(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 647 538**

(51) Int. CI.:

C07C 275/24 (2006.01)
C07C 275/04 (2006.01)
C08G 63/664 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 9/52 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2008 E 13162789 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2644594**

(54) Título: **Direccionamiento a células de cáncer usando nanopartículas**

(30) Prioridad:

28.09.2007 US 976197 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2017

(73) Titular/es:

PFIZER INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US

(72) Inventor/es:

ZALE, STEPHEN E. y
ALI, MIR MUKKARAM

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Direccionamiento a células de cáncer usando nanopartículas

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a composiciones farmacéuticas que comprenden nanopartículas recubiertas específicas de diana útiles en el tratamiento del cáncer.

Antecedentes

La administración de un fármaco a un paciente con liberación controlada del principio activo ha sido un área de investigación activa durante décadas y se ha visto alimentada por los muchos desarrollos recientes en la ciencia de polímeros. Además, pueden diseñarse sistemas poliméricos de liberación controlada para proporcionar un nivel de fármaco en el intervalo óptimo a lo largo de un periodo de tiempo más prolongado que otros procedimientos de administración de fármacos, aumentando de este modo la eficacia del fármaco y minimizando los problemas con el cumplimiento del paciente.

Se han desarrollado partículas biodegradables como vehículos de liberación sostenida usados en la administración de fármacos de molécula pequeña, proteínas y fármacos peptídicos y ácidos nucleicos. Los fármacos se encapsulan típicamente en una matriz polimérica que es biodegradable y biocompatible. A medida que se degrada el polímero y/o a medida que el fármaco difunde hacia afuera del polímero, el fármaco se libera en el cuerpo.

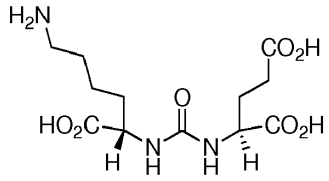
El direccionamiento de sistemas poliméricos de liberación controlada (por ejemplo, dirigidos a un tejido o tipo celular particular o dirigidos a un tejido enfermo específico pero no a tejido normal) es deseable porque reduce la cantidad de fármaco presente en los tejidos del cuerpo que no están fijados como objetivo. Esto es particularmente importante cuando se trata una afección tal como el cáncer, en la que es deseable que se administre una dosis citotóxica del fármaco a células cancerosas sin destruir el tejido no canceroso circundante. El direccionamiento de fármacos eficaz debería reducir los efectos secundarios indeseables y a veces potencialmente mortales comunes en la terapia anticancerosa. Además, el direccionamiento puede permitir que los fármacos alcancen ciertos tejidos que de otro modo serían incapaces de alcanzar sin una nanopartícula dirigida.

El documento WO 2008/058192 desvela heterodímeros de ácido glutámico como restos de unión.

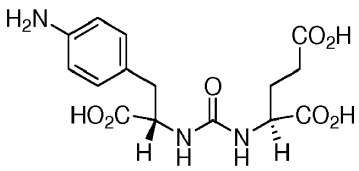
Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar sistemas de administración que puedan administrar niveles terapéuticos de fármaco para tratar enfermedades tales como el cáncer, al tiempo que reduzcan también los efectos secundarios en el paciente.

Sumario de la invención

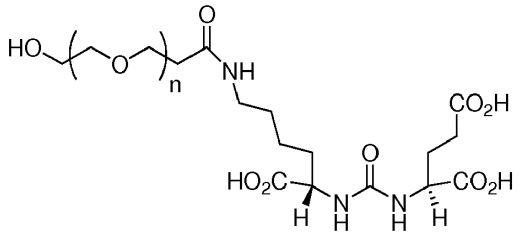
Continúa existiendo la necesidad de composiciones útiles en el tratamiento o la prevención o la mejora de uno o más síntomas de cáncer, particularmente cánceres que expresan antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), que incluyen, pero sin limitación, cáncer de próstata, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma colorrectal y glioblastoma, y tumores sólidos que expresan PSMA en la neovasculatura tumoral. En un aspecto, la invención proporciona un compuesto que tiene la estructura:



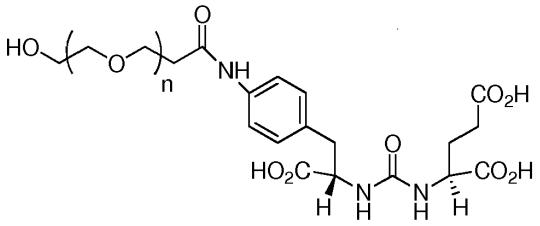
o



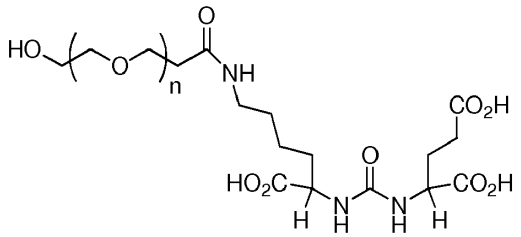
y enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereómeros o racematos del mismo; en la que el grupo NH_2 está unido covalentemente a poli(etilen)glicol. En una realización, el compuesto tiene la estructura:



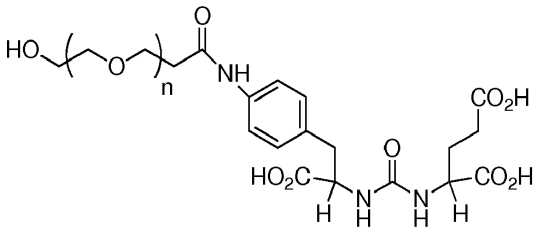
o



en la que n es 1-100.000. En otra realización, el compuesto tiene la estructura:

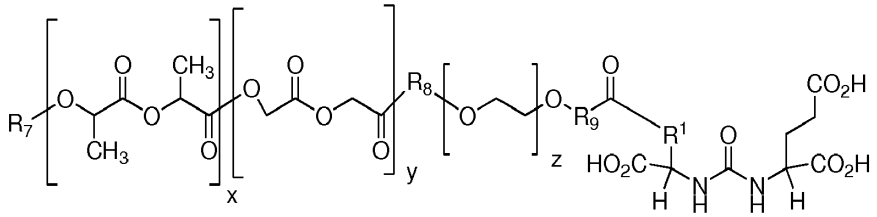


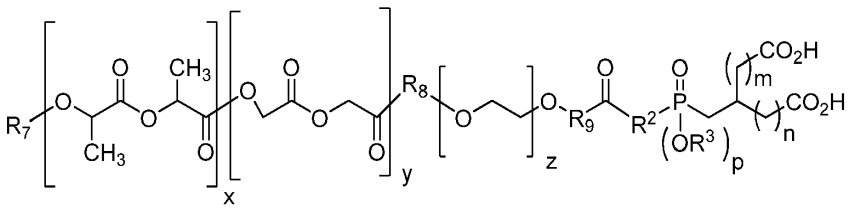
o

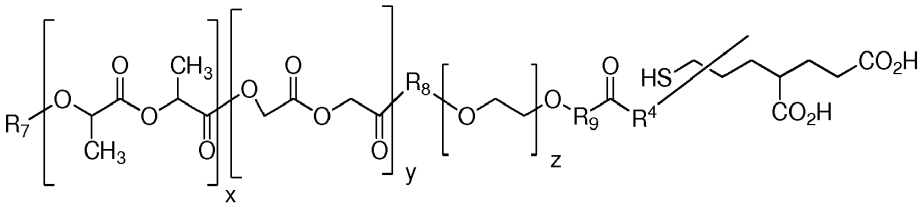


en la que n es 20-1720.

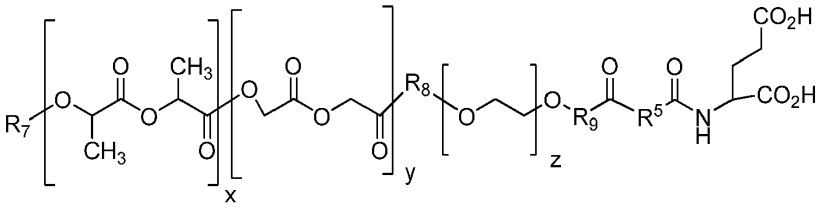
En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto seleccionado de entre:







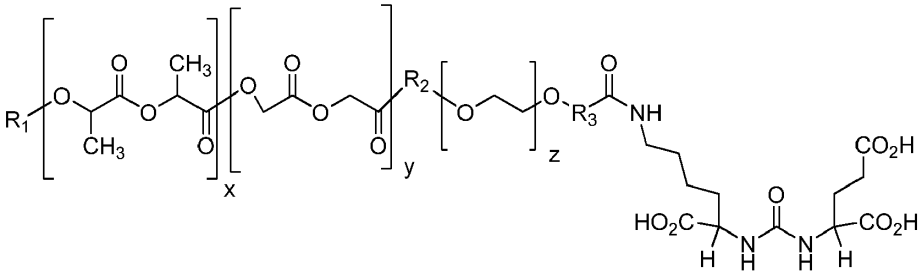
y



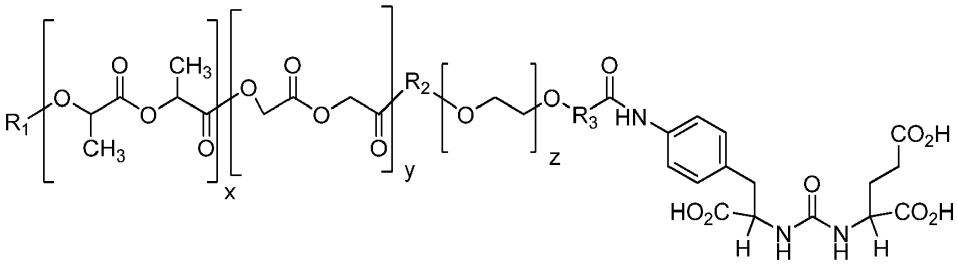
en las que cada uno de m y n es, independientemente, 0, 1, 2 o 3;

p es 0 o 1;

R^1, R^2, R^4 y R^5 se seleccionan cada uno, independientemente, del grupo que consiste en alquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, y cualquier combinación de los mismos; y R^3 es H o CH_3, y en las que R_7 y R_9 son grupos alquilo, R_8 es un enlace éster o amida, X = fracción molar de 0 a 1, Y = fracción molar de 0 a 0,5, X+Y = 20 a 1720, y Z = 25 a 455. En una realización, el compuesto se selecciona de entre:



y



en las que R_1 y R_3 son grupos alquilo, R_2 es un enlace éster o amida, X = fracción molar de 0 a 1, Y = fracción molar de 0 a 0,5, X+Y = 20 a 1720, y Z = 25 a 455.

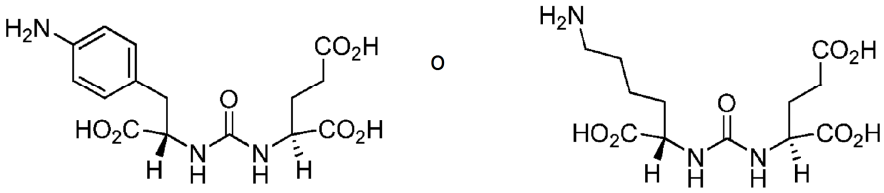
También se describe en el presente documento una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de nanopartículas recubiertas específicas de diana que comprenden un agente terapéutico; en la que dichas nanopartículas contienen restos de direccionamiento unidos a las mismas, en la que el resto de direccionamiento es un ligando de PSMA de bajo peso molecular.

En una realización de la composición farmacéutica descrita en el presente documento, la nanopartícula tiene una cantidad de resto de direccionamiento eficaz para el tratamiento de cáncer de próstata en un sujeto que lo necesite. En otra realización, la nanopartícula tiene una cantidad de resto de direccionamiento eficaz para el tratamiento de tumores sólidos que expresan PSMA en la neovasculatura tumoral en un sujeto que lo necesite. En otra realización más, el ligando de PSMA de bajo peso molecular tiene una K_i de entre 0,5 nM y 10 nM.

En una realización de la composición farmacéutica descrita en el presente documento, la nanopartícula tiene una

cantidad de agente terapéutico eficaz para el tratamiento de cáncer de próstata en un sujeto que lo necesite. En otra realización, la nanopartícula tiene una cantidad de agente terapéutico eficaz para el tratamiento de tumores sólidos que expresan PSMA en la neovasculatura tumoral en un sujeto que lo necesite.

En otra realización de las nanopartículas recubiertas específicas de diana descritas en el presente documento, el ligando de PSMA de bajo peso molecular tiene un peso molecular de menos de 1000 g/mol. En realizaciones particulares, el ligando de PSMA de bajo peso molecular se selecciona del grupo que consiste en los compuestos I, II, III e IV. En otras realizaciones, el ligando de PSMA de bajo peso molecular es



y enantiómeros, estereoisómeros rotámeros, tautómeros, diastereómeros, o racemato del mismo.

En otras realizaciones de las nanopartículas recubiertas específicas de diana descritas en el presente documento, la nanopartícula comprende una matriz polimérica. En una realización, la matriz polimérica comprende dos o más polímeros. En otra realización, la matriz polimérica comprende polietilenos, policarbonatos, polianhídridos, polihidroxiácidos, polipropilfumeratos, policaprolactonas, poliamidas, poliacetales, poliéteres, poliésteres, poli(ortoésteres), policianoacrilatos, alcoholes polivinílicos, poliuretanos, polifosfacenos, poliacrilatos, polimetacrilatos, policianoacrilatos, poliureas, poliestirenos, o poliaminas, o combinaciones de los mismos. En otra realización más, la matriz polimérica comprende uno o más poliésteres, polianhídridos, poliéteres, poliuretanos, polimetacrilatos, poliacrilatos o policianoacrilatos. En otra realización, al menos un polímero es un polialquilenglicol. En otra realización más, el polialquilenglicol es polietilenglicol. En otra realización más, al menos un polímero es un poliéster. En otra realización, el poliéster se selecciona del grupo que consiste en PLGA, PLA, PGA y policaprolactonas. En otra realización más, el poliéster es PLGA o PLA. En otra realización más, la matriz polimérica comprende un copolímero de dos o más polímeros. En otra realización, el copolímero es un copolímero de un polialquilenglicol y un poliéster. En otra realización más, el copolímero es un copolímero de PLGA o PLA y PEG. En otra realización más, la matriz polimérica comprende PLGA o PLA y un copolímero de PLGA o PLA y PEG.

En otra realización, la matriz polimérica comprende un polialquilenglicol terminado el lípido y un poliéster. En otra realización de la composición farmacéutica descrita en el presente documento, la matriz polimérica comprende PEG terminado en lípido y PLGA. En una realización, el lípido es de la Fórmula V. En una realización particular, el lípido es 1,2 distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), y sales del mismo, por ejemplo, la sal sódica.

En otra realización de la composición farmacéutica descrita en el presente documento, una porción de la matriz polimérica está unida covalentemente al ligando de PSMA de bajo peso molecular. En otra realización, la matriz polimérica está unida covalentemente al ligando de PSMA de bajo peso molecular a través del extremo libre de PEG. En otra realización más, la matriz polimérica está unida covalentemente al ligando de PSMA de bajo peso molecular a través de un grupo carboxilo en el extremo libre de PEG. En otra realización más, la matriz polimérica está unida covalentemente al ligando de PSMA de bajo peso molecular a través de un grupo funcional de maleimida en el extremo libre de PEG.

En otra realización de la composición farmacéutica descrita en el presente documento, la nanopartícula tiene una relación de polímero unido a ligando con respecto a polímero no funcionalizado eficaz para el tratamiento del cáncer de próstata. En otra realización, los polímeros de la matriz polimérica tienen un peso molecular eficaz para el tratamiento del cáncer de próstata. En otra realización más, la nanopartícula tiene una carga superficial eficaz para el tratamiento del cáncer de próstata.

En otra realización de la composición farmacéutica descrita en el presente documento, dicho sistema es adecuado para el tratamiento específico de diana de una enfermedad o trastorno y la administración de un agente terapéutico. En otra realización, la nanopartícula comprende además un agente terapéutico. En una realización, el agente terapéutico se asocia con la superficie de, se encapsula en el interior de, se rodea por, o se dispersa a través de la nanopartícula. En otra realización más, el agente terapéutico se encapsula en el interior del núcleo hidrófobo de la nanopartícula. En realizaciones particulares, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en mitoxantrona y docetaxel.

También se describe en el presente documento un procedimiento de tratamiento de cáncer de próstata en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la invención. En una realización, la composición farmacéutica se administra directamente a la próstata de un sujeto. En otra realización más, la composición farmacéutica se administra directamente a células de cáncer de próstata. En otra realización, la composición farmacéutica se administra directamente a células de cáncer de próstata por

inyección en el tejido que comprende las células de cáncer de próstata. En otra realización más, la composición farmacéutica se administra al sujeto por implantación de nanopartículas en o próximas a células de cáncer de próstata durante la extirpación quirúrgica de un tumor. En otra realización, la composición farmacéutica se administra sistémicamente, o a través de administración intravenosa.

También se describe en el presente documento un procedimiento para preparar una nanopartícula recubierta, en el que la nanopartícula tiene una relación de polímero unido a ligando con respecto a polímero no funcionalizado eficaz para el tratamiento del cáncer de próstata, que comprende: proporcionar un agente terapéutico; proporcionar un polímero; proporcionar un ligando de PSMA de bajo peso molecular; mezclar el polímero con el agente terapéutico para preparar partículas; y asociar las partículas con el ligando de PSMA de bajo peso molecular. En una realización del procedimiento, el polímero comprende un copolímero de dos o más polímeros. En otra realización, el copolímero es un copolímero de PLGA y PEG o PLA y PEG.

También se describe en el presente documento un procedimiento para preparar una nanopartícula recubierta, en el que la nanopartícula tiene una relación de polímero unido a ligando con respecto a polímero no funcionalizado eficaz para el tratamiento del cáncer de próstata, que comprende: proporcionar un agente terapéutico; proporcionar un primer polímero; proporcionar un ligando de PSMA de bajo peso molecular; hacer reaccionar el primer polímero con el ligando de PSMA de bajo peso molecular para preparar un polímero unido a ligando; y mezclar el polímero unido a ligando con un segundo polímero no funcionalizado y el agente terapéutico; de modo que se forme la nanopartícula recubierta. En una realización de este procedimiento, el primer polímero comprende un copolímero de dos o más polímeros. En otra realización, el segundo polímero no funcionalizado comprende un copolímero de dos o más polímeros

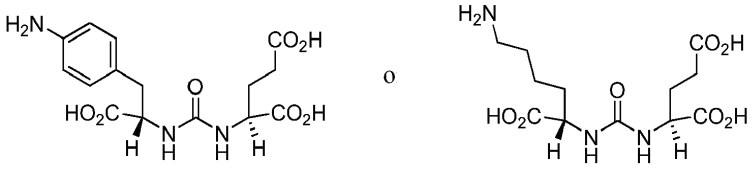
En una realización de los procedimientos descritos anteriormente, el copolímero es un copolímero de PLGA y PEG, o PLA y PEG. En otra realización, el primer polímero es un copolímero de PLGA y PEG, en el que el PEG tiene un grupo carboxilo en el extremo libre. En otra realización, el primer polímero se hace reaccionar con un lípido, para formar un conjugado polímero/lípido, que después se mezcla con el ligando de PSMA de bajo peso molecular. En otra realización más, el lípido es 1,2 distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), y sales del mismo, *por ejemplo,* la sal sódica.

En otra realización de la composición farmacéutica descrita en el presente documento, la nanopartícula tiene una cantidad de resto de direccionamiento eficaz para el tratamiento de un cáncer, en la que el PSMA se expresa en la superficie de células cancerosas o en la neovasculatura del tumor en un sujeto que lo necesite. En una realización, la indicación relacionada con PSMA se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma colorrectal y glioblastoma.

También se describe en el presente documento una nanopartícula recubierta, que comprende un copolímero de PLGA y PEG; y un agente terapéutico que comprende mitoxantrona o docetaxel; en el que dicha nanopartícula contiene restos de direccionamiento unidos a la misma, en el que el resto de direccionamiento es un ligando de PSMA de bajo peso molecular.

[0024] También se describe en el presente documento una nanopartícula recubierta, que comprende una matriz polimérica que comprende un complejo de un PEG y PLGA unido a fosfolípido; y un agente terapéutico; en el que dicha nanopartícula contiene restos de direccionamiento unidos a los mismos, en el que el resto de direccionamiento es un ligando de PSMA de bajo peso molecular. En una realización de esta nanopartícula recubierta, el agente terapéutico es mitoxantrona o docetaxel.

[0025] En realizaciones particulares de las nanopartículas recubiertas descritas anteriormente, el ligando de PSMA de bajo peso molecular es



y enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereómeros o racematos del mismo.

[0026] También se describe en el presente documento una partícula diana, que comprende: un resto diana, y un agente terapéutico; en el que la partícula comprende una matriz polimérica, en el que la matriz polimérica comprende un poliéster, y en el que el resto de direccionamiento es un ligando de PSMA de bajo peso molecular. En una realización de esta partícula diana, la partícula es una nanopartícula. En otra realización, el poliéster se selecciona del grupo que consiste en PLGA, PLA, PGA, policaprolactona y polianhídridos. En una realización de la matriz polimérica de esta partícula diana, al menos un polímero es polialquilenglicol. En ciertas realizaciones de la partícula diana, el ligando de PSMA de bajo peso molecular se selecciona del grupo que consiste en ácido fólico, derivados de tiol e indol tio, derivados de hidroxamato e inhibidores a base de urea.

[0027] También se describe en el presente documento una composición que comprende: una partícula que tiene una dimensión característica media de menos de aproximadamente 1 micrómetro, comprendiendo la partícula una macromolécula que comprende una primera porción que comprende un polímero biocompatible y una segunda porción que comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un resto diana, y un resto terapéutico, en la que el resto diana es un ligando de PSMA de bajo peso molecular, y en la que el resto diana tiene una concentración esencialmente diferente de cero internamente de la partícula, es decir, hay poca o ninguna cantidad detectable del compuesto presente en el interior de la partícula. En una realización de esta partícula, el polímero biocompatible comprende poli(lactida-co-glicolida). En otra realización de esta partícula, el polímero comprende poli(etilenglicol).

[0028] También se describe en el presente documento una nanopartícula que comprende un ligando de PSMA de bajo peso molecular, un polímero biodegradable, un polímero recubierto, y un agente terapéutico. En una realización, la nanopartícula comprende un ligando de PSMA de bajo peso molecular, un polímero biodegradable, un polímero recubierto, y un agente terapéutico, en la que la nanopartícula puede acumularse selectivamente en la próstata o en el tejido endotelial vascular que rodea un cáncer. En una realización, la nanopartícula comprende un ligando de PSMA de bajo peso molecular, un polímero biodegradable, un polímero recubierto, y un agente terapéutico, en la que la nanopartícula puede acumularse selectivamente en la próstata o en el tejido endotelial vascular que rodea un cáncer, y en la que la nanopartícula puede experimentar endocitosis por una célula que expresa PSMA. En otra realización, la nanopartícula comprende un ligando de PSMA de bajo peso molecular, un polímero biodegradable, polietilenglicol y un agente quimioterapéutico. En otra realización, la nanopartícula comprende un ligando de PSMA de bajo peso molecular, un polímero biodegradable, polietilenglicol y docetaxel. En otra realización, la nanopartícula comprende un ligando de PSMA de bajo peso molecular, PLGA, polietilenglicol y docetaxel.

[0029] También se describe en el presente documento una nanopartícula recubierta específica de diana que comprende un agente terapéutico; en la que la nanopartícula contiene restos de direccionamiento unidos a la misma, en la que el resto de direccionamiento es un ligando de PSMA de bajo peso molecular, y en la que el agente terapéutico es un siRNA. La molécula de siRNA puede ser complementaria a dianas relacionadas con tumores, por ejemplo, un tumor de próstata.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A, 1B, y **2** muestran esquemas de síntesis representativos para las nanopartículas recubiertas específicas de diana descritas en el presente documento.
La **figura 3** es un esquema representativo de una nanopartícula descrita en el presente documento.
La **figura 4** demuestra la captación celular de las nanopartículas descritas en el presente documento.

Descripción detallada

Se describe en el presente documento un procedimiento para desarrollar nanopartículas poliméricas con propiedades deseadas, en el que las nanopartículas contienen un resto de direccionamiento que es un ligando de PSMA de bajo peso molecular. En un conjunto de realizaciones, el procedimiento incluye la producción de bibliotecas de nanopartículas que contienen ligandos de PSMA de bajo peso molecular, en el que las bibliotecas tienen propiedades altamente controladas, y en el que las bibliotecas pueden formarse mezclando dos o más polímeros (por ejemplo, polímeros funcionalizados con ligando y polímeros no funcionalizados) en diferentes relaciones. Uno o más de los polímeros pueden ser un polímero biocompatible (por ejemplo, homopolímero, copolímero o copolímero en bloque), en los que el polímero biocompatible puede conjugarse con un ligando de PSMA de bajo peso molecular. En algunos casos, la nanopartícula puede contener un agente terapéutico, *por ejemplo,* un fármaco.

En una realización, la nanopartícula del sistema de liberación controlada tiene una cantidad de resto de direccionamiento (es decir, un ligando de PSMA de bajo peso molecular) eficaz para el tratamiento del cáncer de próstata en un sujeto que lo necesite. En determinadas realizaciones, el ligando de PSMA de bajo peso molecular se conjuga con un polímero, y la nanopartícula comprende una cierta relación de polímero conjugado con ligando con respecto al polímero no funcionalizado. La nanopartícula puede tener una relación optimizada de estos dos polímeros, de manera que una cantidad eficaz de ligando se asocia con la nanopartícula para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, una densidad de ligando aumentada (por ejemplo, sobre un copolímero de PLGA-PEG) aumentará la unión de diana (unión celular/absorción de diana), haciendo que la nanopartícula sea "específica para una diana". Como alternativa, una determinada concentración de polímero no funcionalizado (por ejemplo, copolímero PLGA-PEG no funcionalizado) en la nanopartícula puede controlar la inflamación y/o la inmunogenicidad (es decir, la capacidad para provocar una respuesta inmune), y permitir que la nanopartícula tenga una semivida en circulación que sea adecuada para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata). Además, el polímero no funcionalizado puede disminuir la velocidad de depuración del sistema circulatorio a través del sistema retículo-endotelial (RES). Así pues, el polímero no funcionalizado proporciona a la nanopartícula características de "recubrimiento". En una realización particular, el polímero recubierto es PEG. Adicionalmente, el polímero no funcionalizado equilibra una concentración de otro modo elevada de ligandos, que de otro modo puede acelerar la depuración por el sujeto, dando como resultado una menor administración a las células diana.

Al tener restos de direccionamiento, las nanopartículas "específicas de diana" son capaces de unirse eficazmente a o asociarse de otro modo con una entidad biológica, por ejemplo, un componente de membrana o receptor de superficie celular. El direccionamiento de un agente terapéutico (por ejemplo, hacia un tejido o tipo celular particular, hacia un tejido enfermo específico pero no hacia tejido normal, etc.) es deseable para el tratamiento de enfermedades específicas de tejido tales como cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata). Por ejemplo, al contrario que la administración sistémica de un agente anticanceroso citotóxico, la administración dirigida podría evitar que el agente destruya células sanas. Adicionalmente, la administración dirigida permitirá la administración de una menor dosis del agente, lo que podría reducir los efectos secundarios indeseables comúnmente asociados con la quimioterapia tradicional. Como se ha analizado anteriormente, la especificidad de diana de las nanopartículas se maximizará por optimización de la densidad de ligando en la nanopartícula.

Nanopartículas recubiertas específicas de diana que comprenden polímeros

En algunas realizaciones, las nanopartículas descritas en el presente documento comprenden una matriz de polímeros. En general, una "nanopartícula" se refiere a cualquier partícula que tenga un diámetro de menos de 1000 nm. En algunas realizaciones, un agente terapéutico y/o resto de direccionamiento (es decir, un ligando de PSMA de bajo peso molecular) puede asociarse con la matriz polimérica. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento puede asociarse covalentemente con la superficie de una matriz polimérica. En algunas realizaciones, la asociación covalente está mediada por un enlazador. En algunas realizaciones, el agente terapéutico puede asociarse con la superficie de, se encapsula en el interior de, se rodea por, y/o se dispersa a través de la matriz polimérica.

Se conocen en la técnica de la administración de fármacos una amplia diversidad de polímeros y procedimientos para formar partículas a partir de los mismos. En algunas realizaciones, la matriz de una partícula comprende uno o más polímeros. Puede usarse cualquier polímero de acuerdo con la presente invención. Los polímeros pueden ser polímeros 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. Típicamente, los polímeros de acuerdo con la presente invención son polímeros orgánicos.

A un "polímero", como se usa en el presente documento, se le otorga su significado habitual como se usa en la técnica, es decir, una estructura molecular que comprende una o más unidades de repetición (monómeros) conectadas por enlaces covalentes. Las unidades de repetición pueden ser todas idénticas, o en algunos casos, puede haber más de un tipo de unidad de repetición presente dentro del polímero. En algunos casos, el polímero se obtiene biológicamente, *es decir,* un biopolímero. Los ejemplos no limitantes de polímeros incluyen péptidos o proteínas (es decir, polímeros de diversos aminoácidos) o ácidos nucleicos tales como ADN o ARN, como se analizan a continuación. En algunos casos, también pueden estar presentes en el polímero restos adicionales, restos biológicos tales como los descritos a continuación.

Si está presente más de un tipo de unidad de repetición dentro del polímero, entonces se dice que el polímero es un "copolímero". Debe entenderse que en cualquier realización que emplee un polímero, el polímero que se emplee puede ser un copolímero en algunos casos. Las unidades de repetición que forman el copolímero pueden disponerse de cualquier forma. Por ejemplo, las unidades de repetición pueden disponerse en un orden aleatorio, en un orden alterno, o como un copolímero en bloque, *es decir,* que comprende una o más regiones comprendiendo cada una una primera unidad de repetición (por ejemplo, un primer bloque) y una o más regiones comprendiendo cada una una segunda unidad de repetición (por ejemplo, un segundo bloque), etc. Los copolímeros de bloque pueden tener dos (un copolímero dibloque), tres (un copolímero tribloque) o más números de bloques distintos.

Debería entenderse que, aunque los términos "primero", "segundo", etc. pueden usarse en el presente documento para describir diversos elementos, incluyendo componentes poliméricos, estos términos no deberían interpretarse como limitantes (por ejemplo, que describen un orden o número de elemento particular) sino más bien como simplemente descriptivos, *es decir,* marcadores que distinguen un elemento de otro, como se usan comúnmente dentro del campo de la legislación de patentes. Por lo tanto, por ejemplo, aunque una realización de la invención pueda describirse como que tiene un "primer" elemento presente y un "segundo" elemento presente, otras realizaciones de la invención pueden tener un "primer" elemento presente pero ningún "segundo" elemento presente, un "segundo" elemento presente pero ningún "primer" elemento presente, dos (o más) "primeros" elementos presentes y/o dos (o más) "segundos" elementos presentes, etc., y/o elementos adicionales tales como un "primer" elemento, un "segundo" elemento y un "tercer" elemento.

También se describen en el presente documento copolímeros que, en realizaciones particulares, describen dos o más polímeros (tales como los descritos en el presente documento) que se han asociado entre sí, habitualmente por enlace covalente de los dos o más polímeros entre sí. Por lo tanto, un copolímero puede comprender un primer polímero y un segundo polímero, que se han conjugado entre sí para formar un copolímero en bloque, en el que el primer polímero es un primer bloque del copolímero en bloque y el segundo polímero es un segundo bloque del copolímero en bloque. Por supuesto, los expertos en la materia entenderán que un copolímero de bloque puede contener, en algunos casos, múltiples bloques de polímero, y que un "copolímero de bloque", como se usa en el presente documento, no se limita solamente a copolímeros de bloque que tengan únicamente un solo primer bloque

y un solo segundo bloque. Por ejemplo, un copolímero de bloque puede comprender un primer bloque que comprende un primer polímero, un segundo bloque que comprende un segundo polímero y un tercer bloque que comprende un tercer polímero o el primer polímero, etc. En algunos casos, los copolímeros de bloque pueden contener cualquier cantidad de primeros bloques de un primer polímero y de segundos bloques de un segundo polímero (y, en ciertos casos, terceros bloques, cuartos bloques, *etc.).* Además, debería señalarse que también pueden formarse copolímeros de bloque, en algunos casos, a partir de otros copolímeros de bloque.

Por ejemplo, un primer copolímero de bloque puede conjugarse con otro polímero (que puede ser un homopolímero, un biopolímero, otro copolímero de bloque, etc.), para formar un nuevo copolímero de bloque que contenga múltiples tipos de bloques y/u otros restos (por ejemplo, restos no poliméricos).

En algunas realizaciones, el polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero de bloque) es anfífilo, *es decir,* que tiene una porción hidrófila y una porción hidrófoba, o una porción relativamente hidrófila y una porción relativamente hidrófoba. Un polímero hidrófilo es uno que generalmente atrae agua y un polímero hidrófobo es uno que generalmente repele el agua. Puede identificarse un polímero hidrófilo o hidrófobo, por ejemplo, por preparación de una muestra del polímero y medición de su ángulo de contacto con el agua (típicamente, el polímero tendrá un ángulo de contacto de menos de 60º, mientras que un polímero hidrófobo tendrá un ángulo de contacto de más de aproximadamente 60º). En algunos casos, la hidrofilicidad de dos o más polímeros puede medirse la de uno 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.

En un conjunto de realizaciones, un polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero de bloque) de la presente invención incluye un polímero biocompatible, *es decir,* el polímero que no induce típicamente una respuesta adversa cuando se inserta o inyecta en un sujeto vivo, por ejemplo, sin una inflamación significativa y/o rechazo agudo del polímero por el sistema inmune, por ejemplo, a través de una respuesta de linfocitos T. Se reconocerá, por supuesto, que la biocompatibilidad es un término relativo, y debe esperarse cierto grado de respuesta inmune incluso para polímeros que sean altamente compatibles con el tejido vivo. Sin embargo, como se usa en el presente documento, la "biocompatibilidad" se refiere al rechazo agudo de material por al menos una porción del sistema inmune, *es decir,* un material no biocompatible implantado en un sujeto provoca una respuesta inmune en el sujeto que es lo bastante grave de modo que el rechazo del material por el sistema inmune no puede controlarse adecuadamente y, con frecuencia, es de un grado tal que el material debe eliminarse del sujeto. Un simple ensayo para determinar la biocompatibilidad consiste en exponer un polímero a células *in vitro*; los polímeros biocompatibles son polímeros que típicamente no dan como resultado una muerte celular significativa a concentraciones moderadas, *por ejemplo,* a concentraciones de 50 microgramos/10^6 células. Por ejemplo, un polímero biocompatible puede causar una muerte celular de menos de aproximadamente el 20 % cuando se expone a células tales como fibroblastos o células epiteliales, incluso si se fagocita o capta de otro modo por dichas células. Los ejemplos no limitantes de polímeros biocompatibles que pueden ser útiles incluyen polidioxano (PDO), polihidroxialcanoato, polihidroxibutirato, poli(glicerol sebacato), poliglicolida, polilactida, PLGA, policaprolactona, o copolímeros o derivados que incluyen estos y/u otros polímeros.

En determinadas realizaciones, el polímero biocompatible es biodegradable, *es decir,* el polímero es capaz de degradarse química y/o biológicamente dentro de un entorno fisiológico, tal como dentro del cuerpo. Por ejemplo, el polímero puede ser uno que se hidrolice espontáneamente tras su exposición a agua (por ejemplo, dentro de un sujeto), el polímero puede degradarse tras su exposición a calor (por ejemplo, a temperaturas de aproximadamente 37 ºC). La degradación de un polímero puede producirse a velocidades variables, dependiendo del polímero o copolímero usado. Por ejemplo, la semivida del polímero (el tiempo en que se degrada el 50 % del polímero en monómeros y/u otros restos no poliméricos) puede ser del orden de días, semanas, meses o años dependiendo del polímero. Los polímeros pueden degradarse biológicamente, *por ejemplo,* por actividad enzimática o por la maquinaria celular, en algunos casos, por ejemplo, a través de la exposición a una lisozima (por ejemplo, que tenga un pH relativamente reducido). En algunos casos, los polímeros pueden degradarse en monómeros y/u otros restos no poliméricos que las células pueden volver a usar o desechar sin efectos tóxicos significativos sobre las células (por ejemplo, la polilactida puede hidrolizarse para formar ácido láctico, la poliglicolida puede hidrolizarse para formar ácido glicólico etc.). *etc.).*

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres, incluyendo copolímeros que comprenden unidades de ácido láctico y ácido glicólico, tales como poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) y poli(lactida-co-glicolida), en su conjunto denominados en el presente documento como "PLGA"; y homopolímeros que comprenden unidades de ácido glicólico, denominados en el presente documento como "PGA", y unidades de ácido láctico, tales como ácido poli-L-láctico, ácido poli-D-láctico, ácido poli-D,L-láctico, poli-L-lactida, poli-D-lactida y poli-D,L-lactida, en su conjunto denominados en el presente documento como "PLA". En algunas realizaciones, los poliésteres ejemplares incluyen, por ejemplo, polihidroxiácidos; polímeros y copolímeros PEGilados de lactida y glicolida (por ejemplo, PLA PEGilado, PGA PEGilado, PLGA PEGilado y derivados de los mismos. 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-lactida-co-L-lisina), poli(éster de serina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina), poli[ácido a-(4-aminobutil)-L-glicólico] y derivados de los mismos.

En algunas realizaciones, el polímero puede ser PLGA. El PLGA es un copolímero biodegradable y biocompatible de

ácido láctico y ácido glicólico y diversas formas de PLGA están caracterizadas por la proporción de ácido láctico:ácido glicólico. El ácido láctico puede ser ácido L-láctico, ácido D-láctico o ácido D,L-láctico. La velocidad de degradación del PLGA puede ajustarse alterando la proporción de ácido láctico-ácido glicólico. En algunas realizaciones, el PLGA a usar de acuerdo con la presente invención está caracterizado por una proporción de ácido láctico:ácido glicólico de aproximadamente 85:15, aproximadamente 75:25, aproximadamente 60:40, aproximadamente 50:50, aproximadamente 40:60, aproximadamente 25:75 o aproximadamente 15:85.

En realizaciones particulares, por optimización de la proporción de monómeros de ácido láctico con respecto a monómeros de ácido glicólico en el polímero de la nanopartícula (por ejemplo, el copolímero de bloque de PLGA o el copolímero de bloque de PLGA-PEG), pueden optimizarse parámetros de la nanopartícula tales como la captación de agua, la liberación de agente terapéutico (por ejemplo, la "liberación controlada") y la cinética de degradación del polímero.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser uno o más polímeros acrílicos. En determinadas 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 aminoalquil metacrilato, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), copolímero de alquilamida ácido metacrílico, poli(metacrilato de metilo), poli(ácido metacrílico poliacrilamida, copolímero de aminoalquil metacrilato, copolímeros de glicidil metacrilato, 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 cadenas de ácido nucleicos cargadas negativamente (por ejemplo, ADN, ARN o derivados de los mismos). Los polímeros que contienen amina tales como poli(lisina) (Zauner y col., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; y Kabanov y col., 1995, Bioconjugate Chem., *6:7),* poli(etilenimina) (PEI; Boussif y col, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297), y dendrímeros de poli(amidoamina) (Kukowska-Latallo y col., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang y col., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703; y Haensler y col., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372) están cargados positivamente a pH fisiológico, forman parejas de iones con ácidos nucleicos y median la transfección en una diversidad de líneas celulares.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres degradables que lleven cadenas laterales catiónicas (Putnam y col., 1999, Macromolecules, 32:3658; Barrera y col., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010; Urn y col., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633; y Zhou y col, 1990, Macromolecules, 23:3399). Los ejemplos de estos poliésteres incluyen poli(L-lactida-co-L-lisina) (Barrera y col, 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010), poli(éster de serina) (Zhou y col, 1990, Macromolecules, 23:3399), poli(éster de -hidroxi-L-prolina) (Putnam y col, 1999, Macromolecules, 32:3658; y Lim y col, 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633). Se demostró que el poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) condensaba el ADN plasmídico a través de interacciones electrostáticas y mediaba la transferencia de genes (Putnam y col, 1999, Macromolecules, 32:3658; y Lim el al, 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633). Estos nuevos polímeros son menos tóxicos que la poli(lisina) y PEI y se degradan en metabolitos no tóxicos.

Un polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero de bloque) que contiene unidades de repetición de poli(etilenglicol) también se denomina polímero "PEGilado". Dichos polímeros pueden controlar la inflamación y/o inmunogenicidad (es decir, la capacidad para provocar una respuesta inmune) y/o disminuir la velocidad de depuración del sistema circulatorio a través del sistema retículo-endotelial (RES), debido a la presencia de los grupos de poli(etilenglicol).

También puede usarse la PEGilación, en algunos casos, para disminuir la interacción de carga entre un polímero y un resto biológico, *por ejemplo,* creando una capa hidrófila en la superficie del polímero que pueda proteger al polímero de la interacción con el resto biológico. En algunos casos, la adición de unidades de repetición de poli(etilenglicol) puede aumentar la semivida en plasma del polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero de bloque), por ejemplo, disminuyendo la captación del polímero por el sistema fagocítico al tiempo que disminuye la eficacia de transfección/captación por las células. Los expertos en la materia conocerán procedimientos y técnicas para PEGilar un polímero, por ejemplo, usando 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 por apertura de anillo (ROMP), o similares.

Además, en ciertas realizaciones, se describen en el presente documento copolímeros que contienen poli(éster-éter), *por ejemplo,* polímeros que tienen unidades de repetición unidas por enlaces éster (por ejemplo, enlaces R-C(O)-O-R) y enlaces éter (por ejemplo, enlaces R-O-R). En algunas realizaciones de la invención, un polímero biodegradable tal como un polímero hidrolizable que contiene grupos ácido carboxílico, puede conjugarse con unidades de repetición de poli(etilenglicol) para formar un poli(éster-éter).

En una realización particular, En una realización particular, el peso molecular de los polímeros de las nanopartículas de la invención se optimiza para el tratamiento eficaz del cáncer, *por ejemplo,* cáncer de próstata. Por ejemplo, el peso molecular del polímero influye en la velocidad de degradación de la nanopartícula (particularmente cuando se ajusta el peso molecular de un polímero biodegradable), la solubilidad, la captación de agua y la cinética de

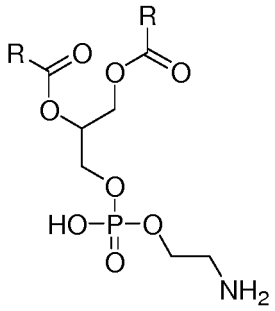
liberación de fármaco (por ejemplo, "liberación controlada"). Como ejemplo adicional, el peso molecular del polímero puede ajustarse de modo que la nanopartícula se biodegrade en el sujeto que se esté tratando dentro de un periodo de tiempo razonable (que varía de unas pocas horas a 1-2 semanas, 3-4 semanas, 5-6 semanas, 7-8 semanas, *etc.).* En realizaciones particulares de una nanopartícula que comprende un polímero de PEG y PLGA, el PEG tiene un peso molecular de 1.000-20.000, *por ejemplo,* 5,000-20.000, *por ejemplo,* 10.000-20.000, y el PLGA tiene un peso molecular de 5.000-100.000, *por ejemplo,* 20.000-70.000, *por ejemplo,* 20.000-50.000.

En determinadas realizaciones, los polímeros de las nanopartículas pueden conjugarse con un lípido. El polímero puede ser, por ejemplo, un PEG terminado en lípido. Como se describe a continuación, la porción lipídica del polímero puede usarse para autoensamblarse con otro polímero, facilitando la formación de una nanopartícula. Por ejemplo, un polímero hidrófilo podría conjugarse con un lípido que se autoensamblará con un polímero hidrófobo.

En algunas realizaciones, los lípidos son aceites. En general, cualquier aceite conocido en la técnica puede conjugarse con los polímeros usados en el presente documento. En algunas realizaciones, un aceite puede comprender uno o más grupos ácido graso o sales de los mismos. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede comprender hidrocarburos digestibles de cadena larga (por ejemplo, C_8-C_{50}), sustituidos o no sustituidos. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser un ácido graso C_{10}-C_{20} o sal del mismo. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser un ácido graso C_{15}-C_{20} o sal del mismo. En algunas realizaciones, un ácido graso puede estar insaturado. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede estar monoinsaturado. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede estar 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 ácido graso insaturado puede estar en la conformación *trans*.

En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser uno o más de 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 de ácido palmitoleico, oleico, vaccénico, linolénico, alfa-linolénico, gamma-linolénico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico o erúcico.

En una realización particular, el lípido es de Fórmula V:



(V)

y sales del mismo, en la que cada R es, independientemente, alquilo C_{1-30}. En una realización de Fórmula V, el lípido es 1,2 diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) y sales del mismo, *por ejemplo,* la sal sódica.

En una realización, los restos de direccionamiento de molécula pequeña están unidos, *por ejemplo,* unidos covalentemente, al componente lipídico de la nanopartícula. Por lo tanto, también se describe en el presente documento una nanopartícula recubierta que comprende un agente terapéutico, una matriz polimérica, un lípido y un ligando de direccionamiento de PSMA de bajo peso molecular, en la que el ligando de direccionamiento está unido, *por ejemplo,* unido covalentemente, al componente lipídico de la nanopartícula. En una realización, el componente lípido que está unido al resto de direccionamiento de bajo peso molecular es de fórmula V. En otra realización, se describe en el presente documento una nanopartícula recubierta que comprende un agente terapéutico, una matriz polimérica, CSPE, y un ligando de direccionamiento de PSMA de bajo peso molecular, en la que el ligando está unido, *por ejemplo,* unido covalentemente, a DSPE. Por ejemplo, la nanopartícula describe en el presente documento comprende una matriz polimérica que comprende PLGA-DSPE-PEG-Ligando. Estas nanopartículas pueden usarse para el tratamiento de las enfermedades y trastornos analizados en el presente documento.

Las propiedades de estos y otros polímeros y procedimientos para prepararlos son bien conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 6.123.727, 5.804.178; 5.770.417; 5.736.372; 5.716.404; 6.095.148; 5.837.752; 5.902.599; 5.696.175; 5.514.378; 5.512.600; 5.399.665; 5.019.379; 5.010.167; 4.806.621; 4.638.045; y 4.946.929; Wang y col, 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480; Lim y col., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:2460; Langer, 2000, Ace. Chem. Res., 33:94; Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7; y Uhrich y col., 1999, Chem. Rev., 99:3181). Más en general, se describen una diversidad de procedimientos para sintetizar polímeros adecuados en Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. de Goethals, Pergamon Press, 1980; Principles of Polymerization de Odian, John Wiley & Sons, Cuarta Edición, 2004;

Contemporary Polymer Chemistry de Allcock y col., Prentice-Hall, 1981; Deming y col, 1997, Nature, 390:386; y en las Patentes de Estados Unidos 6.506.577, 6.632.922, 6.686.446 y 6.818.732.

Aún en otro conjunto de realizaciones, una partícula (que comprende, por ejemplo, un copolímero, *por ejemplo,* un copolímero de bloque) de la presente invención incluye un resto terapéutico, es decir, un resto que tiene un efecto terapéutico o profiláctico cuando se administra a un sujeto. Los ejemplos de restos terapéuticos a usar con las nanopartículas descritas en el presente documento incluyen agentes antineoplásicos o citostáticos u otros agentes con propiedades anticancerosas, o una combinación de los mismos.

En algunos casos, la partícula es una nanopartícula, *es decir,* la partícula tiene una dimensión característica de menos de aproximadamente 1 micrómetro, donde la dimensión característica de una partícula es el diámetro de una esfera perfecta que tiene el mismo volumen que la partícula. Por ejemplo, la partícula puede tener una dimensión característica de la partícula que puede ser inferior a aproximadamente 300 nm, inferior a aproximadamente 200 nm, inferior a aproximadamente 150 nm, inferior a aproximadamente 100 nm, inferior a aproximadamente 50 nm, inferior a aproximadamente 30 nm, inferior a aproximadamente 10 nm, inferior a aproximadamente 3 nm o inferior a aproximadamente 1 nm en algunos casos. En realizaciones particulares, la nanopartícula descrita en el presente documento tiene un diámetro de 80 nm-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 pero no presente en la superficie (o viceversa) 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, tal como un resto de direccionamiento (es decir, un ligando PSMA 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 mayor concentración 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,* existe una cantidad detectable del compuesto presente en el interior de la partícula.

En algunos casos, En algunos casos, el interior de la partícula es más hidrófobo que la superficie de la partícula. Por ejemplo, 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 se asocia fácilmente con el centro relativamente hidrófobo de la partícula. El fármaco u otra carga útil puede estar contenido por lo tanto dentro del interior de la partícula, que de este modo puede protegerlo del entorno externo que rodea a la partícula (o viceversa). Por ejemplo, un fármaco u otra carga útil contenida dentro de una partícula administrada a un sujeto estará protegido del cuerpo de un sujeto, y el cuerpo también estará aislado del fármaco. Un resto de direccionamiento presente en la superficie de la partícula puede permitir que la partícula se localice en un sitio de direccionamiento particular, por ejemplo, un tumor, un sitio patológico, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. Como tal, la nanopartícula es "específica de diana". El fármaco u otra carga útil puede entonces liberarse, en algunos casos, de la partícula y permitirse que interaccione localmente con el sitio de direccionamiento particular.

También se describen en el presente documento partículas poliméricas que tienen más de un polímero o macromolécula presente, y bibliotecas que implican dichos polímeros o macromoléculas. Por ejemplo, en un conjunto de realizaciones, las partículas pueden contener más de un polímero distinguible (por ejemplo, copolímeros, por ejemplo, copolímeros de bloque), y las proporciones de los dos (o más) polímeros pueden controlarse independientemente, lo que permite el control de propiedades de la partícula. Por ejemplo, un primer polímero puede ser un conjugado polimérico que comprende un resto de direccionamiento y una porción biocompatible, y un segundo polímero puede comprender una porción biocompatible pero no contener el resto de direccionamiento, 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 puede usarse por lo tanto para controlar diversas propiedades físicas, biológicas o químicas de la partícula, por ejemplo, el tamaño de la partícula (por ejemplo, variando los pesos moleculares de uno o ambos polímeros), la carga superficial (por ejemplo, controlando las proporciones de los polímeros si los polímeros tienen cargas o grupos terminales diferentes), la hidrofilicidad superficial (por ejemplo, si los polímeros tienen pesos moleculares y hidrofilicidades diferentes), la densidad superficial del resto de direccionamiento (por ejemplo, controlando las proporciones de los dos o más polímeros), etc. *etc.*

Como ejemplo específico, una partícula puede comprender un primer polímero que comprende un poli(etilenglicol) y un resto de direccionamiento conjugado con el poli(etilenglicol), y un segundo polímero que comprende el poli(etilenglicol) pero no el resto de direccionamiento, o que comprende tanto el poli(etilenglicol) como el resto de direccionamiento, donde el poli(etilenglicol) del segundo polímero tiene una longitud diferente (o número de unidades de repetición) que el poli(etilenglicol) del primer polímero. Como otro ejemplo, una partícula puede comprender un primer polímero que comprende una primera porción biocompatible y un resto de direccionamiento, y un segundo polímero que comprende una segunda porción biocompatible diferente de la primera porción biocompatible (por ejemplo, que tiene una composición diferente, un número de unidades de repetición sustancialmente diferente, etc.) y el resto de direccionamiento. Como otro ejemplo más, un primer polímero puede comprender una porción biocompatible y un primer resto de direccionamiento, y un segundo polímero puede comprender una porción biocompatible y un segundo resto de direccionamiento diferente del primer resto de direccionamiento.

En otras realizaciones, las nanopartículas descritas en el presente documento son liposomas, combinaciones poliméricas de liposomas, dendrímeros y partículas de albúmina que están funcionalizadas con un ligando de PSMA de bajo peso molecular. Estas nanopartículas pueden usarse para administrar un agente terapéutico a un sujeto, tal como un agente anticanceroso como mitoxantrona o docetaxel.

Tal como se usa en el presente documento, el término "liposoma" se refiere a una vesícula generalmente esférica o cápside compuesta generalmente por moléculas anfipáticas (por ejemplo, que tienen tanto una porción hidrófoba (no polar) como una porción hidrófila (polar)). Típicamente, el liposoma puede producirse como una bicapa cerrada individual (unilaminar) o una bicapa cerrada multicompartimento (multilaminar). El liposoma puede estar formado por lípidos naturales, lípidos sintéticos o una combinación de los mismos. En una realización preferida, el liposoma comprende uno o más fosfolípidos. Los lípidos conocidos en la técnica para formar liposomas incluyen, pero sin limitación, lecitina (de soja o huevo; fosfatidilcolina), dipalmitoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, dicetilfosfato, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina hidrogenada, ácido fosfatídico, colesterol, fosfatidilinositol, un glicolípido, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, un fosfolípido derivatizado con maleimidilo (por ejemplo, N-[4(p-maleimidofenil)butiril]fosfatidiletanolamina), dioleilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilglicerol, ácido dimiristoilfosfatídico y una combinación de los mismos. Se han usado liposomas para administrar agentes terapéuticos a células.

Las nanopartículas descritas en el presente documento también pueden ser "liposomas recubiertos", que comprenden lípidos en los que el grupo de cabeza está modificado con PEG. Esto da como resultado una semivida en circulación prolongada en el sujeto.

Los polímeros dendríticos (conocidos de otro modo como "dendrímeros") son polímeros uniformes a los que se hace referencia de diversas formas en la bibliografía como dendrímeros hiperramificados, arboroles, polímeros fractales y dendrímeros de explosión estelar, que tienen un núcleo central, una estructura dendrítica interior (hiperramificada) y una superficie exterior con grupos terminales. Estos polímeros difieren de los polímeros lineales clásicos tanto en la forma como en la función. La química de dendrímeros construye macromoléculas con un estrecho control del tamaño, la topología morfológica, la flexibilidad y los grupos de superficie (por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular). En lo que se conoce como síntesis divergente, estas macromoléculas comienzan por hacer reaccionar un núcleo iniciador en secuencias de reacción repetitivas de alto rendimiento para construir ramificaciones simétricas que se disponen radialmente desde el núcleo con grupos de superficie bien definidos. Como alternativa, en lo que se conoce como síntesis convergente, se construyen cuñas dendríticas desde la periferia hacia dentro hacia un punto focal, y después se acoplan varias cuñas dendríticas en los puntos focales con un núcleo polifuncional. Las síntesis dendríticas forman capas concéntricas, conocidas como generaciones, duplicando cada generación la masa molecular y el número de grupos reactivos en los extremos de ramificaciones, de modo que el dendrímero de generación final es una macromolécula monodispersa uniforme altamente pura que se solubiliza fácilmente a lo largo de una variedad de condiciones. Por las razones analizadas a continuación, los pesos moleculares de dendrímeros varían de 300 a 700.000 daltons, y el número de grupos de superficie (por ejemplo, sitios reactivos para acoplamiento) varía significativamente.

Las "partículas de albúmina" (también denominadas como "microesferas de albúmina") se han descrito como transportadores de agentes farmacológicos o de diagnóstico (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos números 5.439.686; 5.498.421; 5.560.933; 5.665.382; 6.096.331; 6.506.405; 6.537.579; 6.749.868; y 6.753.006). Se han preparado microesferas de albúmina por desnaturalización térmica o entrecruzamiento químico. Las microesferas desnaturalizadas térmicamente se producen a partir de una mezcla emulsionada (por ejemplo, albúmina, el agente a incorporar y un aceite adecuado) a temperaturas de entre 100 ºC y 150 ºC. Después, las microesferas se lavan con un disolvente adecuado y se almacenan. Leucuta y col. (International Journal of Pharmaceutics 41: 213-217 (1988)) describen el procedimiento de preparación de microesferas desnaturalizadas térmicamente.

Restos de direccionamiento de molécula pequeña

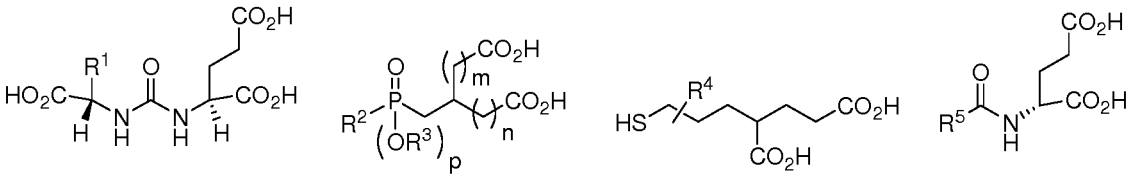
Aún en otro conjunto de realizaciones, un conjugado polimérico como se describe en el presente documento incluye un resto de direccionamiento, *es decir,* un resto capaz de unirse a o asociarse de otro modo con una entidad biológica, por ejemplo, un componente de membrana, un receptor de superficie celular, un antígeno de membrana específico de próstata o similares. El resto de direccionamiento descrito en el presente documento es un ligando de PSMA de bajo peso molecular. El término "unir" o "unión", como se usa en el presente documento, se refiere a la interacción entre una pareja de moléculas correspondiente o porciones de las mismas, que presentan una capacidad de afinidad o unión mutua, típicamente debido a la unión o interacción específica o inespecífica incluyendo, pero sin limitación, interacciones bioquímicas, fisiológicas y/o químicas. La "unión biológica" define un tipo de interacción que se produce entre parejas de moléculas incluyendo proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas, carbohidratos, hormonas o similares. La expresión "compañero de unión" se refiere a una molécula que puede experimentar la unión con una molécula particular. La "unión específica" se refiere a moléculas, tales como polinucleótidos, que son capaces de unirse a o reconocer un compañero de unión (o un número limitado de compañeros de unión) en un grado sustancialmente superior al de otras entidades biológicas similares. En un conjunto de realizaciones, el resto de direccionamiento tiene una afinidad (según se mide a través de una constante de disociación) de menos de aproximadamente 1 micromolar, al menos aproximadamente 10 micromolar, o al menos aproximadamente 100

micromolar.

En realizaciones preferidas, el resto de direccionamiento de la invención es una molécula pequeña. En determinadas realizaciones, la expresión "molécula pequeña" se refiere a compuestos orgánicos, ya sea naturales o creados artificialmente (por ejemplo, a través de síntesis química) que tienen un peso molecular relativamente bajo y que no son proteínas, polipéptidos ni ácidos nucleicos. Las moléculas pequeñas normalmente tienen múltiples enlaces carbono-carbono. En determinadas realizaciones, En ciertas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen un tamaño menor de aproximadamente 2000 g/mol. En algunas realizaciones, En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen un tamaño menor de aproximadamente 1500 g/mol o menor de aproximadamente 1000 g/mol. En algunas realizaciones, En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen un tamaño menor de aproximadamente 800 g/mol o menor de aproximadamente 500 g/mol.

En realizaciones particularmente preferidas, el resto de direccionamiento molecular pequeño se dirige a tumores de cáncer de próstata y, en particular, el resto de direccionamiento molecular pequeño es un inhibidor de peptidasa de PSMA. Estos restos también se denominan en el presente documento "ligandos de PSMA de bajo peso molecular". Cuando se compara con la expresión en tejidos normales, la expresión de antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) está sobreexpresada al menos 10 veces en próstata maligna con respecto al tejido normal, y el nivel de expresión de PSMA está más regulado positivamente a medida que la enfermedad avanza hacia fases metastásicas (Silver y col. 1997, Clin. Cancer Res., 3:81).

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



I **II** **III** **IV** ,

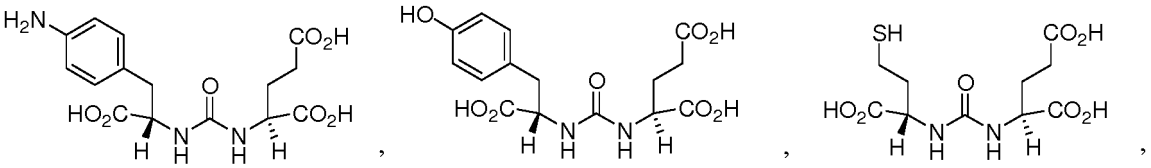
y enantiómeros, estereoisómeros rotámeros, tautómeros, diastereómeros, o racemato del mismo; en las que

cada uno de m y n es, independientemente, 0, 1, 2 o 3;
p es 0 o 1;
R^1, R^2, R^4 y R^5 se seleccionan cada uno, independientemente, del grupo que consiste en alquilo sustituido o sin sustituir, (por ejemplo, alquilo C_{1-10}, alquilo C_{1-6}, o alquilo C_{1-4}), arilo sustituido o sin sustituir (por ejemplo, fenilo o piridinilo), y cualquier combinación de los mismos; y
R^3 es H o alquilo C_{1-6} (por ejemplo, CH_3).

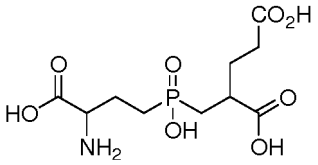
Para los compuestos de Fórmulas I, II, III e IV, R^1, R^2, R^4 y R^5 comprenden puntos de unión a la nanopartícula, *por ejemplo,* un polímero que comprende la nanopartícula, *por ejemplo,* PEG. El punto de unión se forma por un enlace covalente. Por ejemplo, si R^1, R^2, R^4 o R^5 se definen como anilina o un grupo alquil C_{1-6}-NH_2, cualquier hidrógeno (por ejemplo, un hidrógeno amino) de estos grupos funcionales se podría eliminar de modo que el ligando PSMA de bajo peso molecular se una covalentemente a la matriz polimérica (por ejemplo, el bloque PEG de la matriz polimérica) de la nanopartícula. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "enlace covalente" se refiere a un enlace entre dos átomos que se forma 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 son cada uno, independientemente, alquilo C_{1-6} o fenilo, o cualquier combinación de alquilo C_{1-6} o fenilo, que están sustituidos independientemente una o más veces con OH, SH, NH_2, o CO_2H, y en la que el grupo alquilo puede interrumpirse por N(H), S u O. En otra realización, R^1, R^2, R^4 y R^5 son cada uno, independientemente, 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, u O-$(CH_2)_2$-Ph, en las que 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 ejemplo, -N(H)-PEG, -O-PEG, o -S-PEG).

En una realización de la presente invención, el ligando de PSMA de bajo peso molecular se selecciona del grupo que consiste en

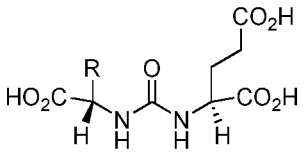
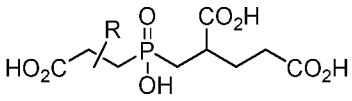
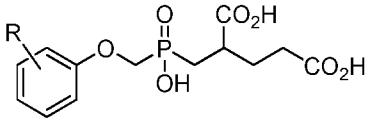


y

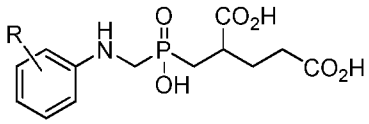


y enantiómeros, estereoisómeros rotámeros, tautómeros, diastereómeros, o racematos de los mismos, y en los que los grupos NH_2, OH o SH sirven como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por ejemplo, -N(H)-PEG, -O-PEG, o -S-PEG).

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

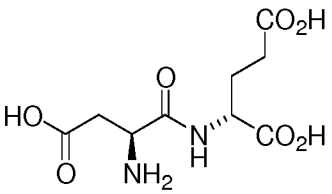
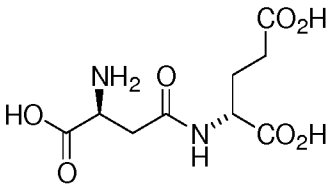
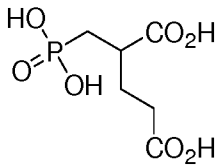

,

,


y

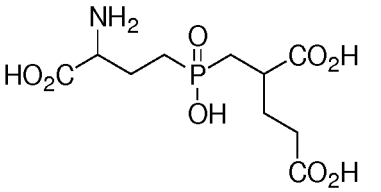

,

y enantiómeros, estereoisómeros rotámeros, tautómeros, diastereómeros, o racemato del mismo, en la que cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en NH_2, SH, OH, CO_2H, alquilo C_{1-6} 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 en el que R sirve como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por ejemplo, -N(H)-PEG, -S-PEG, -O-PEG, o CO_2-PEG).

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

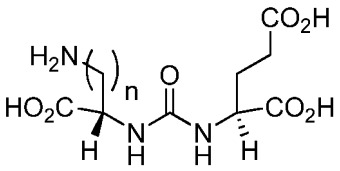

,

,

,

y


,

y enantiómeros, estereoisómeros rotámeros, tautómeros, diastereómeros, o racemato del mismo, en el que los grupos NH_2 o CO_2H sirven como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por ejemplo, -N(H)-PEG, o CO_2-PEG). Estos compuestos pueden estar sustituidos adicionales con NH_2, SH, OH, CO_2H, alquilo C_{1-6} que está sustituido con NH_2, SH, OH o CO_2H, o fenilo que está sustituido con NH_2, SH, OH o CO_2H, en los que estos grupos funcionales también pueden servir como el punto de unión covalente a la nanopartícula.

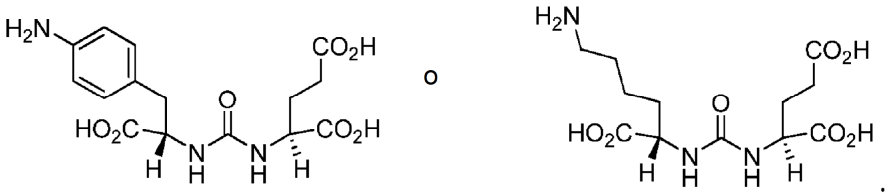
En otra realización, el ligando de PSMA de bajo peso molecular es



y enantiómeros, estereoisómeros rotámeros, tautómeros, diastereómeros, o racemato del mismo, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Para este ligando, el grupo NH_2 sirve como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por

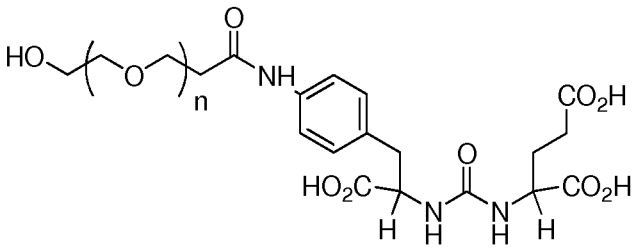
ejemplo, -N(H)-PEG).

En una realización de la presente invención, el ligando de PSMA de bajo peso molecular es

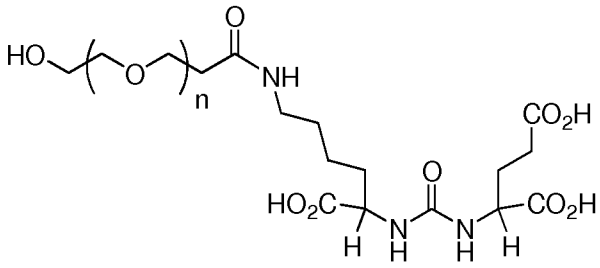


y enantiómeros, estereoisómeros rotámeros, tautómeros, diastereómeros, o racemato del mismo. Particularmente, el compuesto de butil-amina tiene la ventaja de la facilidad de síntesis, especialmente debido a su carencia de un anillo de benceno. Además, sin desear quedar ligado a teoría, el compuesto de butil-amina se degradará probablemente en moléculas de origen natural (es decir, lisina y ácido glutámico), minimizando de este modo las preocupaciones por la toxicidad.

Para estos ligandos, los grupos NH_2 sirven como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por ejemplo, -N(H)-PEG). Por consiguiente, la presente invención proporciona los ligandos de PSMA de bajo peso molecular mostrados anteriormente, en los que los sustituyentes amina de los compuestos se unen covalentemente a poli(etilenglicol), *por ejemplo,* los compuestos:

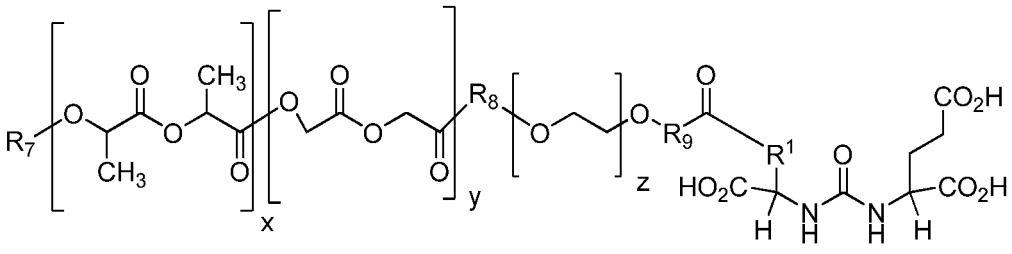


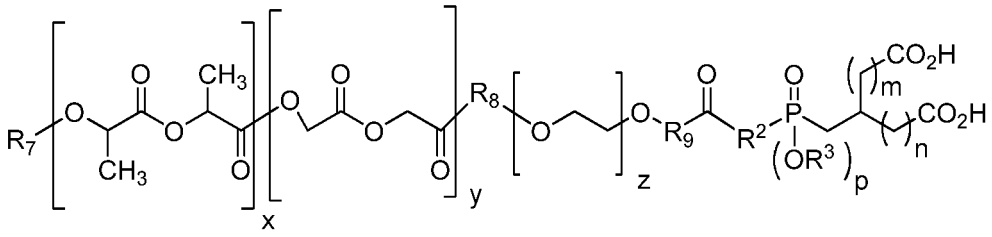
o

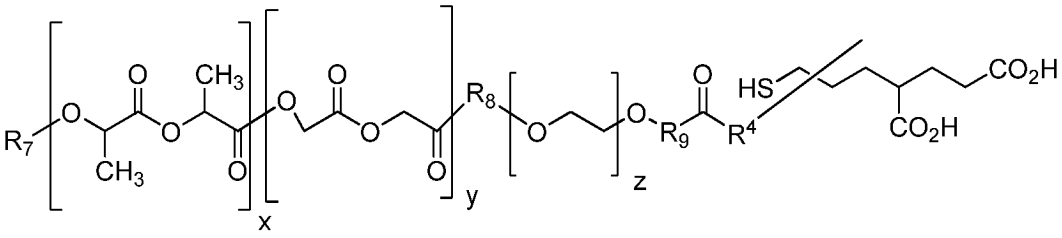


en los que n es de 20 a 1720.

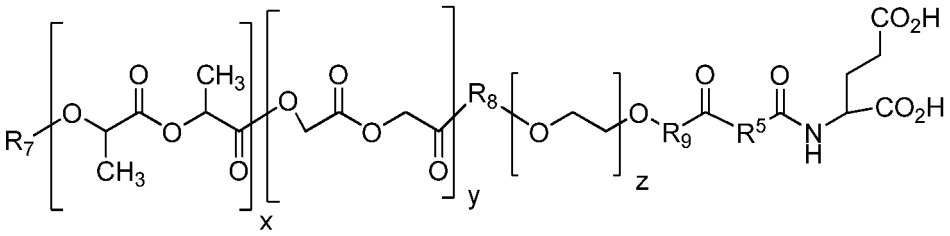
Los compuestos de la invención también incluyen los ligandos de PSMA de bajo peso molecular de Fórmulas I, II, III o IV, en los que los ligandos de PSMA de bajo peso molecular están unidos a un polímero. Dichos conjugados incluyen:





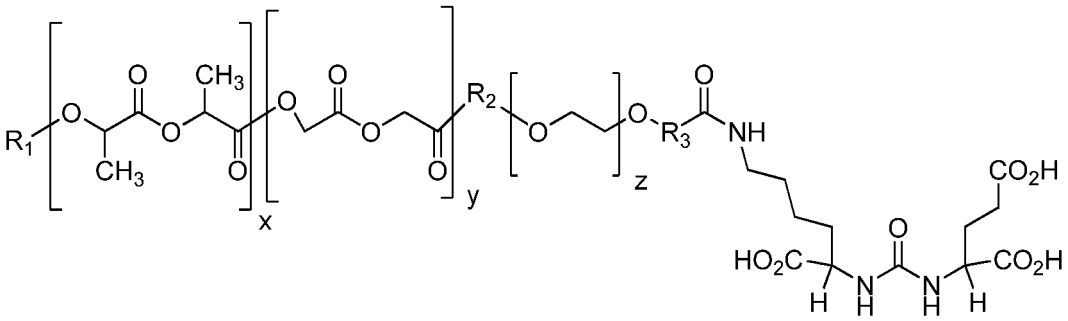


y

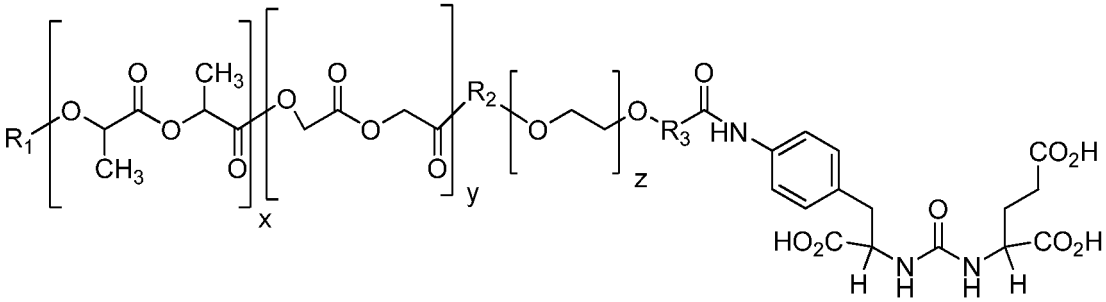


en la que R_1, R_2, R_3, R_4 y R_5 tienen las definiciones descritas para las Fórmulas I, II, III o IV, en las que R_7 y R_9 son grupos alquilo, R_8 es un enlace éster o amida, X = fracción molar de 0 a 1, Y = fracción molar de 0 a 0,5, X+Y = de 20 a 1720, y Z = de 25 a 455.

Los compuestos de la invención también incluyen:



y



en las que R_1 y R_3 son grupos alquilo, R_2 es un enlace éster o amida, X = fracción molar de 0 a 1, Y = fracción molar de 0 a 0,5, X+Y = de 20 a 1720, y Z = de 25 a 455.

Por consiguiente, se describe en el presente documento una nanopartícula recubierta específica de diana que comprende un agente terapéutico y cualquiera de los conjugados de polímero/ligando de PSMA de bajo peso

molecular descritos anteriormente.

Los procedimientos para detectar moléculas de bajo peso molecular capaces de unirse específicamente a las proteínas de superficie celular PSMA o GCPII se conocen bien en la técnica. En un ejemplo no limitante, las moléculas candidatas de bajo peso molecular se pueden marcar radioactivamente (véase Foss y col., Clin Cancer Res, 2005, 11, 4022-4028) o por fluorescencia (Humblet y col., Molecular Imaging, 2005, 4, 448-462). Una línea celular de laboratorio estándar, *por ejemplo,* células HeLa, que normalmente no expresan PMSA (células de control), puede transfectarse con un transgén que codifica la proteína PMSA de manera que PMSA se exprese en la superficie celular de estas células transfectadas. La capacidad de las moléculas marcadas de bajo peso molecular de unirse a las células que expresan ectópicamente PMSA pero no a las células de control puede determinarse *in vitro* usando medios estándar reconocidos en la técnica tales como el recuento de centelleo o el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las moléculas de bajo peso molecular que se unen a las células que expresan PMSA pero no a las células de control se consideran específicas para PMSA. La unión y absorción de nanopartículas puede evaluarse con ensayos usando células LNCap, que expresan PSMA (véase, por ejemplo, el Ejemplo 4 en el presente documento).

Un conjugado polimérico de la presente invención puede formarse usando cualquier técnica de conjugación adecuada. Por ejemplo, dos compuestos tales como un resto de direccionamiento y un polímero biocompatible, un polímero biocompatible y un poli(etilenglicol), *etc.,* pueden conjugarse juntos usando técnicas tales como química de EDC-NFIS (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y *N*-hidroxisuccinimida) o una reacción que implique una maleimida o un ácido carboxílico, que pueda conjugarse con un extremo de un tiol, una amina o un poliéter funcionalizado de forma similar. La conjugación de dichos polímeros, por ejemplo, la conjugación de un poli(éster) y un poli(éter) para formar un poli(éster-éter), puede realizarse en un disolvente orgánico, tal como, pero sin limitación, diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida, tetrahidrofurano, acetona, o similares. Las condiciones de reacción específicas pueden determinarse por los expertos en la materia usando no más que una experimentación de rutina.

En otro conjunto de realizaciones, puede realizarse una reacción de conjugación por reacción de un polímero que comprende un grupo funcional ácido carboxílico (por ejemplo, un compuesto de poli(éster-éter)) con un polímero u otro resto (tal como un resto de direccionamiento) que comprende una amina. Por ejemplo, un resto de direccionamiento, tal como un ligando de PSMA de bajo peso molecular, puede hacerse reaccionar con una amina para formar un resto que contiene amina, que después puede conjugarse con el ácido carboxílico del polímero. Dicha reacción puede suceder como una reacción de una sola etapa, *es decir,* la conjugación se realiza sin usar intermedios tales como N-hidroxisuccinimida o una maleimida. La reacción de conjugación entre el resto que contiene amina y el polímero terminado en ácido carboxílico (tal como un compuesto de poli(éster-éter)) puede conseguirse, en un conjunto de realizaciones, por adición del resto que contiene amina solubilizado en un disolvente orgánico tal como, (pero sin limitación) 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 dentro de un disolvente orgánico tal como, pero sin limitación, diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida, tetrahidrofurano, o acetona. La reacción entre el resto que contiene amina y el polímero terminado en ácido carboxílico puede suceder espontáneamente, en algunos casos. Los reactivos no conjugados pueden eliminarse por lavado después de dichas reacciones, y el polímero puede precipitarse en disolventes tales como, por ejemplo, éter etílico, hexano, metanol o etanol.

Como ejemplo específico, puede prepararse un ligando de PSMA de bajo peso molecular como resto de direccionamiento en una partícula como se indica a continuación. Puede conjugarse poli(lactida-coglicolida) modificada con ácido carboxílico (PLGA-COOH) con un poli(etilenglicol)heterobifuncional modificado con amina (Nh_2-PEG-COOH) para formar un copolímero de PLGA-PEG-COOH. Mediante el uso de un ligando de PSMA de bajo peso molecular modificado con amina (NH_2-Lig), puede formarse un polímero tribloque de PLGA-PEG-Lig por conjugación del extremo ácido carboxílico del PEG con el grupo funcional amina en el ligando. El polímero multibloque puede usarse después, por ejemplo, como se analiza a continuación, *por ejemplo,* para las aplicaciones terapéuticas.

También se describen en el presente documento partículas que incluyen conjugados poliméricos tales como los descritos anteriormente. Las partículas pueden tener una configuración sustancialmente esférica (es decir, las partículas en general parecen ser esféricas) o no esférica. Por ejemplo, las partículas, tras hincharse o encogerse, pueden adoptar una configuración no esférica. En algunos casos, las partículas pueden incluir mezclas poliméricas. Por ejemplo, puede formarse una mezcla polimérica que incluya un primer polímero que comprende un resto de direccionamiento (es decir, un ligando de PSMA de bajo peso molecular) y un polímero biocompatible, y un segundo polímero que comprende un polímero biocompatible pero que no comprende el resto de direccionamiento. Por control de la proporción del primer y segundo polímeros en el polímero final, la concentración y localización del resto de direccionamiento en el polímero final pueden controlarse fácilmente en cualquier grado adecuado.

Tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo incluye grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, *etc.),* grupos alquilo de cadena ramificada (isopropilo, terc-butilo, isobutilo, *etc.),* grupos cicloalquilo (alicíclicos)

(ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo, y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. Además, la expresión "alquilo C_x-C_y", en la que x es 1-5 e y es 2-10, indica un grupo alquilo particular (de cadena lineal o ramificada) de un intervalo particular de carbonos. Por ejemplo, la expresión quilo C_1-C_4 incluye, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, terc-butilo e isobutilo.

El término alquilo incluye además grupos alquilo que pueden incluir además átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo sustituyendo a uno o más carbonos de la cadena principal de hidrocarburo. En una realización, un alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada tiene 10 o menos átomos de carbono en su cadena principal (por ejemplo, C_1-C_{10} para cadena lineal, C_3-C_{10} para cadena ramificada), y más preferiblemente 6 o menos carbonos. Del mismo modo, los cicloalquilos preferidos tienen 4-7 átomos de carbono en su estructura de anillo y más preferentemente tienen 5 o 6 carbonos en la estructura de anillo.

Además, alquilo (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, etc.) incluye tanto "alquilo no sustituido" como "alquilo sustituido", refiriéndose este último a restos alquilo que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos de la cadena principal de hidrocarburo, lo que permite que la molécula realice su función deseada. El término "sustituido" pretende describir restos que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más átomos, por ejemplo, C, O o N, de una molécula. Dichos sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, alquenilo, alquinilo, halógeno, hidroxilo, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, alcoxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, carboxilato, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, amino (incluyendo alquil amino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoílo y ureído), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfinilo, sulfonato, sulfamoílo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterocíclico, alquilarilo, morfolino, fenol, bencilo, fenilo, piperizina, ciclopentano, ciclohexano, piridina, 5H-tetrazol, triazol, piperidina o un resto aromático o heteroaromático.

Los ejemplos adicionales de sustituyentes que no pretenden ser limitantes, incluyen restos seleccionadas de alquilo lineal o ramificado (preferentemente C_1-C_5), cicloalquilo (preferentemente C_3-C_8), alcoxi (preferentemente C_1-C_6), tioalquilo (preferentemente C_1-C_6), alquenilo (preferentemente C_2-C_6), alquinilo (preferentemente C_2-C_6), heterocíclico, carbocíclico, arilo (por ejemplo, fenilo), ariloxi (por ejemplo, fenoxi), aralquilo (por ejemplo, bencilo), ariloxialquilo (por ejemplo, feniloxialquilo), arilacetamidoílo, alquilarilo, heteroaralquilo, alquilcarbonilo y arilcarbonilo u otro grupo acilo de este tipo, heteroarilcarbonilo o grupo heteroarilo, grupo $(CR'R'')_{0-3}NR'R''$ (por ejemplo, $-NH_2$), $(CR'R'')_{0-3}CN$ (por ejemplo, -CN), $-NO_2$, halógeno (por ejemplo, -F, -Cl, -Br, o -I), $(CR'R'')_{0-3}C(halógeno)_3$ (por ejemplo, $-CF_3$), $(CR'R'')_{0-3}CH(halógeno)_2$, $(CR'R'')_{0-3}CH_2(halógeno)$, $(CR'R'')_{0-3}CONR'R''$, $(CR'R'')_{0-3}(CNH)NR'R''$, $(CR'R'')_{0-3}S(O)_{1-2}NR'R''$, $(CR'R'')_{0-3}CHO$, $(CR'R'')_{0-3}O(CR'R'')_{0-3}H$, $(CR'R')_{0-3}S(O)_{0-3}R'$ (por ejemplo, $-SO_3H$, $-OSO_3H$), $(CR'R'')_{0-3}O(CR'R'')_{0-3}H$ (por ejemplo, $-CH_2OCH_3$ y $-OCH_3$), $(CR'R'')_{0-3}S(CR'R'')_{0-3}H$ (por ejemplo, -SH y $-SCH_3$), $(CR'R'')_{0-3}OH$ (por ejemplo, -OH), $(CR'R'')_{0-3}COR'$, $(CR'R'')_{0-3}$(fenilo sustituido o sin sustituir), $(CR'R'')_{0-3}$(cicloalquilo C_3-C_8), $(CR'R'')_{0-3}CO_2R'$ (por ejemplo, $-CO_2H$), o $(CR'R'')_{0-3}OR'$, o la cadena lateral de cualquier aminoácido de origen natural; en las que R' y R" son cada uno independientemente hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_5, alquenilo C_2-C_5, alquinilo C_2-C_5 o arilo. Dichos sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, alcoxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, carboxilato alquilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluyendo alquil amino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoílo y ureído), amidino, imino, oxima, tiol, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, sulfonato, sulfamoílo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, o un resto aromático o heteroaromático. En determinadas realizaciones, un resto carbonilo (C=O) puede derivatizarse además con un resto oxima, *por ejemplo,* un resto aldehído puede derivatizarse como su análogo de oxima (-C=N-OH). Los expertos en la materia entenderán que los restos sustituidos en la cadena de hidrocarburo pueden de por sí sustituirse, si es apropiado. Los cicloalquilos pueden sustituirse adicionalmente, *por ejemplo,* con los sustituyentes descritos anteriormente. Un resto "aralquilo" es un alquilo sustituido con un arilo (por ejemplo, fenilmetilo (es decir, bencilo)).

El término "arilo" incluye grupos, incluyendo grupos aromáticos de un solo anillo de 5 y 6 miembros, que pueden incluir de cero a cuatro heteroátomos, por ejemplo, fenilo, pirrol, furano, tiofeno, tiazol, isotiaozol, imidazol, triazol, tetrazol, pirazol, oxazol, isoxazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina y similares. Además, el término "arilo" incluye grupos arilo multicíclicos, *por ejemplo,* tricíclicos, bicíclicos, *por ejemplo,* naftaleno, benzoxazol, benzodioxazol, benzotiazol, benzoimidazol, benzotiofeno, metilendioxifenilo, quinolina, isoquinolina, antrilo, fenantrilo, naftridina, indol, benzofurano, purina, benzofurano, desazapurina o indolizina. Aquellos grupos arilo que tienen heteroátomos en la estructura de anillo también pueden denominarse "heterociclos de arilo", "heterociclos", "heteroarilos" o "heteroaromáticos". El anillo aromático puede sustituirse en una o más posiciones del anillo con sustituyentes tales como los descritos anteriormente, como por ejemplo alquilo, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, alcoxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, carboxilato arilcarbonilo, alquilaminocarbonilo, aralquilaminocarbonilo, alquenilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, aralquilcarbonilo, alcoxicarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluyendo alquil amino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoílo y ureído), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfinilo, sulfonato, sulfamoílo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo, o un resto aromático o heteroaromático. Los grupos arilo también pueden fusionarse o formar un puente con anillos alicíclicos o heterocíclicos que no sean aromáticos para formar un policiclo (por ejemplo, tetralina).

Adicionalmente, la expresión "cualquier combinación de los mismos" implica que pueden combinarse cualquier cantidad de los grupos funcionales y moléculas enumeradas para crear una arquitectura molecular de mayor tamaño. Por ejemplo, los términos "alquilo" y "arilo" pueden combinarse para formar $-CH_2Ph$, o un grupo $-PhCH_3$ (touilo). Igualmente, la expresión "cualquier combinación de alquilo C_{1-6} o fenilo, que están sustituidos independientemente una o más veces con OH, SH, NH_2, o CO_2H" representa una estructura de $-(CH_2)_3$-analina, o un sustituyente $-Ph-(CH_2)_3-NH_2$. Se debe entender que al combinar grupos funcionales y moléculas para crear una arquitectura molecular más grande, se pueden eliminar o añadir hidrógenos, según se requiera, para satisfacer la valencia de cada átomo.

Preparación de nanopartículas recubiertas específicas de diana

También se describen en el presente documento sistemas y procedimientos de producción de dichas nanopartículas recubiertas específicas de diana. En algunas realizaciones, una solución que contiene un polímero se pone en contacto con un líquido, tal como un líquido inmiscible, para formar nanopartículas que contienen el conjugado polimérico.

Como se ha mencionado, se describe en el presente documento un procedimiento para desarrollar nanopartículas con propiedades deseadas, tales como propiedades químicas, biológicas o físicas deseadas. En un conjunto de realizaciones, el procedimiento incluye producir bibliotecas de nanopartículas que tienen propiedades altamente controladas, que pueden formarse mezclando entre sí dos o más polímeros en diferentes proporciones. Mezclando entre sí dos o más polímeros diferentes (por ejemplo, copolímeros, por ejemplo, copolímeros en bloque) en diferentes proporciones y produciendo partículas a partir de los polímeros (por ejemplo, copolímeros, por ejemplo, copolímeros de bloque), pueden formarse partículas que tengan propiedades altamente controladas. Por ejemplo, un polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero en bloque) puede incluir un ligando de PSMA de bajo peso molecular, mientras que otro polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero en bloque) puede seleccionarse por su biocompatibilidad y/o su capacidad para controlar la inmunogenicidad de la partícula resultante.

En un conjunto de realizaciones, las partículas se forman proporcionando una solución que comprende uno o más polímeros, y poniendo en contacto la solución con un no disolvente de polímeros para producir la partícula. La solución puede ser miscible o inmiscible con el no disolvente de polímeros. Por ejemplo, un líquido miscible en agua tal como acetonitrilo puede contener los polímeros, y las partículas se forman a medida que el acetonitrilo se pone en contacto con agua, un no disolvente de polímeros, *por ejemplo,* vertiendo el acetonitrilo en el agua a una velocidad controlada. El polímero contenido dentro de la solución, tras el contacto con el no disolvente de polímeros, puede precipitar entonces para formar partículas tales como nanopartículas. Se dice que dos líquidos son "inmiscibles" o no miscibles entre sí cuando uno no es soluble en el otro a un nivel de al menos el 10 % en peso a temperatura y presión ambiental. Típicamente, una solución orgánica (por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, tetrahidrofurano, acetona, formamida, dimetilformamida, piridinas, dioxano, dimetilsulfóxido, etc.) y un líquido acuoso (por ejemplo, agua, o agua que contiene sales disueltas u otras especies, células o medios biológicos, etanol, etc.) son inmiscibles entre sí. Por ejemplo, la primera solución puede verterse en la segunda solución (a un ritmo o velocidad adecuada). En algunos casos, pueden formarse partículas tales como nanopartículas a medida que la primera solución contacta con el segundo líquido inmiscible, *por ejemplo,* la precipitación del polímero tras el contacto causa que el polímero forme nanopartículas mientras que la primera solución se vierte en el segundo líquido, y en algunos casos, por ejemplo, cuando la velocidad de introducción se controla cuidadosamente y se mantiene en una velocidad relativamente lenta, pueden formarse nanopartículas. El control de dicha formación de partículas puede optimizarse fácilmente por un experto en la técnica usando solamente una experimentación de rutina.

Al crear una biblioteca de dichas partículas, pueden identificarse partículas que tengan cualquier propiedad deseable. Por ejemplo, las propiedades tales como la funcionalidad superficial, la carga superficial, el tamaño, el potencial zeta (ζ), la hidrofobicidad, la capacidad para controlar la inmunogenicidad y similares. pueden controlarse en gran medida. Por ejemplo, puede sintetizarse una biblioteca de partículas y explorarse para identificar las partículas que tienen una proporción particular de polímeros que permite que las partículas tengan una densidad específica de restos (por ejemplo, ligandos de PSMA de bajo peso molecular) presente en la superficie de la partícula. Esto permite que se preparen partículas que tengan una o más propiedades específicas, por ejemplo, un tamaño específico y una densidad superficial específica de restos, sin un grado de esfuerzo excesivo. Además, la identificación puede producirse por cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, la identificación puede ser directa o indirecta, o desarrollarse cuantitativamente o cualitativamente.

En algunas realizaciones, las nanopartículas ya formadas pueden funcionalizarse con un resto de direccionamiento usando procedimientos análogos a los descritos para producir conjugados poliméricos funcionalizados con ligando. Como un ejemplo específico no limitante, esta realización se ilustra esquemáticamente en la figura 1A. En esta figura, un primer copolímero (PLGA-PEG, poli(lactida-co-glicolida) y poli(etilenglicol)) se mezcla con un agente terapéutico para formar partículas. Después, las partículas se asocian con un ligando de PSMA de bajo peso molecular para formar nanopartículas que pueden usarse para el tratamiento del cáncer. Las partículas pueden asociarse con cantidades variables de ligandos de PSMA de bajo peso molecular para controlar la densidad superficial de ligando de PSMA de la nanopartícula, alterando de este modo las características terapéuticas de la nanopartícula. Además, por ejemplo, controlando parámetros tales como el peso molecular de PLGA, el peso

molecular de PEG y la carga superficial de la nanopartícula pueden obtenerse partículas controladas con mucha precisión usando este procedimiento de preparación.

Como un ejemplo específico no limitante, se muestra esquemáticamente otra realización en la figura 1B. En esta figura, un primer copolímero (PLGA-PEG) se conjuga con un ligando de PSMA de bajo peso molecular (PSMALig) para formar un polímero de PLGA-PEG-PSMALig. Este polímero unido a ligando se mezcla con un segundo polímero no funcionalizado (PLGA-PEG en este ejemplo) a proporciones variables para formar una serie de partículas que tienen propiedades diferentes, por ejemplo, densidades superficiales diferentes de ligando de PSMA como se muestra en este ejemplo. Por ejemplo, controlando parámetros tales como el peso molecular de PLGA, el peso molecular de PEG, la densidad superficial de ligando de PSMA y la carga superficial de la nanopartícula, pueden obtenerse partículas controladas con mucha precisión usando este procedimiento de preparación. Como se muestra en la figura 1B, la nanopartícula resultante también puede incluir un agente terapéutico.

En otra realización, se describe en el presente documento un procedimiento para preparar una nanopartícula recubierta en la que la nanopartícula tiene una relación de polímero unido a ligando con respecto a polímero no funcionalizado eficaz para el tratamiento del cáncer de próstata, en el que el polímero hidrófilo unido a ligando está conjugado con un lípido que se autoensamblará con el polímero hidrófobo, de tal forma que los polímeros hidrófobos e hidrófilos que constituyen la nanopartícula no están unidos covalentemente. El "autoensamblaje" se refiere a un proceso de montaje espontáneo de una estructura de orden superior que depende de la atracción natural de los componentes de la estructura de orden superior (por ejemplo, moléculas) entre sí. Por lo general, se produce a través de movimientos aleatorios de las moléculas y la formación de enlaces en base al tamaño, forma, composición o propiedades químicas. Por ejemplo, tal procedimiento comprende proporcionar un primer polímero que se hace reaccionar con un lípido, para formar un conjugado polímero/lípido. El conjugado polímero/lípido se hace reaccionar luego con el ligando de PSMA de bajo peso molecular para preparar un conjugado polímero unido a ligando/lípido; y mezclar el conjugado polímero unido a ligando/lípido con un segundo polímero no funcionalizado y el agente terapéutico; de modo que se forme la nanopartícula recubierta. En determinadas realizaciones, el primer polímero es PEG, de tal forma que se forma un PEG terminado en lípido. En una realización, el lípido es de la Fórmula V, *por ejemplo,* 2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), y sales del mismo, *por ejemplo,* la sal sódica. El PEG terminado en lípidos puede entonces, por ejemplo, mezclarse con PLGA para formar una nanopartícula.

También pueden formarse bibliotecas de dichas partículas. Por ejemplo, variando las proporciones de los dos (o más) polímeros dentro de la partícula, estas bibliotecas pueden ser útiles para ensayos de exploración, ensayos de alto rendimiento o similares. Las entidades dentro de la biblioteca pueden variar en propiedades tales como las descritas anteriormente y, en algunos casos, puede variarse más de una propiedad de las partículas dentro de la biblioteca. Por consiguiente, puede proporcionarse una biblioteca de nanopartículas que tienen diferentes proporciones de polímeros con propiedades diferentes. La biblioteca puede incluir cualquier proporción o proporciones adecuadas de los polímeros.

En algunos casos, puede estar presente una población de partículas. Por ejemplo, una población de partículas puede incluir al menos 20 partículas, al menos 50 partículas, al menos 100 partículas, al menos 300 partículas, al menos 1.000 partículas, al menos 3.000 partículas, o al menos 10.000 partículas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las partículas pueden ser cada una sustancialmente de la misma forma y/o tamaño ("monodispersas"). Por ejemplo, Por ejemplo, las partículas pueden tener una distribución de dimensiones características de modo que no más de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 10 % de las partículas tengan una dimensión característica de más de aproximadamente el 10 % superior al promedio de la dimensión característica de las partículas y, en algunos casos, de modo que no más de aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,1 %, aproximadamente el 0,03 % o aproximadamente el 0,01 % tengan una dimensión característica de más de aproximadamente el 10 % superior al promedio de la dimensión característica de las partículas. En algunos casos, no más de aproximadamente el 5 % de las partículas tienen una dimensión característica de más de aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,1 %, aproximadamente el 0,03 % o aproximadamente el 0,01 % superior al promedio de la dimensión característica de las partículas.

Más generalmente, los polímeros seleccionados para usarse para crear la biblioteca de partículas pueden ser cualquiera de una amplia diversidad de polímeros, tal como se describen en el presente documento. En general, dos, tres, cuatro o más polímeros se mezclan en una amplia variedad de proporciones (por ejemplo, variando cada una del 0 % al 100 %), para formar partículas tales como nanopartículas que tengan proporciones diferentes de cada uno de los polímeros. Los dos o más polímeros pueden ser distinguibles de alguna forma, *por ejemplo,* teniendo diferentes grupos poliméricos, teniendo los mismos grupos poliméricos pero con pesos moleculares diferentes, teniendo algunos grupos poliméricos en común pero teniendo otros que sean diferentes (por ejemplo, uno puede tener un grupo polimérico que el otro no tenga), teniendo los mismos grupos poliméricos pero en diferentes órdenes, etc. La biblioteca de partículas puede tener cualquier número de miembros, por ejemplo, la biblioteca puede tener 2, 3, 5, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10.000, 30.000, 100.000, etc. miembros, que pueden identificarse de alguna forma. En algunos casos, la biblioteca puede existir al mismo tiempo; por ejemplo, la biblioteca puede estar contenida en una o más placas de microtitulación, viales, etc.; o en algunas realizaciones, la biblioteca puede haber incluido miembros creados en momentos diferentes.

La biblioteca de partículas puede explorarse después de alguna forma para identificar aquellas partículas que tengan una o más propiedades deseadas, por ejemplo, funcionalidad superficial, carga superficial, tamaño, potencial zeta (ζ), hidrofobicidad, capacidad para controlar la inmunogenicidad y similares. Una o más de las macromoléculas dentro de las partículas pueden incluir uno o más polímeros seleccionados para que sean biocompatibles o biodegradables, uno o más polímeros seleccionados para reducir la inmunogenicidad, y/o uno o más ligandos de PSMA de bajo peso molecular. Las macromoléculas dentro de la biblioteca pueden comprender algunos o todos estos polímeros, en cualquier combinación adecuada (incluyendo, pero sin limitación, combinaciones en las que un primer polímero comprende un ligando de PSMA de bajo peso molecular y un segundo polímero no contiene ninguna de estas especies).

Como ejemplo específico, en una realización, las partículas pueden incluir una primera macromolécula que comprende un polímero biocompatible y un ligando de PSMA de bajo peso molecular, y una segunda macromolécula que comprende un polímero biocompatible, que puede o no ser el mismo que el de la primera macromolécula. Como otro ejemplo, una primera macromolécula puede ser un copolímero en bloque que comprenda un polímero hidrófobo biocompatible, un polímero hidrófilo biocompatible y un ligando de PSMA de bajo peso molecular; y una segunda macromolécula distinguible de la primera macromolécula de alguna forma. Por ejemplo, Por ejemplo, la segunda macromolécula puede comprender el mismo polímero hidrófobo biocompatible (o uno diferente) y el mismo polímero hidrófilo biocompatible (o uno diferente), pero un ligando de PSMA de bajo peso molecular diferente que la primera macromolécula (o ningún ligando en absoluto).

La nanopartícula descrita en el presente documento también puede estar compuesta por, como otro ejemplo, 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 es distinguible de la primera macromolécula. Por ejemplo, la segunda macromolécula puede no contener ninguno de los polímeros de la primera macromolécula, la segunda macromolécula puede contener uno o más polímeros de la primera macromolécula y uno o más polímeros no presentes en la primera macromolécula, la segunda macromolécula puede carecer de uno o más de los polímeros de la primera macromolécula, la segunda macromolécula puede contener todos los polímeros de la primera macromolécula, pero en un orden diferente y/o teniendo uno o más de los polímeros pesos moleculares diferentes, *etc.*

Como otro ejemplo más, la primera macromolécula puede comprender un polímero hidrófobo biocompatible, un polímero hidrófilo biocompatible y un ligando de PSMA de bajo peso molecular, y la segunda macromolécula puede comprender el polímero hidrófobo biocompatible y el polímero hidrófilo biocompatible y ser distinguible de la primera macromolécula de alguna forma. Como otro ejemplo más, la primera macromolécula puede comprender un polímero hidrófobo biocompatible y un polímero hidrófilo biocompatible, y la segunda macromolécula puede comprender el polímero hidrófobo biocompatible y un ligando de PSMA de bajo peso molecular, donde la segunda macromolécula es distinguible de la primera macromolécula de alguna forma.

Las nanopartículas descritas anteriormente también pueden contener agentes terapéuticos. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, un agente quimioterapéutico, un agente radiactivo, un agente basado en ácido nucleico, un agente basado en lípidos, un agente basado en carbohidratos, una molécula pequeña natural, o una molécula pequeña sintética.

Los polímeros o macromoléculas pueden formarse después en una partícula usando técnicas tales como las analizadas en detalle a continuación. La geometría formada por la partícula a partir del polímero o macromolécula puede depender de factores tales como los polímeros que forman la partícula.

La figura 2 ilustra que pueden producirse bibliotecas usando polímeros tales como los descritos anteriormente. Por ejemplo, en la figura 2, 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, pueden usarse para crear una biblioteca de partículas que tengan proporciones diferentes de la primera y segunda macromoléculas.

Dicha biblioteca puede ser útil para conseguir partículas que tengan cualquier cantidad de propiedades deseables, por ejemplo, propiedades tales como funcionalidad superficial, carga superficial, tamaño, potencial zeta (ζ), hidrofobicidad, capacidad para controlar la inmunogenicidad, o similares. En la figura 2, se combinan proporciones diferentes de la primera y segunda macromoléculas (incluyendo proporciones en las que una de las macromoléculas está ausente) para producir partículas que formen la base de la biblioteca.

Por ejemplo, como se muestra en la figura 2, a medida que se aumenta la cantidad de la primera macromolécula con respecto a la segunda macromolécula, la cantidad de resto (por ejemplo, ligando de PSMA de bajo peso molecular) presente en la superficie de la partícula puede aumentarse. Por lo tanto, puede conseguirse cualquier concentración adecuada de resto en la superficie controlando simplemente la proporción de la primera y segunda macromoléculas en las partículas. Por consiguiente, dicha biblioteca de partículas puede ser útil en la selección o identificación de partículas que tengan una funcionalidad particular.

Como ejemplos específicos, en algunas realizaciones, la biblioteca incluye partículas que comprendan conjugados poliméricos de un polímero biocompatible y un ligando de PSMA de bajo peso molecular, como se analiza en el presente documento. Haciendo referencia ahora a la figura 3, se muestra una partícula de este tipo como ejemplo no limitante. En esta figura, se usa un conjugado polimérico de la invención para formar una partícula 10. El polímero que forma la partícula 10 incluye un ligando de PSMA de bajo peso molecular 15, presente en la superficie de la partícula y una porción biocompatible 17. En algunos casos, como se muestra aquí, el resto de direccionamiento 15 puede conjugarse con la porción biocompatible 17. Sin embargo, no toda la porción biocompatible 17 se muestra conjugada con el resto de direccionamiento 15. Por ejemplo, en algunos casos, pueden formarse partículas tales como la partícula 10 usando un primer polímero que comprende una porción biocompatible 17 y un ligando de PSMA de bajo peso molecular 15, y un segundo polímero que comprende la porción biocompatible 17 pero no el resto de direccionamiento 15. Controlando la proporción del primer y segundo polímeros pueden formarse partículas que tengan propiedades diferentes y, en algunos casos, pueden formarse bibliotecas de dichas partículas. Además, el fármaco 12 está contenido en el Interior del centro de la partícula 10. 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 asocie con el centro relativamente hidrófobo de la partícula. En una realización, el agente terapéutico se asocia con la superficie de, se encapsula en el interior de, se rodea por, o se dispersa a través de la nanopartícula. En otra realización, el agente terapéutico se encapsula en el interior del núcleo hidrófobo de la nanopartícula.

Como ejemplo específico, la partícula 10 puede contener polímeros que incluyen un polímero biocompatible relativamente hidrófobo y un resto de direccionamiento relativamente hidrófilo 15, de tal manera que, durante la formación de partículas, se expone una mayor concentración del resto de direccionamiento hidrófilo en la superficie y está presente una mayor concentración del polímero hidrófobo biocompatible en el interior de la partícula.

En algunas realizaciones, El polímero biocompatible es un polímero hidrófobo. Los ejemplos no limitativos de polímeros biocompatibles incluyen polilactida, poliglicolida y/o poli (lactida-co-glicolida).

En una realización, se describe en el presente documento una nanopartícula que comprende 1) una matriz polimérica; 2) un compuesto o capa anfífila que rodea o está dispersa dentro de la matriz polimérica formando una envoltura continua o discontinua para la partícula; 3) un polímero recubierto, y 4) un ligando de PSMA de bajo peso molecular unido covalentemente. Una capa anfífila puede reducir la penetración de agua en la nanopartícula, aumentando de este modo la eficacia de encapsulación del fármaco y ralentizando la liberación del fármaco. Además, estas nanopartículas protegidas por capas anfífilas pueden proporcionar ventajas terapéuticas liberando el fármaco encapsulado y el polímero en los momentos apropiados.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anfífilo" se refiere a una propiedad en la que una molécula tiene tanto una porción polar como una porción no polar. A menudo, un compuesto anfífilo tiene una cabeza polar unida a una larga cola hidrófoba. En algunas realizaciones, la parte polar es soluble en agua, mientras que la porción no polar es insoluble en agua. Además, la porción polar puede tener una carga positiva formal o una carga negativa formal. Como alternativa, la porción polar puede tener tanto una carga formal positiva como una carga negativa, y ser un zwitterión o una sal interna. El compuesto anfífilo puede ser, pero sin limitación, uno o una pluralidad de los siguientes: lípidos de origen natural, tensioactivos, o compuestos sintetizados con restos hidrófilos e hidrófobos.

Los ejemplos específicos de compuestos anfífilos incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos, tales como 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), diaraxidoilfosfatidilcolina (DAPC), dibehenoilfosfatidilcolina (DBPC), ditricosanoilfosfatidilcolina (DTPC), y dilignoceroilfatidilcolina (DLPC), incorporado en una proporción de entre 0,01-60 (peso de lípido/peso de polímero), más preferentemente entre 0,1-30 (peso de lípido/peso de polímero). Los fosfolípidos que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, ácidos fosfatídicos, fosfatidil colinas con lípidos saturados e insaturados, fosfatidil etanolaminas, fosfatidilgliceroles, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, derivados lisofosfatidilos, cardiolipina y fosfolípidos β-acil-y-alquilo. Los ejemplos de fosfolípidos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilcolinas tales como dioleoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipentadecanoilfosfatidilcolina, dilauroilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), diaraquidoilfosfatidilcolina (DAPC), dibehenoilfosfatidilcolina (DBPC), ditricosanoilfosfatidilcolina (DTPC), dilignoceroilfatidilcolina (DLPC); y fosfatidiletanolaminas tales como dioleoilfosfatidiletanolamina o 1-hexadecil-2-palmitoilglicerofosfetoetanolamina. También pueden usarse fosfolípidos sintéticos con cadenas acilo asimétricas (por ejemplo, con una cadena acilo de 6 carbonos y otra cadena acilo de 12 carbonos).

En una realización particular, un componente anfífilo que puede usarse para formar una capa anfífila es la lecitina y, en particular, fosfatidilcolina. La lecitina es un lípido anfífilo y, como tal, forma una bicapa fosfolipídica que tiene las cabezas hidrófilas (polares) orientadas a su entorno, que son a menudo acuosas, y las colas hidrófobas enfrentadas entre sí. La lecitina tiene una ventaja de ser un lípido natural que está disponible de, *por ejemplo,* soja, y ya tiene aprobación de la FDA para su uso en otros dispositivos de administración. Además, una mezcla de lípidos tales como la leticina, es más ventajosa que un único lípido puro.

En determinadas realizaciones, la capa anfífila de la nanopartícula, *por ejemplo,* la capa de lecitina, es una monocapa, lo que significa que la capa no es una bicapa de fosfolípidos, sino que existe como una única capa

continua o discontinua alrededor o dentro de la nanopartícula. La capa anfífila está "asociada" a la nanopartícula de la invención, lo que significa que está situada en una cierta proximidad a la matriz polimérica, tal como rodando el exterior de la envoltura polimérica, o dispersada dentro de los polímeros que forman la nanopartícula.

Por lo tanto, en una realización, se describe en el presente documento una nanopartícula específica de diana que comprende 1) PLGA; 2) PEG; 3) un compuesto o capa anfífila (por ejemplo, lecitina) que rodea o se dispersa dentro de la matriz PLGA/PEG formando una envoltura continua o discontinua para la partícula; y 4) un ligando de PSMA de bajo peso molecular unido covalentemente. En una realización, PLGA y PEG son copolímeros, y el ligando de PSMA de bajo peso molecular está unido covalentemente a PEG. En otra realización, el PEG está unido a DSPE, que se autoensambla con PLGA, y el ligando de PSMA de bajo peso molecular está unido covalentemente a PEG. En otra realización, la relación de compuesto anfífilo con respecto a polímero está entre 14:1 y 34:1, en peso.

En otra realización, se describe en el presente documento una nanopartícula que comprende 1) una matriz polimérica que comprende un polímero biodegradable; 2) un compuesto o capa anfífila que rodea o está dispersa dentro de la matriz polimérica formando una envoltura continua o discontinua para la partícula; 3) un polímero recubierto, y 4) un ligando de PSMA de bajo peso molecular unido covalentemente, en la que el diámetro de las nanopartículas está entre 40-80 nm y en la que la proporción de compuesto anfífilo con respecto polímero es entre 14:1 y 34:1, en peso. En otra realización, se describe en el presente documento una nanopartícula que comprende 1) una matriz polimérica que comprende un polímero biodegradable; 2) lecitina; 3) un polímero recubierto, y 4) un ligando de PSMA de bajo peso molecular unido covalentemente. En otra realización, se describe en el presente documento una nanopartícula que comprende 1) una matriz polimérica que comprende un polímero biodegradable; 2) lecitina; 3) un polímero recubierto, y 4) un ligando de PSMA de bajo peso molecular unido covalentemente, en la que el diámetro de las nanopartículas está entre 40-80 nm y en la que la proporción de lecitina con respecto polímero es entre 14:1 y 34:1 en peso. En otra realización, se describe en el presente documento una nanopartícula que comprende 1) una matriz polimérica que comprende un polímero biodegradable; 2) una mezcla de dos o más compuestos anfífilos seleccionados de fosfatidilcolina, fosfatidil inositol, fosfatidil etanolamina y ácido fosfatídico; 3) un polímero recubierto, y 4) un ligando de PSMA de bajo peso molecular unido covalentemente. En una realización adicional, se describe en el presente documento una nanopartícula que comprende 1) una matriz polimérica que comprende un polímero biodegradable; 2) una mezcla de tres o más compuestos anfífilos seleccionados de fosfatidilcolina, fosfatidil inositol, fosfatidil etanolamina y ácido fosfatídico; 3) un polímero recubierto, y 4) un ligando de PSMA de bajo peso molecular unido covalentemente. Aún en una realización adicional, se describe en el presente documento una nanopartícula que comprende 1) una matriz polimérica que comprende un polímero biodegradable; 2) un compuesto o capa anfífila que rodea o está dispersa dentro de la matriz polimérica formando una envoltura continua o discontinua para la partícula; 3) polietilenglicol, y 4) un ligando de PSMA de bajo peso molecular unido covalentemente. En otra realización, se describe en el presente documento una nanopartícula que comprende 1) una matriz polimérica que comprende un polímero biodegradable; 2) lecitina; 3) polietilenglicol, y 4) un ligando de PSMA de bajo peso molecular unido covalentemente. En otra realización, se describe en el presente documento una nanopartícula que comprende 1) una matriz polimérica que comprende un polímero biodegradable; 2) una mezcla de dos o más compuestos anfífilos seleccionados de fosfatidilcolina, fosfatidil inositol, fosfatidil etanolamina y ácido fosfatídico; 3) polietilenglicol, y 4) un ligando de PSMA de bajo peso molecular unido covalentemente. En una realización, se describe en el presente documento una nanopartícula que comprende 1) una matriz polimérica que comprende un polímero biodegradable; 2) lecitina; 3) polietilenglicol, y 4) un ligando de PSMA de bajo peso molecular unido covalentemente, en la que el diámetro de las nanopartículas está entre 40-80 nm y en la que la proporción de lecitina con respecto polímero es entre 14:1 y 34:1 en peso. En determinadas realizaciones, el polímero biodegradable es PLGA. En otras realizaciones, el polímero recubierto es PEG.

Agentes terapéuticos

Cualquier agente ("carga útil"), incluyendo, por ejemplo, agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes anticancerosos), agentes de diagnóstico (por ejemplo, agentes de contraste; radionucleidos; y restos fluorescentes, luminiscentes y magnéticos), agentes profilácticos (por ejemplo, vacunas), y/o agentes nutracéuticos (por ejemplo, vitaminas, minerales, etc.) pueden administrarse por las nanopartículas descritas en el presente documento. Los agentes ejemplares a administrar incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas (por ejemplo, agentes citotóxicos), ácidos nucleicos (por ejemplo, agentes de ARNsi, ARNi y microARN), proteínas (por ejemplo, anticuerpos, péptidos, lípidos, carbohidratos, hormonas, metales, elementos y compuestos radiactivos, fármacos, vacunas, agentes inmunológicos, etc. y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agente a administrar es un agente útil en el tratamiento del cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata).

Por ejemplo, el resto de direccionamiento puede dirigirse a o provocar que la partícula se localice en partes específicas dentro de un sujeto, y la carga útil puede administrarse a esas partes. En una realización particular, el fármaco u otra carga útil puede liberarse de una forma de liberación controlada desde la partícula y permitirse que interaccione localmente con el sitio de direccionamiento particular (por ejemplo, un tumor). La expresión "liberación controlada" (y variantes de esa expresión), como se usa en el presente documento (por ejemplo, en el contexto de un "sistema de liberación controlada") se entiende generalmente que incluye la liberación de una sustancia (por ejemplo, un fármaco) en un sitio seleccionado, o de otro modo controlable en velocidad, intervalo y/o cantidad. La liberación controlada incluye, pero no se limita necesariamente a, la administración sustancialmente continua, la administración en patrones (por ejemplo, administración intermitente a lo largo de un periodo de tiempo que se

interrumpe a intervalos de tiempo regulares o irregulares) y la administración de un bolo de una sustancia seleccionada (por ejemplo, una cantidad discreta predeterminada de una sustancia a lo largo de un periodo de tiempo relativamente corto (por ejemplo, unos pocos segundos o minutos)).

Por ejemplo, una porción de direccionamiento puede provocar que las partículas se localicen en un tumor, un sitio patológico, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. dentro del cuerpo de un sujeto, dependiendo del resto de direccionamiento usado. Por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular puede localizarse en células de cáncer de próstata. El sujeto puede ser un animal humano o no humano. Los ejemplos de sujetos incluyen, pero sin limitación, un mamífero, tal como un perro, un gato, un caballo, un burro, un conejo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, una rata, un ratón, una cobaya, un hámster, un primate, un ser humano o similares.

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 puede usarse un resto de direccionamiento para dirigir a una partícula que contiene un fármaco a una localización particular localizada dentro de un sujeto, *por ejemplo,* para permitir que se produzca una administración localizada del fármaco Los agentes terapéuticos ejemplares incluyen agentes quimioterapéuticos tales como doxorrubicina (adriamicina), gemcitabina (gemzar), daunorrubicina, procarbazina, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleucina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, camptotecina, CPT-11,10-hidroxi-7-etilcamptotecina (SN38), dacarbazina, S-l capecitabina, ftorafur, 5'-desoxiflurouridina, UFT, eniluracilo, desoxicitidina, 5-azacitosina, 5-azadesoxicitosina, alopurinol, 2-cloroadenosina, trimetrexato, aminopterina, metilen-10-desazaaminopterina (MDAM), oxaplatino, picoplatino, tetraplatino, satraplatino, platino-DACH, ormaplatino, CI-973, JM-216, y análogos de los mismos, epirrubicina, fosfato de etopósido, 9-aminocamptotecina, 10,11-metilendioxicamptotecina, karenitecina, 9-nitrocamptotecina, TAS 103, vindesina, mostaza de L-fenilalanina, ifosfamida, mafosfamida, 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, 5-fluorouracilo, y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos no limitantes de fármacos potencialmente adecuados incluyen agentes anticancerosos, incluyendo, por ejemplo, docetaxel, mitoxantrona y clorhidrato de mitoxantrona. En otra realización, la carga útil puede ser un fármaco anticanceroso tal como 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3, 4-ipomeanol, 5-etiniluracilo, 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, antramicina, anti-proteína morfogenética dorsalizante 1, antiestrógenos, antineoplastón, oligonucleótidos antisentido, glicinato de afidicolina, moduladores de genes de 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, azatoxina, azatirosina, azetepa, azotomicina, derivados de bacatina III, balanol, batimastat, benzoclorinas, benzodepa, benzoilestaurosporina, derivados de beta-lactama, beta-aletina, betaclamicina 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 BRC/ABL, breflato, brequinar sódico, bropirimina, budotitano, busulfán, butionina sulfoximina, cactinomicina, calcipotriol, calfostina C, calusterona, derivados de camptotecina, IL-2 de viruela del canario, capecitabina, caracemida, carbetimer, carboplatino, carboxamida-amino-triazol, carboxiamidotriazol, carest M3, carmustina, earn 700, inhibidor derivado de cartílago, clorhidrato de carubicina, carzelesina, inhibidores de caseína cinasa, castanoespermina, cecropina B, cedefingol, cetrorelix, clorambucilo, clorinas, cloroquinoxalina sulfonamida, cicaprost, cirolemicina, cisplatino, cisporfirina, cladribina, análogos de clomifeno, clotrimazol, colismicina A, colismicina B, combretastatina A4, análogo de combretastatina, conagenina, crambescidina 816, crisnatol, mesilato de crisnatol, criptoficina 8, derivados de criptoficina A, curacina A, ciclopentantraquinonas, ciclofosfamida, cicloplatam, cipemicina, citarabina, ocfosfato de citarabina, factor citolítico, citostatina, dacarbazina, dacliximab, dactinomicina, clorhidrato de daunorubicina, decitabina, deshidrodidemnina B, deslorelina, dexifosfamida, dexormaplatino, dexrazoxano, dexverapamilo, dezaguanina, mesilato de dezaguanina, diazicuona, didemnina B, didox, dietilhiorespermina, dihidro-5-azacitidina, dioxamicina, difenil espiromustina, docetaxel, docosanol, dolasetrón, doxifluridina, doxorrubicina, clorhidrato de doxorubicina, droloxifeno, citrato de droloxifeno, propionato de dromostanolona, dronabinol, duazomicina, duocanicina SA, ebseleno, ecomustina, edatrexato, edelfosina, edrecolomab, eflomitina, clorhidrato de eflomitina, elemeno, elsarnitrucina, emitefur, enloplatino, enpromato, epipropidina, epirrubicina, clorhidrato de epirubicina, epristerida, erbulozol, sistema vector de terapia génica de eritrocitos, clorhidrato de esorubicina, estramustina, análogo 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 fluorodaunorunicina, fluorouracilo, flurocitabina, forfenimex, formestano, fosquidona, fostriecina, fostriecina sódica, fotemustina, texafirina de gadolinio, nitrato de galio, galocitabina, ganirelix, inhibidores de gelatinasa, gemcitabina, clorhidrato de gemcitabina, inhibidores de glutatión, hepsulfam, herregulina, bisacetamida de hexametileno, hidroxiurea, hipericina, ácido ibandrónico, idarrubicina, clorhidrato de idarrubicina, idoxifeno, idramantona, ifosfamida, ihnofosina, ilomastat, imidazoacridonas, imiquimod, péptidos

inmunoestimulantes, inhibidor del receptor del factor de crecimiento de tipo insulina 1, agonistas de interferón, interferón alfa-2A, interferón alfa-2B, interferón alfa-N1, interferón alfa-N3, interferón beta-IA, interferón gamma-IB, interferones, interleucinas, iobenguano, yododoxorrubicina, iproplatm, irinotecán, clorhidrato de irinotecán, iroplact, irsogladina, isobengazol, isohomohalicondrina B, itasetrón, jasplaquinolida, kahalalida F, triacetato de lamelarina-N, lanreotida, acetato de lanreotida, leinamicina, lenograstim, sulfato de lentinán, leptolstatina, Letrozol, factor inhibidor de leucemia, interferón alfa de leucocitos, acetato de leuprolida, leuprolida/estrógeno/progesterona, leuprorelina, levamisol, liarozol, clorhidrato de liarozol, análogo de poliamina lineal, péptido de disacárido lipófilo, compuestos de platino lipófilos, lisoclinamida, lobaplatino, lombricina, lometrexol, lometrexol sódico, lomustina, lonidamina, losoxantrona, clorhidrato de losoxantrona, lovastatina, loxoribina, lurtotecan, texafirina lisofilina de lutecio, péptidos líticos, maitansina, manostatina A, marimastat, masoprocol, maspina, inhibidores de matrilisina, inhibidores de metaloproteinasa de matriz, maitansina, clorhidrato de mecloretamina, acetato de megestrol, acetato de melengestrol, melfalano, menogaril, merbarona, mercaptopurina, meterelina, metioninasa, metotrexato, metotrexato sódico, metoclopramida, metoprina, meturedepa, inhibidores de proteína quinasa C de microalgas, inhibidor de MIF, mifepristona, miltefosina, mirimostim, ARN bicatenario desemparejado, mitindomida, mitocarcina, mitocromina, mitogilina, mitoguazona, mitolactol, mitomalcina, mitomicina, análogos de mitomicina, mitonafida, mitosper, mitotano, mitotoxina factor de crecimiento de fibroblastos-saporina, mitoxantrona, mitoxantrona clorhidrato, mofaroteno, molgramostim, anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana, lípido A de monofosforilo/SK de la pared celular de Mycobacterium, mopidamol, inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos, terapia a base de supresor de múltiples tumores-1, agente anticáncer de mostaza, micaperóxido B, extracto de pared celular micobacteriana, ácido micofenólico, miriaporona, n-acetildinalina, nafarelina, nagrestip, naloxona/pentazocina, napavina, nafterpina, nartograstim, nedaplatino, nemorrubicina, ácido neidrónico, endopeptidasa neutra, nilutamida, nisamicina, moduladores del óxido nítrico, antioxidante de nitróxido, nitrulina, nocodazol, nogalamicina, benzamidas n-sustituidas, O6-bencilguanina, octreotida, okicenona, oligonucleótidos, onapristona, ondansetron, oracina, inductor de citocinas oral, ormaplatino, osaterona, oxaliplatino, oxaunomicina, oxisuran, paclitaxel, análogos de paclitaxel, derivados de paclitaxel, palauamina, palmitoilrizoxina, ácido pamidrónico, panaxitriol, panomifeno, parabactina, pazeliptina, pegaspargasa, peldesina, peliomicina, pentamustina, polisulfato sódico de pentosano, pentostatina, pentrozol, sulfato de peplomicina, perflubron, perfosfamida, alcohol perilílico, fenazinomicina, fenilacetato, inhibidores de fosfatasa, picibanil, clorhidrato de pilocarpina, pipobromano, piposulfan, pirarrubicina, piritrexim, clorhidrato de piroxantrona, placetina A, placetina B, inhibidor de activador de plasminógeno, complejo de platino, compuestos de platino, complejo de platino-triamina, plicamicina, plomestano, porfímero sódico, porfiromicina, prednimustina, clorhidrato de procarbazina, propil bis-acridona, prostaglandina J2, antiandrógeno de carcinoma prostático, inhibidores del proteosoma, inmunomodulador basado en proteína A, inhibidor de proteína cinasa C, inhibidores de proteína tirosina fosfatasa, inhibidores de fosforilasa de nucleósidos de purina, puromicina, clorhidrato de puromicina, purpurinas, pirazorurina, pirazoloacridina, conjugado de hemoglobina piridoxilada-polioxietileno, antagonistas de RAF, raltitrexed, ramosetrón, inhibidores de RAS farnesil proteína transferasa, inhibidor de RAS, inhibidor de RAS-GAP, reteliptina desmetilada, etidronato de renio Re 186, rizoxina, riboprina, ribozimas, RFI retinarnida, iARN, rogletimida, rohitucina, romurtida, roquinimex, rubiginona B1, ruboxil, safingol, safingol clorhidrato, saintopina, SarCNU, sarcofitol A, sargramostim, miméticos de SDI1, semustina, inhibidor 1 derivado de senescencia, oligonucleótidos sentido, inhibidores de la transducción de señales, moduladores de la transducción de señales, simtrazeno, proteína de unión a antígeno de cadena sencilla, sizofirán, sobuzoxano, borocaptato sódico, fenilacetato sódico, solverol, proteína de unión a somatomedina, sonermina, esparfosafo sódico, ácido esparfósico, esparsomicina, espicamicina D, clorhidrato de espirogermanio, espiromustina, espiroplatino, esplenopentina, espongistatina 1, escualamina, inhibidor de células madre, inhibidores de la división de células madre, estipiamida, estreptonigrina, estreptozocina, inhibidores de estromelisina, sulfinosina, sulofenur, antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo, suradista, suramina, swainsonina, glucosaminoglucanos sintéticos, talisomicina, talimustina, metyoduro de tamoxifeno, tauromustina, tazaroteno, tecogalan sódico, tegafur, telurapirilio, inhibidores de telomerasa, clorhidrato de teloxantrona, temoporfina, temozolomida, tenipósido, teroxirona, testolactona, tetraclorodecaóxido, tetrazomina, taliblastina, talidomida, tiamiprina, tiocoralina, tioguanina, tiotepa, trombopoyetina, mimético de trombopoyetina, timafalsina, agonista del receptor de timopoyetina, timotrinano, hormona estimulante tiroidea, tiazofurina, etil etiopurina de estaño, tirapazamina, diclorhidrato 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, glucuronato de trimetrexato, triptorelina, tropisetron, clorhidrato de tubulozol, turosterida, inhibidores de tirosina cinasa, trifostinas, inhibidores de UBC, ubenimex, mostaza de uracilo, uredepa, factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital, antagonistas del receptor de urocinasa, 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, sulfato de vinorelbina, sulfato de vinrosidina, vinxaltina, sulfato de vinzolidina, vitaxina, vorozol, zanoterona, zeniplatino, zilascorb, zinostatina, estimalámero de zinostatina o clorhidrato de zorrubicina.

Una vez que se han preparado los conjugados, pueden combinarse con vehículos farmacéuticos aceptables para formar una composición farmacéutica. Como se apreciará por un experto en esta técnica, los vehículos pueden seleccionarse basándose en la vía de administración como se describe a continuación, la localización del tejido diana, el fármaco a administrar, el transcurso de tiempo de administración del fármaco, *etc.*

En una realización, las nanopartículas descritas en el presente documento contendrán ácidos nucleicos tales como

ARNsi.

Preferentemente, la molécula de ARNsi tiene una longitud de aproximadamente 10-50 o más nucleótidos. Más preferentemente, la molécula de ARNsi tiene una longitud de aproximadamente 15-45 nucleótidos. Incluso más preferentemente, la molécula de ARNsi tiene una longitud de aproximadamente 19-40 nucleótidos. Incluso más preferentemente, la molécula de ARNsi tiene una longitud de aproximadamente 21-23 nucleótidos.

El ARNsi media preferentemente la ARNi contra un ARNm diana. La molécula de ARNsi puede diseñarse de modo que cada resto sea complementario a un resto en la molécula diana. Como alternativa, pueden realizarse una o más sustituciones dentro de la molécula para aumentar la estabilidad y/o aumentar la actividad de procesamiento de dicha molécula. Las sustituciones pueden realizarse dentro de la cadena o pueden realizarse en restos en los extremos de la cadena.

La reacción de escisión de ARNm diana guiada por ARNsi es específica de secuencia. En general, se prefieren para la inhibición ARNsi que contienen una secuencia de nucleótidos idéntica a una porción del gen diana. Sin embargo, no es necesaria una identidad de secuencia del 100 % entre el ARNsi y el gen diana. Pueden tolerarse variaciones de secuencia incluyendo las que podrían esperarse debido a mutación genética, polimorfismo de cepa o divergencia evolutiva. Por ejemplo, también se ha descubierto que son eficaces para la inhibición secuencias de ARNsi con inserciones, delecciones y mutaciones puntuales individuales con respecto a la secuencia diana. Como alternativa, las secuencias de ARNsi con sustituciones o inserciones de análogos de nucleótidos pueden ser eficaces para la inhibición.

Además, no todas las posiciones de un ARNsi contribuyen de igual forma al reconocimiento de la diana. Los emparejamientos erróneos en el centro del ARNsi son más críticos y esencialmente suprimen la escisión del ARN diana. Por el contrario, los nucleótidos 3' del ARNsi no contribuyen significativamente a la especificidad del reconocimiento de la diana. Generalmente, los restos en el extremo 3' de la secuencia de ARNsi que es complementaria al ARN diana (por ejemplo, la secuencia de guía) no son críticos para la escisión del ARN diana.

La identidad de secuencia puede determinarse fácilmente por comparación de secuencias y algoritmos de alineamiento conocidos en la técnica. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico (o de dos secuencias de aminoácidos), las secuencias se alinean con el fin de una comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la primera secuencia o en la segunda secuencia para un alineamiento óptimo). Los nucleótidos (o restos de aminoácidos) en posiciones de nucleótidos (o aminoácidos) correspondientes se comparan entonces. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = n.º de posiciones idénticas/n.º total de posiciones x 100), penalizando opcionalmente la puntuación por el número de huecos introducidos y/o la longitud de los huecos introducidos.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden efectuarse usando un algoritmo matemático. En una realización, el alineamiento se generaba a lo largo de una porción determinada de la secuencia alineada que tenía una identidad suficiente pero no a lo largo de porciones que tenían un bajo grado de identidad (es decir, un alineamiento local). Un ejemplo preferido no limitante de un algoritmo de alineamiento local utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. NatL Acad Sci. USA 87:2264-68, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. NatL Acad. Sci. USA 90:5873. Dicho algoritmo se incorpora en los programas BLAST (versión 2.0) de Altschul, y col. (1990) J Mol Biol. 215:403-10.

En otra realización, el alineamiento se optimiza por introducción de huecos apropiados y el porcentaje de identidad se determina a lo largo de la longitud de las secuencias alineadas (es decir, un alineamiento con huecos). Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, puede utilizarse el Gapped BLAST como se describe en Altschul y col., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389. En otra realización, el alineamiento se optimiza introduciendo huecos apropiados y el porcentaje de identidad se determina a lo largo de la longitud completa de las secuencias alineadas (es decir, un alineamiento global). Un ejemplo preferido no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación global de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Dicho algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de programas informáticos de alineamiento de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede usarse una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por longitud de huecos de 12, y una penalización por huecos de 4.

Se prefiere una identidad de secuencia superior al 90 %, *por ejemplo,* 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso el 100 % de identidad de secuencia, entre el ARNsi y la porción del ARNm diana. Como alternativa, el ARNsi puede definirse funcionalmente como una secuencia de nucleótidos (o secuencia oligonucleotídica) que es capaz de hibridar una porción del transcrito de ARNm diana (por ejemplo, NaCl 400 mM, PIPES 40 mM, pH 6,4, EDTA 1 mM, hibridación a 50 ºC o 70 ºC durante 12-16 horas; seguida de lavado). Las condiciones de hibridación adicionales incluyen hibridación a 70 ºC en SSC 1 x o 50 ºC en SSC 1 x, formamida al 50 % seguida de lavado a 70 ºC en SSC 0,3 x, o hibridación a 70 ºC en SSC 4 x o 50 ºC en SSC 4 x, formamida al 50

%, seguida de lavado a 67 ºC en SSC 1 x. La temperatura de hibridación para híbridos que se espera que sean de menos de 50 pares de bases de longitud debería ser de 5-10 ºC menos que la temperatura de fusión (Tm) del híbrido, donde la Tm se determina de acuerdo con las ecuaciones siguientes. Para híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, Tm(ºC) = 2(n.º de bases A + T) + 4(n.º de bases G + C). Para híbridos entre 18 y 49 pares de bases de longitud, Tm(ºC) = 81,5 + 16,6($\log_{10}$[Na+]) + 0,41 (% de G+C) - (600/N), donde N es el número de bases en el híbrido y [Na+] es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación ([Na+] para SSC 1 x = 0,165 M). Se proporcionan ejemplos adicionales de condiciones de rigurosidad para la hibridación de polinucleótidos en Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, capítulos 9 y 11, y Current Protocols in Molecular Biology, 1995, F.M. Ausubel y col., eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4. La longitud de las secuencias de nucleótidos idénticas puede ser de al menos aproximadamente o aproximadamente igual a 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 27, 30, 32, 35, 37, 40, 42, 45, 47 o 50 bases.

En una realización, las moléculas de ARNsi se modifican para mejorar la estabilidad en suero o en medio de cultivo para cultivos celulares. Para aumentar la estabilidad, los residuos 3' pueden estabilizarse frente a la degradación, *por ejemplo,* pueden seleccionarse de modo que consistan en nucleótidos de purina, particularmente nucleótidos de adenosina o guanosina. Como alternativa, la sustitución de nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, *por ejemplo,* la sustitución de uridina por 2'-desoxitimidina se tolera y no afecta a la eficacia de la interferencia del ARN. Por ejemplo, la ausencia de un 2'-hidroxilo puede aumentar significativamente la resistencia a nucleasa de los ARNsi en medio de cultivo de tejidos.

En otra realización, la molécula de ARNsi puede contener al menos un análogo de nucleótido modificado. Los análogos de nucleótidos pueden localizarse en posiciones en las que la actividad específica de diana, *por ejemplo,* la actividad de mediación de la ARNi no se realiza sustancialmente, *por ejemplo,* en una región en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la molécula de ARN. Particularmente, los extremos pueden estabilizarse por incorporación de análogos de nucleótidos modificados.

Los análogos de nucleótidos incluyen ribonucleótidos modificados con azúcares y/o en su cadena principal (es decir, incluyen modificaciones en la cadena principal de fosfato-azúcar). Por ejemplo, los enlaces fosfodiéster del ARN natural pueden modificarse para incluir al menos uno de un heteroátomo de nitrógeno o azufre. En ribonucleótidos de cadena principal modificada preferidos el grupo fosfoéster que conecta con ribonucleótidos adyacentes se sustituye por un grupo modificado, *por ejemplo,* grupo fosfotioato. En ribonucleótidos modificados con azúcares preferidos, el grupo 2'-OH se sustituye por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH_2, NHR, NR_2 o NO_2, en los que R es alquilo C1-C6, alquenilo o alquinilo y halo es F, Cl, Br o I.

Los análogos de nucleótidos también incluyen ribonucleótidos de nucleobases modificadas, *es decir,* ribonucleótidos que contienen al menos una nucleobase de origen no natural en lugar de una nucleobase de origen natural. Las bases pueden modificarse para bloquear la actividad de la adenosina desaminasa. Las nucleobases modificadas ejemplares incluyen, pero sin limitación, uridina y/o citidina modificada en la posición 5, *por ejemplo,* 5-(2-amino)propil uridina, 5-bromo uridina; adenosina y/o guanosinas modificadas en la posición 8, *por ejemplo,* por ejemplo, 8-bromo guanosina; desaza nucleótidos, *por ejemplo,* 7-desaza-adenosina; nucleótidos O- y N-alquilados, *por ejemplo,* es adecuada la N6-metil adenosina. Debería señalarse que las modificaciones anteriores pueden combinarse.

El ARN puede producirse enzimáticamente o mediante síntesis orgánica parcial/total, cualquier ribonucleótido modificado puede introducirse mediante síntesis enzimática u orgánica *in vitro*. En una realización, un ARNsi se prepara químicamente. Se conocen en la técnica procedimientos de síntesis de moléculas de ARN, en particular, los procedimientos de síntesis química que se describen en Verina y Eckstein (1998), Annul Rev. Biochem. 67:99. En otra realización, un ARNsi se prepara enzimáticamente. Por ejemplo, un ARNsi puede prepararse por procesamiento enzimático de un ARN bicatenario largo que tenga una complementariedad suficiente con el ARNm diana deseado. El procesamiento del ARN largo puede efectuarse *in vitro,* por ejemplo, usando lisados celulares apropiados, y los ARNsi pueden purificarse posteriormente mediante electroforesis en gel o filtración en gel. Después, el ARNsi puede desnaturalizarse de acuerdo con metodologías reconocidas en la técnica. En una realización ejemplar, el ARNsi puede purificarse a partir de una mezcla por extracción con un disolvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía o una combinación de los mismos. Como alternativa, el ARNsi puede usarse con ninguna o con un mínimo de purificación para evitar pérdidas debido al procesamiento de la muestra.

Como alternativa, los ARNsi también pueden prepararse por transcripción enzimática a partir de plantillas de ADN sintético o a partir de plásmidos de ADN aislados a partir de bacterias recombinantes. Típicamente, se usan ARN polimerasas de fago tales como ARN polimerasa de T7, T3 o SP6 (Milligan y Uhlenbeck (1989) Methods EnzynioL 180:51-62). El ARN puede secarse para su almacenamiento o disolverse en una solución acuosa. La solución puede contener tampones o sales para inhibir la hibridación y/o promover la estabilización de las dobles cadenas.

Las herramientas de diseño y kits disponibles en el mercado, tales como las disponibles en Ambion, Inc. (Austin, TX) y el Whitehead Institute of Biomedical Research en el MIT (Cambridge, MA), permiten el diseño y la producción de ARNsi. A modo de ejemplo, una secuencia de ARNm deseada puede introducirse en un programa de secuencias que generará secuencias de cadena diana con sentido y antisentido. Estas secuencias pueden introducirse después

en un programa que determine las plantillas oligonucleotídicas de ARNsi de sentido y antisentido. Los programas también pueden usarse para añadir, *por ejemplo,* insertos de tipo horquilla o secuencias de cebadores de promotor T1. También pueden emplearse después kits para construir casetes de expresión de ARNsi.

En diversas realizaciones, los ARNsi se sintetizan *in vivo, in situ,* e *in vitro.* La ARN polimerasa endógena de la célula puede mediar la transcripción *in vivo* o *in situ,* o puede usarse ARN polimerasa clonada para la transcripción *in vivo* o *in vitro.* Para la transcripción de un transgen *in vivo* o una construcción de expresión, una región reguladora (por ejemplo, promotor, potenciador, silenciador, donador y aceptor de corte y empalme, poliadenilación) para transcribir los ARNsi. La inhibición puede dirigirse por transcripción específica en un órgano, tejido o tipo celular; la estimulación de una condición ambiental (por ejemplo, infección, estrés, temperatura, inductores químicos); y/o transcripción por ingeniería genética en una fase o edad del desarrollo. Un organismo transgénico que expresa ARNsi a partir de una construcción recombinante puede producirse por introducción de la construcción en un cigoto, una célula madre embrionaria, u otra célula multipotente derivada del organismo apropiado.

En una realización, el ARNm diana especifica la secuencia de aminoácidos de al menos una proteína tal como una proteína celular (por ejemplo, una proteína nuclear, citoplasmática, transmembrana o asociada a membrana). En otra realización, el ARNm diana de la invención especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína extracelular (por ejemplo, una proteína de la matriz extracelular o proteína secretada). Tal como se usa en el presente documento, la expresión "especifica la secuencia de aminoácidos" de una proteína significa que la secuencia de ARNm se traduce en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con las normas del código genético. Las siguientes clases de proteínas se enumeran con fines ilustrativos: proteínas del desarrollo (por ejemplo, moléculas de adhesión, inhibidores de ciclina cinasa, miembros de la familia Wnt, miembros de la familia Pax, miembros de la familia de hélice alada, miembros de la familia Hox, citocinas/linfocinas y sus receptores, factores de crecimiento/diferenciación y sus receptores, neurotransmisores y sus receptores); proteínas codificadas por oncogenes (por ejemplo, ABLI, BCLI, BCL2, BCL6, CBFA2. CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2, ERBB2, ERBB3, ETSI, ETSI, ETV6, FGR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCLI, MYCN, NRAS, PIM 1, PML, RET, SRC, TALI, TCL3 y YES); proteínas supresoras de tumores (por ejemplo, APC, BRCA1, BRCA2, MADH4, MCC, NF1, NF2, RB 1, TP53 y WTI); y enzimas (por ejemplo, ACC sintasas y oxidasas, ACP desaturasas e hidroxilasas, ADP glucosa piroforilasas, acetilasas y desacetilasas, ATPasas, alcohol deshidrogenasas, amilasas, amiloglucosidasas, catalasas, celulasas, chalcona sintasas, quitinasas, ciclooxigenasas, descarboxilasas, dextrinasas, ADN y ARN polimerasas, galactosidasas, glucanasas, glucosa oxidasas, sintasas de almidón unidas a gránulos, GTPasas, helicasas, hemicelulasas, integrasas, inulinasas, invertasas, isomerasas, cinasas, lactasas, lipasas, lipooxigenasas, lisozimas, nopalina sintasas, octopina sintasas, pectinoesterasas, peroxidasas, fosfatasas, fosfolipasas, fosforilasas, fitasas, sintasas del regulador del crecimiento de plantas, poligalacturonasas, proteinasas y peptidasas, pulanasas, recombinasas, transcriptasas inversas, RUBISCO, topoisomerasas y xilanasas), proteínas implicadas en el crecimiento de tumores (incluyendo la vascularización) o en la actividad o potencial metastásico, incluyendo receptores de superficie celular y ligandos, así como proteínas secretadas, reguladores del ciclo celular, reguladores de genes y proteínas reguladoras de la apoptosis, proteínas reguladoras de la respuesta inmune, la inflamación, el complemento o la coagulación.

Tal como se usa en el presente documento, el término "oncogen" se refiere a un gen que estimula el crecimiento celular y, cuando se reduce su nivel de expresión en la célula, se reduce la velocidad de crecimiento celular o la célula se vuelve quiescente. En el contexto usado en el presente documento, los oncogenes incluyen proteínas intracelulares, así como factores de crecimiento extracelulares que pueden estimular la proliferación celular a través de una función autocrina o paracrina. Los ejemplos de oncogenes humanos contra los que pueden diseñarse ARNsi y construcciones de morfolino incluyen c-myc, c-myb, mdm2, PKA-I (proteína cinasa A tipo I), Abl-1, Bcl2, Ras, c-Raf cinasa, CDC25 fosfatasas, ciclinas, cinasas dependientes de ciclina (cdks), telomerasa, PDGF/sis, erb-B, fos, jun, mos y src, por nombrar algunos. En el contexto de la presente invención, los oncogenes también incluyen un gen de fusión resultado de una translocación cromosómica, por ejemplo, el oncogen de fusión Bcr/Abl.

Las proteínas adicionales incluyen cinasas dependientes de ciclina, c-myb, c-myc, antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) y factor nuclear de factores de transcripción kappaB (NF-.kappa.B), E2F, HER- 2/neu, PKA, TGF-alfa, EGFR, TGF-beta, IGFIR, P12, MDM2, BRCA, Bcl-2, VEGF, MDR, ferritina, receptor de transferrina, IRE, C-fos, HSP27, C-raf y genes de metalotioneína.

El ARNsi empleado puede dirigirse contra la síntesis de una o más proteínas. Además, o como alternativa, puede haber más de un ARNsi dirigido contra una proteína, *por ejemplo,* ARNsi duplicado o ARNsi que corresponde a secuencias diana solapantes o no solapantes contra la misma proteína diana. Por consiguiente, en una realización, dos, tres, cuatro o cualquier pluralidad de ARNsi contra el mismo ARNm diana pueden incluirse en las nanopartículas de la invención. Además, pueden emplearse varios ARNsi dirigidos contra varias proteínas. Como alternativa, el ARNsi puede dirigirse contra moléculas de ARN estructurales o reguladoras que no codifiquen proteínas.

La molécula de ARNm diana puede especificar la secuencia de aminoácidos de una proteína asociada con una afección patológica. Por ejemplo, la proteína puede ser una proteína asociada a un patógeno (por ejemplo, una proteína vírica implicada en la inmunosupresión o inmunoevitación del huésped, la replicación del patógeno, la transmisión del patógeno o el mantenimiento de la infección) o una proteína huésped que facilite la entrada del

patógeno en el huésped, el metabolismo de fármacos por el patógeno o huésped, la replicación o integración del genoma del patógeno, el establecimiento o la propagación de la infección en el huésped o el ensamblaje de la nueva generación de patógeno. Como alternativa, la proteína puede ser una proteína asociada a tumor o una proteína asociada a una enfermedad autoinmune.

En una realización, la molécula de ARNm diana especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína endógena (es decir, una proteína presente en el genoma de una célula u organismo). En otra realización, la molécula de ARNm diana especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína heteróloga expresada en una célula recombinante o un organismo alterado genéticamente. En otra realización, la molécula de ARNm diana especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína codificada por un transgén (es decir, una construcción génica insertada en un sitio ectópico en el genoma de la célula). En otra realización más, la molécula de ARNm diana especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína codificada por un genoma de patógeno que es capaz de infectar a una célula o a un organismo del que procede la célula.

Por inhibición de la expresión de dichas proteínas, puede obtenerse información valiosa respecto a la función de dichas proteínas y a los beneficios terapéuticos que pueden obtenerse a partir de dicha inhibición.

En una realización, las nanopartículas descritas en el presente documento comprenden una o más moléculas de ARNsi para silenciar un gen PDGF beta, gen Erb-B, gen Src, gen CRK, gen GRB2, gen RAS, gen MEKK, gen INK, gen RAF, gen Erkl/2, gen PCNA(p21), gen MYB, gen JIJN, gen FOS, gen BCL-2, gen Ciclina D, gen VEGF, gen EGFR, gen Ciclina A, gen Ciclina E, gen WNT-1, gen beta-catenina, gen c-MET, gen PKC, gen Skp2, gen de proteína del huso de quinesina, gen Bcr-Abl, gen Stat3, gen cSrc, gen PKC, gen Bax, gen Bcl-2, gen EGFR, gen VEGF, gen myc, gen NFKB, gen STAT3, gen survivina, gen Her2/Neu, gen topoisomerasa I, gen PLK1, gen de proteína quinasa 3, gen CD31, gen IGF-1, gen de topoisomerasa II alfa, mutaciones en el gen p73, mutaciones en el gen p21 (WAF 1/CIP 1), mutaciones en el gen p27(KIP1), mutaciones en el gen PPM 1D, mutaciones en el gen RAS, mutaciones en el gen caveolina I, mutaciones en el gen MIB I, mutaciones en el gen MTAI, mutaciones en el gen M68, mutaciones en genes supresores de tumores, mutaciones en el gen de supresor de tumor p53, mutaciones en el miembro de la familia p53 DN-p63, mutaciones en el gen de supresor de tumores pRb, mutaciones en el gen supresor de tumores APC1, mutaciones en el gen supresor de tumores BRCA1, mutaciones en el gen supresor de tumores PTEN, gen de fusión mLL, gen de fusión BCRIABL, gen de fusión TEL/AML1, gen de fusión EWS/FLI1, gen de fusión TLS/FUS1, gen de fusión PAX3/FKHR, gen de fusión AML1/ETO, gen alfa v-integrina, gen del receptor de Fit-i, gen tubulina, gen del virus del papiloma humano, un gen necesario para la replicación del virus del papiloma humano, gen del virus de la inmunodeficiencia humana, un gen necesario para la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana, gen del virus de la hepatitis A, un gen necesario para la replicación del virus de la hepatitis A, gen del virus de la hepatitis B, un gen necesario para la replicación del virus de la hepatitis B, gen del virus de la hepatitis C, un gen necesario para replicación del virus de la hepatitis C, gen del virus de la hepatitis D, un gen necesario para replicación del virus de la hepatitis D, gen del virus de la hepatitis E, un gen necesario para la replicación del virus de la hepatitis E, gen del virus de la hepatitis F, un gen necesario para la replicación del virus de la hepatitis F, gen del virus de la hepatitis G, un gen necesario para la replicación del virus de la hepatitis G, gen del virus de la hepatitis H, un gen necesario para la replicación del virus de la hepatitis H, gen del virus respiratorio sincitial, un gen que es necesario para la replicación del virus respiratorio sincitial, gen de Virus Herpes Simple, un gen que es necesario para la replicación del Virus Herpes Simple, gen de Herpes Citomegalovirus, un gen que es necesario para la replicación de Herpes Citomegalovirus, gen de Virus Herpes Epstein Barr, un gen que es necesario para la replicación del Virus Herpes Epstein Barr, gen del Virus Herpes asociado a Sarcoma de Kaposi, un gen que es necesario para la replicación de Virus Herpes asociado a Sarcoma de Kaposi, gen de Virus JC, gen humano que es necesario para la replicación del Virus JC, gen de mixovirus, un gen que es necesario para la replicación del gen de mixovirus, gen de rinovirus, un gen que es necesario para la replicación de rinovirus, gen de coronavirus, un gen que es necesario para la replicación de coronavirus, gen de Virus del Oeste del Nilo, un gen que es necesario para la replicación del Virus del Oeste del Nilo, gen de la Encefalitis de St. Louis, un gen que es necesario para la replicación de la Encefalitis de St. Louis, gen del virus de la encefalitis por garrapatas, un gen que es necesario para la replicación del virus de la encefalitis por garrapatas, gen del virus de la encefalitis del Valle de Murray, un gen que es necesario para la replicación del virus de la encefalitis del Valle de Murray, gen del virus del dengue, un gen que es necesario para la replicación del gen del virus del dengue, gen del Virus del simio 40, un gen que es necesario para la replicación del Virus del simio 40, gen del Virus Linfotrófico de Linfocitos T Humanos, un gen que es necesario para la replicación del Virus Linfotrófico de Linfocitos T Humanos, gen del Virus de la Leucemia Murina de Moloney, un gen que es necesario para la replicación del Virus de la Leucemia Murina de Moloney, gen del virus de la encefalomiocarditis, un gen que es necesario para la replicación del virus de la encefalomiocarditis, gen del virus del sarampión, un gen que es necesario para la replicación del virus del sarampión, gen del virus de la varicela zóster, un gen que es necesario para la replicación del virus de la varicela zoster, gen de adenovirus, un gen que es necesario para la replicación de adenovirus, gen del virus de la fiebre amarilla, un gen que es necesario para la replicación del virus de la fiebre amarrilla, gen de poliovirus, un gen que es necesario para la replicación de poliovirus, gen de poxvirus, un gen que es necesario para la replicación de poxvirus, gen de Plasmodium, un gen que es necesario para la replicación del gen de Plasmodium, gen de Mycobacterium ulcerans, un gen que es necesario para la replicación de Mycobacterium ulcerans, gen de Mycobacterium tuberculosis, un gen que es necesario para la replicación de Mycobacterium tuberculosis, gen de Mycobacterium leprae, un gen -185-a que es necesario para la replicación de Mycobacterium leprae, gen de Staphyiococcus aureus,

un gen que es necesario para la replicación de Staphylococcus aureus, gen de Streptococcus pneumoniae, un gen que es necesario para la replicación de Streptococcus pneumoniae, gen de Streptococcus pyogenes, un gen que es necesario para la replicación de Streptococcus pyogenes, gen de Chlamydia pneumoniae, un gen que es necesario para la replicación de Chlamydia pneumoniae, gen de Mycoplasma pneumoniae, un gen que es necesario para la replicación de Mycoplasma pneumoniae, un gen de integrina, un gen de selectina, gen del sistema de complemento, gen de quimiocina, gen de receptor de quimiocina, gen GCSF, gen Gro1, gen Gro2, gen Gro3, gen PF4, gen MIG, gen de Pro-Proteína Básica Plaquetaria, gen MIP-11, gen MIP-1J, gen RANTES, gen MCP-1, gen MCP-2, gen MCP-3, gen CMBKR 1, gen CMBKR2, gen CMBKR3, CMBKR5v, gen AIF-1, gen 1-3 09, un gen para un componente de un canal iónico, un gen para un receptor de neurotransmisor, un gen para un ligando de neurotransmisor, gen de la familia amiloide, gen de presenilina, gen HD, gen DRPLA, gen SCA 1, gen SCA2, gen MJD 1, gen CACNL1A4, gen SCA7, gen SCA8, gen alélico encontrado en células LOH o un gen alélico de un gen polimórfico. Pueden encontrarse ejemplos de moléculas de ARNsi pertinentes para silenciar genes y procedimientos de elaboración de moléculas de ARNsi a partir de fuentes comerciales tales como Dharmacon o a partir de las solicitudes de patente siguientes: documentos US2005017667, WO2006066158, WO2006078278, US7.056.704, US7.078.196, US5.898.031, US6.107.094, EP 1144623, EU 1144623. Aunque se enumeran varias dianas de sllenciamiento génico específicas, esta lista es simplemente ilustrativa y también podrían usarse otras moléculas de ARNsi con las nanopartículas de esta Invención.

En una realización, las nanopartículas descritas en el presente documento comprenden una molécula de ARNsi que tiene actividad de iARN contra un ARN, en las que la molécula de ARNsi comprende una secuencia complementaria a cualquier ARN que tenga una secuencia codificante o no codificante, tal como las secuencias a las que se hace referencia por el GenBank n.º de Acceso PCT/US03/05028 (Publicación PCT Internacional N.º WO 03/4654) o conocidas de otro modo en la técnica.

En una realización, las nanopartículas descritas en el presente documento comprenden una molécula de ARNsi que silencia el gen del factor de crecimiento endotelial vascular. En otra realización, las nanopartículas de esta invención comprenden una molécula de ARNsi que silencia el gen del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular.

En otra realización, las nanopartículas descritas en el presente documento comprenden una molécula de ARNsi, en las que la secuencia de la molécula de ARNsi es complementaria a dianas relacionadas con tumores, incluyendo, pero sin limitación, factor I inducible por hipoxia (HIF-1), que se encuentra en células de cáncer de próstata metastásico humano PC3-M (Mol Carcinog. 31 de enero de 2008 [Publicación electrónica antes de impresión]); el gen diana aguas abajo de HIF-1 (Mol Carcinog. 31 de enero de 2008 [Publicación electrónica antes de impresión]), proteínas cinasa activadas por mitógeno (MAPK), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interleucina 12p70 (IL12), receptor del factor de necrosis tumoral inducida por glucocorticoides (GITR), molécula de adhesión Intercelular 1 (ICAM-1), neurotrofina-3 (NT-3), interleucina 17 (IL17), proteína de unión a interleucina 18 a (IL18Bpa) y péptido activador de neutrófilos epiteliales (ENA78) (véase, por ejemplo, "Cytokine profiling of prostatic fluid from cancerous prostate glands identifies cytokines associated with extent of tumor and inflammation", The Prostate Early view Published Online: 24 de marzo de 2008); PSMA (véase, por ejemplo, "Cell-Surface labeling and internalization by a fluorescent inhibitor of prostate-specific membrane antigen" The Prostate Early view Published Online: 24 de marzo de 2008); receptor de andrógenos (AR), queratina, antígeno de membrana epitelial, receptor de EGF y cadherina E (véase, por ejemplo, "Characterization of PacMetUT1, a recently isolated human prostate cancer cell line"); peroxisomes proliferators-activated receptor γ (PPARγ; véase, por ejemplo, The Prostate Volume 68, Edición 6, Fecha: 1 de mayo 2008, Páginas: 588-598); el receptor para productos terminales de glicosilación avanzada (RAGE) y los productos terminales de glicosilación avanzada (AGE), (véase, por ejemplo, "V domain of RAGE interacts with AGEs on prostate carcinoma cells" The Prostate Early view Published Online: 26 de febrero de 2008); el receptor tirosina cinasa erb-B2 (Her2/neu), el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (Met), receptor del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβR1), factor nuclear kappa B (NFkB), Jagged-1, Sonic hedgehog (Shh), Metaloproteinasas de matriz (MMP, esp. MMP-7), receptor de endotelina de tipo A (ET_A), Endotelina-1 (ET-1), subfamilia del receptor nuclear 3, grupo C, miembro 1 (NR3C1), coactivador del receptor nuclear 1 (NCOA1), NCOA2, NCOA3, proteína de unión a E1A p300 (EP300), proteína de unión a CREB (CREBBP), cinasa asociada a Ciclina G (GAK), Gelsolina (GSN), familia de la aldoceto reductasa 1, miembro C1 (AKR1C1), AKR1C2, AKR1C3, Neurotensina (NTS), Enolasa 2 (ENO2), Cromogranina B (CHGB, secretogranina 1), Secretagogina (SCGN, o proteína de unión de calcio a mano EF), Dopa descarboxilasa (DDC, o descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos), coactivador del receptor de esteroides 1 (SRC-1), SRC-2 (también conocido como TIF2), SRC-3 (también conocido como AIB-1) (véase, por ejemplo, "Longitudinal analysis of androgen deprivation of prostate cancer cells identifies pathways to androgen independence" The Prostate Early view Published Online: 26 de febrero de 2008); receptores de estrogenos (ERα, ERβ o GPR30) (véase, por ejemplo, The Prostate Volume 68, Edición 5, Páginas 508 - 516); la molécula de adhesión de células de melanoma (MCAM) (véase, por ejemplo, The Prostate Volume 68, Edición 4, Páginas 418 - 426; factores angiogénicos (tales como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y eritropoyetina), transportadores de glucosa (tales como GLUT1), proteína de interacción 3 de 19 kDa de BCL2/adenovirus E1B (BNIP3) (véase, por ejemplo, The Prostate Volume 68, Edición 3 , Páginas 336 - 343); 5α-reductasa tipos 1 y 2 (véase, por ejemplo, The Journal of Urology Volume 179, Edición 4, Páginas 1235-1242); ERG y ETV1, antígeno específico de próstata (PSA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), antígeno de células madre de próstata (PSCA), α-Metilacil coenzima A racemasa (AMACR), $PCA3^{DD3}$, glutatión-S-transferasa, pi 1 (GSTP1), p16, factor de ADP-ribosilación (ARF), O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT), transcriptasa

inversa de la telomerasa humana (hTERT), antígeno de cáncer de próstata temprano (EPCA), calicreína 2 humana (HK2) y hepsina (véase, por ejemplo, The Journal of Urology Volume 178, Edición 6, Páginas 2252-2259); bromodominio que contiene 2 (BRD2), factor de inicio de la traducción eucariota 4 gamma, 1 (elF4G1), proteína ribosómica L13a (RPL13a) y proteína ribosómica L22 (RPL22) (véase, por ejemplo, N Engl J Med 353 (2005), pág. 1224); HER2/neu, Derlin-1, ERBB2, AKT, ciclooxigenasa-2 (COX-2), PSMD3, CRKRS, PERLD1, y C17ORF37, PPP4C, PARN, ATP6V0C, C16orf14, GBL, HAGH, ITFG3, MGC13114, MRPS34, NDUFB10, NMRAL1, NTHL1, NUBP2, POLR3K, RNPS1, STUB1, TBL3 y USP7.

Por lo tanto, en una realización, la invención comprende una nanopartícula que comprende un ligando de PSMA de bajo peso molecular, un polímero biodegradable, un polímero recubierto, y una molécula de ARNsi. En una realización, la invención comprende una nanopartícula que comprende un ligando de PSMA de bajo peso molecular, un polímero biodegradable, un componente recubierto, y una molécula de ARNsi que silencia el gen del factor de crecimiento endotelial vascular. En una realización, la invención comprende una nanopartícula que comprende un ligando de PSMA de bajo peso molecular, un polímero biodegradable, un componente recubierto, y una molécula de ARNsi que silencia el gen del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular. En otra realización, la invención comprende una nanopartícula que comprende un ligando de PSMA de bajo peso molecular, PLGA, polietilenglicol y una molécula de ARNsi. En una realización, la invención comprende una nanopartícula que comprende un ligando de PSMA de bajo peso molecular, un polímero biodegradable, un componente recubierto y una molécula de ARNsi en la que la nanopartícula puede acumularse selectivamente en la próstata o en el tejido endotelial vascular que rodea un cáncer. En una realización, la invención comprende una nanopartícula que comprende un ligando de PSMA de bajo peso molecular, un polímero biodegradable, un componente recubierto, y una molécula de ARNsi, en la que la nanopartícula puede acumularse selectivamente en la próstata o en el tejido endotelial vascular que rodea un cáncer, y en la que la nanopartícula puede experimentar endocitosis por una célula que exprese PSMA.

En otra realización, los ARNsi que se incorporan en la nanopartícula descrita en el presente documento son los que tratan el cáncer de próstata, tales como los desvelados en la solicitud de Estados Unidos n.º 11/021.159 (la secuencia de ARNsi es complementaria a la SEQ ID No. 8: gaaggccagu uguauggac), y la solicitud de Estados Unidos n.º 11/349.473 (desvela ARNsi que se unen a una región del nucleótido 3023 al 3727 de la SEQ ID No. 1).

En otra realización, los agentes terapéuticos de las nanopartículas de la invención incluyen ARN que pueden usarse para tratar el cáncer, tales como ARNm antisentido y microARN. Los ejemplos de microARN que pueden usarse como agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer incluyen los desvelados en Nature 435 (7043): 828-833; Nature 435 (7043): 839-843; y Nature 435 (7043): 834-838.

Uso en procedimientos de tratamiento

En algunas realizaciones, las partículas dirigidas descritas en el presente documento pueden usarse para tratar, mitigar, mejorar, aliviar, retrasar la aparición de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, pueden usarse partículas dirigidas de la invención para tratar un cáncer y/o células cancerosas. En determinadas realizaciones, pueden usarse partículas dirigidas de la invención para tratar cualquier cáncer en el que se exprese PSMA en la superficie de las células cancerosas o en la neovasculatura del tumor en un sujeto que lo necesite, incluyendo la neovasculatura de tumores sólidos de próstata o distintos de próstata. Los ejemplos de la indicación relacionada con PSMA incluyen, pero sin limitación, cáncer de próstata, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma colorrectal y glioblastoma.

El término "cáncer" incluye cánceres preneoplásicos, así como neoplásicos. Los cánceres incluyen, pero sin limitación, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de piel, por ejemplo, melanomas o carcinomas de células basales, cáncer de pulmón, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de bronquios, cáncer pancreático, cáncer de vejiga urinaria, cáncer cerebral o del sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer esofágico, cáncer de la cavidad oral o la faringe, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de testículos, cáncer de conductos biliares, cáncer de apéndice o intestino delgado, cáncer de glándula salival, cáncer de glándula tiroidea, cáncer de glándula adrenal, osteosarcoma, condrosarcoma, cáncer de tejidos hematológicos y similares. Las "células cancerosas" pueden estar en forma de un tumor, existir en solitario dentro de un sujeto (por ejemplo, células de leucemia) o ser líneas celulares derivadas de un cáncer.

El cáncer puede estar asociado con una diversidad de síntomas físicos. Los síntomas de cáncer dependen generalmente del tipo y de la localización del tumor. Por ejemplo, el cáncer pulmonar puede causar tos, falta de aliento y dolor torácico, mientras que el cáncer de colon causa con frecuencia diarrea, estreñimiento y sangre en las heces. Sin embargo, para proporcionar algunos ejemplos, los síntomas siguientes se asocian en general con muchos cánceres: fiebre, escalofríos, sudores nocturnos, tos, disnea, pérdida de peso, pérdida de apetito, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, anemia, ictericia, hepatomegalia, hemoptisis, fatiga, malestar, disfunción cognitiva, depresión, alteraciones hormonales, neutropenia, dolor, úlceras no cicatrizantes, ganglios linfáticos aumentados de tamaño, neuropatía periférica y disfunción sexual.

Se describe en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata). En algunas realizaciones, el tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente

eficaz de partículas dirigidas descritas en el presente documento a un sujeto que lo necesite, en dichas cantidades y durante tanto tiempo como sea necesario para conseguir el resultado deseado. En determinadas realizaciones, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una partícula dirigida es la cantidad eficaz para tratar, mitigar, mejorar, aliviar, retrasar la aparición de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características del cáncer.

Se describe en el presente documento un procedimiento para administrar composiciones a un sujeto que padece cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata). En algunas realizaciones, partículas a un sujeto en dichas cantidades y durante tanto tiempo como sea necesario para conseguir el resultado deseado (es decir, el tratamiento del cáncer). En determinadas realizaciones, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una partícula dirigida es la cantidad eficaz para tratar, mitigar, mejorar, aliviar, retrasar la aparición de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características del cáncer.

Los protocolos terapéuticos implican administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula dirigida a un individuo sano (es decir, un sujeto que no presenta ningún síntoma de cáncer y/o al que no se le haya diagnosticado cáncer). Por ejemplo, los individuos sanos pueden "inmunizarse" con una partícula dirigida antes del desarrollo de cáncer y/o de la aparición de los síntomas de cáncer; los individuos en riesgo (por ejemplo, pacientes que tienen antecedentes familiares de cáncer; pacientes que llevan una o más mutaciones genéticas asociadas con el desarrollo de cáncer; pacientes que tienen un polimorfismo genético asociado con el desarrollo de cáncer; pacientes infectados por un virus asociado con el desarrollo de cáncer; pacientes con hábitos y/o estilos de vida asociados con el desarrollo de cáncer; etc.) pueden tratarse sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo, en un intervalo de 48 horas, en un intervalo de 24 horas o en un intervalo de 12 horas desde) la aparición de síntomas del cáncer. Por supuesto, los individuos que se sabe que tienen cáncer pueden recibir el tratamiento de la invención en cualquier momento.

En otras realizaciones, las nanopartículas descritas en el presente documento pueden usarse para inhibir el crecimiento de células cancerosas, *por ejemplo,* células de cáncer de próstata. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "inhibe el crecimiento de células cancerosas" o "que inhibe el crecimiento de células cancerosas" se refiere a cualquier ralentización de la velocidad de la proliferación y/o migración de células cancerosas, detención de la proliferación y/o migración de células cancerosas, o destrucción de células cancerosas, de modo que la velocidad de crecimiento de células cancerosas se reduce en comparación con la velocidad de crecimiento observada o esperada de una célula cancerosa de control sin tratar. La expresión "inhibe el crecimiento" también puede referirse a una reducción en el tamaño o a la desaparición de una célula cancerosa o tumor, así como a una reducción en su potencial metastásico. Preferentemente, dicha inhibición a nivel celular puede reducir el tamaño, impedir el crecimiento, reducir la agresividad o prevenir o inhibir la metástasis de un cáncer en un paciente. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente, por cualquiera de una diversidad de indicios adecuados, si se inhibe el crecimiento de células cancerosas.

La inhibición del crecimiento de células cancerosas puede ponerse de manifiesto, por ejemplo, por detención de células cancerosas en una fase particular del ciclo celular, *por ejemplo,* detención en la fase G2/M del ciclo celular. La inhibición del crecimiento de células cancerosas también puede ponerse de manifiesto por medición directa o indirecta de células cancerosas o del tamaño tumoral. En pacientes con cáncer humanos, dichas mediciones se realizan generalmente usando procedimientos de formación de imágenes bien conocidos tales como formación de imágenes de resonancia magnética, tomografía axial computarizada y rayos X. También puede determinarse el crecimiento de células cancerosas indirectamente, tal como por determinación de los niveles de antígeno carbinoembrionario circulante, antígeno específico de próstata u otros antígenos específicos de cáncer que estén correlacionados con el crecimiento de células cancerosas. La inhibición del crecimiento del cáncer también se correlaciona generalmente con una supervivencia prolongada y/o una salud y bienestar aumentados del sujeto.

Composiciones farmacéuticas

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa una carga no tóxica inerte sólida, semisólida o líquida, diluyente, material encapsulante o adyuvante de formulación de cualquier tipo. Remington’s Pharmaceutical Sciences. Ed. de Gennaro, Mack Publishing, Easton, Pa., 1995 desvela diversos vehículos usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Algunos ejemplos representativos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetil celulosa sódica, etil celulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales coma manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles tales como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; detergentes tales como TWEEN™ 80; agentes tamponantes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua apirógena; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; y soluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como lauril sulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, saporíferos y perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, de acuerdo con el juicio del

formulador. Si no son factibles procedimientos de filtración u otros procedimientos de esterilización terminal, las formulaciones pueden fabricarse en condiciones asépticas.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente por cualquier medio conocido

en la técnica incluyendo vías oral y parenteral. El término "paciente", como se usa en el presente documento, se refiere a seres humanos, así como a no humanos, incluyendo, por ejemplo, mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. Por ejemplo, los no humanos pueden ser mamíferos (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, un primate o un cerdo). En ciertas realizaciones, son deseables vías parenterales puesto que evitan el contacto con las enzimas digestivas que se encuentran en el canal alimentario. De acuerdo con dichas realizaciones, las composiciones pueden administrarse por inyección (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular, intraperitoneal), por vía rectal, vaginal, tópica (en forma de polvos, cremas, pomadas o gotas), o por inhalación (en forma de pulverizaciones).

En una realización particular, las nanopartículas descritas en el presente documento se administran a un sujeto que lo necesite por vía sistémica, *por ejemplo,* por infusión o inyección IV.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones inyectables estériles acuosas u oleaginosas, pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua,, solución de Ringer, U.S.P. y solución de cloruro sódico isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites estériles fijos como disolvente o medio de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite fijo suave incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. En una realización, el conjugado de la invención se suspende en un fluido de vehículo que comprende carboximetil celulosa sódica al 1 % (p/v) y TWEEN™ 80 y al 0,1 % (v/v). Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o por incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes del uso.

Las composiciones para administración rectal o vaginal pueden ser supositorios que pueden prepararse por mezcla del conjugado de la invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio que sea sólida a temperatura ambiente pero líquida a temperatura corporal y, por lo tanto, se funden en el recto o en la cavidad vaginal y liberan el conjugado.

Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de una composición farmacéutica incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizadores, inhaladores o parches. El conjugado de la invención se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario según se requiera. Las formulaciones oftalmológicas, gotas óticas y colirios, también se contemplan. Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de los conjugados de esta invención, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc o mezclas de los mismos. Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar la administración controlada de un compuesto al cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden prepararse por disolución o dispensación de los conjugados de la invención en un medio apropiado. También pueden usarse potenciadores de absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de la velocidad o por dispersión de los conjugados de la invención en una matriz o gel polimérico.

Los polvos y pulverizadores pueden contener, además de los conjugados descritos en el presente documento, excipientes, tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida o mezclas de los mismos. Las pulverizaciones pueden contener además propulsores habituales tales como clorofluorohidrocarburos.

Cuando se administran por vía oral, las micropartículas pueden estar, pero no necesariamente, encapsuladas. Se conocen en la técnica una diversidad de sistemas de encapsulación adecuados ("Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," Editado por Doubrow, M., CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz y Langer J. Control. Release 5:13, 1987; Mathiowitz y col. Reactive Polymers 6:275, 1987; Mathiowitz y col. J. Appl. Polymer Sci. 35:755, 1988; Langer Ace. Chem. Res. 33:94,2000; Langer J. Control. Release 62:7,1999; Uhrich y col. Chem. Rev. 99:3181,1999; Zhou y col. J. Control. Release 75:27, 2001; y Hanes y col. Pharm. Biotechnol. 6:389,1995). Los conjugados pueden encapsularse dentro de microesferas poliméricas biodegradables o liposomas. Los ejemplos de polímeros naturales y sintéticos útiles en la preparación de microesferas biodegradables incluyen carbohidratos tales como alginato, celulosa, polihidroxialcanoatos, poliamidas, polifosfacenos, polipropilfumaratos, poliéteres, poliacetales, policianoacrilatos, poliuretanos biodregadables, policarbonatos, polianhídridos, polihidroxiácidos, poli(ortoésteres) y otros poliésteres biodegradables. Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina,

esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden ser líquidas o sólidas. Las formas de dosificación liquida adecuadas para la administración oral de composiciones de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de un conjugado encapsulado o no encapsulado, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados de manera común en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceite de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitano y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saporíferos y perfumantes. Tal como se usa en el presente documento, el término "adyuvante" se refiere a cualquier compuesto que es un modulador inespecífico de la respuesta inmune. En determinadas realizaciones, el adyuvante estimula la respuesta inmune. Puede usarse cualquier adyuvante. Se conocen en la técnica un gran número de compuestos adyuvantes (Allison Dev. Biol. Stand. 92:3-11, 1998; Unkeless y col. Annu. Rev. Immunol. 6:251-281,1998; y Phillips y col. Vaccine 10:151-158,1992).

Las formas de dosificación sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el conjugado encapsulado o no encapsulado se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte farmacéuticamente aceptable tal como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o (a) cargas o diluyentes tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidinona, sacarosa y goma arábiga, (c) humectantes tales como glicerol, (d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico, (e) agentes retardantes de la disolución tales como parafina, (f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) absorbentes tales como caolín y arcilla bentonita e (i) lubricantes tales como talco, estearato cálcico, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes tamponantes.

Las composiciones sólidas de tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas rellenas de gelatina dura o blanda usando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas tales como el recubrimiento entérico y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica.

Se apreciará que la dosificación exacta de la partícula dirigida a PSMA se selecciona por el médico individual en vista del paciente a tratar, por lo general, la dosificación y la administración se ajustan para proporcionar una cantidad eficaz de la partícula dirigida a PSMA al paciente a tratar. Tal como se usa en el presente documento, la "cantidad eficaz" de una partícula dirigida a PSMA se refiere a la cantidad necesaria para generar la respuesta biológica deseada. Como apreciarán los expertos en la técnica, la cantidad eficaz de partícula dirigida a PSMA puede variar dependiendo de factores tales como el criterio de valoración biológico deseado, el fármaco a administrar, el tejido diana, la ruta de administración, etc. Por ejemplo, la cantidad eficaz de partícula dirigida a PSMA que contiene un fármaco anticanceroso podría ser la cantidad que dé como resultado una reducción del tamaño tumoral en una cantidad deseada a lo largo de un periodo de tiempo deseado. Los factores adicionales que deben tenerse en cuenta incluyen la gravedad de la patología; edad, el peso y el género del paciente a tratar; la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración; combinaciones de fármacos; sensibilidades de reacción; y la tolerancia/respuesta a la terapia.

Las nanopartículas desveladas en el presente documento pueden formularse en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma unitaria de dosificación", como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente discreta de nanopartícula apropiada para el paciente a tratar. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones de la presente invención lo decidirá el médico adjunto dentro del alcance del buen criterio médico. Para cualquier nanopartícula, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, habitualmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también se usa para conseguir un intervalo de concentraciones y una vía de administración deseables. Después, dicha información puede usarse para determinar dosis y vías de administración útiles en seres humanos. La eficacia y la toxicidad terapéutica de las nanopartículas pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, *por ejemplo,* DE_{50} (la dosis es terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) y DL_{50} (la dosis es letal para el 50 % de la población). La relación de dosis de efectos tóxicos con respecto a terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la relación DL_{50}/DE_{50}. Las composiciones farmacéuticas que presentan índices terapéuticos grandes pueden ser útiles en algunas realizaciones. Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos.

Cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente puede usarse en kits, opcionalmente con instrucciones para administrar cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento por cualquier técnica adecuada como se ha descrito previamente, por ejemplo, oral, intravenosa, dispositivo de administración implantable o bomba, o a través de otra ruta conocida de administración farmacológica. Las "instrucciones" pueden definir un componente de promoción, y típicamente implican instrucciones escritas en o asociadas con el envasado de composiciones de la invención. Las instrucciones también pueden incluir cualquier instrucción oral o electrónica proporcionada de cualquier forma. El "kit" define típicamente un envase que incluye una cualquiera o una combinación de las composiciones descritas en el presente documento y las instrucciones, pero también puede incluir la composición descrita en el presente documento e instrucciones de cualquier forma que se proporcionen en relación con la composición de forma tal que un profesional clínico reconocerá claramente que las instrucciones deben asociarse con la composición específica.

Los kits descritos en el presente documento también pueden contener uno o más recipientes, que pueden contener la composición y otros ingredientes como se han descrito previamente. Los kits también pueden contener instrucciones para la mezcla, dilución y/o administración de las composiciones descritas en el presente documento en algunos casos. Los kits también pueden incluir otros recipientes con uno o más disolventes, tensioactivos, conservantes y/o diluyentes (por ejemplo, solución salina normal (NaCl al 0,9 %) o dextrosa al 5 %), así como recipientes para la mezcla, dilución o administración de los componentes en una muestra o a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

Las composiciones del kit pueden proporcionarse como cualquier forma adecuada, por ejemplo, como soluciones líquidas o como polvos secos. Cuando la composición proporcionada es un polvo seco, la composición puede reconstituirse por adición de un disolvente adecuado, que también puede proporcionarse. En realizaciones en las que se usan formas líquidas de la composición, la forma líquida puede estar concentrada o lista para usar. El disolvente dependerá de la nanopartícula y del modo de uso o administración. Se conocen bien disolventes adecuados para composiciones farmacológicas, por ejemplo, como se han descrito previamente, y están disponibles en la bibliografía. El disolvente dependerá de la nanopartícula y del modo de uso o administración.

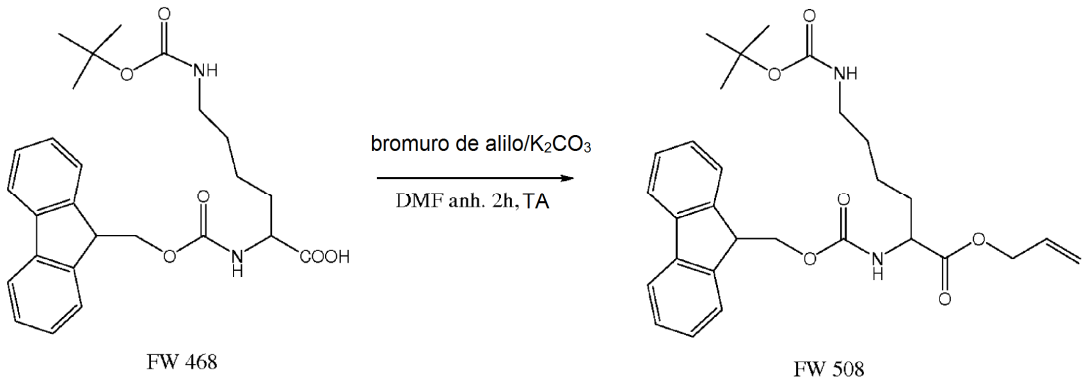
La promoción de la administración de cualquiera de las nanopartículas se describe también en el presente documento. En algunas realizaciones, se promueve una o más composiciones descritas en el presente documento para la prevención o el tratamiento de diversas enfermedades tales como las descritas en el presente documento a través de la administración de una cualquiera de las composiciones de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, "promovido" incluye todos los procedimientos de hacer negocios incluyendo procedimientos de educación, hospital y otra instrucción clínica, actividad de la industria farmacéutica incluyendo ventas farmacéuticas, y cualquier publicidad u otra actividad promocional incluyendo comunicación escrita, oral y electrónica de cualquier forma asociada con composiciones descritas en el presente documento.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar ciertas realizaciones de la presente invención, pero no ilustran el alcance completo de la invención.

Ejemplos

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos. Los ejemplos no deberían interpretarse como adicionalmente limitantes.

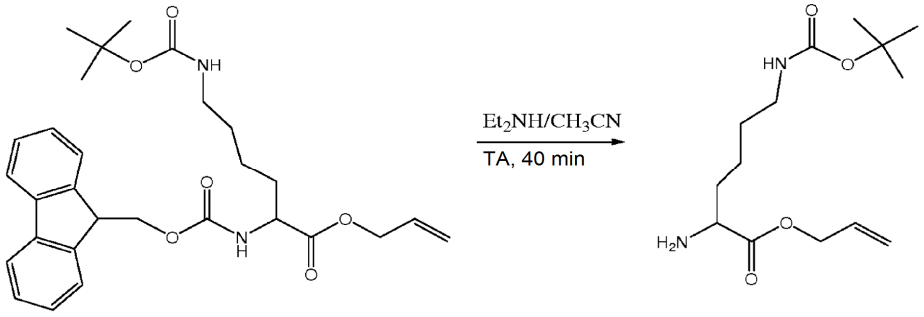
Ejemplo 1: Síntesis de un ligando de PSMA de bajo peso molecular (GL2)



FW 468 FW 508

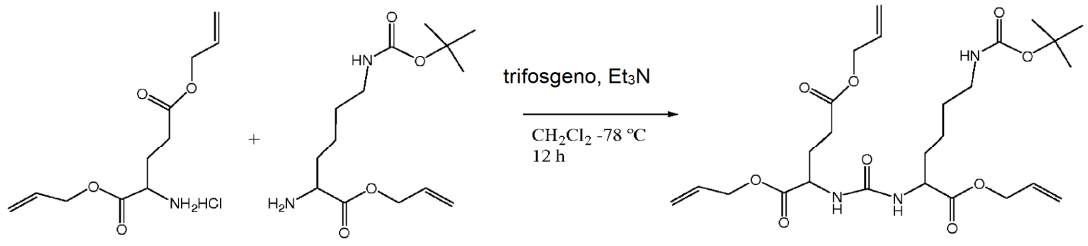
Se disolvieron 5 g (10,67 mmol) del compuesto de partida en 150 ml de DMF anhidra. A esta solución se le añadieron bromuro de alilo (6,3 ml, 72 mmol) y K_2CO_3 (1,47 g, 10,67 mmol). La reacción se agitó durante 2 h, el disolvente se eliminó, el material en bruto se disolvió en AcOEt y se lavó con H_2O hasta un pH neutro. La fase

orgánica se secó con $MgSO_4$ (anhidro) y se evaporó para dar 5,15 g (95 %) del material. (TLC en CH_2Cl_2:MeOH 20:1 Fr = 0,9, Fr del compuesto de partida = 0,1, revelada con ninhidrina y luz uv).



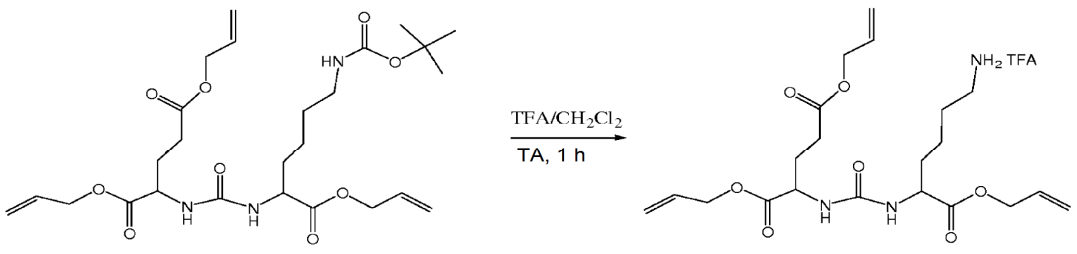
FW 508 FW 286

A una solución del compuesto (5,15 g, 10,13 mmol) en CH_3CN (50 ml) se le añadió Et_2NH (20 ml, 0,19 mol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. El disolvente se eliminó y el compuesto se purificó por cromatografía en columna (Hexano:AcOEt, 3:2) para dar 2,6 g (90 %). (TLC en CH_2Cl_2:MeOH, 10:1 Fr = 0,4, revelada con ninhidrina (el compuesto tiene un color violeta). RMN ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 5,95-5,85 (m, 1H, -CH_2CHCH_2), 5,36-5,24 (m, 2H, -CH_2CHCH_2), 4,62-4,60 (m, 3H, -CH_2CHCH_2, NHBoc), 3,46 (t, 1H, CH(Lys)), 3,11-3,07 (m, 2H, CH_2NHBoc), 1,79 (s a, 2H, NH_2), 1,79-1,43 (m, 6H, 3CH_2(Lys)), 1,43 (s, 9H, Boc).



FW 263.7 FW 286 FW 539

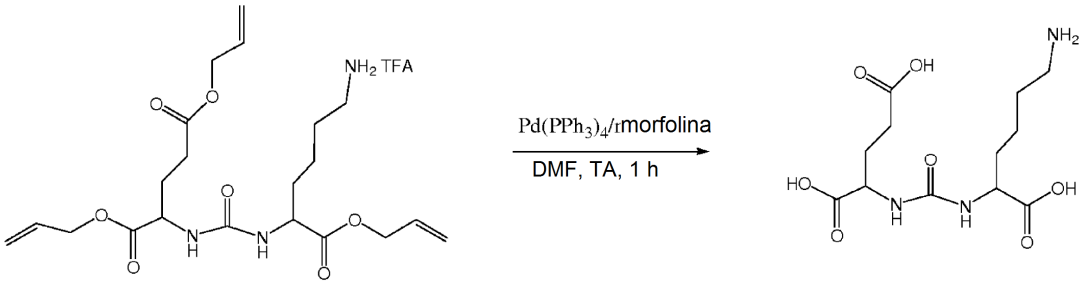
A una solución agitada de glutamato de dialilo (3,96 g, 15 mmol) y trifosgeno (1,47 g, 4,95 mmol) en CH_2Cl_2 (143 ml) a -78 ºC se le añadió Et_3N (6,4 ml, 46 mmol) en CH_2Cl_2 (28 ml). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1,5 h. Después, se añadió el derivado de lisina (2,6 g, 9,09 mmol) en una solución de CH_2Cl_2 (36 ml) a -78 ºC 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 sobre $MgSO_4$ (anh.) y se purificó por cromatografía en columna (Hexano:AcOEt, 3:1 → 2:1 → AcOEt) para dar 4 g (82 %) (TLC en CH_2Cl_2:MeOH, 20:1 Fr = 0,3, revelada con ninhidrina). RMN ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 5,97-5,84 (m, 3H, 3-CH_2CHCH_2), 5,50 (t a, 2H, 2NHurea), 5,36-5,20 (m, 6H, 3-CH_2CHCH_2), 4,81 (s a, 1H, NHBoc), 4,68-4,40 (m, 8H, 3-CH_2CHCH_2, CH(Lys), CH(glu)), 3,09-3,05 (m, 2H, CH_2NHBoc), 2,52-2,39 (m, 2H, CH_2(glu.)), 2,25-2,14 y 2,02-1,92 (2m, 2H, CH_2(glu.)), 1,87-1,64 (m, 4H, 2CH_2(Lys)), 1,51-1,35 (m, 2H, CH_2(Lys)), 1,44 (s, 9H, Boc).



FW 539 FW 553

A una solución del compuesto (4 g, 7,42 mmol) en CH_2Cl_2 seco (40 ml) se le añadió a 0 ºC TFA (9 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se eliminó al vacío hasta sequedad completa, para dar

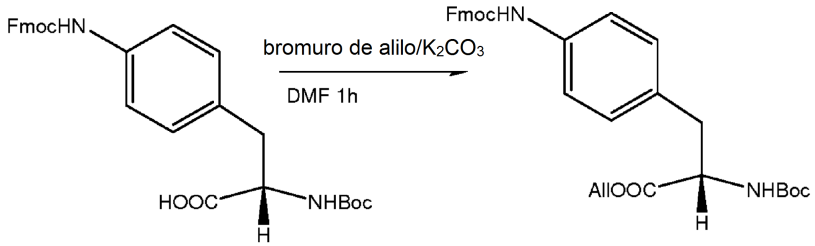
4,1 g (cuantitativo). (TLC en CH_2Cl_2:MeOH, 20:1 Fr = 0,1, revelada con ninhidrina). RMN ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 6,27-6,16 (2d, 2H, 2NHurea), 5,96-5,82 (m, 3H, 3-CH_2CHCH_2), 5,35-5,20 (m, 6H, 3-CH_2CHCH_2), 4,61-4,55 (m, 6H, 3- CH_2CHCH_2), 4,46-4,41 (m, 2H, CH(Lys), CH(glu)), 2,99 (m, 2H, CH_2NHBoc), 2,46 (m, 2H, CH_2(glu.)), 2,23-2,11 y 2,01-1,88 (2m, 2H, CH_2(glu.)), 1,88-1,67 (m, 4H, $2CH_2$(Lys)), 1,45 (m, 2H, CH_2(Lys)).



FW 553 FW 319

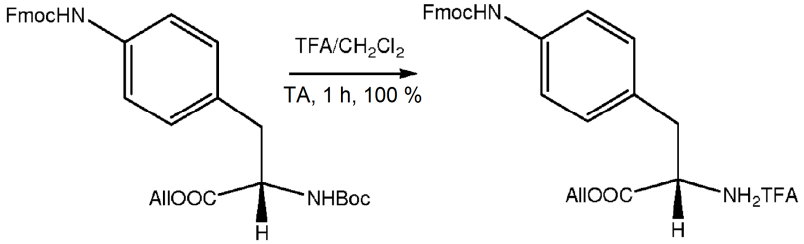
A una solución del compuesto (2 g, 3,6 mmol) en DMF (anh.) (62 ml) en una atmósfera de argón se le añadieron $Pd(PPh_3)_4$ (0,7 g, 0,6 mmol) y morfolina (5,4 ml, 60,7 mmol) a 0 ºC. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se eliminó. El producto en bruto se lavó dos veces con CH_2Cl_2, y después se disolvió en H_2O. A esta solución se le añadió una solución diluida de NaOH (0,01 N) hasta que el pH fue muy básico. El disolvente se eliminó a presión reducida. El sólido se lavó de nuevo con CH_2Cl_2, AcOEt, y una mezcla de MeOH-CH_2Cl_2 (1:1), se disolvió en H_2O y se neutralizó con resina Amberlite IR-120 H^+. El disolvente se evaporó, y el compuesto se precipitó con MeOH, para dar 1 g (87 %) de GL2. RMN ^1H (D_2O, 300 MHz) δ 4,07 (m, 2H, C*H*(Lys), C*H*(glu)), 2,98 (m, 2H, CH_2NH_2), 2,36 (m, 2H, CH_2(glu.)), 2,08-2,00 (m, 1H, CH_2(glu)), 1,93-1,60 (m, 5H, CH_2(glu.), 2CH_2(Lys)), 1,41 (m, 2H, CH_2(Lys)). IEN de masa: 320,47 [M + H^+], 342,42 [M + Na^+].

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



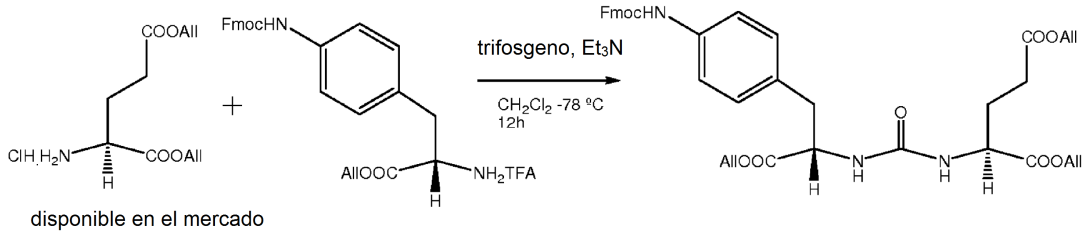
disponible en el mercado

Se disolvieron 130 mg (0,258 mmol) del compuesto de partida en 3 ml de DMF (anh.) A esta solución se le añadieron bromuro de alilo (150 µl, 1,72 mmol) y K_2CO_3 (41 mg, 0,3 mmol). La reacción se agitó durante 1 h, el disolvente se eliminó, el producto en bruto se disolvió en AcOEt y se lavó con H_2O hasta un pH neutro. La fase orgánica se secó con $MgSO_4$ (anh.) y se evaporó para dar 130 mg (93 %). (TLC en CH_2Cl_2:MeOH, 20:1 Fr = 0,9, Fr del compuesto de partida = 0,1, revelada con ninhidrina y luz uv). RMN ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.81-7.05 (12H, aromáticos), 6,81 (s a, 1H, NHFmoc), 5,93-5,81 (m, 1H, -CH_2CHCH_2), 5,35-5,24 (m, 2H, -CH_2CHCH_2), 5,00 (d a, 1H, NHboc), 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).



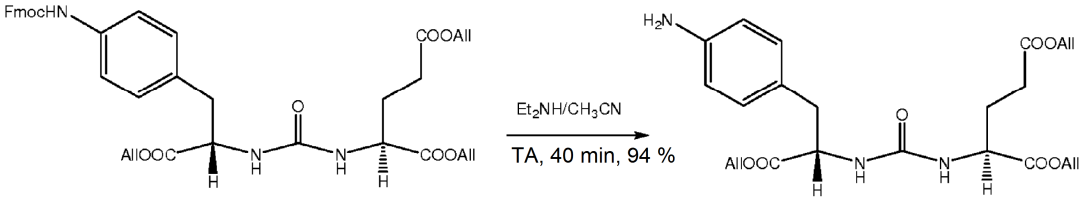
A una solución del compuesto (120 mg, 0,221 mmol) en CH_2Cl_2 seco (2 ml) se le añadió a 0 ºC TFA (1 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se eliminó al vacío, se añadió agua y se eliminó

de nuevo, se añadió CH_2Cl_2 y se eliminó de nuevo hasta sequedad completa para dar 120 mg (cuantitativo). (TLC en CH_2Cl_2:MeOH, 20:1 Fr = 0,1, revelada con ninhidrina y luz uv). RMN ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7,80-7,00 (13H, aromáticos, N*H*Fmoc), 5,90-5,75 (m, 1H, -CH_2CHCH_2), 5,35-5,19 (m, 3H, -CH_2CHCH_2, N*H*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.)).

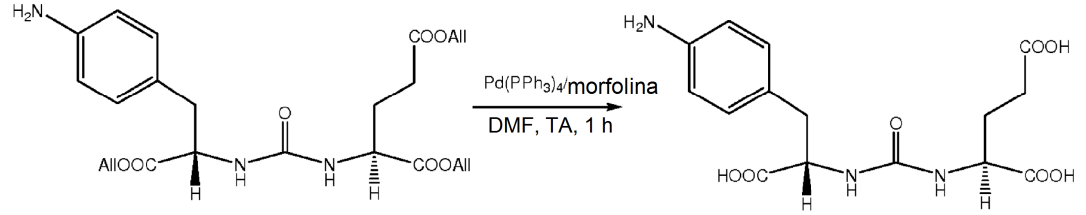


disponible en el mercado

A una solución agitada de glutamato de dialilo (110 mg, 0,42 mmol) y trifosgeno (43 mg, 0,14 mmol) en CH_2Cl_2 (4 ml) a -78 ºC se le añadió Et_3N (180 µl, 1,3 mmol) en CH_2Cl_2 (0,8 ml). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1,5 h. Después, se añadió el derivado de fenilalanina (140 mg, 0,251 mmol) en una solución de CH_2Cl_2 (1 ml) y Et_3N (70 µl, 0,5 mmol) a - 78 ºC 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 sobre $MgSO_4$ (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 Fr = 0,3, revelada con ninhidrina y luz uv). RMN ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7,80-6,95 (13H, aromáticos, NHFmoc), 5,98-5,82 (m, 3H, 3-CH_2CHCH_2), 5,54 (d a, 1H, NHurea), 5,43-5,19 (m, 7H, 3-CH_2CHCH_2, NHurea), 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.)).



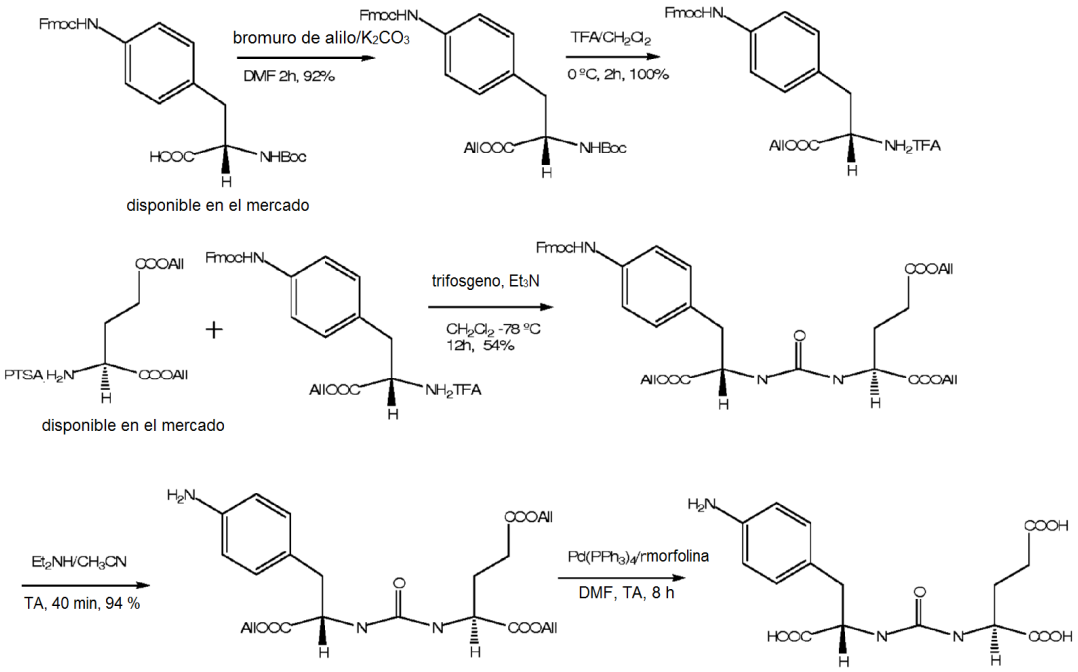
A una solución del material de partida (60 mg, 0,086 mmol) en CH_3CN (1 ml) se le añadió Et_2NH (1 ml, 10 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. El disolvente se eliminó y el compuesto se purificó por cromatografía en columna (Hexano:AcOEt, 2:1) para dar 35 mg (85 %). (TLC en CH_2Cl_2:MeOH, 10:1 Fr = 0,5, Fr del compuesto de partida = 0,75, revelada con ninhidrina (el compuesto tiene un color violeta) y luz uv). RMN ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 6,85 y 6,55 (2d, 4H, aromáticos), 5,98-5,82 (m, 3H, 3-CH_2CHCH_2), 5,56 (d a, 1H, NHurea), 5,44-5,18 (m, 7H, 3-CH_2CHCH_2, NHurea), 4,79-4,72 (m, 1H, CH(pheala.)), 4,65-4,49 (m, 7H, 3-CH_2CHCH_2, CH(glu.)), 3,64 (s a, 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 una atmósfera de argón se le añadieron $Pd(PPh_3)_4$ (21 mg, 0,018 mmol) y morfolina (154 µl, 1,77 mmol) a 0 ºC. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se eliminó. El material en bruto se lavó dos veces con CH_2Cl_2, y se disolvió en H_2O. A esta solución se le añadió una solución diluida de NaOH (0,01 N) hasta que el pH fue muy básico. El disolvente se eliminó a presión reducida. El sólido se lavó de nuevo con CH_2Cl_2, AcOEt, y la mezcla de MeOH-CH_2Cl_2 (1:1), se disolvió en H_2O y se neutralizó con resina Amberlite IR-120 H^+. El disolvente se evaporó, y el compuesto se precipitó con MeOH, para dar 25 mg (67 %) de GL1. RMN ^1H (D_2O, 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_2(pheala.)), 2,22-2,11 (m, 2H, CH_2(glu.)), 2,05-1,70 (2m, 2H, CH_2(glu.)). RMN ^{13}C (D_2O, 75 MHz) δ 176,8, 174,5, 173,9 (3 COO), 153,3 (NHCONH), 138,8 (H_2N-C(Ph)), 124,5, 122,9, 110,9 (aromáticos), 51,3 (CH(pheala.)), 49,8 (CH(glu.)), 31,8 (CH_2(pheala.)), 28,4 y 23,6 (2CH_2-glu.)). IEN de masa: 354,19 [M + H^+], 376,23 [M + Na^+].

Ejemplo 3: Preparación de nanopartículas

Un ejemplo no limitante de la preparación de las nanopartículas de la invención puede prepararse usando el procedimiento de síntesis mostrado en la figura 1B, en el que el ligando es, por ejemplo, GL1 o GL2. El inhibidor de PSMA a base de urea GL2, que tiene un grupo amino libre situado en una región no crítica para la unión a PSMA, se sintetiza a partir de materiales de partida disponibles en el mercado Boc-Phe(4NHFmoc)-OH y ácido dialil glutámico, de acuerdo con el procedimiento mostrado en el Esquema 1. El análogo se une a un copolímero dibloque de PLGA-PEG que tiene un grupo carboxilo en el extremo terminal libre del PEG usando una química de conjugación convencional, por ejemplo, a través del uso de carbodiimida EDC y N-hidroxisuccinimida soluble en agua. Las nanopartículas se forman usando nanoprecipitación: El conjugado de polímero-ligando se disuelve en un disolvente orgánico miscible en agua junto con otro agente farmacológico para realizar un seguimiento de la captación de partículas. Puede incluirse un polímero no funcionalizado adicional para modular la densidad superficial de ligando. La solución de polímero se dispersa en una fase acuosa y las partículas resultantes se recogen por filtración. Las partículas pueden secarse o ensayarse inmediatamente para determinar la captación celular in vitro o la actividad anti-tumor de próstata in vivo.



Esquema 1

Usando el procedimiento descrito anteriormente, podía prepararse una diversidad de nanopartículas recubiertas específicas de diana, tales como nanopartículas que comprenden PEG, PLA o PLGA, los productos quimioterapéuticos descritos en el presente documento, y GL1 o GL2. Se muestran en la tabla a continuación ejemplos específicos de nanopartículas que pueden prepararse:

Agente terapéutico	Polímero biocompatible	Polímero recubierto	Resto de direccionamiento
mitoxantrona	PLGA	PEG	GL1
mitoxantrona	PLA	PEG	GL1
mitoxantrona	PGA	PEG	GL1
mitoxantrona	PLGA	PEG	GL2
mitoxantrona	PLA	PEG	GL2
mitoxantrona	PGA	PEG	GL2
mitoxantrona	PLGA	PEG-DSPE	GL1
mitoxantrona	PLA	PEG-DSPE	GL1
mitoxantrona	PGA	PEG-DSPE	GL1
mitoxantrona	PLGA	PEG-DSPE	GL2
mitoxantrona	PLA	PEG-DSPE	GL2

(continuación)

Agente terapéutico	Polímero biocompatible	Polímero recubierto	Resto de direccionamiento
mitoxantrona	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
doxorrubicina	PLGA	PEG	GL1
doxorrubicina	PLA	PEG	GL1
doxorrubicina	PGA	PEG	GL1
doxorrubicina	PLGA	PEG	GL2
doxorrubicina	PLA	PEG	GL2
doxorrubicina	PGA	PEG	GL2
doxorrubicina	PLGA	PEG-DSPE	GL1
doxorrubicina	PLA	PEG-DSPE	GL1
doxorrubicina	PGA	PEG-DSPE	GL1
doxorrubicina	PLGA	PEG-DSPE	GL2
doxorrubicina	PLA	PEG-DSPE	GL2
doxorrubicina	PGA	PEG-DSPE	GL2
gemcitabina	PLGA	PEG	GL1
gemcitabina	PLA	PEG	GL1
gemcitabina	PGA	PEG	GL1
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

(continuación)

Agente terapéutico	Polímero biocompatible	Polímero recubierto	Resto de direccionamiento
paclitaxel	PLA	PEG-DSPE	GL2
paclitaxel	PGA	PEG-DSPE	GL2
daunorrubicina	PLGA	PEG	GL1
daunorrubicina	PLA	PEG	GL1
daunorrubicina	PGA	PEG	GL1
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 4: Unión/captación de nanopartículas mediada por resto de direccionamiento de molécula pequeña en células LNcap

La unión y captación de nanopartículas (NP-GL1, NP-GL2) con ligandos unidos a superficie GL1 (basado en ácido glutámico/4-amino-fenilalanina) y GL2 (basado en ácido glutámico/lisina) por células LNCap que expresan altos niveles de PSMA se ensayó por comparación con nanopartículas (NP) de PLGA-PEG desnudas como control negativo y NP que llevaban aptámero (Apt) de antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) A10 terminado en amina (NP-Apt) como control positivo. La captación de NP-GL1, NP-GL2, NP y NP-Apt por células LNCap y células PC3 que expresan bajos niveles de PSMA se comparó con la unión/captación mediada por PSMA específica de NP-GL1, NP-GL2.

Materiales

Copolímero dibloque $PLGa_{067}$-PEG_{5000}-CO_2H (solución madre 50 mg/ml en ACN); Aptámero (1 mg/ml); ligando basado en ácido glutámico/fenilalanina (GL1); ligando basado en ácido glutámico/lisina (GL2); EDC. HCl (Pierce Biotech); SulfoNHS (Pierce Biotech), solución salina tamponada con fosfato, PBS (Sigma); tampón de fijación: formaldehído al 4 % recién preparado en PBS; solución de bloqueo: BSA al 1 % recién preparado en PBS; solución de bloqueo y permeabilización: Triton X100 0,1 recién preparado en solución de bloqueo. Alexa-568 faloidina (5 U/ml), NBD Colesterol (Invitrogen); DAPI (Sigma): 0,1 mg/ml; Vectashield (Vector Labs); laca de uñas.

Preparación de nanopartículas:

Se prepararon nanopartículas basadas en copolímeros dibloque de PLGA-PEG-Co_2H mediante el procedimiento de nanoprecipitación. Se unió covalentemente GL1, GL2 y Apt a los extremos terminales ácido carboxílico de la corona de PEG de nanopartículas en suspensión acuosa de PBS. La conjugación covalente de GL1, GL2 y Apt con NP estaba basada en la activación por EDC/NHS del extremo terminal de PEG ácido carboxílico y la posterior reacción de los grupos terminales de éster de succinimida activos con la funcionalidad amina en GL1, GL2 y Apt usando el siguiente procedimiento:

Se diluyó solución madre de PLGA-PEG-Co_2H (1,2 ml, solución de 50 mg/ml en acetonitrilo) con acetonitrilo para producir 6 ml de solución dibloque de 10 mg/ml. Se añadió NBD Colesterol (600 ul, solución de 1 mg/ml en DMF) a la solución dibloque anterior y la mezcla se añadió gota a gota a 12 ml de agua desionizada agitada (18 Mω). La suspensión de NP resultante se dejó agitar (400 rpm) abierta en una campana extractora durante 2 h, y posteriormente se purificó por ultrafiltración usando filtros Amicon basados en celulosa regenerada (MWCO 5000 Da) para eliminar el acetonitrilo, DMF y NBD no encapsulado residual como se indica a continuación. Se transfirió la suspensión de NP (16 ml) en cuatro porciones iguales a cuatro tubos de filtración centrífuga Amicon de 15 ml y se concentraron a 250-400 ul cada uno (5000 g x 10 minutos). Las suspensiones concentradas se diluyeron con agua DI (3 ml) y se concentraron de forma similar (200-300 ul cada vez) antes de reconstituirse en PBS estéril (1,5 ml cada vez).

Las cuatro suspensiones de NP 10 mg/ml resultantes se trataron posteriormente como se indica a continuación:

Se usó la formulación de NP sin ligando unido a superficie de direccionamiento (NP, suspensión de NP 10 mg/ml) anterior sin ningún tratamiento adicional. Se usaron 100 ul por pocillo de NP en el estudio de captación celular.

Se prepararon formulaciones de NP-GL1 y NP-GL2 por activación del extremo terminal ácido carboxílico de la corona de PEG usando una solución de PBS estéril de 1 ml de EDC/NHS (1,9 mg/ml, 2,2 mg/ml, 20 equivalentes con respecto a CO_2H) durante 15 minutos a temperatura ambiente y posterior acoplamiento a GL1 y GL1 (soluciones

de PBS estéril de 1 ml, 3,5 mg/ml y 3,1 mg/ml, respectivamente) después de la inactivación (3 minutos) del EDC sin reaccionar usando 2-mercaptoetanol (2,8 ul, 4 equivalentes con respecto a EDC). NP-GL1 y NP-GL2 se concentraron 14 veces por ultrafiltración y posteriormente se reconstituyeron en PBS estéril cada una (suspensión de NP 9 mg/ml). Se usaron 100 ul por pocillo de NP-GL1 y NP-GL2 en el estudio de captación celular.

Se preparó la formulación de NP-Apt mediante activación con EDC/NHS en un recipiente (75 mg/45 mg, 200 equivalentes con respecto a CO_2H) y acoplamiento de Apt (150 ug Apt), seguido de purificación por concentración 15 veces y redispersión en H2O DI (tres veces) usando ultrafiltración en filtros de centrífuga Amicon (MWCO 5000 Da). El concentrado final se reconstituyó en 1,6 ml de PBS estéril (suspensión de NP 9 mg/ml) y se usaron 100 ul por pocillo de NP-Apt en el estudio de captación celular.

Captación y tinción de NP:

Día 0

Se pusieron en placas ~30.000 células/pocillo en portaobjetos con cámara de 8 pocillos. Si las células tenían un aspecto sano después de 8-16 h, se realizó el protocolo de unión y captación de NP. Si no, las células se incubaron durante más tiempo (-24 h totales) permitiendo que se adhiriesen y propagasen; la monocapa debería tener una confluencia de ~50 %.

Día 1

Diseño de portaobjetos: 4 condiciones.

Portaobjetos 1: LNCaP				
Vacío	GL1-NP	NP	Apt-NP	NP en LNCaP
Vacío	GL1-NP	NP	Apt-NP	

Portaobjetos 2: PC3				
Vacío	GL1-NP	NP	Apt-NP	NP en PC3
Vacío	GL1-NP	NP	Apt-NP	

El medio en todos los pocillos se sustituyó con 300 µl de medio recién preparado complementado con FBS al 10 % por pocillo. Se añadieron 100 µl por pocillo de solución de NP (500 µg de NP por pocillo) en PBS. Los portaobjetos se incubaron durante 30 min a 37 ºC y se lavaron tres veces suavemente con PBS. Las células se fijaron con tampón de fijación recién preparado durante 30 min a TA, después se lavaron suavemente con PBS 2 x 1 minuto. Las células se incubaron con el tampón de bloqueo/permeabilización durante 1 h a TA. Después, las células se tiñeron con Alexa-Fluor 568 faloidina en el tampón de bloqueo/permeabilización a TA durante 1 h y se lavaron con PBS 3 x 5 min con agitación suave. Se añadieron 100 µl de DAPI (1 mg/ml) por pocillo y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS. Se añadió 1 gota de Vectashield por pocillo y los portaobjetos se montaron con un cubreobjetos de vidrio. El cubreobjetos se selló con laca de uñas transparente.

Las muestras se mantuvieron protegidas de la luz en el frigorífico.

Microscopía:

Se obtuvieron imágenes de los portaobjetos usando un microscopio Leica invertido equipado con un objetivo de inmersión en aceite 60X. La intensidad se ajustó al 10 % para NBD y Alexa y al 1 % para DAPI. Los tiempos de exposición eran de 0,05 s para DAPI, 1 s para NBD y 0,5 s para Alexa. Se tomaron imágenes en aumentos de 0,5 um durante 70 secciones a lo largo del eje z. Después, todas las imágenes se combinaron y se deconvolucionaron usando Softworx.

Análisis de imagen:

Después del procesamiento, se obtuvieron las imágenes mostradas en la figura 4. Estas imágenes muestran las diferencias entre las condiciones experimentales. El color verde muestra la localización de las nanopartículas, el rojo tiñe la actina en el citoesqueleto y la tinción azul muestra el núcleo. La prevalencia de la tinción verde en el pocillo de NP-GL1-LNCaP indica que GL es eficaz en su unión al PSMA y que las nanopartículas de NP-GL1 se captan fácilmente por las células. La ausencia de una tinción verde significativa en los pocillos de NP indica que las partículas no están experimentando una endocitosis inespecífica por las células.

Ejemplo 5: Nanopartícula específica de diana encapsulada en capa anfífila

Puede prepararse una nanopartícula específica de diana encapsulada en capa anfífila usando el siguiente

procedimiento. Como se ha indicado anteriormente, la capa anfífila puede reducir la penetración de agua en la nanopartícula, aumentando de este modo la eficacia de encapsulación del fármaco y ralentizando la liberación del fármaco.

1) Capa anfífila: Pesar 10 mg de lecitina de soja (MP Biomedicals, LLC: 1-800-854-0530, www.mpbio.com) en una caja de manipulación con guantes en un vial de centelleo de 20 ml y disolver en 10 ml de H_2O + EtOH al 4 % para obtener una solución de 1 mg/ml.
2) Polímero no fluorescente: Pesar 6mg de polímero de PLGA-éster terminal [DURECT Corporation (205)-620-0025, LACTEL® Absorbable Polymers; Poli(DL-lactida-co-glicolida) 50:50, éster terminal; intervalo de viscosidad inherente: 0,76 - 0,94 dl/g en HFIP; Almacenar a ≤ -10 ºC en forma de cristales. Sensible a la humedad. Abrir después de que el frasco se haya calentado] en una caja de manipulación con guantes en un vial de centelleo de 7 ml. Añadir 0,6 ml de ACN para una concentración final de 10 mg/ml. Agitar vorticialmente para mezclar.
3) DSPE-PEG-OME: Pesar 10 mg de PEG [Avanti® Polar Lipids, Inc.; www.avantilipids.com; Se pesa 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)2000] (sal de amonio) 880120P; PM: 2805,54] en una caja de manipulación con guantes en un vial de centelleo de 10 ml. Añadir 10 ml de EtOH DI H2O al 4 %para una concentración final de 1 mg/ml. Agitar vorticialmente para mezclar.

Protocolo (preparar lotes de 5 mg en 5 mg/ml de PLGA) por lote de NP:

1) Mezcla de lípidos: preparar cada una en un vial de centelleo de 7 ml
a) Solución de lípidos:

Lecitina (1 mg/ml)	0,35 mg o 0,35 ml
DSPE-PEG (1 mg/ml) o DSPE-PEG-GL2	0,15 mg o 0,15 ml
H_2O + etanol al 4 %	1,5 ml

2) Añadir una barra de agitación y agitar;
3) Soluciones de PLGA: dividir en alícuotas en viales de centelleo de 7 ml;
b) Solución de PLGA:

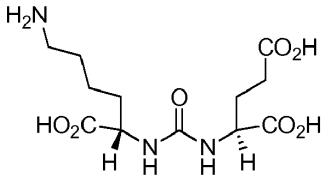
PLGA	0,5 ml
ACN	0,5 ml

a. Agitar vorticialmente;

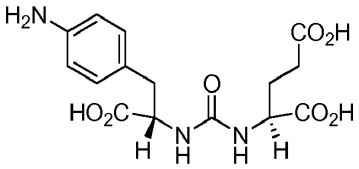
4) Calentar la mezcla de lípidos a 68ºC durante ~3-4 min;
5) Añadir PLGA gota a gota mientras se calientan los lípidos;
6) Agita vorticialmente durante 3 min;
7) Añadir 1 ml de H_2O DI gota a gota, agitar (volumen total: 4 ml);
8) Agitar durante 2 h con la tapa abierta a temperatura ambiente;
9) Transferir a casete de diálisis (PIERCE Slide-A-Lyzer 10K MWCO Dialysis Cassettes) durante 3 h en H_2O 1000 veces;
10) Cambiar el tampón de diálisis en 1 hora, 2 horas y 3 horas;
11) Durante la diálisis, preparar tampón Tween 80 al 5 % en vol (100 ml) para congelar la nanopartícula con Tween 80 al 0,5 % en vol;
12) Preparar/marcar tubos Amicon;
13) Después de la diálisis, eliminar la alícuota (1,0 mg) para mediciones del tamaño y del potencial zeta;
14) Usar filtro Amicon (Amicon ®Ultra-15 Ultracel 10K N.º Cat: UFC8 010 96) para centrifugar ~3 x a 4000 rpm durante 10 min para concentrar hasta 1 ml, completando con PBS;
15) Eliminar una alícuota de 1,0 mg de cada lote y medir el tamaño y el potencial zeta;
16) Dividir en alícuotas de 3,0 mg de cada lote en tubos eppendorf;
17) Añadir Tween al 0,5 % en vol en tubos eppendorf para cada lote;
18) Congelar instantáneamente los tubos en N2 líquido y poner en el congelador.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura:

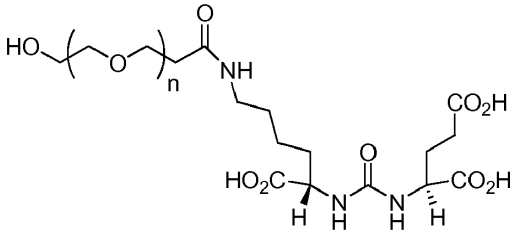


o

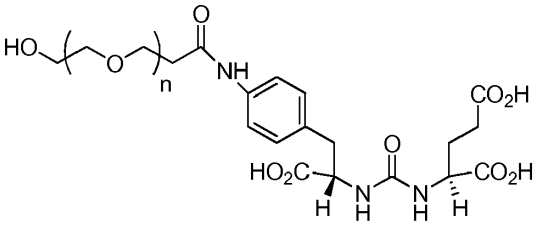


y enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereómeros o racematos del mismo; en la que el grupo NH_2 está unido covalentemente a poli(etilen)glicol.

2. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura:

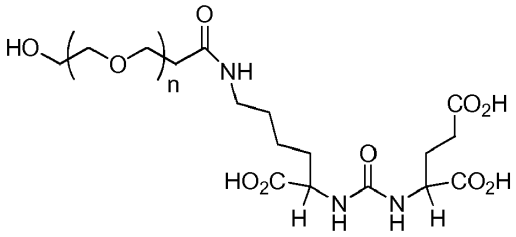


o

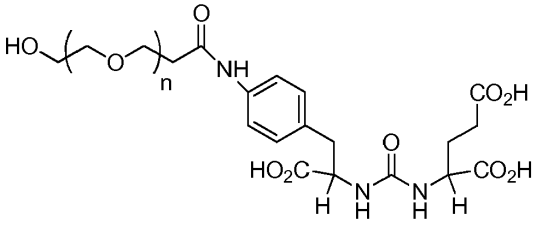


en la que n es 1-100.000.

3. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura:

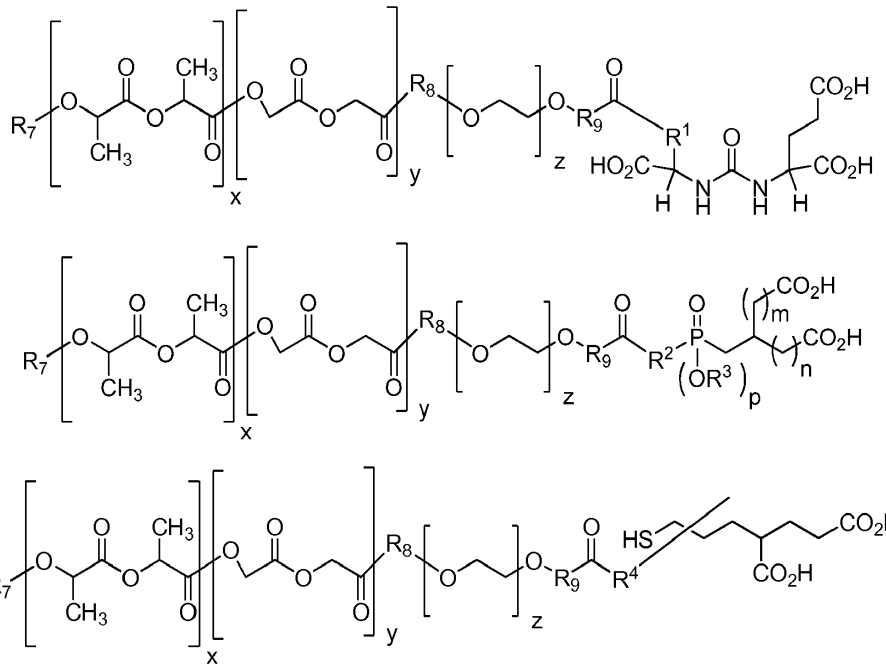


o

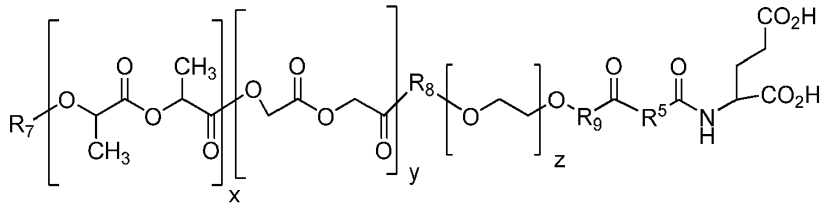


en la que n es 20-1720.

4. Un compuesto seleccionado de entre:



y

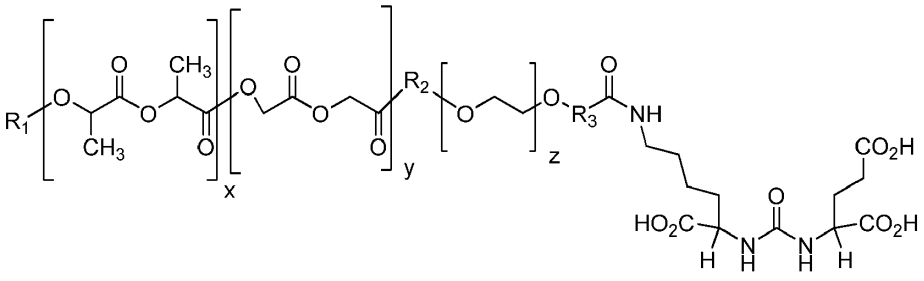


en las que cada uno de m y n es, independientemente, 0, 1, 2 o 3;

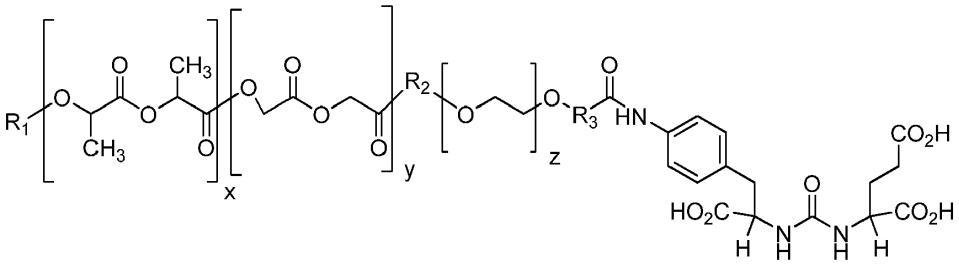
p es 0 o 1;

R^1, R^2, R^4 y R^5 se seleccionan cada uno, independientemente, del grupo que consiste en alquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, y cualquier combinación de los mismos; y R^3 es H o CH_3, y en las que R_7 y R_9 son grupos alquilo, R_8 es un enlace éster o amida, X = fracción molar de 0 a 1, Y = fracción molar de 0 a 0,5, X+Y = 20 a 1720, y Z = 25 a 455.

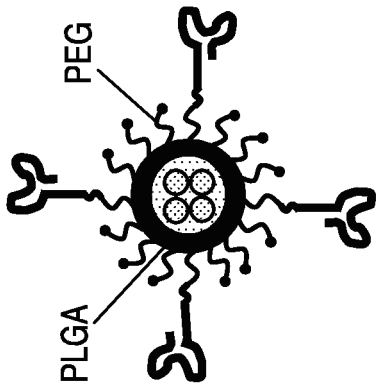
5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que el compuesto se selecciona de entre:



y



en las que R_1 y R_3 son grupos alquilo, R_2 es un enlace éster o amida, X = fracción molar de 0 a 1, Y = fracción molar de 0 a 0,5, X+Y = 20 a 1720, y Z = 25 a 455.


PEG
PLGA

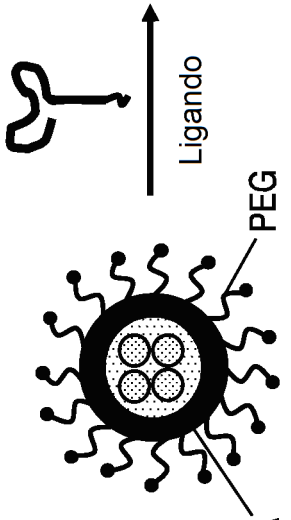

Ligando
PEG
Precipitado
en H_2O
PLGA
Fármaco
+
PLGA
PEG

Fig. 1A

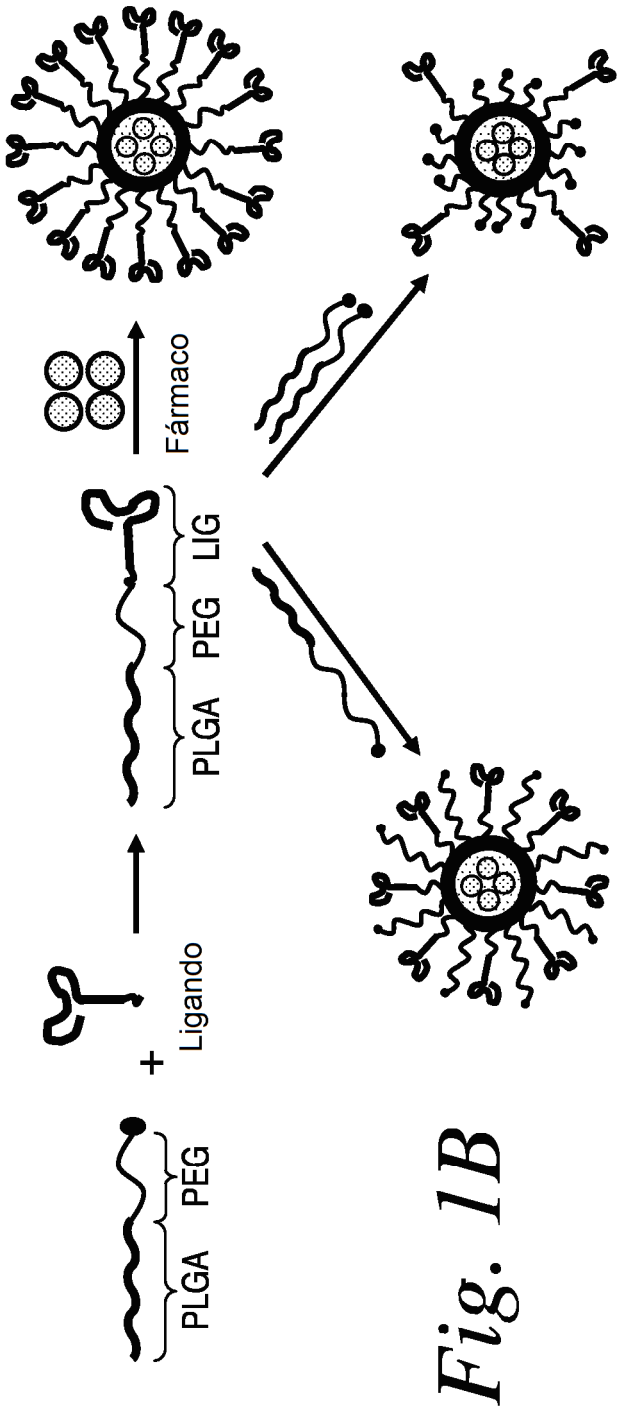

Fármaco
Ligando
+
PLGA
PEG
LIG
PLGA
PEG

Fig. 1B

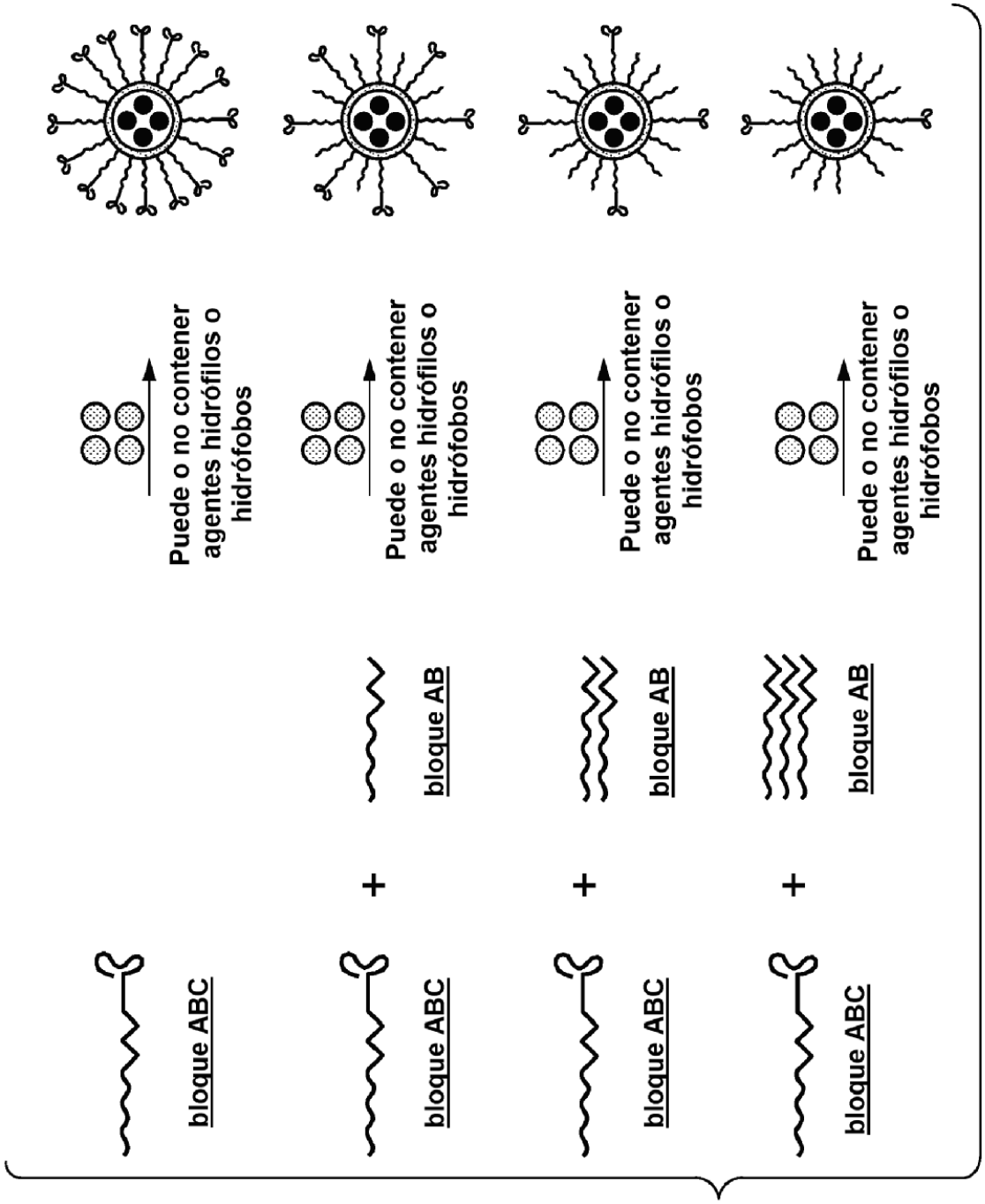

bloque ABC
+
bloque AB
Puede o no contener agentes hidrófilos o hidrófobos
bloque ABC
+
bloque AB
Puede o no contener agentes hidrófilos o hidrófobos
bloque ABC
+
bloque AB
Puede o no contener agentes hidrófilos o hidrófobos
bloque ABC
+
bloque AB
Puede o no contener agentes hidrófilos o hidrófobos

Fig. 2

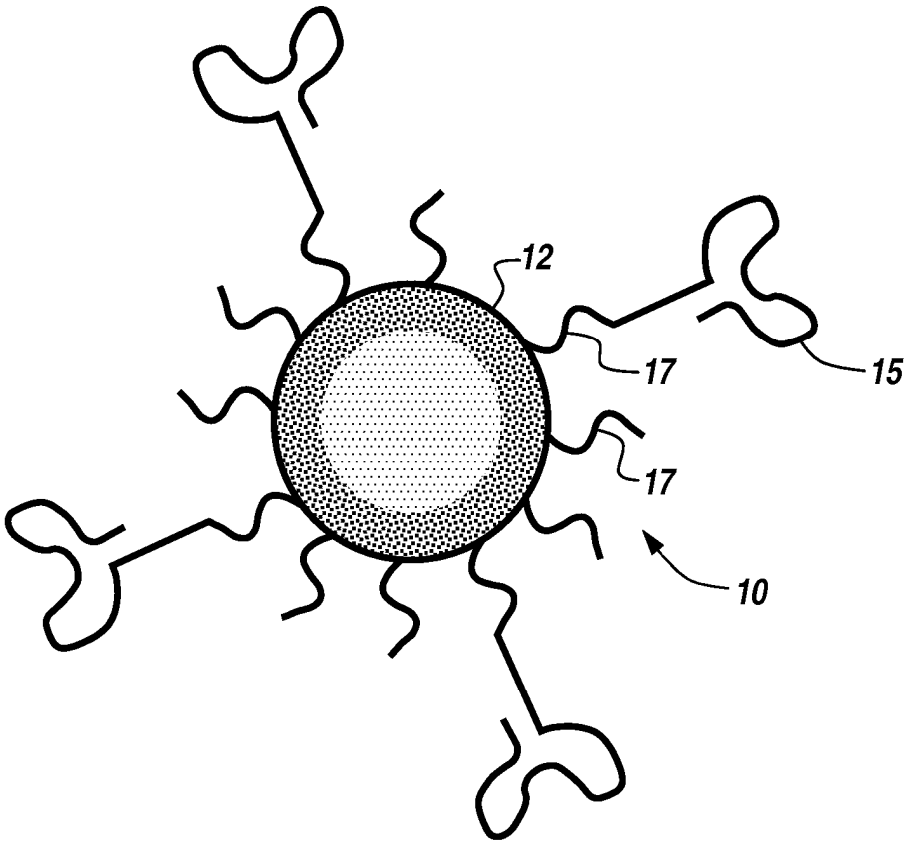


Fig. 3

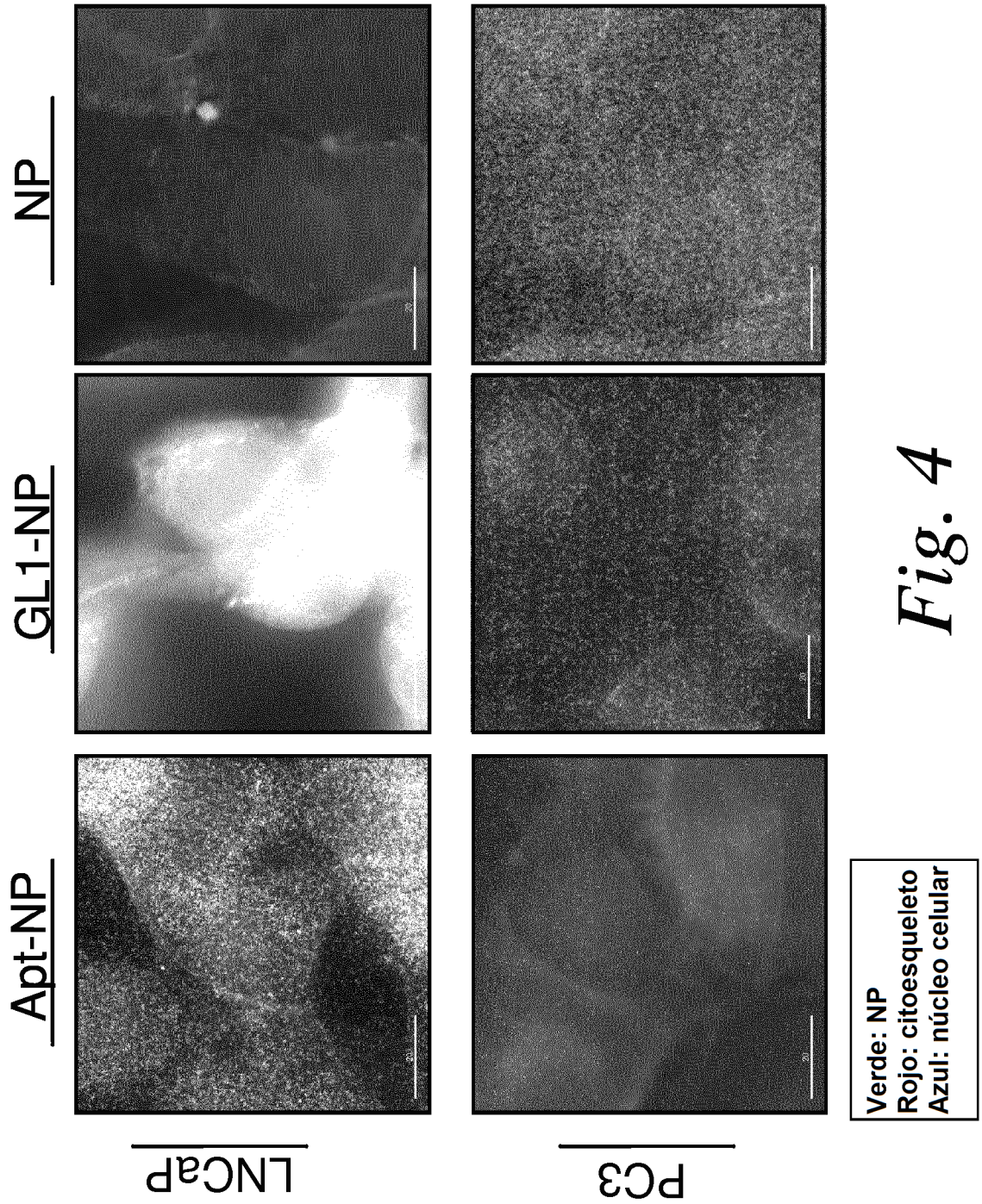

Apt-NP
GL1-NP
NP
LNCaP
PC3
Verde: NP
Rojo: citoesqueleto
Azul: núcleo celular

Fig. 4