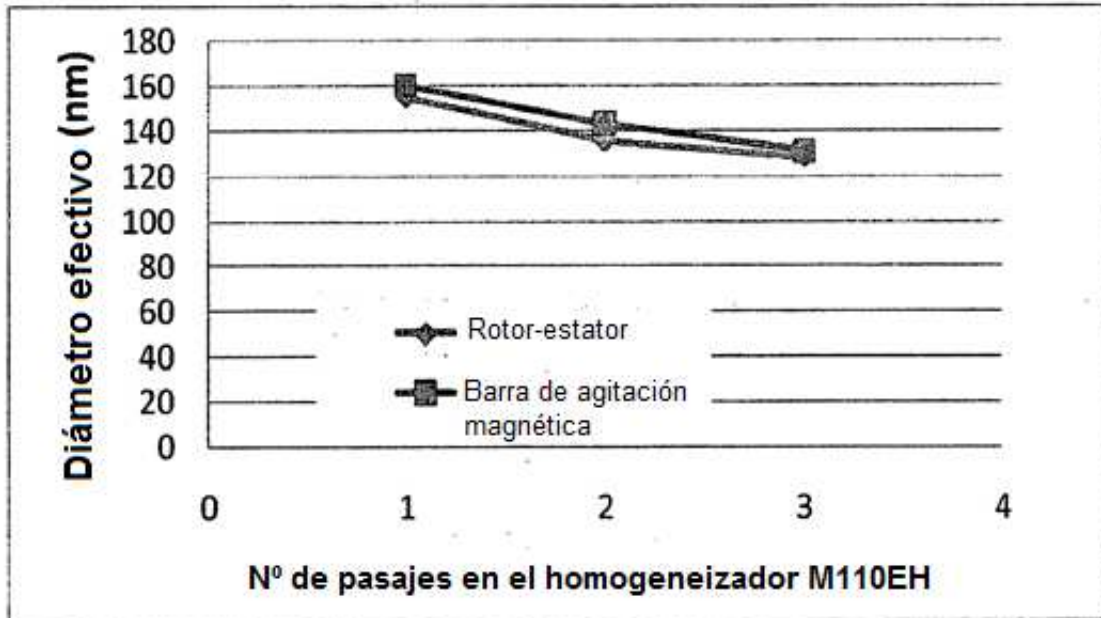




FIGURA 6

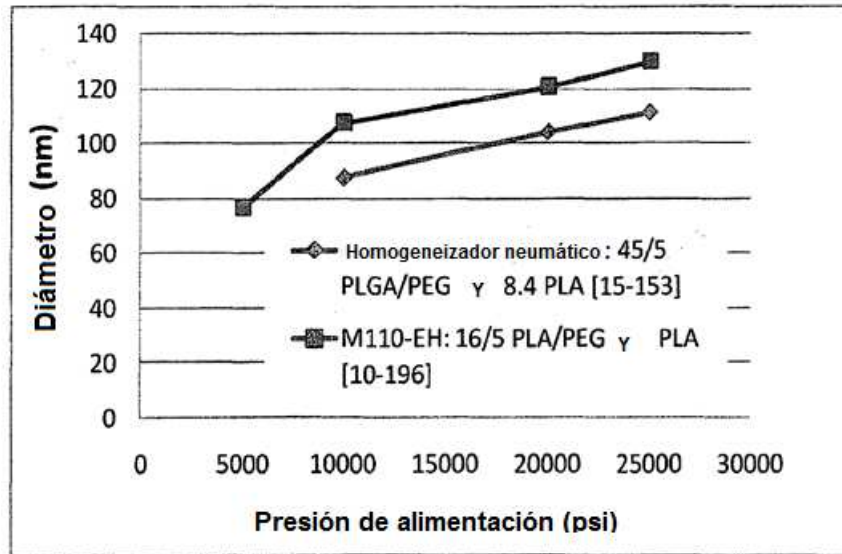


FIGURA 7

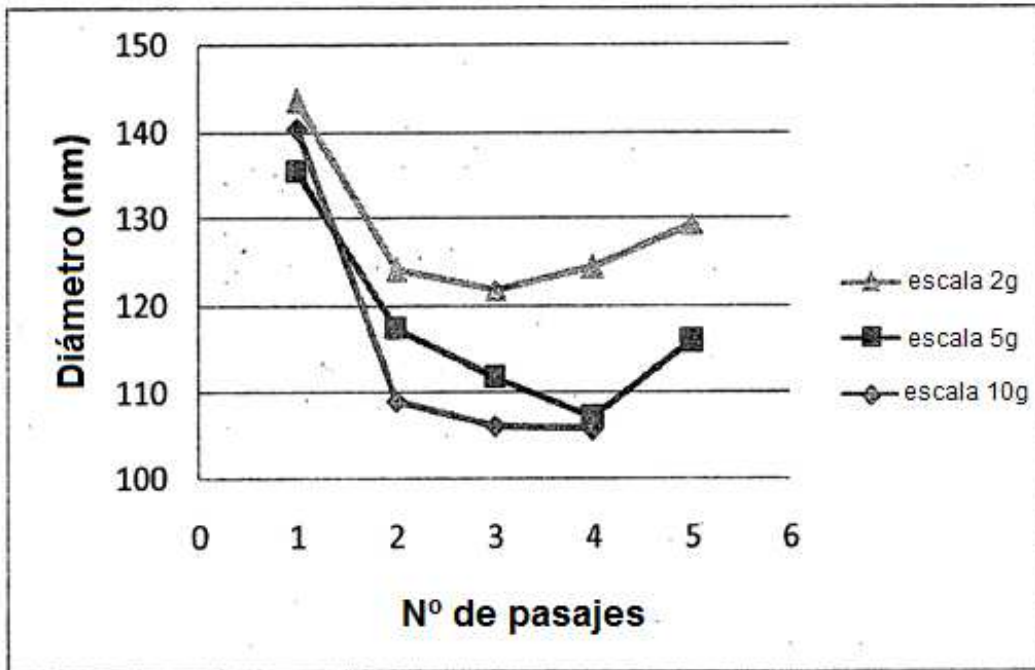


FIGURA 8

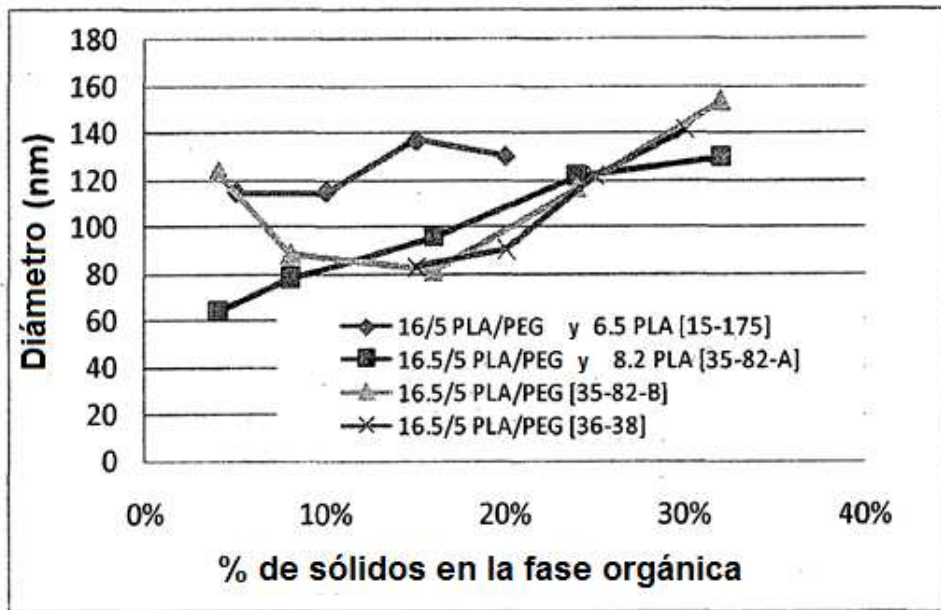


FIGURA 9

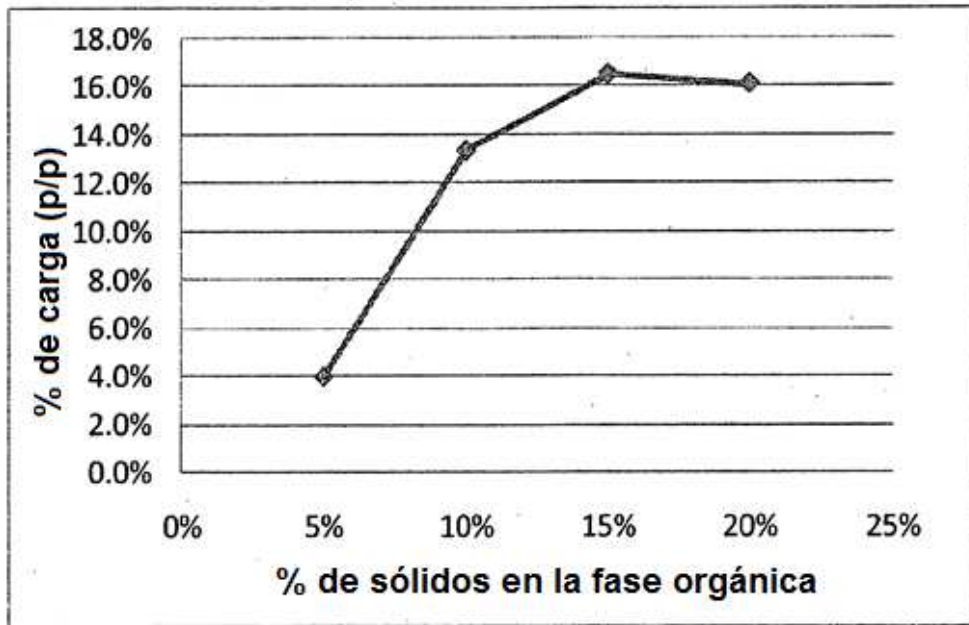


FIGURA 10

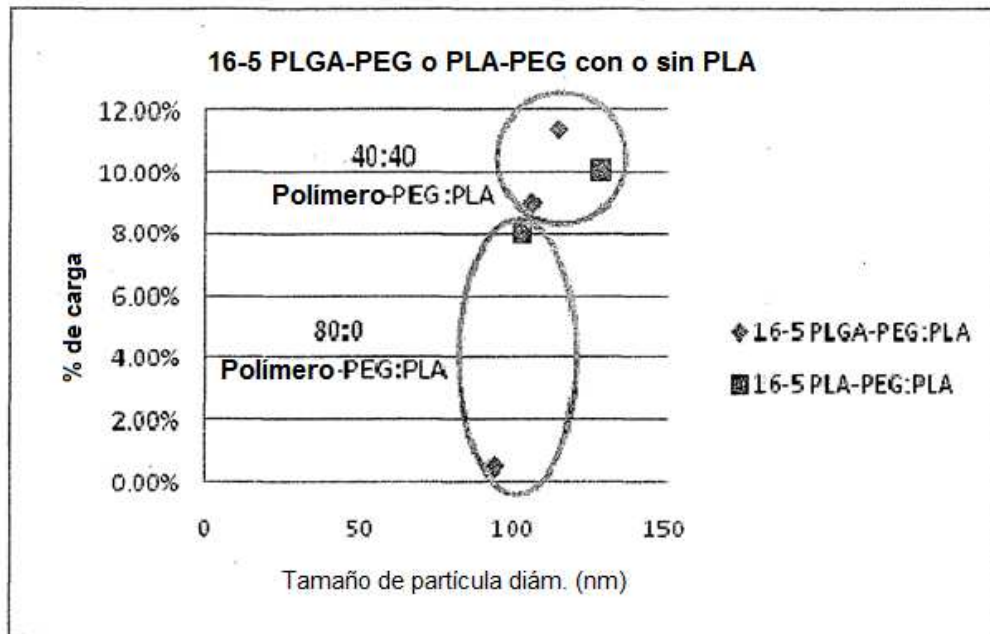


FIGURA 11

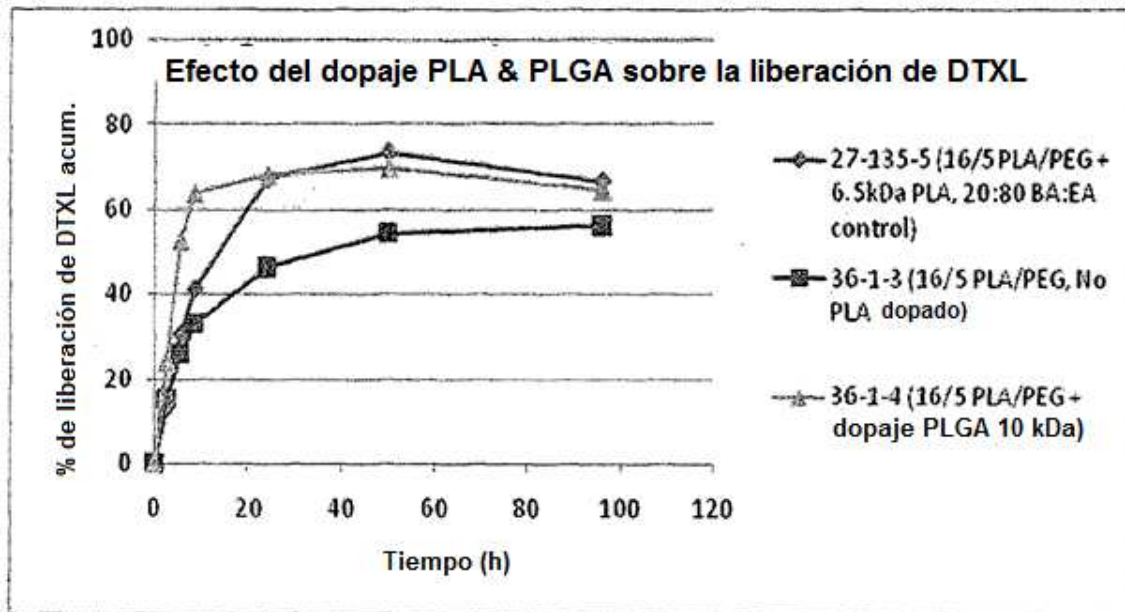


FIGURA 12

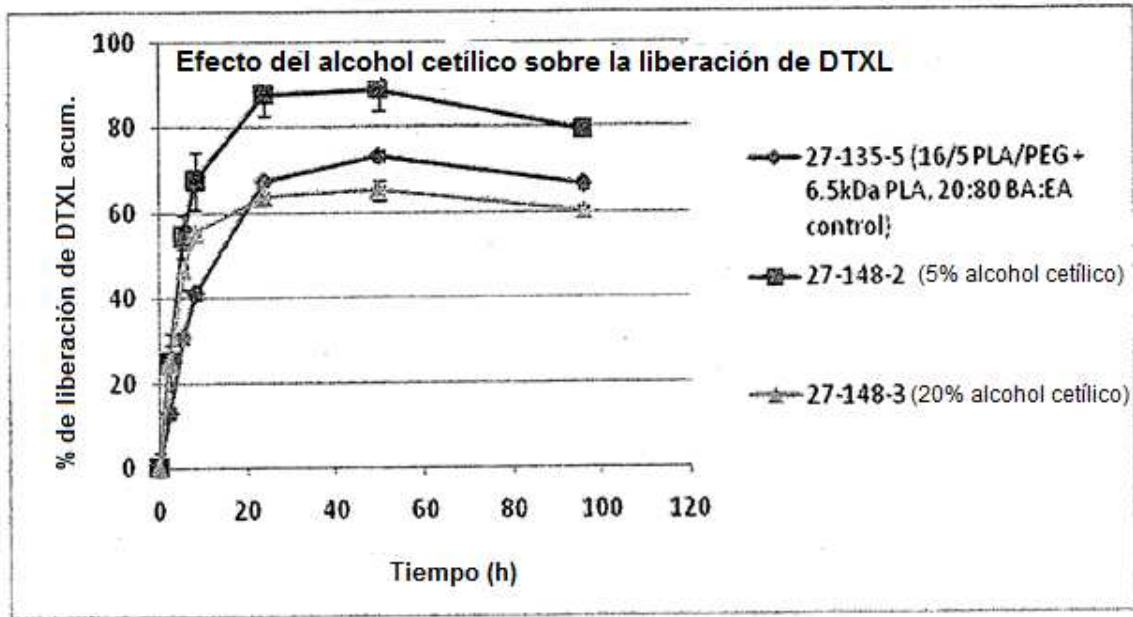


FIGURA 13

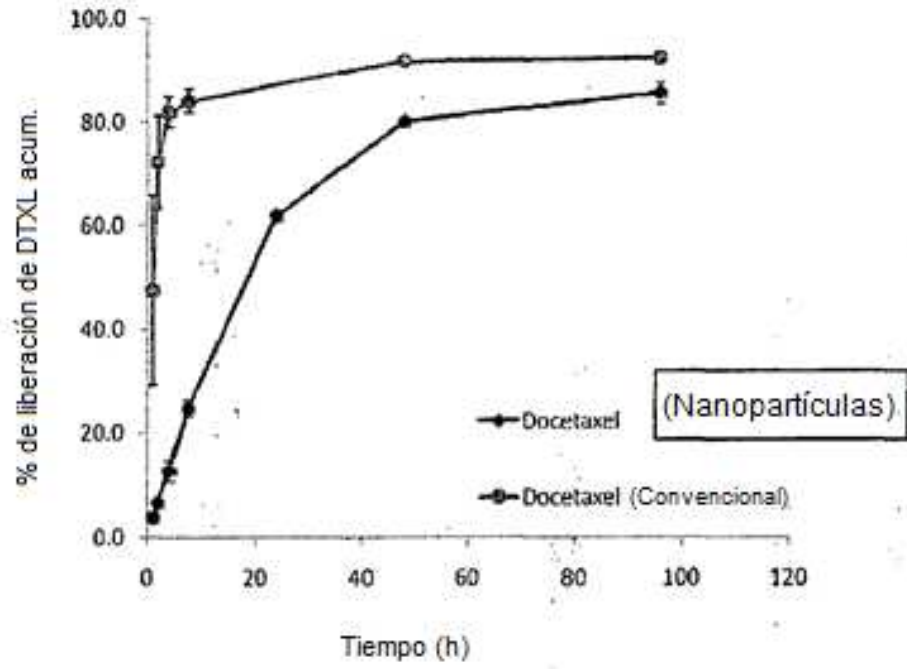




FIGURA 14

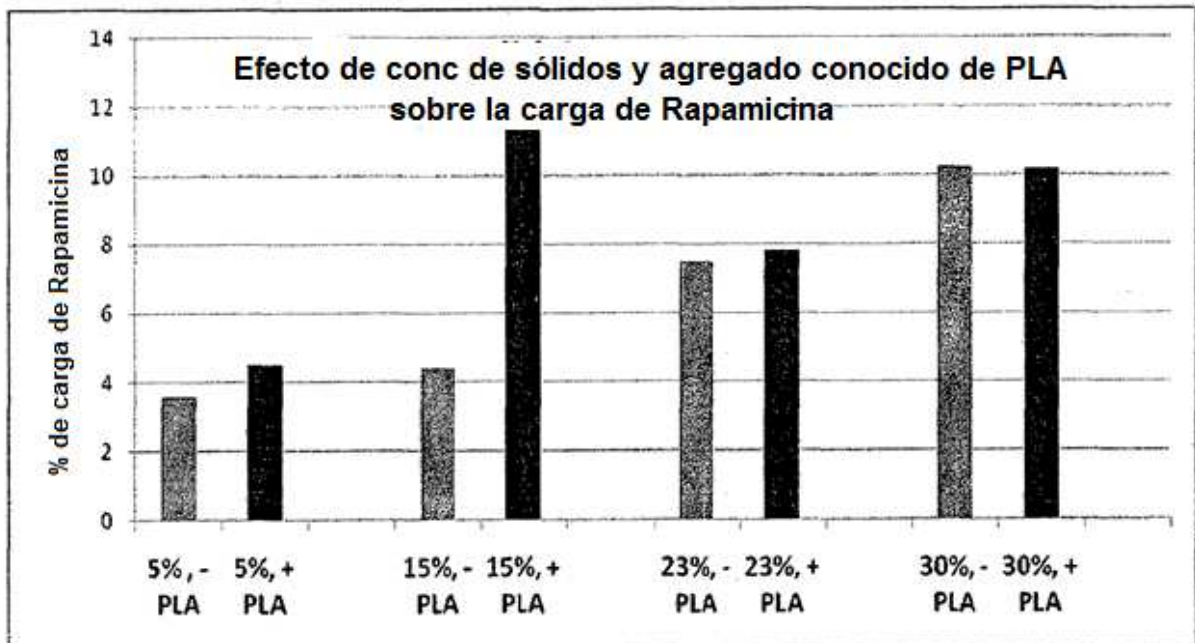


FIGURA 15

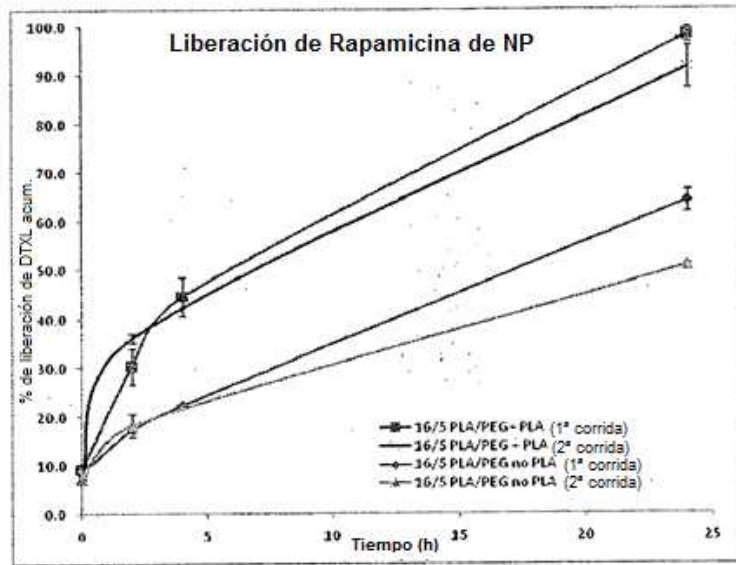


FIGURA 16

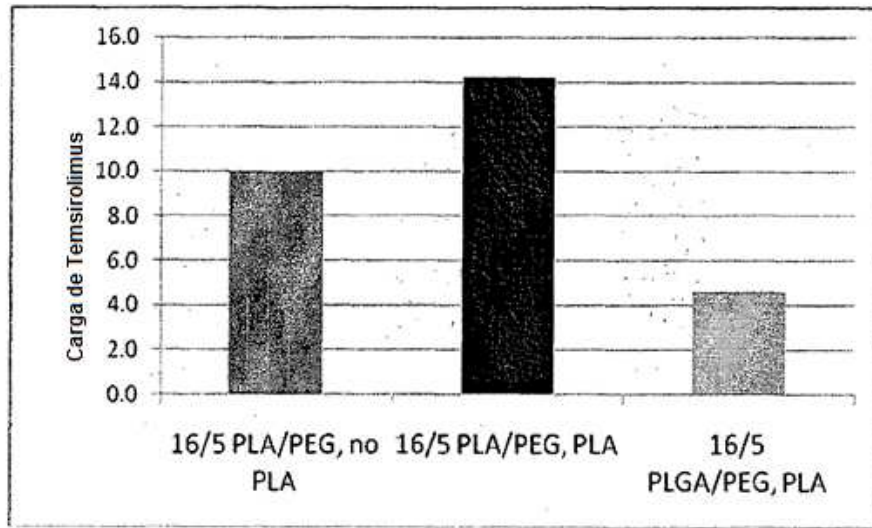


FIGURA 17

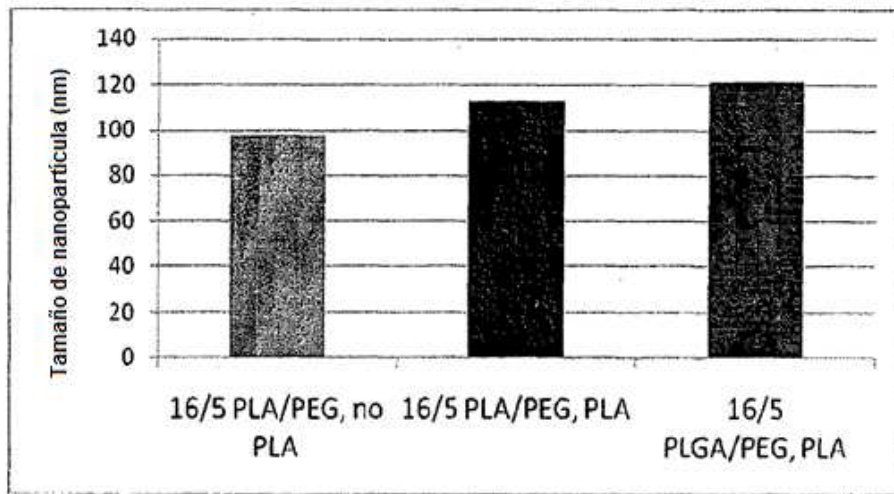


FIGURA 18

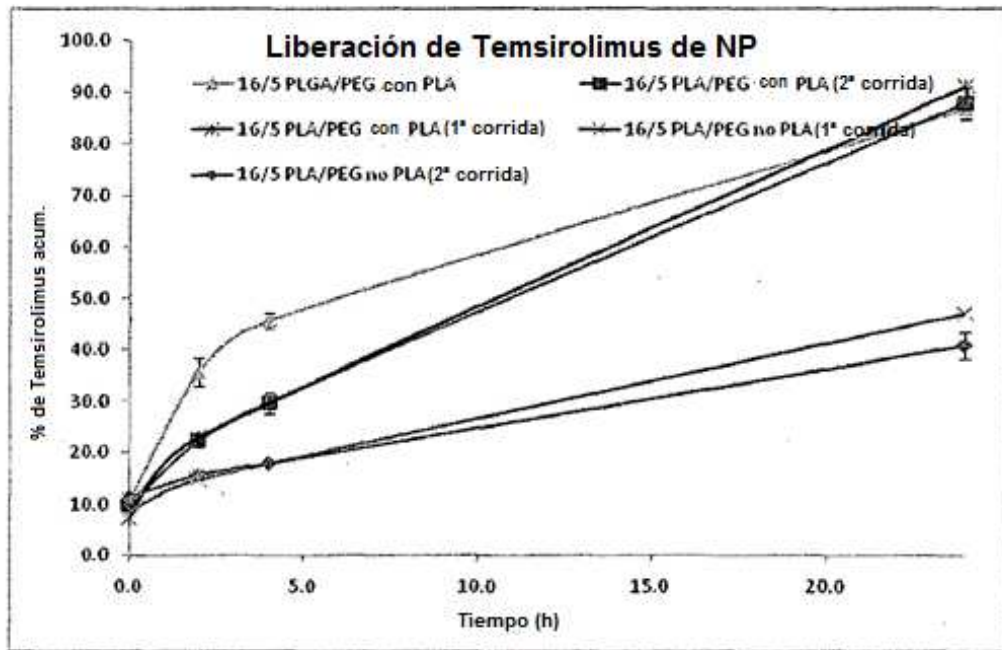


FIGURA 19

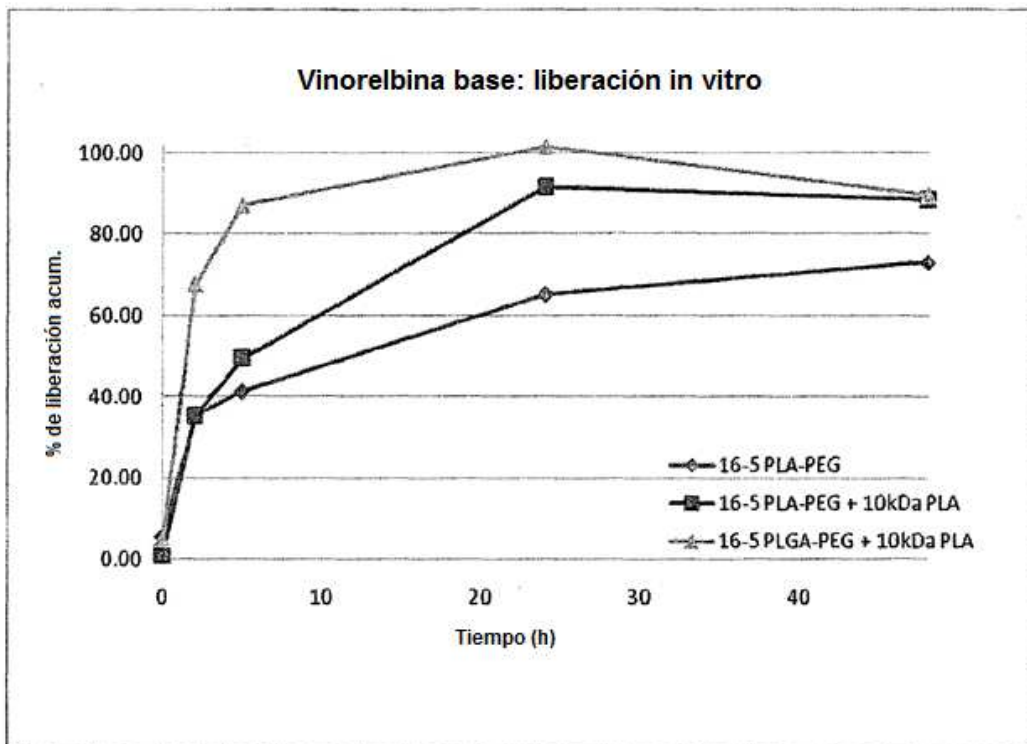


FIGURA 20

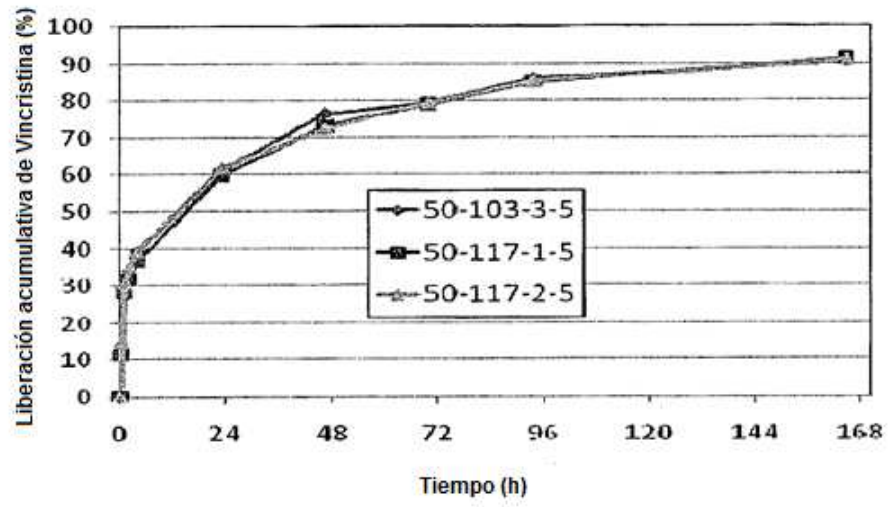


FIGURA 21

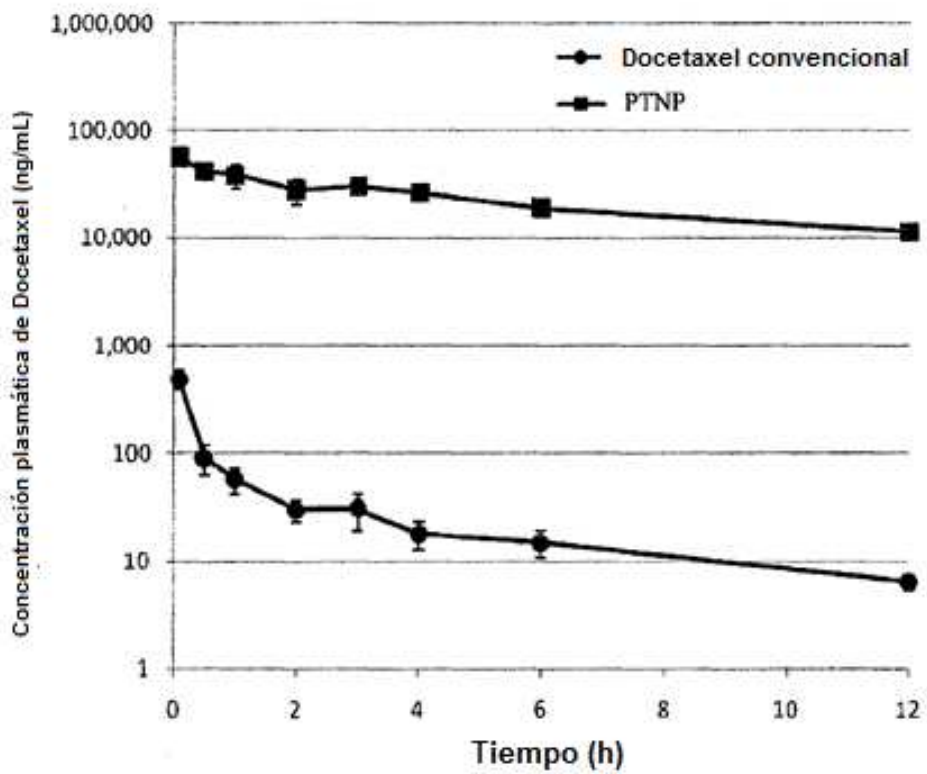
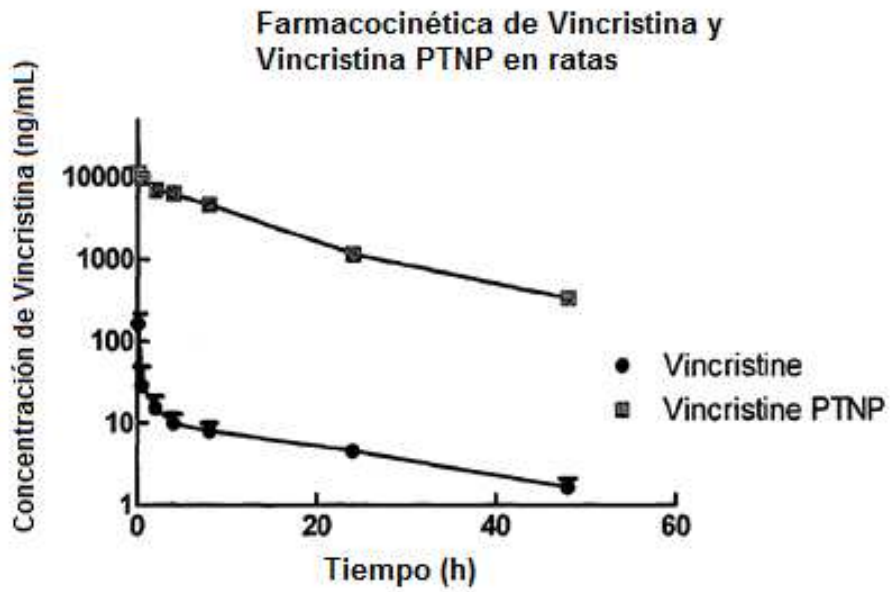




FIGURA 22

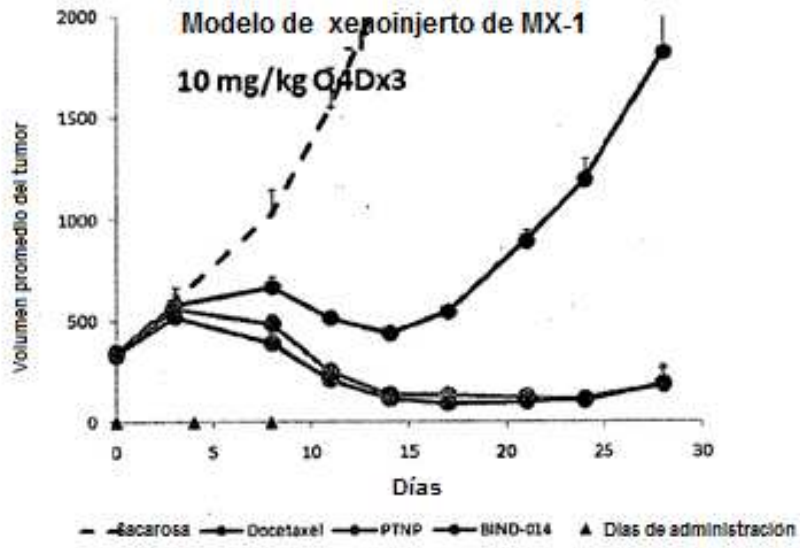


FIGURA 23

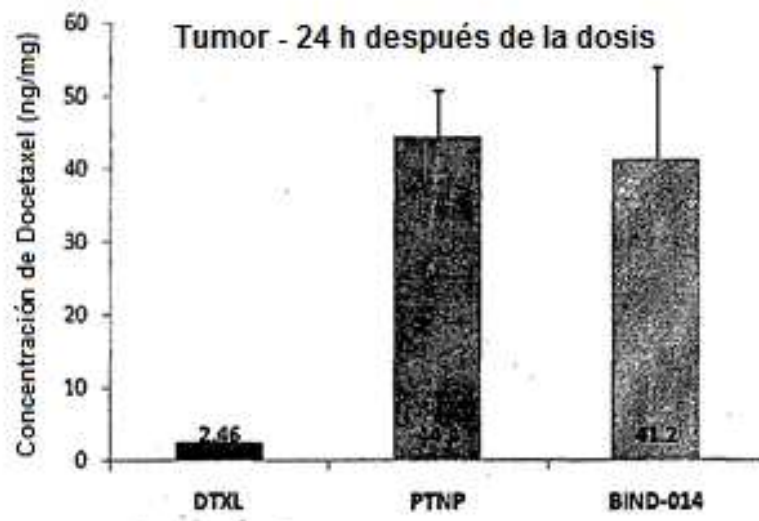


FIGURA 24

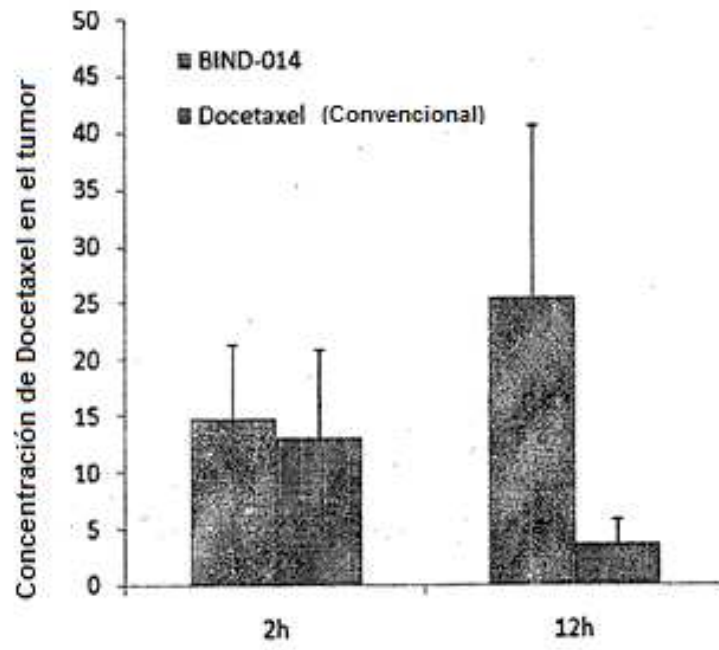


FIGURA 25

