

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 533**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 47/34 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2009 PCT/US2009/047554**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2010 WO10005740**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2009 E 09794932 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2285350**

54 Título: **Procedimientos para la preparación de copolímeros dibloque funcionalizados con un agente de direccionamiento para su uso en la fabricación de nanopartículas terapéuticas**

30 Prioridad:

16.06.2008 US 61712

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

14.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ALI, MIR, M.;
HRKACH, JEFF;
ZALE, STEPHEN, E. y
ALVAREZ DE CIENFUEGOS, LUIS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 654 533 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para la preparación de copolímeros dibloque funcionalizados con un agente de direccionamiento para su uso en la fabricación de nanopartículas terapéuticas

Antecedentes de la invención

5 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.

10 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.

15 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 diana sin destruir el tejido circundante. 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.

Breve resumen de la invención

25 La presente solicitud proporciona procedimientos para preparar nanopartículas usando poli(etilenglicol) prefuncionalizado (también denominado PEG) como macroiniciador para la síntesis de copolímeros dibloque según las reivindicaciones. Estos copolímeros dibloque comprenden un bloque polimérico de PEG funcional que lleva un agente dirigido en uno de sus extremos y un segundo bloque polimérico hidrofóbico biocompatible y biodegradable (por ejemplo, un poli(éster)). El poli(etilenglicol) es heterobifuncional con un agente dirigido (AD) unido covalentemente a su extremo α y un grupo funcional iniciador de la polimerización (por ejemplo, un grupo hidroxilo) presente en su extremo ω . Como alternativa, el poli(etilenglicol) está funcionalizado con un AD en su extremo α y un grupo funcional capaz de unirse covalentemente a un poli(éster) que, a su vez, está funcionalizado con un grupo terminal reactivo. Los ejemplos incluyen un PEG de extremo amino y un poli(éster) terminado en ácido carboxílico o un PEG terminado en azida y un poli(éster) terminado en alquino. También se proporcionan nanopartículas de acuerdo con los procedimientos divulgados y su uso en el tratamiento de varias enfermedades y trastornos.

Breve descripción de las figuras

35 **Figuras 1A-C:** Espectros de RMN de protones de HO-PEG-lys-urea-glu(protegido), Números de lote 11-189-1 y 11-176-1. Figura 1A - HO-PEG-lys-urea-glu(protegido) n.º de lote 11-176-1. Expansión n.º 1 del espectro de RMN de 1H usado para el cálculo del contenido de lys-urea-glu(protegido) funcionalización final (%lys-urea-glu(protegido) = $[\text{Int. } \delta 1,95-2,1] \times 2 / [\text{Int. } \delta 2,15-2,3] \times 100\% = [2 \times 10847/25777] \times 100 = 84\%$). Figura 1B - HO-PEG-lys-urea-glu(protegido) n.º de lote 11-176-1; Expansión n.º 2 del espectro de RMN de 1H. Figura 1C - HO-PEG-lys-urea-glu(protegido) n.º de lote 11-176-1; Expansión n.º 3 del espectro de RMN de 1H.

40 **Figuras 2A-B:** Cromatogramas de exclusión por tamaño (SEC) de HO-PEG-lys-urea-glu(protegido), números de lote 11-189-1 (Figura 2B) y 11-176-1 (Figura 2A).

Condiciones de SEC:

45 Detector: Detección del índice de refracción (IR); Temperatura del detector del IR = 35 °C
Columnas: Water Styragel (HR1, 100 - 5000 Da; HR3, 500 - 30000 Da; HR4, 5000 - 600.000 Da en series).
Temperatura de la columna = 30 °C;
Fase móvil: Cloroformo; Caudal: 1 ml/min
Concentración de la muestra = 10 mg/ml, Volumen de inyección = 50 μ l (11-176-1) y 100 μ l (11-189-1 codificado 44-44-6 en las leyendas del cromatograma más adelante);
50 El peso molecular promedio en número y en peso (M_n y M_w) y la polidispersidad (M_w/M_n) se obtuvieron con respecto a los estrechos patrones dispersos de poli(etilenglicol) (Servicio de patrones de polímeros, EE.UU., Warwick, Rhode Island).
Se usó un ajuste de polinomios ($R^2 = 0,99957$; error estándar = 0,02) para la calibración. 11-176-1 (Fig. 2A) y 11-189-1 (Fig. 2B) Cromatogramas de SEC

55 **Figuras 3A-F:** Espectros de RMN de protones de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido), números de lote 11-187-1, 11-188-1 y 11-198-1.

Instrumento de RMN: Bruker 400 MHz
Parámetros del experimento RMN:

Disolvente: CDCl₃; Secuencia de pulso: 7,5 us; Retraso del pulso: 5 s; Número de barridos: 128

5 Figura 3A - PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido), N.º de lote 11-187-1; Expansión n.º 1 del espectro de RMN de 1H que muestra el pico del grupo terminal de lactida metina y alilo en la determinación de la masa molar promedio en número absoluta (M_n) de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido). procedimiento para la determinación de la masa molar promedio en número absoluta (M_n) de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido): $M_n(\text{PLA-PEG-lys-urea-glu}(\text{protegido})) = M_n(\text{PEG-lys-urea-glu}(\text{protegido})) + (\text{Masa molar de la unidad de repetición de lactida} * ((\text{Int. } \delta 5,1\text{ppm} - 5,3\text{ppm}) * 3) / (\text{Int. } \delta 5,85\text{ppm} - 5,95\text{ppm})) = 5000 + ((72 * 10.000) * 3) / 143 = 20.105 \text{ Da}$. Figura 3B - PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido), N.º de lote 11-187-1; Expansión n.º 2 del espectro de RMN de 1H que muestra el pico de PEG y los picos de lactida de metilo de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido). Figura 3C - PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido), N.º de lote 11-188-1; Expansión n.º 1 del espectro de RMN de 1H que muestra el pico del grupo terminal de lactida metina y alilo en la determinación de la masa molar promedio en número absoluta (M_n) de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido). procedimiento para la determinación de la masa molar promedio en número absoluta (M_n) de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido): $M_n(\text{PLA-PEG-lys-urea-glu}(\text{protegido})) = M_n(\text{PEG-lys-urea-glu}(\text{protegido})) + (\text{Masa molar de la unidad de repetición de lactida} * ((\text{Int. } \delta 5,1\text{ppm} - 5,3\text{ppm}) * 3) / (\text{Int. } \delta 5,85\text{ppm} - 5,95\text{ppm})) = 5000 + ((72 * 10.000) * 3) / 137 = 20.766 \text{ Da}$. Figura 3D - PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido), N.º de lote 11-188-1; Expansión n.º 2 del espectro de RMN de 1H que muestra el pico de PEG y los picos de lactida de metilo de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido). Figura 3E - PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido), N.º de lote 11-198-1; Expansión n.º 1 del espectro de RMN de 1H que muestra el pico del grupo terminal de lactida metina y alilo en la determinación de la masa molar promedio en número absoluta (M_n) de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido). procedimiento para la determinación de la masa molar promedio en número absoluta (M_n) de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido): $M_n(\text{PLA-PEG-lys-urea-glu}(\text{protegido})) = M_n(\text{PEG-lys-urea-glu}(\text{protegido})) + (\text{Masa molar de la unidad de repetición de lactida} * ((\text{Int. } \delta 5,1\text{ppm} - 5,3\text{ppm}) * 3) / (\text{Int. } \delta 5,85\text{ppm} - 5,95\text{ppm})) = 5000 + ((72 * 10.000) * 3) / 156 = 18.846 \text{ Da}$. Figura 3F - PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido), N.º de lote 11-198-1; Expansión n.º 2 del espectro de RMN de 1H que muestra el pico de PEG y los picos de lactida de metilo de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido).

Figura 4: Cromatogramas de exclusión por tamaño (SEC) de HO-PEG-lys-urea-glu(protegido), números de lote 11-189-1 (marcados 44-44-6 para análisis SEC y 11-176-1.

30 **Condiciones de la cromatografía de exclusión por tamaño:**

Detector: Detección del índice de refracción (IR); Temperatura del detector del IR = 35 °C

Columnas: Water Styragel (HR1, 100 - 5000 Da; HR3, 500 - 30000 Da; HR4, 5000 - 600,000 Da en serie).

Temperatura de la columna = 30 °C; Fase móvil: Cloroformo; Caudal: 1 ml/min

Concentración de la muestra = 10 mg/ml, Volumen de inyección 20 µl;

35 El peso molecular promedio en número y en peso (M_n y M_w) y la polidispersidad (M_w/M_n) se obtuvieron con respecto a los estrechos patrones dispersos de poli(estireno) (Patrones Shodex, Kawasaki, Japón). Se usó un cuarto ajuste de polinomios (R² = 0,999927; error estándar = 0,008) para calibración.

Figuras 5A-E: Eficacia de la desprotección y estimación de la masa molar de PLA-PEG-lys-urea-glu en bruto (antes de la eliminación del paladio) mediante espectroscopia de RMN de 1H.

40 Instrumento de RMN: Bruker 400 MHz
Parámetros del experimento RMN:

Disolvente: CDCl₃; Secuencia de pulso: 7,5 us; Retraso del pulso: 5 s; Número de barridos: 128

45 Figura 5A - PLA-PEG-lys-urea-glu bruto N.º de lote 11-190-1; Expansión n.º 1 del espectro de RMN de 1H que muestra: a) pico de lactida metina, a) picos de protones aromáticos de tetraquis(trifenil-fosfina)paladio (0), y c) ausencia de picos residuales de alilo (δ 5,85 - 5,95) que indican la eliminación cuantitativa de grupos protectores. Figura 5B - PLA-PEG-lys-urea-glu bruto N.º de lote 11-190-1; Expansión n.º 2 del espectro de RMN de 1H que muestra los picos de PEG y lactida metilo. Figura 5C - PLA-PEG-lys-urea-glu bruto N.º de lote 11-191-1; Expansión n.º 1 del espectro de RMN de 1H que muestra: a) pico de lactida metina, a) picos de protones aromáticos de tetraquis(trifenil-fosfina)paladio (0), y c) < 3% (respecto al precursor de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido) de picos de alilo residuales (δ 5,85 - 5,95) que indican la eliminación > 96 % de grupos protectores. Figura 5D - PLA-PEG-lys-urea-glu bruto N.º de lote 11-191-1; Expansión n.º 2 del espectro de RMN de 1H que muestra los picos de PEG y lactida metilo. Figura 5E - PLA-PEG-lys-urea-glu bruto N.º de lote 11-199-1; Expansión n.º 1 del espectro de RMN de 1H que muestra: a) pico de lactida metina, b) ausencia de picos residuales de alilo (δ 5,85 - 5,95) que indican la eliminación cuantitativa de grupos protectores. Figura 5F - PLA-PEG-lys-urea-glu bruto N.º de lote 11-199-1; Expansión n.º 2 del espectro de RMN de 1H que muestra los picos de PEG y lactida metilo.

Figuras 6A-B: Masa molar y fracción de PEG de PLA-PEG-lys-urea-glu purificada por espectroscopia de RMN de 1H.

60 Instrumento de RMN: Bruker 400 MHz
Parámetros del experimento RMN:

Disolvente: CDCl₃; Secuencia de pulso: 7,5 us; Retraso del pulso: 5 s; Número de barridos: 128

Figura 6A - PLA-PEG-lys-urea-glu bruto N.º de lote 44-49-1; Expansión n.º 1 del espectro de RMN de 1H que muestra: a) pico de lactida metina, b) ausencia de picos residuales de alilo (δ 5,85 - 5,95) que indican la eliminación cuantitativa de grupos protectores. Figura 6B - PLA-PEG-lys-urea-glu purificado N.º de lote 44-49-1; Expansión n.º 2 del espectro de RMN de 1H que muestra los picos de PEG y lactida metilo.

5 **Figura 7:** Peso molecular de PLA-PEG-lys-urea-glu y el precursor protegido PLA-PEG-lys-urea-glu (protegido) por mediciones de la viscosidad Inherente.

Figura 8: Contenido de paladio en el lote de PLA-PEG-lys-urea-glu crudo (antes de la eliminación del paladio) número 44-48-1 (código de la muestra 11-204-1) y en el lote purificado (después de la eliminación del paladio) de PLA-PEG-lys-urea-glu número 44-49-1 (código de la muestra 11-204-2) determinado por espectrometría ICP.

10 Divulgación detallada de la invención

La presente solicitud proporciona procedimientos para preparar nanopartículas usando poli(etilenglicol) prefuncionalizado (también denominado PEG) como macroiniciador para la síntesis de copolímeros dibloque según las reivindicaciones. Estos copolímeros dibloque comprenden un bloque de poli(etilenglicol) bioactivo y un segundo bloque de polímero hidrófobo biocompatible y biodegradable (por ejemplo, un poli(éster)). El poli(etilenglicol) es heterobifuncional con un resto dirigido (agente) unido covalentemente a su extremo α y un grupo funcional iniciador de la polimerización (por ejemplo, un grupo hidroxilo) presente en su extremo ω .

La solicitud objeto también proporciona el uso de derivados de agentes dirigidos (AD) (por ejemplo, análogos en los que grupos funcionales, tales como ácidos carboxílicos u otros grupos funcionales, están protegidos) en la síntesis del polímero de poli(etilenglicol) para a los cuales se adjuntan AD que mejoran su solubilidad y evitan posibles reacciones secundarias. Después de acoplar un agente dirigido protegido (PRO-TA) al polímero de PEG en el extremo α , el PEG funcionalizado (HO-PEG-TA-PRO) se utiliza como macroiniciador para sintetizar un bloque de poli(éster). Por ejemplo, se añade HO-PEG-TA-PRO a una mezcla de monómeros de lactona cíclica tal como lactida, glicólido o caprolactona y la mezcla se calienta en condiciones de fusión. Después se agrega un catalizador de la polimerización, tal como 2-etilhexanoato de estaño (II), a la masa fundida de monómero/iniciador. El polímero resultante se purifica a partir de monómero sin reaccionar y un catalizador de la polimerización mediante precipitación en una mezcla no disolvente, tal como éter/hexano (70/30), y se recupera por decantación seguido de secado al vacío. La posterior desprotección de los grupos funcionales protegidos puede realizarse para recuperar el grupo funcional químicamente activo original (por ejemplo, a ácido carboxílico). Este enfoque permite que la reacción de polimerización deseada proceda de manera eficiente y evita las reacciones secundarias entre el catalizador de la polimerización y los grupos funcionales en el resto de direccionamiento en su forma nativa no protegida. Dichas reacciones secundarias dan como resultado la formación de geles insolubles reticulados en lugar del polímero de poli(éster) lineal deseado. Además, la composición y el peso molecular del poli(éster) se puede ajustar según se desee controlando la composición de la fusión del monómero y la relación molar del HO-PEG-TA (PRO) a los monómeros. Además, el resto de direccionamiento protegido es libremente soluble en una amplia gama de disolventes orgánicos en relación con los análogos no protegidos. Esto permite el acoplamiento del resto de direccionamiento a poli(etilenglicol) con un alto grado de funcionalización del grupo terminal del polímero. Los ejemplos no limitantes de grupos protectores para varios grupos funcionales de agentes de direccionamiento, tal como se desvela en el presente documento, son:

Grupo funcional	Grupo protector
Ingesta de alcohol	Carbonato de alquilalilo, Alloc-OR
Alcohol	Éter metílico
Alcohol	Éter metílico
Alcohol	Éter metílico
Alcohol	Bencilcarbonato de alilo, ROCO ₂ Bn
Fenol	Carbonato de alilo
Fenol	Éter metílico
Fenol	Éter benciloximetílico - BOM
Fenol	Éter metoxietoximetílico - Éter MEM
Tiol	Tioéter S-p-Metoxibencilico
Tiol	Tioéter S-trifenilmetílico (Tr-SR)
Tiol	4-metoxitritilo (Mtt-SR)

(continuación)

Tiol	Tioéter S-t-butílico
Tiol	S-[Tricarbonil[1,2,3,4,5, η]-2,4-diciclohexadieno-1-ii]-hierro(1+) tioéter
Amina	N-alilamina
Amina	N-bencilamina
Amina	Carbamato de alilo (Aloc-NR ₂)
Amina	Carbamato de bencilo - benciloxicarbonilo (CBz)
Amina	Carbamato de p-metoxibencilo- Moz
Amina	Carbamato de p-nitrobencilo- PNZ
Ácido carboxílico	Éster alílico
Ácido carboxílico	Éster propargílico
Ácido carboxílico	Éster bencílico- RCO ₂ Bn

Adicionalmente, esta solicitud proporciona un procedimiento para el acoplamiento eficaz del resto dirigido no protegido a poli(etilenglicol) en condiciones acuosas. En este enfoque, el pH del medio de reacción se usa para maximizar el rendimiento del producto deseado. Las ventajas de este aspecto de la invención se refieren a la utilización de la alta solubilidad en agua del agente de direccionamiento (TA). Por ejemplo, el grupo terminal ácido de un ácido α-azida-ω-carboxílico poli(etilenglicol) (N₃-PEG-CO₂H) se activa primero por conversión en el éster de succinimida N₃-PEG-COSu) mediante reacción con N-hidroxisuccinimida (NHS) y clorhidrato de dimetilaminopropilcarbodiimida de etilo (EDC) o diciclohexilcarbodiimida (DCC) en condiciones de disolvente orgánico anhidro, tal como en diclorometano. El poli(etilenglicol) activado (N₃-PEG-COSu) se purificó posteriormente a partir de la precipitación de reactivos de molécula pequeña en un no disolvente anhidro, tal como éter-hexano (70/30). La forma no protegida del agente de direccionamiento amino funcional (H₂N-TA) se disuelve en tampón de bicarbonato (pH = 9,7) y el pH se reduce luego a 7,4 usando hidróxido de sodio acuoso. El ácido activado (N₃-PEG-COSu) se disuelve en agua DI, se agrega gota a gota a un gran exceso molar de la solución de H₂N-TA. El éster de succinimida de N₃-PEG-COSu es estable a pH = 5,5 - 6, mientras que la reacción de formación de enlace amida con H₂N-TA es eficiente en condiciones de pH = 7,4. Esta estrategia expone el N₃-PEG-COSu a pH = 7,4 solo cuando también está presente un gran exceso de resto de direccionamiento con funcionalidad amina. Por lo tanto, la conversión en el conjugado deseado de agente de direccionamiento-PEG (N₃-PEG-TA) mientras se minimiza la exposición de N₃-PEG-COSu a condiciones básicas, evitando así la hidrólisis del éster de succinimida. El N₃-PEG-TA se acopla posteriormente a un poli(éster) de alquino terminal usando catalizador de cobre en condiciones convencionales de química clic en un disolvente orgánico, tal como dimetilformamida (DMF) o dimetilsulfóxido (DMSO). El poli(éster) de alquino terminal se prepara por polimerización con apertura de anillo de monómeros de láctido y glicólido usando, por ejemplo, alcohol propargílico como iniciador de la polimerización y 2-etil hexanoato de estaño (II) como catalizador de la polimerización.

A modo de ejemplo, un resto/agente de direccionamiento puede dirigirse a o provocar que la partícula se localice en partes específicas dentro de un sujeto y, de este modo, el agente bioactivo/agente terapéutico se administra de a un sitio diana. En una realización, un fármaco u otro agente terapéutico puede liberarse de una forma de liberación controlada desde la partícula y permitirse que interaccione localmente con el sitio de objetivo particular (por ejemplo, un tumor). El término "liberación controlada" (y variaciones de esa frase (por ejemplo, en el contexto de un "sistema de liberación controlada") se entiende generalmente que incluye la liberación de un agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco) en un sitio seleccionado a velocidad, intervalo y/o cantidad controlables. La "liberación controlada" incluye, pero no se limita necesariamente a, la administración sustancialmente continua, la administración en patrones (por ejemplo, la liberación intermitente a lo largo de un periodo de tiempo que se interrumpe a intervalos de tiempo regulares o irregulares) y la liberación de un bolo de un agente terapéutico seleccionado (o diversas combinaciones del mismo) según esté predeterminado, en cantidad pequeña durante un periodo de tiempo relativamente corto (por ejemplo, unos pocos segundos o minutos).

Los ejemplos de segundos bloques de polímero hidrofóbico biocompatibles y biodegradables que se pueden usar en la fabricación de las nanopartículas reivindicadas pueden ser poliésteres. Poliésteres de ejemplo adecuados para su uso en la fabricación de las nanopartículas desveladas incluyen copolímeros que comprenden unidades de ácido láctico y ácido glicólico, tales como poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) y poli(lactida-co-glicólido), en su conjunto denominados en el presente documento como "PLGA"; y homopolímeros que comprenden unidades de ácido glicólico, denominados en el presente documento "PGA", y unidades de ácido láctico, tales como ácido poli-L-láctico, ácido poli-D-láctico, poli- D, ácido L-láctico, poli-L-lactida, poli-D-lactida y poli-D, L-lactida, en su conjunto

denominados en el presente documento "PLA". En algunas realizaciones, los poliésteres de ejemplo incluyen, por ejemplo, polihidroxiácidos; polímeros y copolímeros PEGilados de lactida y glicólido (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, poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster de serina), poli(4-hidroxi-L-prolina éster), poli[ácido α -(4-aminobutil)-L-glicólico] y derivados de los mismos.

El segundo bloque de polímero hidrofóbico biocompatible y biodegradable (por ejemplo, poliésteres) utilizado en la fabricación de las nanopartículas descritas puede contener grupos funcionales que reaccionan con el término ω del poli(etilenglicol). Los ejemplos no limitantes de dichos grupos funcionales incluyen y, no están limitados a los mismos, aminas, grupos hidroxilo, grupos de ácido carboxílico, grupos NHS, grupos alquino o grupos azida. Los grupos con los que reaccionan los segundos grupos funcionales de bloques poliméricos hidrofóbicos biocompatibles y biodegradables en el extremo ω del polímero de poli(etilenglicol) se proporcionan en la siguiente tabla.

Grupo funcional poliéster	Grupo reactivo en el extremo ω de poli(etilenglicol)
N-hidroxisuccinimida (NHS)	Amina
Amina	Hidroxilo, Ácido carboxílico
Hidroxilo	Amina
Ácido carboxílico	Amina
Alquino	Azida

Los agentes de direccionamiento desvelados en el presente documento pueden contener, o pueden modificarse para que contengan, un grupo funcional que puede reaccionar con el extremo α de un polímero (por ejemplo, PEG) para producir un polímero conjugado con un resto de direccionamiento. Los grupos funcionales incluyen cualquier resto que se puede usar para crear un enlace covalente con un polímero (por ejemplo, PEG), tal como amino, hidroxilo, azida, alquino y tio. Por ejemplo, los agentes de direccionamiento pueden estar sustituidos con NH_2 , SH o OH, que están unidos directamente al agente e direccionamiento o bien a través de un grupo adicional, *por ejemplo*, alquilo o fenilo. En un ejemplo no limitante, anilina, alquil- NH_2 (por ejemplo, $(\text{CH}_2)_{1-6}\text{NH}_2$), o alquil-SH (por ejemplo, $(\text{CH}_2)_{1-6}\text{NH}_2$) se pueden usar para unir el agente de direccionamiento a un polímero a través de los grupos NH_2 y SH libres para formar un enlace covalente.

La conjugación de un polímero e PEG funcionalizado (un polímero e PEG que comprende uno o más agentes de direccionamiento en su extremo α y grupos funcionales reactivos en el extremo ω) y un segundo polímero hidrofóbico biocompatible y biodegradable se puede realizar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica a través de grupos funcionales en el extremo ω de un polímero de PEG funcionalizado y grupos reactivos presentes en el segundo polímero hidrofóbico biocompatible y biodegradable. Por ejemplo, se puede usar química de EDC-NHS (hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida) o una reacción que implica una maleimida o un ácido carboxílico. La conjugación de un poli(éster) y un poli(éter) para formar un poli(éster-éter), puede realizarse en un disolvente orgánico, tales 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.

La conjugación de un polímero de PEG funcionalizado (un polímero de PEG que comprende uno o más agentes e direccionamiento (AD) en su extremo α y grupos funcionales reactivos en el extremo ω) y un segundo polímero hidrofóbico biocompatible y biodegradable también se puede realizar usando químicas que son ortogonales al enlace de amida que forma la química EDC-NHS. Dichos procedimientos incluyen técnicas e químicas "clic". Por ejemplo, un poli(éster) terminado en alquino puede hacerse reaccionar con un poli(etilenglicol) heterobifuncional que porta un AD en su extremo α y un resto de azida reactivo de alquino en su extremo ω . La conjugación de un poli(éster) y un poli(éter) para formar un poli(éster-éter), puede realizarse en un disolvente orgánico, tales como, pero sin limitación, diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida, tetrahidrofurano, acetona, o similares. Se pueden emplear catalizadores de química "clic" convencionales, tales como sulfato de cobre.

En otro conjunto de realizaciones o divulgaciones, 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.

Otro aspecto de la invención se refiere a partículas que incluyen conjugados de polímeros 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 de PEG que comprende un resto de direccionamiento (es decir, un ligando de PSMA de bajo peso molecular) y un segundo polímero que comprende un polímero biocompatible (por ejemplo, que carece de un 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.

Como se ha analizado anteriormente, el polímero puede ser PLGA en algunas realizaciones. 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. Aún otras realizaciones proporcionan polímeros que pueden ser uno o más polímeros acrílicos. En determinadas realizaciones, los polímeros acrílicos incluyen, por ejemplo, copolímeros, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de aminoalquil metacrilato, copolímero de alquilamida ácido metacrílico, poli(metacrilato de metilo), copolímero de aminoalquil metacrilato, copolímeros de glicidil metacrilato, policianoacrilatos y combinaciones que comprenden uno o más de los polímeros anteriores.

En algunas otras 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(etilnimina) (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.

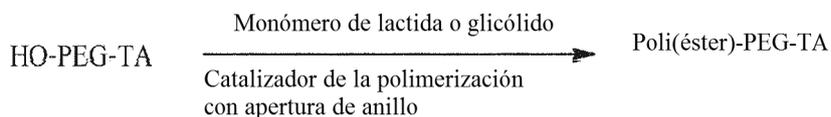
En otras realizaciones más, los polímeros pueden ser poliésteres degradables que lleven cadenas laterales catiónicas (Putnam y col., 1999, Macromolecules, 32: 3658; Barrera y col., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115: 11010; Urn y col., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121: 5633; y Zhou y col., 1990, Macromolecules, 23: 3399). La incorporación de comonómeros hidrofóbicos (por ejemplo, lactida, glicólido, caprolactona o aminoácidos hidrofóbicos tales como alanina, valina, leucina, isoleucina o fenilalanina) en la cadena principal del polímero en una medida que impartirá carácter hidrófobo al copolímero, permite la formación de nanopartículas con un grado de carácter catiónico dentro de la partícula núcleo. Esto, a su vez, permite la encapsulación de fármacos tales como ARNip en el núcleo de la nanopartícula. Los ejemplos de estos poliésteres incluyen poli(L-lactida-co-L-lisina) (Barrera y col., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115: 11010), poli(serina éster) (Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23: 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 et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121: 5633). Estos nuevos polímeros son menos tóxicos que la poli(lisina) y la PEI, y se degradan en metabolitos no tóxicos.

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 Da (por ejemplo, 5.000-20.000, *por ejemplo*, 10.000-20.000) y, en algunas realizaciones, 5000 Da, y el PLGA tiene un peso molecular de 5.000- 100.000 Da (*por ejemplo*, 20.000-70.000, *por ejemplo*, 20.000-50.000) o en algunas realizaciones, 15.000-30.000 Da.

Las nanopartículas desveladas en el presente documento pueden usarse para el tratamiento de las enfermedades y trastornos analizados en un sujeto. Un sujeto puede ser un animal humano o no humano. Los ejemplos de sujetos incluyen, aunque sin limitaciones, 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.

La divulgación proporciona una serie de procedimientos para fabricar nanopartículas que comprenden uno o más agentes de direccionamiento y/o uno o más restos bioactivos/agentes terapéuticos. En diversos aspectos de la invención, se sintetiza un copolímero dibloque conjugado con un agente de direccionamiento funcionalizado iniciando la polimerización de un polímero hidrofóbico biocompatible y biodegradable (tal como poli(éster)) desde el extremo ω del poli(etilenglicol). El esquema 1 ilustra este proceso como se ejemplifica mediante un poli(etilenglicol) que lleva un grupo funcional hidroxilo en su extremo α y su agente de direccionamiento (AD) en su extremo ω. La polimerización de un bloque de poli(éster) a partir de este extremo hidroxilo produce el copolímero dibloque deseado que lleva un AD unido covalentemente a su extremo PEG.



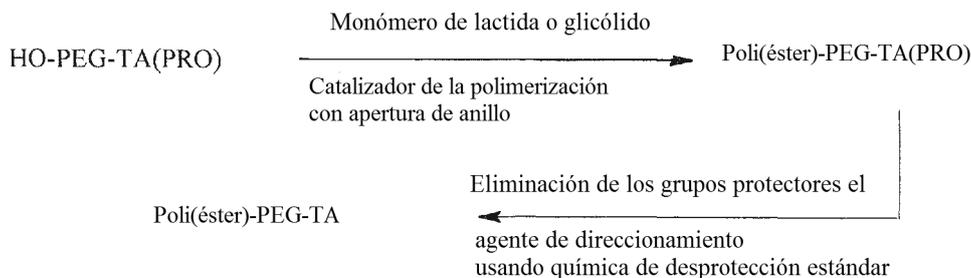
PEG= poli(etilenglicol)

AD= agente de direccionamiento

El poli(éster) incluye poli(D,L-lactida), poli(L-lactida), poli(D,L-lactida-co-glicólido)

Esquema 1. Procedimiento de síntesis e poli(éster)-bloque-poli(etilenglicol) que lleva un agente de direccionamiento (AD) en su extremo PEG

De acuerdo con la invención, se puede preparar un copolímero de dibloque que porta un agente de direccionamiento (AD) en su extremo de poli(etilenglicol) mediante conjugación de una forma adecuadamente protegida del agente de direccionamiento (TA-PRO) al polímero de poli(etilenglicol) (produciendo HO-PEG-TA (PRO)), y, posteriormente, usando este macroiniciador en la polimerización de apertura de anillo de un monómero de lactona cíclica, tal como lactida, glicólido o una mezcla de los mismos. La retirada de los grupos protectores del agente de direccionamiento usando metodología de desprotección estándar proporciona el poli(éster)-bloque-PEG-TA deseado (véase el esquema 2). En una divulgación adicional, se puede preparar un copolímero dibloque funcional (poli(éster)-PEG-TA) mediante el acoplamiento covalente del PEG-TA dirigido a un poli(éster) preformado. Por ejemplo, un poli(lactida-co-glicólido) terminado en ácido carboxílico (Poli(éster)-CO₂H y poli(etilenglicol) que llevan el agente de direccionamiento en su extremo α y un grupo funcional amino reactivo a ácido en su extremo ω (H₂N-PEG-TA) puede hacerse reaccionar en condiciones de disolvente orgánico.



PEG= poli(etilenglicol)

AD= agente de direccionamiento

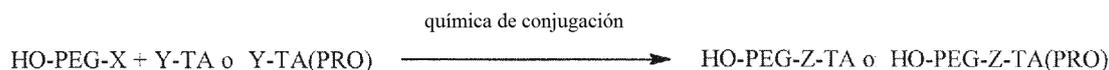
TA(PRO)= Forma protegida del agente de direccionamiento

El poli(éster) incluye poli(D,L-lactida), poli(L-lactida), poli(D,L-lactida-co-glicólido)

Esquema 2. Procedimiento de síntesis e poli(éster)-bloque-poli(etilenglicol) que lleva un agente de direccionamiento (AD) en su extremo PEG usando la forma protegida del agente de direccionamiento (HO-PEG-TA(PRO)) como macroiniciador en la polimerización con apertura del anillo de un monómero de lactona cíclica.

5
10
15
Los agentes de direccionamiento (AD) pueden estar compuestos de aminoácidos naturales o no naturales individuales o una combinación de dos o más residuos de aminoácidos unidos covalentemente por un enlace amida o de urea. Los AD también puede estar compuestos por ácidos nucleicos. Como tales, los AD pueden contener restos de cadena lateral que llevan grupos funcionales que incluyen ácidos carboxílicos, aminas, tioles, alcoholes, fenoles, guanidina, purinas (tales como adenina, guanina), pirimidinas (tales como citosina, uracilo, timina). El procedimiento del esquema 2 es preferido sobre el procedimiento del esquema 1 cuando los AD contienen grupos funcionales que pueden iniciar una polimerización de apertura de anillo (tal como un alcohol, un fenol, una amina o un tiol) o reaccionar y alterar estructuralmente el catalizador de la polimerización (tal como guanidina, restos de ácido 1,5-pentandioico como se encuentran cuando un dipéptido o polipéptido AD tiene un residuo de ácido glutámico en su extremo C, o un enlace de urea capaz de unirse al catalizador de la polimerización).

20
La presente invención o divulgación también describe procedimientos para la síntesis de conjugados covalentes de poli(etilenglicol) heterobifuncional y agentes de direccionamiento (TA). En el presente documento se describen poli(etilenglicol) (PEG) que lleva un grupo hidroxilo en su extremo α y un grupo funcional reactivo en su extremo ω tal como un ácido carboxílico, un aldehído, una azida, un alquino, un grupo maleimido. Dichos PEG heterobifuncionales pueden hacerse reaccionar con un AD que porta una amina, un tiol, un alquino o una azida para producir un conjugado covalente de PEG y TA (HO-PEG-TA). Los restos reactivos preferidos incluyen amina y ácido carboxílico y amina y aldehído que producen enlaces naturales tales como amidas o aminas secundarias. El Esquema 3 proporciona metodologías químicas sintéticas para permitir tal conjugación covalente.



25 PEG= poli(etilenglicol)

AD= agente de direccionamiento

TA(PRO)= Forma protegida del agente de direccionamiento

X= ácido carboxílico, aldehído, maleimida, azida o alquino

Y= amina, tiol, azida o alquino

30 Y-TA se usa cuando el agente de direccionamiento está libre de grupos funcionales capaces e producir reacciones secundarias indeseadas con X y/o iniciación e polimerización con apertura de anillo o capaces de producir reacciones secundarias indeseadas con catalizadores de la polimerización

Y-TA(PRO) se usa cuando el agente de direccionamiento no cumple los requisitos estructurales químicos indicados anteriormente para el uso e Y-TA

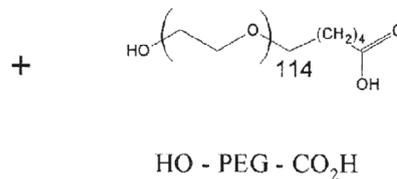
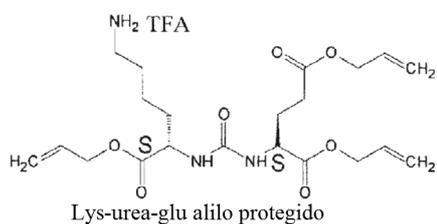
35 Las químicas de conjugación incluyen activación de ácido en éster de succinimidilo usando, por ejemplo, etildimetilaminopropilcarbodiimida (EDC) y/o N-hidroxisuccinimida (NHS), seguido de reacción de amidación; alquilación reductora que implica un aldehído y amina y la posterior reducción usando, por ejemplo, cianoborohidruro de sodio; química clic que implica restos azido y alquino usando, por ejemplo, un catalizador de cobre; química de tiol-maleimida para dar un mercaptano secundario estable.

40 El poli(éster) incluye poli(D,L-lactida), poli(L-lactida), poli(D,L-lactida-co-glicólido)

Esquema 3. Metodologías de síntesis de conjugados covalentes de poli(etilenglicol) y agente de direccionamiento (AD) o su análogo protegido (TA-PRO).

45
50
La presente invención también describe procedimientos para la síntesis de conjugados HO-PEG-TA (PRO) en condiciones de disolvente orgánico anhidro usando la reacción de amidación preferida de un resto amina del TA (PRO) y un extremo ácido de PEG. El esquema 4 ilustra el procedimiento utilizado para la conjugación covalente de HO-PEG-CO₂H en un agente de direccionamiento de lisina-urea-glutámico (lys-urea-glu) protegido con alilo. El uso del análogo protegido con alilo del agente objetivo de lys-urea-glu mejora su solubilidad en disolventes orgánicos más adecuados (tales como diclorometano) para la química de activación de ácido EDC/NHS. La reacción de amidación en condiciones de disolvente orgánico anhidro permite un alto grado de eficacia de la conjugación y produce más del 80 % de funcionalización del grupo terminal en HO-PEG-lys-urea-glu (protegido con alilo). Además, Además, el lys-urea-glu protegido con alilo (TA (PRO)) permite la polimerización de apertura de anillo de los

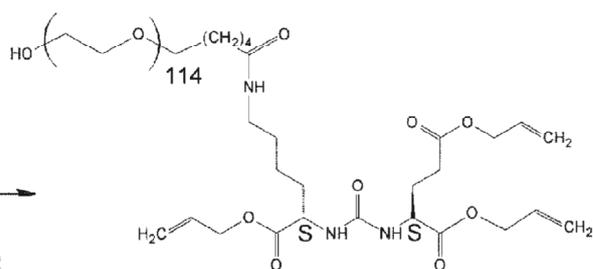
monómeros de lactona sin reacción secundaria indeseable con el catalizador de la polimerización preferido (2-etilhexanoato de estaño (II)).



TA(PRO)

1. Dimetilaminopropilcarbodiimida de etilo (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), diisopropiletilamina (DIEA) en cloroformo anhidro
2. 2 h a temperatura ambiente
3. Eliminar el cloroformo mediante evaporación rotatoria a temperatura ambiente

4. Disolver en etanol-cloroformo (10:1) y diafiltrar contra 30 diavolumenes e disolvente binario
5. Eliminar el disolvente mediante evaporación rotatoria a 35 °C
6. Purificar mediante precipitación en éter/hexano (70/30)

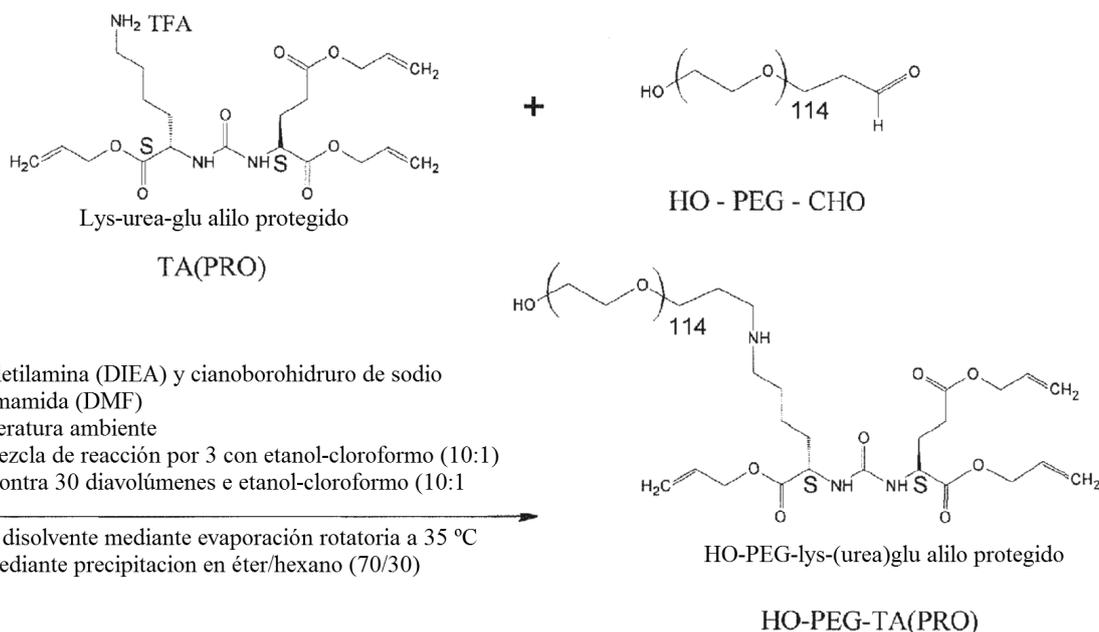


HO-PEG-lys(urea)-glu alilo protegido

HO-PEG-TA(PRO)

5 Esquema 4. Síntesis del conjugado HO-PEG-lys-urea-glu(alilo protegido) en condiciones de disolvente orgánico anhidro usando activación con EDC/NHS del extremo ácido de PEG, seguido de amidación mediante reacción con el resto amina de TA(PRO)

10 La presente invención también describe procedimientos para la síntesis de conjugados HO-PEG-TA (PRO) en condiciones de disolvente orgánico usando la reacción de alquilación reductora de un resto amina del TA (PRO) y un extremo aldehído de PEG. El esquema 5 ilustra el procedimiento utilizado para la conjugación covalente de HO-PEG-CHO al lisina-urea-ácido glutámico (TA(PRO)) protegido con alilo. El uso del análogo protegido con alilo del agente de direccionamiento de lys-urea-glu mejora su solubilidad en disolventes orgánicos (tales como diclorometano, dimetilformamida) adecuados para la química de alquilación reductora. La reacción de alquilación reductora en condiciones de disolvente orgánico permite un alto grado de eficacia de la conjugación y produce más del 80 % de funcionalización del grupo terminal en HO-PEG-lys-urea-glu (protegido con alilo).

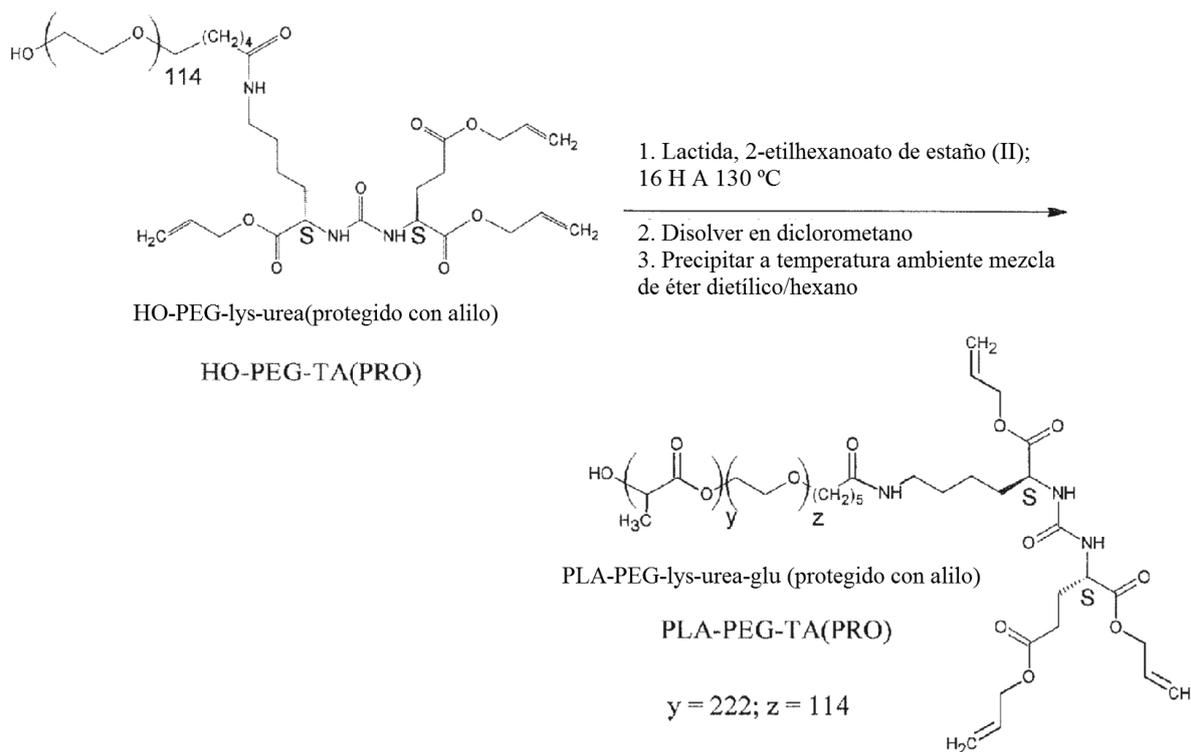


1. Diisopropiletilamina (DIEA) y cianoborohidruro de sodio en dimetilformamida (DMF)
2. 2 h a temperatura ambiente
3. Diluir la mezcla de reacción por 3 con etanol-cloroformo (10:1)
4. Diafiltrar contra 30 diavolumenes e etanol-cloroformo (10:1)

5. Eliminar el disolvente mediante evaporación rotatoria a 35 °C
6. Purificar mediante precipitación en éter/hexano (70/30)

Esquema 5. Síntesis del conjugado HO-PEG-lys-urea-glu(alilo protegido) en condiciones de disolvente orgánico usando aminación reductora que implica el resto amina del agente de direccionamiento protegido (TA(PRO)) y el extremo aldehído de PEG

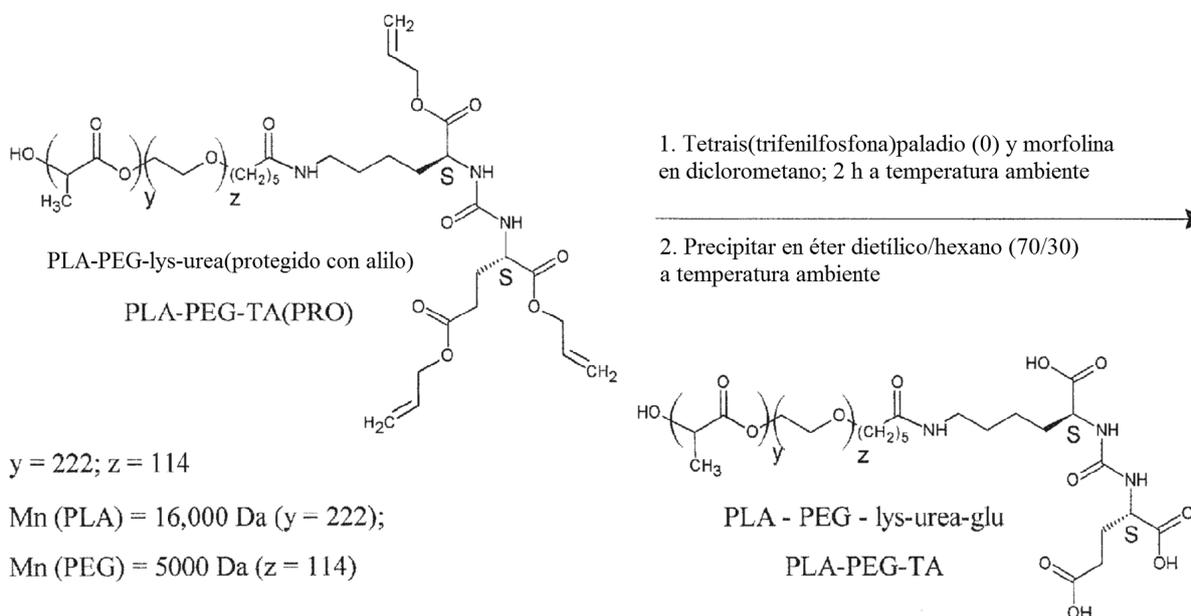
- 5 La presente invención también describe la polimerización de apertura de anillo de monómeros de lactona cíclica utilizando el conjugado HO-PEG-lys (urea) glu (protegido con alilo) (HO-PEG-TA (PRO)) como macroiniciador y 2-etilhexanoato de estaño (II) como catalizador de la polimerización en condiciones de fusión del monómero a 130 °C (esquema 6), este procedimiento también se denomina enfoque de "polimerización a partir de". Por ejemplo, el poli(D, L-lactida)-bloque-poli(etilenglicol)-lys-urea-glu (protegido con alilo) obtenido mediante tal polimerización se convierte después en poli(D,L-lactida)-bloque-poli(etilenglicol)-lys-urea-glu mediante la eliminación de los grupos protectores de alilo usando base orgánica (morfolina) y tetrakis(trifenilfosfina) paladio (0) como catalizador (esquema 7). Las condiciones de la reacción de desprotección se optimizan con respecto a los equivalentes molares de morfolina, catalizador de paladio y tiempo de reacción para permitir la eliminación cuantitativa de grupos protectores de alilo (> 98 %, determinados mediante espectroscopia de RMN), sin reducción mensurable de la masa molar (según lo determinado por cromatografía de exclusión por tamaño y viscosimetría de solución diluida) del copolímero de bloque.



Esquema 6. Síntesis del conjugado de poli(D,L-Lactida)-b-PEG-lys-ura-glu(protégido con alilo) mediante polimerización con apertura de anillo de D,L-lactida en condiciones de fusión de monómero a 130°C usando HO-PEG-PEG-lys-glu(protégido con alilo) como macroiniciador y 2-etilhexanoato de estaño (II) como catalizador de polimerización

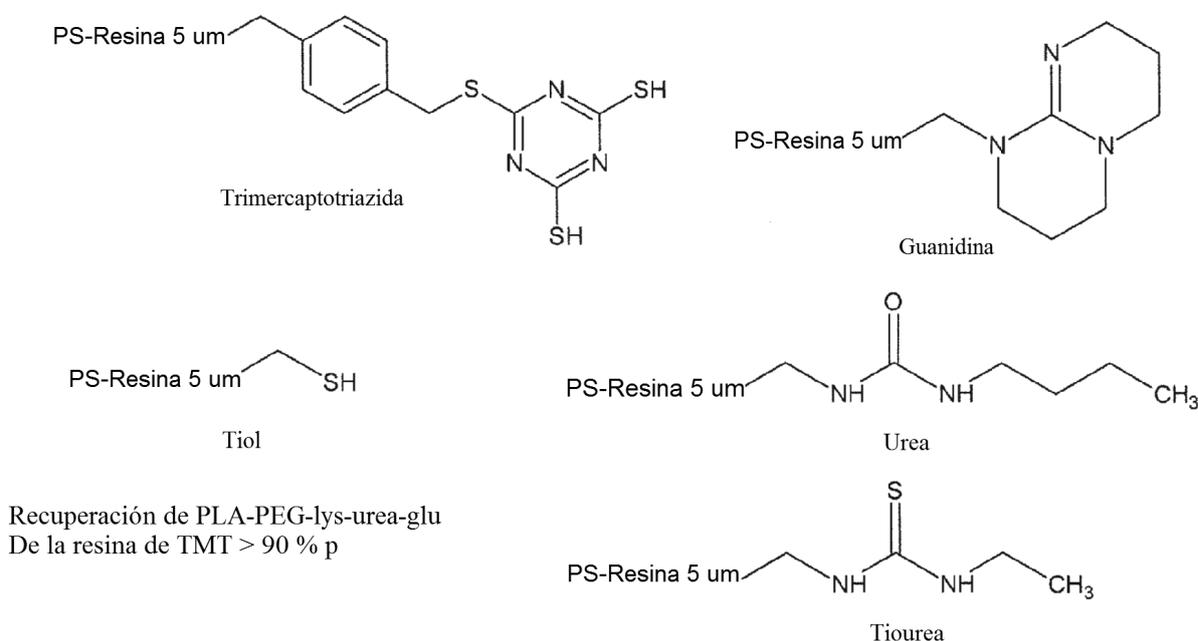
5 Esta solicitud también describe la eliminación del paladio residual del copolímero dibloque funcionalizado PLA-PEG-lys-urea-glu (PLA-PEG-TA). El Esquema 8 muestra las estructuras químicas de varias resinas disponibles comercialmente usadas para eliminar contaminantes de paladio. Se prefiere la resina funcional trimercaptotriazida (TMT) para la eliminación de paladio de muestras de PLA-PEG-lys-urea-glu con una pérdida mínima de rendimiento del polímero en la etapa de eliminación de paladio. La pérdida de rendimiento se observa cuando se usan resinas funcionalizadas con restos de unión a paladio distintos de TMT. Esto se debe a la interacción entre los restos de unión a paladio unidos a resina y el AD en PLA-PEG-TA.

10



Esquema 7. Conversión de poli(D,L-Lactida)-b-PEG-lys-urea-glu(protegido con alilo) (PLA-PEG-TA(PRO)) en PLA-PEG-PEG-lys-urea-glu (PLA-PEG-TA) usando catalizador tetrakis(trifenilfosfina) paladio (0) en solución de morfolina/diclorometano

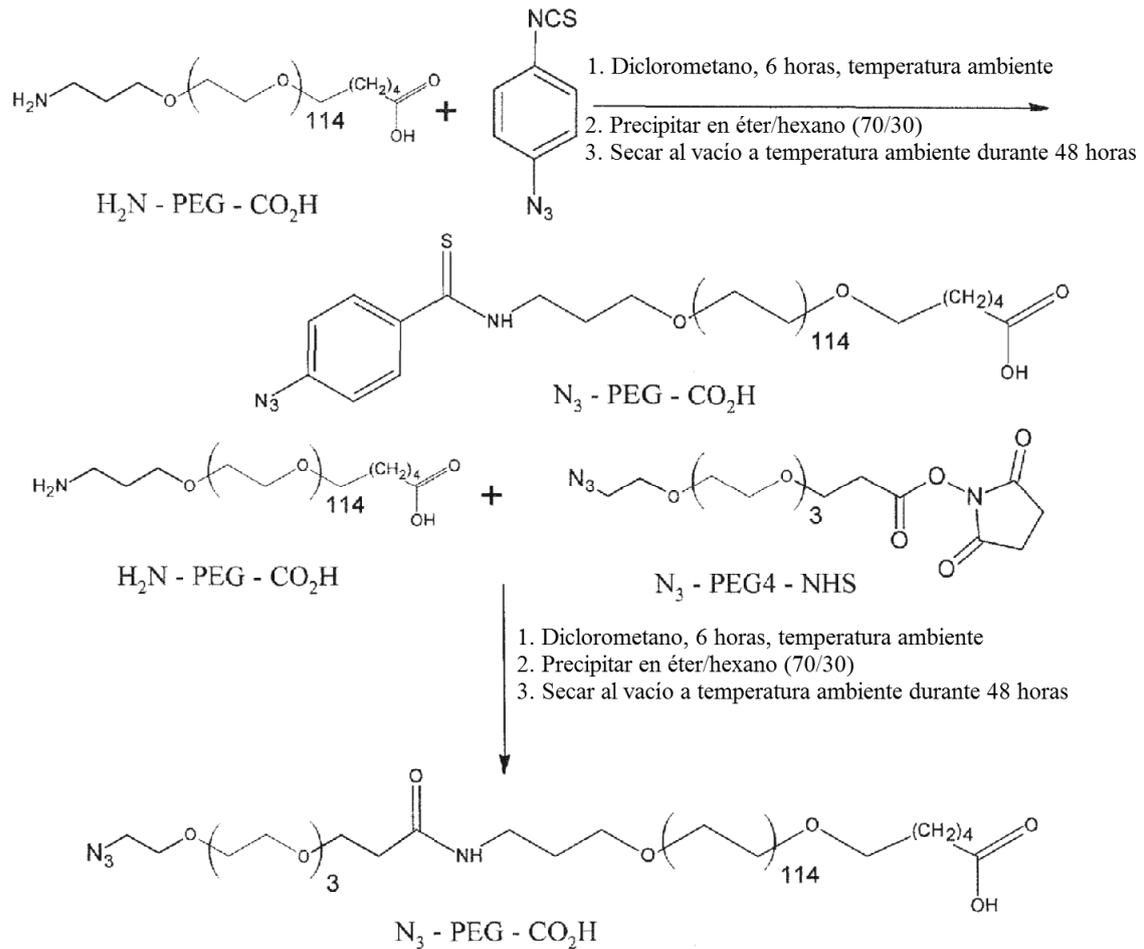
- 5 Esta solicitud también describe la conjugación covalente de los agentes de direccionamiento (AD) en su forma nativa no protegida en condiciones de solución acuosa a poli(etilenglicol) heterobifuncional. Este procedimiento utiliza la alta solubilidad en agua del resto de direccionamiento tal como lys-urea-glu u otros ligandos de direccionamiento basados en péptidos. Las propiedades de solubilidad del conjugado PEG-lys-urea-glu están dominadas por el polímero de poli(etilenglicol). Por lo tanto, a diferencia de lys-urea-glu, PEG-lys-urea-glu es soluble en disolventes orgánicos comunes que incluyen, pero no se limitan a, diclorometano, dimetilformamida, tetrahidrofurano, cloroformo o dimetilsulfóxido. Esto permite el acoplamiento covalente del conjugado PEG-lys-urea-glu al poli(éster) funcional final para producir el poli(éster)-PEG-lys-urea-glu (poli(éster)-PEG-TA) deseado en condiciones de disolvente orgánicos, en los que lys-urea-glu antes de la conjugación de PEG es insoluble o escasamente soluble. Este enfoque se conoce como el enfoque de "acoplamiento a". La disolución completa del poli(éster) funcional final y la PEG-lys-urea-glu en un disolvente común es crítica para obtener un alto rendimiento del copolímero de bloque funcional de poli(éster)-PEG-TA deseado.



Esquema 8. Estructuras químicas de resinas de depuración de paladio disponibles comercialmente: funcionalidad preferida para la eliminación de paladio de PLA-PEG-lys-urea-glu es trimercaptotriazida (TMT)

- 20 El PEG-lys-urea-glu se acopla de manera covalente a un poli(éster) funcional final usando químicas que proceden sin reacciones secundarias con los restos de ácido carboxílico de lys-urea-glu. Por ejemplo, un ácido α -azido- ω -carboxílico puede conjugarse con el resto amino de la lys-urea-glu mediante su reacción con el extremo carboxi de dicho PEG.

- 25 El PEG funcional del agente de direccionamiento, el α -azido- ω - (lys-urea-glu) polietilenglicol puede prepararse mediante síntesis de un precursor heterobifuncional tal como α -azido- ω -carboxi polietilenglicol (N_3 -PEG-CO₂H) a partir de materiales de partida comercialmente disponibles tales como α -amino- ω -carboxi-poli(etilenglicol) y, por ejemplo, isotiocianato de 4-azidofenilo, O-(2-azidoetil)-O-[2-diglicilil-amino]etil]heptaetilenglicol o azida-PEG4-NHS usando metodologías de conjugación estándar (esquema 9). A continuación, se hace reaccionar el polímero heterobifuncional, N_3 -PEG-CO₂H, con la funcionalidad amina de lys-urea-glu en condiciones acuosas utilizando los procedimientos ilustrados en el esquema 10.



Esquema 9. Síntesis de N_2 -PEG- CO_2H de materiales de partida disponibles comercialmente usando técnicas químicas convencionales

5 Como alternativa, N_3 -PEG-NHS puede prepararse mediante la activación del extremo carboxi de N_3 -PEG- CO_2H en condiciones de disolvente orgánico anhidro, tal como en diclorometano usando etildimetilaminopropilcarbodiimida (EDC) soluble orgánica, N-hidroxisuccinimida (NHS) y diisopropilamina (DIEA) y, posteriormente, se purifica mediante precipitación en éter/hexano anhidro (70/30). A continuación, el polímero activado (N_3 -PEG-NHS) se recupera por filtración y se seca al vacío y se almacena en un ambiente seco en nitrógeno seco (1 ppm de agua en caja de guantes durante 48 horas) antes del almacenamiento a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. A continuación se prepara N_3 -PEG-NHS

10 mediante este procedimiento para preparar N_3 -PEG-lys-urea-glu como se indica en las etapas 6 a 10 del esquema 10.

1. Tampón MES, Ph= 4,7, 20 equivalentes de EDC.HCl/sulfo-NHS
2. 1 hora a temperatura ambiente en agitación
3. 2-mercaptoetanol, 1 equivalente con respecto a EDC-HCl
4. 5-10 minutos a temperatura ambiente en agitación
5. Purificar a partir de impurezas de molécula pequeña

- a) Concentrado 50 x mediante filtración centrífuga a 4 °C; 4000 g
60 minutos
- b) Reconstituir en agua DI
- c) Usar esta solución (A) de N₂-PEG-NHS (4°C) en la etapa 8
en 30 minutos de preparación

N₃-PEG-CO₂H

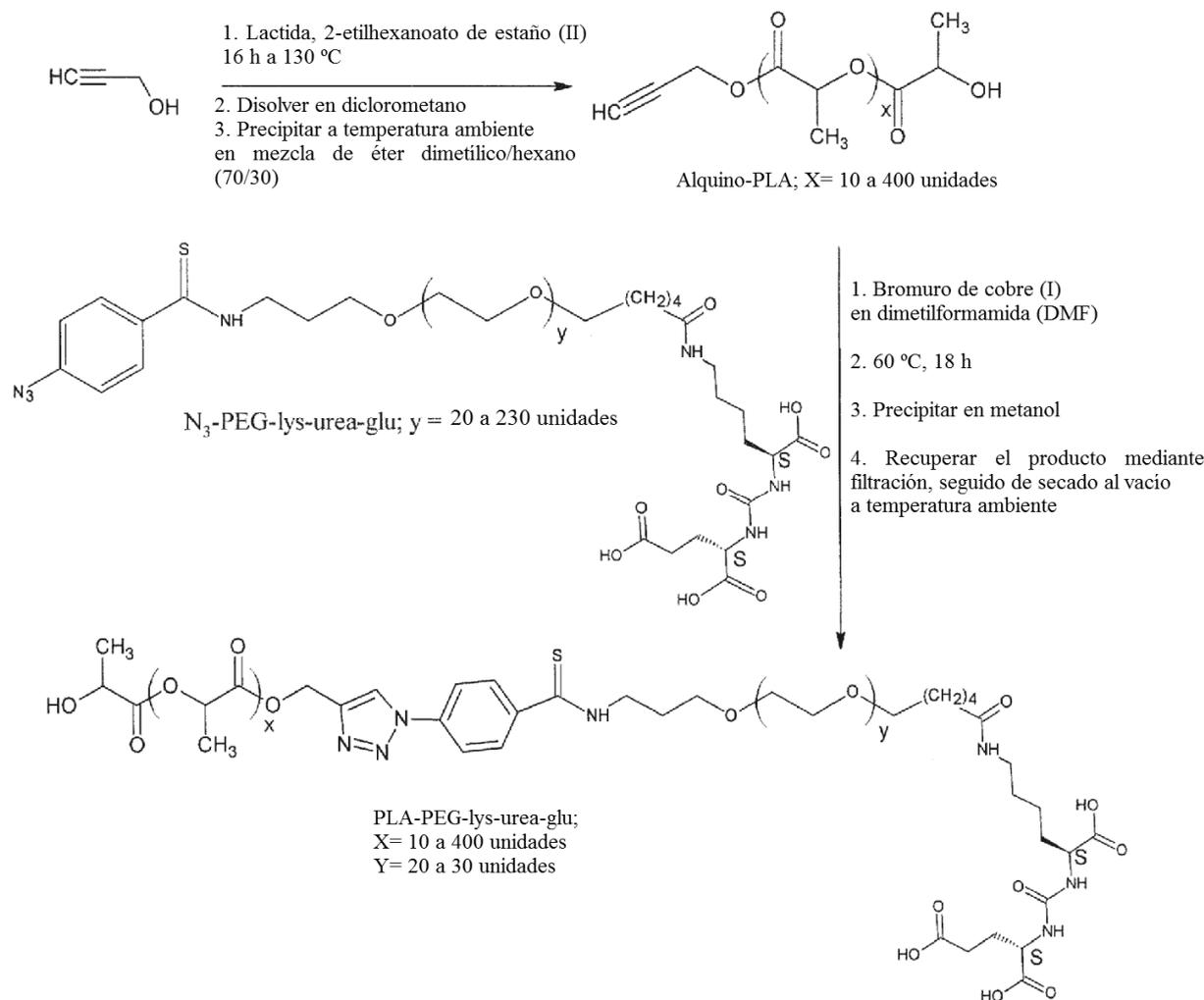


N₃-PEG-lys-urea-glu

6. Disolver lys-urea-gluc (10 equivalente frente a N₂-PEG-NHS
en tampón bicarbonato, pH= 9,7
7. Ajustar el pH A 7,4 usando hidróxido sódico 0,1N (solución B)
8. Añadir la solución A a la solución B gota a gota y agitar
a temperatura ambiente durante 6 horas
9. Purificar a partir de exceso de lys-urea-glu en la etapa 5(a) (solución C)
10. Liofilizar la solución C para recuperar N₂-PEG-lys-urea-glu

Esquema 10. Síntesis de N₂-PEG-lys-urea-glu en condiciones acuosas a partir de N₂-PEG-CO₂H usando ajuste de pH para maximizar el rendimiento del producto deseado

- 5 Tal como se ha afirmado anteriormente, esta aplicación también describe el acoplamiento covalente de ₃-PEG-lys-urea-glu a un poli(éster) funcional final que tiene un resto alquino en su extremo α-terminal y un extremo hidroxilo en su extremo ω usando técnicas químicas "clic" bien establecidas, tal como el uso de un catalizador de sulfato de cobre en condiciones de disolvente orgánico, por ejemplo en dimetilformamida (DMF) (esquema 11). Esta metodología de química "clic" es particularmente útil, ya que las funcionalidades de ácido carboxílico de lys-urea-glu no son reactivas hacia la funcionalidad alquino del poli(éster). Tal química ortogonal descarta posibles reacciones secundarias y permite el uso de largos tiempos de reacción entre el poli(éster)-alquino y N₃-PEG-lys-urea-glu.
- 10 Además, a diferencia de la química de amidación que usa poli(éster)-NHS, la química de "clic" no es sensible a la humedad, por lo que la necesidad de condiciones anhidras no es crucial para garantizar un grado aceptable de conjugación covalente que proporcione > 80 % de funcionalización final.



Esquema 11. Síntesis de PLA-PEG-lys-urea-glu mediante conjugación covalente de N_2 -PEG-lys-urea-glu a alquino-PLA en dimetilformamida usando catalizador de bromuro de cobre (I) a 60 °C

El enfoque de "polimerización a partir de" del esquema 6 y 7 tiene las siguientes ventajas:

- 5 1. El uso de HO-PEG-TA(PRO) en la polimerización de apertura de anillo garantiza la ausencia de reactividad cruzada entre los grupos funcionales del catalizador o monómero de polimerización de AD, evitando así la pérdida de control sobre la polimerización y los subproductos contaminantes.
- 10 2. La ausencia de reacciones secundarias permite un excelente control del peso molecular y la composición del poli(éster)-PEG-TA (PRO)
- 15 3. El ajuste de la composición de la alimentación de monómero y la relación molar entre el iniciador y el monómero permite la síntesis del bloque de poli(éster) de una amplia gama de composiciones y pesos moleculares deseados. La relación entre el PEG y el poli(éster) también se puede variar con facilidad.
- 20 4. El PLA-PEG-TA (PRO) es soluble en los disolventes orgánicos deuterados habituales que se utilizan para la espectroscopia de RMN, tal como cloroformo-d, DMSO-d6, DMF-d7 o THF-d4. Esto permite el análisis de RMN de poli(éster)-PEG-TA (PRO), proporcionando información cuantitativa con respecto a las características cruciales del polímero, tal como la extensión del grupo final TA(PRO) en poli(éster)-PEG-TA (PRO), así como el peso molecular promedio en número absoluto (M_n). Siempre que la masa molar relativa (determinada, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión por tamaño o viscosidad inherente) de poli(éster)-PEG-TA sea equivalente a la de su precursor protegido (poli(éster)-PEG-TA (PRO)), el M_n absoluto de poli(éster)-PEG-TA(PRO) (determinado mediante espectroscopia de RMN) puede considerarse igual a la de su precursor. Esto permite una determinación precisa de la característica del polímero.
- 25 5. La determinación precisa de la característica poli(éster)-PEG-TA, tal como su M_n absoluto y el grado de funcionalización del grupo terminal AD es crucial para controlar las propiedades de direccionamiento de las nanopartículas hechas de poli(éster)-PEG-TA. Dichas nanopartículas se preparan mezclando cantidades conocidas de este polímero funcional (poli(éster)-PEG-TA) con polímero no funcional (poli(éster)-PEG) para

controlar el grado del agente de direccionamiento dentro de la nanopartícula terapéutica.

El enfoque de "polimerización a partir de" del esquema 6 y 7 tiene los siguientes defectos:

- 5 1. Requiere que los grupos funcionales del AD estén protegidos. Esto puede requerir el uso de materiales de partida costosos y/o difíciles de obtener cuando el AD se basa en 2 o más residuos de aminoácidos o ácidos nucleicos que contienen restos de la cadena lateral que pueden interferir con la polimerización de apertura del anillo.
- 10 2. Se necesita la eliminación de los grupos protectores de TA (PRO) para producir el poli(éster)-PEG-TA deseado. La reacción de desprotección puede requerir el uso de un catalizador de metal pesado que debe eliminarse del producto final. Esto agrega una etapa de purificación al proceso que, en algunos casos, puede ser difícil de lograr con suficiente eficacia para proporcionar un material polimérico de pureza farmacéuticamente aceptable.

El enfoque de "acoplamiento a" (que no es parte de la invención) tiene las siguientes ventajas:

- 15 1. No requiere análogos protegidos potencialmente costosos del agente de direccionamiento (TA (PRO))
2. No requiere la desprotección del TA (PRO) para obtener el polímero de poli(éster)-PEG-TA deseado, evitando de ese modo los inconvenientes asociados descritos anteriormente.

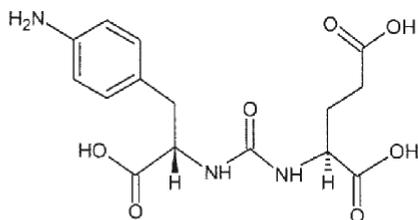
El enfoque de "acoplamiento a" tiene las siguientes deficiencias:

- 20 1. Se basa en el acoplamiento de poli(ésteres) funcionales finales prefabricados a PEG-TA, por lo que el control sobre la composición y el peso molecular del poli(éster) requiere la síntesis de poli(ésteres) de varias propiedades deseadas antes de la reacción de acoplamiento.
2. El acoplamiento de entidades macromoleculares, tales como un poli(éster) funcional final y PEG-TA es lento debido a la escasa difusión característica de los polímeros y requiere largos tiempos de reacción a altas concentraciones de reactivos para asegurar eficiencias de acoplamiento aceptables (> 80 %).
- 25 3. El procedimiento produce poli(éster)-PEG-TA. Los copolímeros dibloque que tienen AD como un grupo final son difíciles de analizar mediante espectroscopia de RMN debido a las diferencias en las características de solubilidad del polímero de poli(éster)-PEG y el AD. Por lo tanto, el análisis cuantitativo de la funcionalidad del grupo final y el M_n absoluto es difícil usar procedimientos convencionales, tales como espectroscopia de RMN.

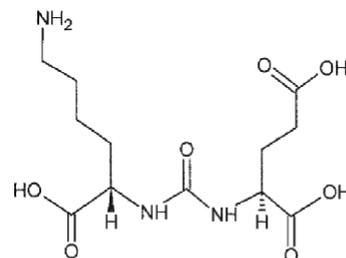
30 En vista de las ventajas y deficiencias de los enfoques de "polimerización a partir de" y "acoplamiento a", este último se prefiere sobre el primero solamente cuando el TA (PRO) es costoso y/o difícil de obtener o las condiciones de desprotección son difíciles o contaminar de forma irreversible el producto polimérico final. En caso contrario, se prefiere el enfoque de "polimerización a partir de" debido al fácil acceso a una gran variedad de arquitecturas y composiciones de polímeros, así como la facilidad de la caracterización analítica del poli(éster)-PEG-TA (PRO) y, por lo tanto, del producto final (poli(éster)-PEG-TA) en casos en los que la equivalencia de la arquitectura del polímero puede establecerse mediante otros procedimientos analíticos no absolutos pero fiables.

35 El autoensamblaje de los copolímeros dibloque de poli(éster)-PEG-X en un medio acuoso produce nanopartículas que comprenden un núcleo hidrófobo y una corona hidrófila de poli(etilenglicol) (exterior). El núcleo hidrofóbico porta el agente bioactivo/terapéutico, mientras que la corona hidrófila presenta el agente de direccionamiento en la superficie de la nanopartícula y permite que las nanopartículas se unan selectivamente a los sitios diana (por ejemplo, tejido enfermo) a través de la interacción del agente de direccionamiento con un agente correspondiente expresado en el sitio de destino.

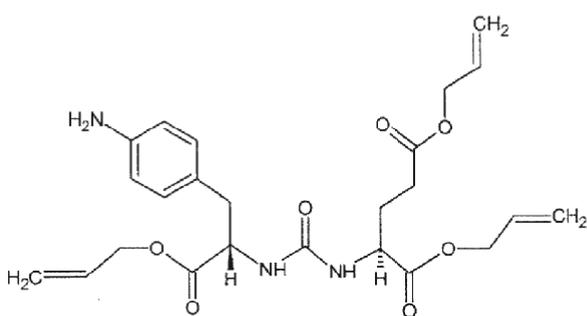
40 Estructuras químicas de las abreviaturas utilizadas:



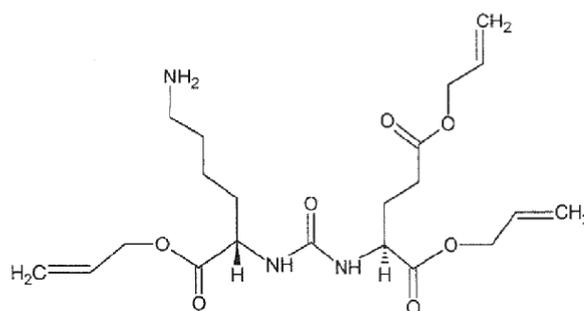
GL 1



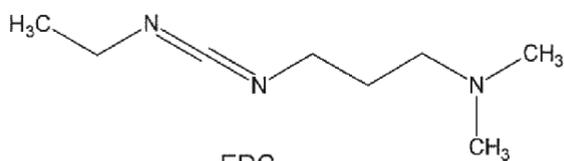
GL 2



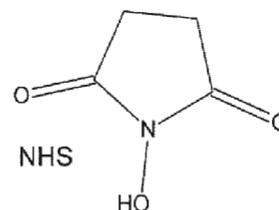
GL 1P



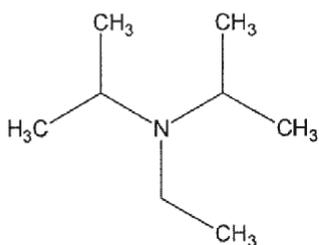
GL 2P



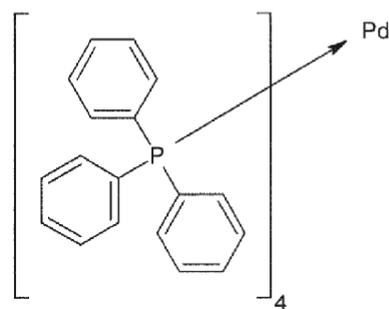
EDC



NHS



DIEA



Catalizador de Pd

RESTOS BIOACTIVOS / AGENTES TERAPÉUTICOS

5 Como se ha analizado anteriormente, los agentes terapéuticos (restos bioactivos) pueden incorporarse en el núcleo de las nanopartículas hidrófobas en un medio acuoso o en disolventes orgánicos y las nanopartículas pueden purificarse posteriormente. Agentes bioactivos (agentes terapéuticos) incluyen, sin limitaciones, 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 nutraceuticos (por ejemplo, vitaminas, minerales, etc.). Como se trata en el presente documento, los agentes bioactivos se pueden administrar a un individuo como se divulga en el presente documento. Los ejemplos de

10 agentes terapéuticos que se administrarán de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque sin limitaciones, moléculas pequeñas (por ejemplo, agentes citotóxicos), ácidos nucleicos (por ejemplo, agentes de ARNip, 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).

Algunos ejemplos de agentes terapéuticos que pueden administrarse dentro de las nanopartículas producidas de acuerdo con los procedimientos desvelados incluyen, pero sin limitación, agentes tales como penicilinas, aminopenicilinas, penicilinas junto con inhibidor de penicilinas y/o agentes antifúngicos), cefalosporinas, cefamicinas y carbapenémicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos y aminoglucósidos. Ejemplos específicos incluyen, aunque sin limitaciones, eritromicina, bacitracina cinc, polimixina, sulfatos de polimixina B, neomicina, gentamicina, tobramicina, gramicidina, ciprofloxacino, trimetoprima, ofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino, norfloxacino, sulfacetamida de sodio, cloranfenicol, tetraciclina, azitromicina, claritromicina, sulfato de trimetoprima y bacitracina.

Todavía otros ejemplos de agentes terapéuticos adecuados para su inclusión dentro de las nanopartículas desveladas son agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y esteroideos (generalmente denominados agentes antiinflamatorios (que incluyen tanto inhibidores de COX-1 como COX-2)). Los ejemplos incluyen, aunque sin limitaciones, corticoesteroides, medrisona, prednisolona, acetato de prednisolona, fosfato sódico de prednisolona, fluorometolona, dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, betametasona, fluorometasona, antazolona, acetato de fluorometolona, rimexolona, etabonato de loteprednol, diclofenaco (diclofenaco sódico), ketorolaco, ketorolaco trometamina, hidrocortisona, bromfenaco, flurbiprofeno, antazolona y xilometazolina.

Otros agentes terapéuticos que se pueden incorporar en las nanopartículas como se desvelan en el presente documento incluyen antihistamínicos, estabilizadores de mastocitos y otros agentes antialérgicos. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitaciones, cromolino sódico, lodoxamida trometamina, olopatadina HCl, nedocromilo sódico, fumarato de ketotifeno, levocabastina HCl, azelastina HCl, pemirolast (pemirolast de potasio), epinastina HCl, nafazolina HCl, emedastina, antazolona, feniramina, cromoglicato sódico, ácido N-acetil-aspartilglutámico y amlexanox.

Otros ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos potencialmente adecuados para la incorporación en nanopartículas incluyen agentes anticancerosos tales como 5-fluorouracilo (5-FU), CPT-11, 10-hidroxi-7-etilcamptotecina (SN38), S-I capecitabina, ftorafur, 5'-desoxiflurouridina, UFT, eniluracilo, desoxicitidina, 5-azacitosina, 5-azadesoxicitosina, alopurinol, 2-cloroadenosina, aminopterina, metileno-10-deazaaminopterina (MDAM), oxaplatino, picoplatino, tetraplatino, satraplatino, platino-DACH, ormaplatino, CI-973, JM-216, y análogos de los mismos, 9-aminocamptotecina, 10,11-metilendioxycamptotecina, karenitecina, 9-nitrocamptotecina, TAS 103, mostaza de L-fenilalanina, ifosfamida mefosfamida, trofosfamida carmustina, epotilonas A-E, tomudex, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, karenitecina, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir, amantadina, rimantadina, lamivudina, zidovudina, bevacizumab, trastuzumab, rituximab, 20-epi-1 α , 25 dihidroxivitamina D3, 4-ipomeanol, 5-etniluracilo, 9-dihidrotaxol, abiraterona, acivicina, aclarubicina, clorhidrato de acodazol, acronina, acilfilveno, adecipenol, adozelesina, aldesleucina, todos los antagonistas de tk, alretamina, ambamustina, ambomicina, acetato de ametanzona, amidox, amifostina, aminoglutetimida, ácido aminolevulínico, amrubicina, amsacrina, anagrelida, anastrozol, andrografolida, inhibidores de la angiogénesis, antagonista D, antagonista G, antarelix, antramincina, 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, betaclamincina B, ácido betulínico, inhibidor de BFGF, bicalutamida, bisantreno, bisantreno hidrocloruro, 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, calfofostina C, calusterona, derivados de camptotecina, IL-2 de viruela del canario, capecitabina, caraceraida, carbetimer, carboplatino, carboxamida-amino-triazol, carboxiamidotriazol, carest M3, carmustina, earn 700, inhibidor derivado de cartilago, clorhidrato de carubicina, carzelesina, inhibidores de caseína cinasa, castanospermina, cecropina B, cedefingol, cetorelix, clorambucilo, clorinas, cloroquinolaxina 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, dehidrodidemina B, deslorelina, dexifosfamida, dexormaplatino, dexrazoxano, dexverapamilo, dezaguanina, mesilato de dezaguanina, diazicuona, didemina B, didox, dietilhiotespermina, dihidro-5-azacitidina, dioxamicina, difenil espiromustina, docetaxel, docosanol, dolasetrón, doxiluridina, doxorubicina, clorhidrato de doxorubicina, droloxifeno, citrato de droloxifeno, propionato de dromostanolona, dronabinol, duazomicina, duocanicina SA, ebseleno, ecomustina, edatrexato, edelfosina, edrecolomab, eflomitina, clorhidrato de eflomitina, elemeno, elsarnitruccina, emitetur, enloplatino, enpromato, epipropidina, epirubicina, epirubicina hidrocloruro, 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, fluorodaunorubicina hidrocloruro, fluorouracilo, flurocitabina, forfenimex, formestano, fosquidona, fostriecina, fostriecina sódica, fotemustina, texafirina de gadolinio,

5 nitrato de galio, galocitabina, ganirelix, inhibidores de gelatinasa, gemcitabina, clorhidrato de gemcitabina, inhibidores de glutatión, hepsulfam, herregulina, bisacetamida de hexametileno, hidroxurea, hipericina, ácido ibandrónico, idarrubicina, clorhidrato de idarrubicina, idoxifeno, idramantona, ifosfamida, inofosina, 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-1A, interferón gamma-1B, interferones, interleucinas, iobenguano, yododoxorrubicina, iproplatin, 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, leptostatina, 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, lissoclinamida, 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 metaloproteínasa de matriz, maitansina, mecloretamina hidrocloreto, acetato de megestrol, acetato de melengestrol, melfalano, menogaril, merbarona, mercaptopurina, meterelina, metioninasa, metotrexato, metotrexato sódico, metoclopramida, metoprina, meturedapa, inhibidores de proteína quinasa C de microalgas, inhibidor de MIF, mifepristona, miltefosina, mirimostim, ARN bicatenario despareado, mitindomida, mitocarcina, mitocromina, mitogilina, mitoguzona, mitolactol, mitomalcina, mitomicina, análogos de mitomicina, mitonafida, mitosper, mitotano, mitotoxina factor de crecimiento de fibroblastos-saporina, mitoxantrona, mitoxantrona clorhidrato, mofarotena, 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-acetil-dinalina, nafarelina, nagrestip, naloxona/pentazocina, napavina, nafterpina, nartograstim, nedaplatino, nemorubicina, ácido neidrónico, endopeptidasa neutra, nilutamida, nisamicina, moduladores del óxido nítrico, antioxidante de nitrógeno, nitulina, nocodazol, nogalamicina, benzamidas n-sustituidas, 06-bencilguanina, octreotida, okicenona, oligonucleótidos, onapristona, ondansetron, oracina, inductor de citocinas oral, ormaplatino, osaterona, oxaliplatino, oxaunomicina, oxisuran, paclitaxel, análogos de paclitaxel, derivados de paclitaxel, palauamina, palmitoil- rioxina, ácido pamidrónico, panaxitriol, panomifeno, parabactina, pazeliptina, pegaspargasa, peldesina, peliomicina, pentamustina, polisulfato sódico de pentosano, pentostatina, pentrozol, sulfato de peplomicina, perflubron, perfosfamida, alcohol perillílico, fenazinomicina, fenilacetato, inhibidores de fosfatasa, picibanilo, pilocarpina hidrocloreto, pipobromano, pipsulfán, 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, porfimer sódico, porfiomicina, prednimustina, clorhidrato de procarbazona, 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, puromicina hidrocloreto, purpurinas, pirazorurina, pira- zoloacridina, conjugado de hemoglobina piridoxilada-polioxi-etileno, antagonistas de RAF, raltitrexed, ramosetrón, inhibidores de la RAS farnesil proteína transferasa, inhibidor de RAS, inhibidor de RAS-GAP, reteliptina desmetilada, etidronato de renio Re 186, rioxina, riboprina, ribozimas, RFI retinamida, iARN, rogletimida, rohitucina, romurtida, roquinimex, rubiginona B1, ruboxil, safinol, safinol clorhidrato, saintopina, SarCNU, sarcofitol A, sargramostim, miméticos de SD11, 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, sizofiran, sobuzoxano, borocaptato sódico, fenilacetato sódico, solverol, proteína de unión a somatomedina, sonermina, esparfosafó sódico, ácido esparfósico, esparsomicina, espicamicina D, espiro- germanio hidrocloreto, espiromustina, espiroplatino, esplenopentina, espongiestatina 1, escualamina, inhibidor de células madre, inhibidores de la división de las células madre, estiapiamida, estreptonigrina, estreptozocina, inhibidores de estromelina, 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, temporquina, temozolomida, tenipósido, teroxirona, testolactona, tetraclorode- caóxido, 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 urocina, vapreotida, variolina B, velaresol, veramina, verdinas, verteporfina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, vindesina, sulfato de vindesina, sulfato de vinepidina, sulfato de vinglicinato, sulfato de vinleurosina, vinorelbina, sulfato de vinorelbina, sulfato de vinrosidina, vinxaltina, sulfato de vinzolidina, vitaxina, vorozol, zanoterona, zeniplatino, zilascorb, zinostatina, zinostatina stimalamer o zorubicina hidrocloreto y combinaciones de los mismos.

65 En una realización, las nanopartículas de la presente invención pueden contener ARNip como agente terapéutico. Preferentemente, la molécula de ARNip tiene una longitud de aproximadamente 10-50 o más nucleótidos. Más preferentemente, la molécula de ARNip tiene una longitud de aproximadamente 15-45 nucleótidos. Incluso más

preferentemente, la molécula de ARNip tiene una longitud de aproximadamente 19-40 nucleótidos. Incluso más preferentemente, la molécula de ARNip tiene una longitud de aproximadamente 21-23 nucleótidos. El ARNip de la invención media, preferentemente, en el ARNi contra un ARNm diana. La molécula de ARNip 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.

Las moléculas de ARNip usadas como agentes terapéuticos en las nanopartículas divulgadas se pueden modificar para mejorar la estabilidad, ya sea *in vivo* o *in vitro*. 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 la nucleasa de los ARNsi.

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 los moldes de oligonucleótidos de ARNip 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.

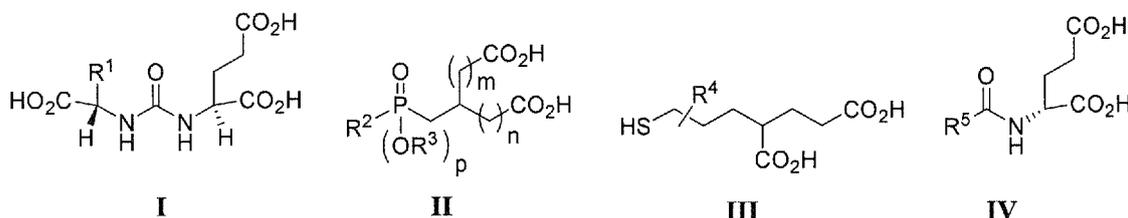
En diversas realizaciones, los ARNip se sintetizan *in vivo*, *in situ*, e *in vitro*. La ARN polimerasa endógena de la célula puede mediar la transcripción *in vivo* o *in situ*, o puede usarse ARN polimerasa clonada para la transcripción *in vivo* o *in vitro*. Para la transcripción de un transgen *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 ARNip a partir de una construcción recombinante puede producirse mediante la introducción de la construcción en un cigoto, una célula madre embrionaria, u otra célula multipotente derivada del organismo apropiado.

En una realización, las moléculas de ARNip están dirigidas al ARNm que codifica al menos una proteína celular (por ejemplo, una proteína nuclear, citoplasmática, transmembrana o asociada a membrana). En otra realización, las moléculas de ARNip están dirigidas al ARNm que codifica una o más proteínas extracelulares (por ejemplo, una proteína de la matriz extracelular o proteína secretada). Por lo tanto, un ARNm diana puede codificar 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, ABL1, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSF1R, ERBA, ERBB, EBRB2, ERBB2, ERBB3, ETS1, ETS2, ETV6, FGR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, 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 o 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, fosfatidasas, fosfolipasas, fosforilasas, fitasas, sintasas del regulador del crecimiento de plantas, poligalacturonasas, proteinasas y peptidasas, pulanasas, recombinasas, transcriptasas inversas, RUBISCO, topoisomerasas o xilanasas). El ARNm diana también puede codificar proteínas implicadas en el crecimiento de tumores (incluyendo la vascularización) o en la actividad o potencial metastásico (por ejemplo, receptores de superficie celular y sus ligandos). El ARNm diana también puede codificar una o más proteínas secretadas, proteína reguladora del ciclo celular, proteína reguladora génica, proteína reguladora de la apoptosis o proteínas implicadas en la respuesta inmune, inflamación, cascada del complemento o sistemas de coagulación. Ejemplos adicionales del ARNm diana contra los que pueden diseñarse construcciones de ARNip *incluyen c-myc, c-myc, mdm2, PKA-I (proteína cinasa A tipo I), Ras, c-Raf cinasa, CDC25 fosfatidasas, ciclinas, cinasas dependientes de ciclina (cdks), telomerasa, PDGF/ris y mos*. El ARNm también se puede utilizar para atacar el ARNm codificado por un gen de fusión que resulta de la translocación cromosómica, por ejemplo, el oncogén de fusión Bcr/Abl. El ARNip también puede ser dirigido contra ARNm que codifica proteínas tales como las cinasas dependientes de ciclina, antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), factor beta transformante de crecimiento (TGF-beta), factor nuclear kappa B (NF-kB), E2F, HER-2/neu, PKA, TGF-alfa, EGFR, TGF- beta, IGFR, P12, MDM2, VEGF, MDR, transferrina, ferritina, receptor de ferritina, receptor de transferrina, IRE, C-fos, HSP27, metalotioneína.

AGENTES DE DIRECCIONAMIENTO

Como se ha indicado anteriormente, las nanopartículas producidas por la presente invención también pueden incorporar uno o más agentes de direccionamiento a través de los restos de PEG funcionalizado. Los agentes de direccionamiento adecuados incluyen, por ejemplo, anticuerpos y polipéptidos que se unen a polipéptidos que habitualmente están sobreexpresados por células tumorales o cancerosas. Los ejemplos no limitantes de tales polipéptidos son el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor de somatostatina (SSTR), receptor del factor de crecimiento insulínico, receptores del ácido fólico, receptor HER2, receptor de interleucina 13, receptor peptídico liberador de gastrina, CD30, receptor peptídico intestinal vasoactivo, receptor de gastrina, antígeno prostático específico y/o el receptor de estrógeno.

- 5
10
15
- Otro ejemplo de un agentes de direccionamiento adecuado para el acoplamiento a las nanopartículas desveladas a través de PEG funcionalizado son ligandos de molécula pequeña. Tales ligandos de molécula pequeña se pueden usar para atacar cánceres que expresan proteínas diana particulares. Por ejemplo, para tumores o cánceres que expresan antígeno prostático específico de membrana (PSMA) (incluidos, entre otros, cáncer de próstata, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma colorrectal y glioblastoma, y tumores sólidos que expresan PSMA en la neovasculatura tumoral), se pueden usar ligandos de PSMA. En algunas realizaciones, el ligando de PSMA de bajo peso molecular tiene las Fórmulas I, II, III o IV:



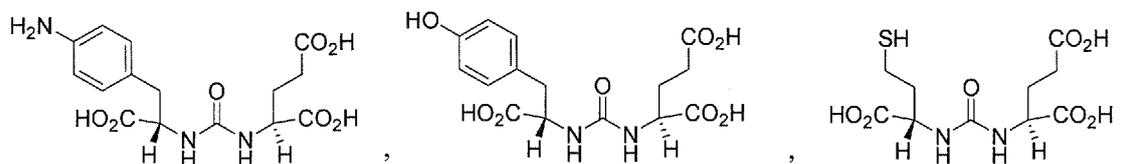
y enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereómeros o racematos del mismo; en la que

- 20
25
- cada uno de m y n es, independientemente, 0, 1, 2 o 3;
p es 0 o 1;
R¹, R², R⁴ y R⁵ son cada uno, independientemente, del grupo que consiste en alquilo sustituido o sin sustituir, (por ejemplo, alquilo C₁₋₁₀, alquilo C₁₋₆ o alquilo C₁₋₄), arilo sustituido o sin sustituir (por ejemplo, fenilo o piridinilo), y cualquier combinación de los mismos; y
R³ es H o alquilo C₁₋₆ (por ejemplo, CH₃).

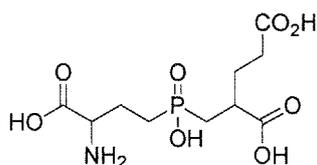
Para los compuestos de Fórmulas I, II, III y IV, R¹, R², R⁴ y R⁵ comprenden puntos de unión a la nanopartícula dentro de la porción de PEG de la nanopartícula. El punto de unión puede formarse por un enlace covalente, enlace iónico, enlace de hidrógeno, un enlace formado por absorción incluyendo adsorción química y adsorción física, un enlace formado a partir de enlaces van der Waals, o fuerzas de dispersión. Por ejemplo, si R¹, R², R⁴ o R³ se definen como una anilina o un grupo alquilo C₁₋₆-NH₂, 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. 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.

- 30
35
40
- En realizaciones particulares de las Fórmulas I, II, III o IV, R¹, R², R⁴ y R⁵ son cada uno, independientemente, alquilo C₁₋₆ o fenilo, o cualquier combinación de alquilo C₁₋₆ o fenilo, que están sustituidos independientemente una o más veces con OH, SH, NH₂, o CO₂H, y en la que el grupo alquilo puede interrumpirse por N(H), S u O. En otra realización, R¹, R², R⁴ y R⁵ son cada uno, independientemente, CH₂-Ph, (CH₂)₂-SH, CH₂-SH, (CH₂)₂C(H)(NH₂)CO₂H, CH₂C(H)(NH₂)CO₂H, CH(NH₂)CH₂CO₂H, (CH₂)₂C(H)(SH)CO₂H, CH₂-N(H)-Ph, O-CH₂-Ph, u O-(CH₂)₂-Ph, en las que cada pH puede estar independientemente sustituido una o más veces con OH, NH₂, CO₂H o SH. Para estas fórmulas, los grupos NH₂, 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 más, el ligando de PSMA de bajo peso molecular se selecciona del grupo que consiste en

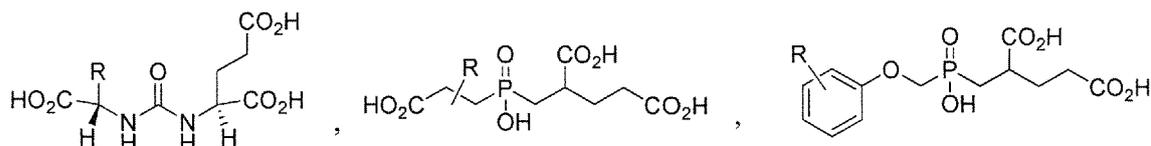


- 45 y

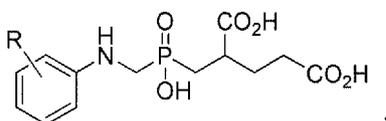


y enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereómeros, o racematos de los mismos, y en los que los grupos NH₂, OH o SH sirven como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por ejemplo, -N(H)-PEG, -O-PEG o -S-PEG).

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

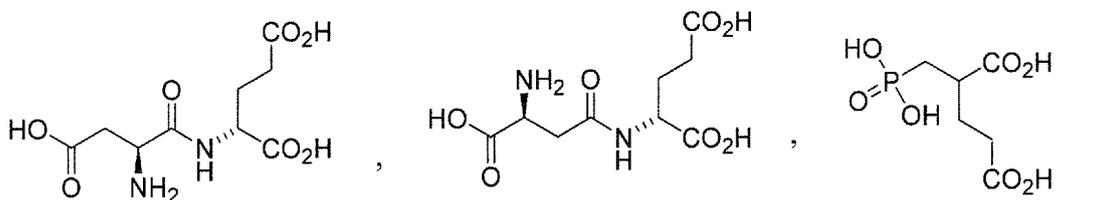


y

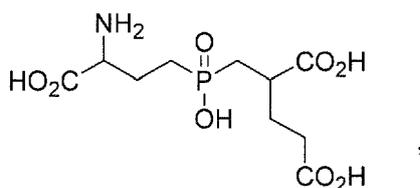


10 y enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereómeros o racematos del mismo, en la que cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en NH₂, SH, OH, CO₂H, alquilo C₁₋₆ que está sustituido con NH₂, SH, OH o CO₂H, y fenilo que está sustituido con NH₂, SH, OH o CO₂H, 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 CO₂-PEG).

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

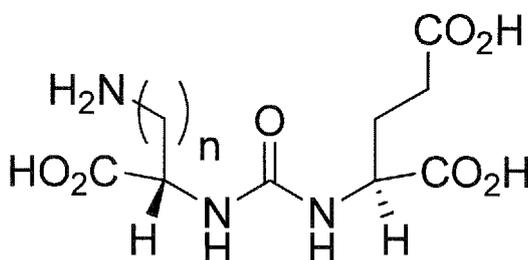


15 y



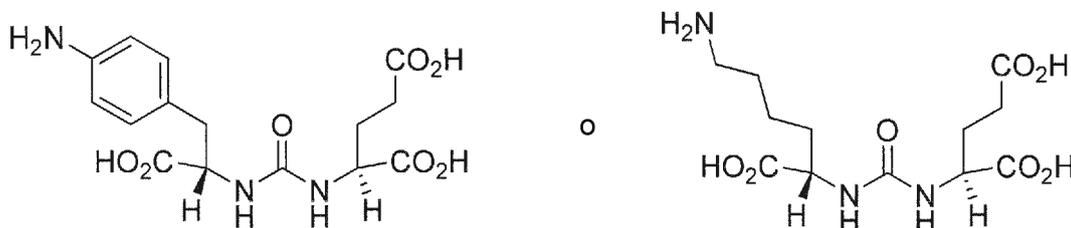
20 y enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereómeros o racematos del mismo, en el que los grupos NH₂ o CO₂H sirven como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por ejemplo, -N(H)-PEG, o CO₂-PEG). Estos compuestos pueden estar sustituidos adicionales con NH₂, SH, OH, CO₂H, alquilo C₁₋₆ que está sustituido con NH₂, SH, OH o CO₂H, o fenilo que está sustituido con NH₂, SH, OH o CO₂H, 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 racematos del mismo, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Para este ligando, el grupo NH₂ sirve como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por ejemplo, -N(H)-PEG).

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

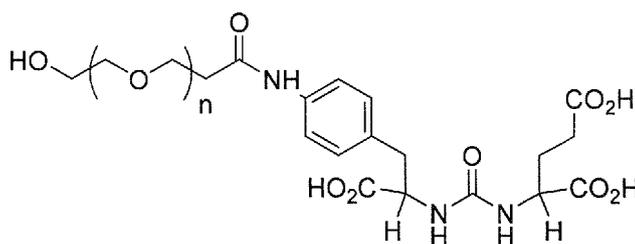


5

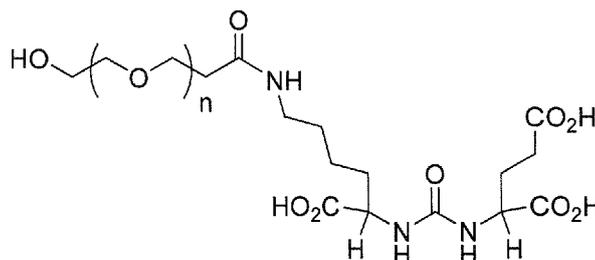
y enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereómeros, o racemato del mismo. Particularmente, el compuesto de butil-amina tiene la ventaja de la facilidad de síntesis, especialmente debido a su carencia de un anillo de benceno. Además, sin desear quedar ligado a teoría, el compuesto 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.

10

Para estos ligandos, los grupos NH₂ 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:



15



en los que n es de 20 a 1720.

Otro aspecto de la invención proporciona un polímero PEG conjugado con un agente de direccionamiento y/o restos bioactivos/agentes terapéuticos como se desvela en el presente documento.

20

COMPOSICIONES DE NANOPARTÍCULAS Y USOS DE LOS MISOS

Las nanopartículas producidas de acuerdo con los procedimientos desvelados pueden administrarse solos o en una composición. Cuando las nanopartículas se administran como una composición, la composición puede ser una composición farmacéutica (por ejemplo, fisiológicamente aceptable). La composición comprende un vehículo (por ejemplo, un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable) y las nanopartículas. Se puede usar cualquier vehículo adecuado (por ejemplo, agua, solución salina y PBS) dentro del contexto de la invención y tales vehículos son bien conocidos en la técnica. La elección del vehículo se determinará, en parte, por el sitio particular al que se administrará la composición y el procedimiento particular usado para administrar la composición. Los vehículos, así como otros componentes adecuados para su uso en la composición de la invención, son conocidos en la técnica (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a edición, (Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa.: 1985)). Adicionalmente, la composición puede comprender agentes activos adicionales, tales como agentes anticancerosos/quimioterapéuticos.

25

30

Las nanopartículas y la composición de las mismas se pueden administrar a un sujeto para tratar o prevenir trastornos y enfermedades particulares. Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos que pueden tratarse según la presente invención incluyen cáncer, tal como cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer testicular, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cuello de útero, cáncer gastrointestinal y combinaciones de los mismos. Las nanopartículas o la composición de las mismas preferentemente se administran al sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva.

Una cantidad terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad de nanopartículas necesarias para tratar o prevenir la enfermedad o trastorno particular. Por ejemplo, las nanopartículas desveladas en el presente documento pueden usarse para inhibir el crecimiento tumoral, inhibir o reducir la proliferación, la invasividad o la metástasis de células cancerosas o tumorales, ralentizar el crecimiento de tumores o cánceres o reducir el tamaño de los tumores.

Se puede usar cualquier vía de administración para administrar las nanopartículas al sujeto. Las vías de administración adecuadas incluyen inyección intramuscular, administración transdérmica, inhalación, aplicación tópica al tejido (por ejemplo, tejido tumoral/canceroso), administración intratumoral y administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, peritoneal, intraarterial, subcutánea, rectal o vaginal). Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente una ruta de administración apropiada.

Como se ha analizado anteriormente, las composiciones que comprenden nanopartículas pueden ser útiles en el tratamiento o prevención o mejora de uno o más síntomas de cáncer, particularmente cánceres que expresan antígeno de membrana específico de próstata (PSMA). Estos cánceres incluyen, aunque sin limitaciones, cáncer de próstata, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma colorrectal y glioblastoma, y tumores sólidos que expresan PSMA en la neovasculatura tumoral.

Varios aspectos de la presente divulgación incluyen:

1. Un procedimiento de preparar una nanopartícula que comprende:

proporcionar un agente de direccionamiento;
proporcionar un polímero de poli(etilenglicol) (PEG) funcionalizado; proporcionar un ligando de agente de direccionamiento;
hacer reaccionar el polímero de poli(etilenglicol) funcionalizado con el agente de direccionamiento para formar un complejo de agente de direccionamiento-polímero de PEG; y
mezclar el complejo de agente de direccionamiento-polímero de PEG con un segundo polímero y un agente terapéutico para formar una nanopartícula, en el que:

el polímero PEG tiene un peso molecular de entre 1.000-20.000 Da (por ejemplo, 5.000-20.000, *por ejemplo*, 10.000- 20.000) y, en algunas realizaciones específicas, 5000 Da; y el segundo polímero tiene un peso molecular de 5.000-100.000 Da (*por ejemplo*, 20.000-70.000, *por ejemplo*, 20.000-50.000), o en algunas realizaciones específicas, 15.000- 30.000 Da;

2. El procedimiento de la realización 1, en el que el poli(etilenglicol) es heterobifuncional y dicho agente de direccionamiento está unido covalentemente al extremo α de dicho poli(etilenglicol) y al menos un grupo funcional iniciador de la polimerización está presente en el extremo ω de dicho poli(etilenglicol);

3. El procedimiento de la realización 2, en el que dicho al menos un grupo funcional iniciador de la polimerización es un grupo hidroxilo (-OH) o un grupo amina (-NH₂) en el extremo ω libre;

4. El procedimiento de la realización 1, 2 o 3, en el que el segundo polímero comprende una mezcla de dos o más polímeros y contiene al menos un grupo funcional que reacciona al grupo funcional presente en el extremo ω libre de dicho poli(etilenglicol) y dicho a al menos un grupo funcional de dicha mezcla de dos o más polímeros es un grupo hidroxilo, un grupo NHS o un grupo amina;

5. El procedimiento de la realización 1, en el que el segundo polímero o el copolímero es un copolímero de poliéster que contiene al menos un grupo funcional seleccionado de un grupo hidroxilo, un grupo NHS o un grupo amina y que reacciona al grupo funcional presente en el extremo libre ω de dicho poli(etilenglicol);

6. El procedimiento de la realización 4, en el que el segundo polímero o el copolímero es un copolímero de poliéster que contiene al menos un grupo funcional seleccionado de un grupo hidroxilo, un grupo NHS o un grupo amina y que reacciona al grupo funcional presente en el extremo libre ω de dicho poli(etilenglicol);

7. El procedimiento de la realización 6, en el que dicho copolímero de poliéster comprende un heteropolímero o un homopolímero;

8. El procedimiento de la realización 6, en el que dicho heteropolímero comprende unidades de ácido láctico y ácido glicólico o unidades de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) y poli(lactida-co-glicólido) (PLGA); y dicho

homopolímero comprende unidades de ácido glicólico (PGA), unidades de ácido láctico (PLA), unidades de ácido poli-L-láctico, unidades de ácido poli-D-láctico, poli-D, unidades de ácido L-láctico, unidades de poli-L-lactida, unidades de poli-D-lactida o poli-D, unidades de poli-L-lactida;

5 9. El procedimiento de la realización 6, en el que dicho copolímero de poliéster se selecciona de polihidroxiácidos; Polímeros y copolímeros PEGilados de unidades de lactida y unidades de glicólido, PLA PEGilado, PGA PEGilado, PLGA PEGilado, 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(4-hidroxi-L-prolina éster), poli[ácido a-(4-aminobutil)-L-glicólico] o derivados de los mismos;

10 10. El procedimiento de la realización 1, en el que los grupos ácidos carboxílicos libres o grupos hidroxilo libres en dicho agente de direccionamiento se protegen antes de hacer reaccionar el polímero funcionalizado de poli(etilenglicol) con el agente de direccionamiento para formar un complejo de agente de direccionamiento-polímero PEG;

15 11. El procedimiento de la realización 4, en el que dicho grupo funcional de dicho segundo polímero es un grupo amina que reacciona con un grupo hidroxilo o un grupo de ácido carboxílico en dicho complejo de agente de direccionamiento-PEG;

20 12. El procedimiento de la realización 4, en el que dicho grupo funcional de dicho segundo polímero es un grupo hidroxilo o un grupo NHS que reacciona con un grupo amina en dicho complejo de agente de direccionamiento - PEG;

25 13. El procedimiento de la realización 6, en el que dicho grupo funcional de dicho segundo polímero o dicho copolímero es un grupo amina que reacciona con un grupo hidroxilo o un grupo de ácido carboxílico en dicho complejo de agente de direccionamiento-PEG;

30 14. El procedimiento de la realización 6, en el que dicho grupo funcional de dicho segundo polímero o dicho copolímero es un grupo NHS o hidroxilo que reacciona con un grupo amina en dicho complejo de agente de direccionamiento-PEG;

35 15. El procedimiento de la realización 1-14, en el que dicho segundo polímero es una mezcla de al menos dos polímeros que pueden ser el mismo polímero o un polímero diferente, en el que el primero de dichos al menos dos polímeros contiene al menos un grupo hidroxilo o un grupo NHS como un grupo funcional y el segundo de dichos al menos dos polímeros contiene al menos un grupo amina como dicho grupo funcional;

40 16. El procedimiento de la realización 1-15, en el que dicho agente terapéutico es un antibiótico, un agente anticanceroso, agente antivírico, un agente antiinflamatorio, un agente de diagnóstico, un antígeno de vacuna o un nutracéutico;

45 17. El procedimiento de la realización 16, en el que dicho agente terapéutico es/son penicilinas, aminopenicilinas, penicilinas junto con inhibidor de penicilinas y/o agentes antifúngicos, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenémicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos, eritromicina, bacitracina cinc, polimixina, sulfatos de polimixina B, neomicina, gentamicina, tobramicina, gramicidina, ciprofloxacino, trimetoprima, ofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino, norfloxacino, sulfacetamida de sodio, cloranfenicol, tetraciclina, azitromicina, claritromicina, sulfato de trimetoprima, bacitracina, corticoesteroides, medrisona, prednisolona, acetato de prednisolona, fosfato sódico de prednisolona, fluorometolona, dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, betametasona, fluorometasona, antazolina, acetato de fluorometolona, rimexolona, etabonato de loteprednol, diclofenaco (diclofenaco sódico), ketorolaco, ketorolaco trometamina, hidrocortisona, bromfenaco, flurbiprofeno, antazolina, xilometazolina, cromolino sódico, lodoxamida trometamina, olopatadina HCl, nedocromilo sódico, fumarato de ketotifeno, levocabastina HCL, azelastina HCL, pemirolast (pemirolast de potasio), epinastina HCL, nafazolina HCL, emedastina, antazolina, feniramina, cromoglicato sódico, ácido N-acetil-aspartilglutámico, amlexanox, 5-fluorouracilo (5-FU), CPT-11, 10- hidroxil-7-etilcamptotecina (SN38), S-I capecitabina, florafur, 5'-desoxiflurouridina, UFT, eniluracilo, desoxicitidina, 5-azacitosina, 5-azadesoxicitosina, alopurinol, 2-cloroadenosina, aminopterina, metileno-10-deazaaminopterina (MDAM), oxaplatino, picoplatino, tetraplatino, satraplatino, platino-DACH, ormaplatino, CI-973, JM-216, y análogos de los mismos, 9-aminocamptotecina, 10,11-metilendioxicamptotecina, karenitecina, karenitecina, 9-nitrocampaototecina, TAS 103, mostaza de L-fenilalanina, ifosfamida mefosfamida, trofosfamida carmustina, epotilonas A-E, tomudex, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, karenitecina, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir, amantadina, rimantadina, lamivudina, zidovudina, bevacizumab, trastuzumab, rituximab, 20-epi-1 α , 25 dihidroxivitamina D3, 4-ipomeanol, 5-etiniluracilo, 9-dihidrotaxol, abiraterona, acivicina, aclarubicina, clorhidrato de acodazol, acronina, acilfilveno, 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, antramycin, 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, benzoilestaurosorina, derivados de beta-lactama, beta-aletina, betaclamocina 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, calfofostina 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, carzelsina, inhibidores de caseína cinasa, castanospermina, cecropina B, cedefingol, cetorelix, 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, dehidrodidemina B, deslorelina, dexifosfamida, dexormaplatino, dexrazoxano, dexverapamilo, dezaguanina, mesilato de dezaguanina, diaziacuona, didemina B, didox, dietilhiotespermina, dihidro-5-azacitidina, dioxamicina, difenil espiromustina, docetaxel, docosanol, dolasetrón, doxifluridina, doxorubicina, clorhidrato de doxorubicina, droloxifeno, citrato de droloxifeno, propionato de dromostanolona, dronabinol, duazomicina, duocanina SA, ebseleno, ecomustina, edatrexato, edelfosina, edrecolomab, eflomitina, clorhidrato de eflomitina, elemeno, elsarnitrucina, emitefur, enloplatino, enpromato, epipropidina, epirubicina, 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 fluorodaunorubicina, 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, hidroxurea, 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-NI, interferón alfa-N3, interferón beta-IA, interferón gamma-IB, interferones, interleucinas, iobenguano, yododoxorubicina, iproplattm, irinotecán, clorhidrato de irinotecán, iroplact, irsogladina, iso-bengazol, isohomohalicondrina B, itasetrón, jasplaginólida, kahalalida F, triacetato de lamelarina-N, lanreotida, acetato de lanreotida, leinamicina, lenograstim, sulfato de lentinán, leptostatina, 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, lissoclinamida, 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 metaloproteína de matriz, maitansina, clorhidrato de mecloretamina, acetato de megestrol, acetato de melengestról, melfalano, menogaril, merbarona, mercaptopurina, meterelina, metioninasa, metotrexato, metotrexato sódico, metoclopramida, metoprina, meturedopa, 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, mofarotena, 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, agente anticáncer de mostaza, micaperóxido B, extracto de pared celular micobacteriana, ácido micofenólico, miraporona, 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, palmitoilirizoxina, ácido pamidrónico, panaxitriol, panomifeno, parabactina, pazeliptina, pegaspargasa, peldesina, peliomicina, pentamustina, polisulfato sódico de pentosano, pentostatina, pentozol, sulfato de peplomicina, perflubron, perfosfamida, alcohol perillílico, fenazinomicina, fenilacetato, inhibidores de fosfatasa, picibanilo, pilocarpina hidrocloreuro, pipobromano, pipsulfan, pirarrubicina, piritrexim, piroxantrona hidrocloreuro, placetina A, placetina B, inhibidor de activador de plasminógeno, complejo de platino, compuestos de platino, complejo de platino-triamina, plicamicina, plomestano, porfimer sódico, porfiromicina, prednimustina, clorhidrato de procarbazona, 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, puomicina, puomicina hidrocloreuro, purpurinas, pirazorurina, pirazoloacridina, conjugado de hemoglobina

5 piridoxilada-polióxietileno, 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 retinamida, iARN, rogletimida, rohitucina, romurtida, roquinimex, rubiginona B1, ruboxilo, safingol, safingol clorhidrato, saintopina, SarCNU, sarcositol A, sargramostim, miméticos de SD11,

10 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, sizofiran, sobuzoxano, borocaptato sódico, fenilacetato sódico, solverol, proteína de unión a somatomedina, sonermina, esparfosfo 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, glicosaminoglucanos 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, tiampirina, tiocoralina, tioguanina, tiotepa, trombopoyetina, mimético de trombopoyetina, timafalsina, agonista del receptor de timopoyetina, timotrinan, 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, vaporetida, 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, zinostatina estimalamer o zorubicina hidrocloreuro, ARNip o cualquier combinación de los mismos;

30 18. El procedimiento de la realización 1-17, en el que dicho al menos un agente de direccionamiento se selecciona de anticuerpos, ligandos PMSA y polipéptidos que se unen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor de somatostatina (SSTR), receptor del factor de crecimiento insulínico, receptores del ácido fólico, receptor HER2, receptor de interleucina 13, receptor peptídico liberador de gastrina, CD30, receptor peptídico intestinal vasoactivo, receptor de gastrina, antígeno prostático específico y/o el receptor de estrógeno;

35 19. El procedimiento de la realización 1-18, en el que dicho procedimiento se realiza en un medio acuoso;

20. El procedimiento de la realización 1-18, en el que dicho procedimiento se realiza en un disolvente orgánico;

40 21. Una nanopartícula producida de acuerdo con los procedimientos de las realizaciones 1-20;

22. Una composición que comprende la nanopartícula de la realización 21 y un vehículo farmacéuticamente aceptable;

45 23. Un procedimiento para tratar una enfermedad que comprende la administración de una nanopartícula de acuerdo con la realización 21 a un sujeto en una cantidad suficiente para tratar dicha enfermedad;

50 24. El procedimiento de la realización 23, en el que dicha enfermedad se selecciona de cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer testicular, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cuello de útero, cáncer gastrointestinal, infecciones víricas, infecciones bacterianas o inflamación; y

55 25. Un polímero producido de acuerdo con el procedimiento de las realizaciones 1-19, comprendiendo dicho polímero un agente de direccionamiento unido covalentemente al extremo α de un polímero de poli(etilenglicol) y al menos un segundo polímero unido covalentemente a dicho polímero de poli(etilenglicol) a través de un grupo funcional presente en el extremo ω de dicho poli(etilenglicol).

60 Debe entenderse que los ejemplos y formas de realización descritos en la presente memoria descriptiva son con fines ilustrativos únicamente y que varias modificaciones o cambios a la luz de los mismos se sugerirán a personas expertas en la técnica y se deben incluir dentro del espíritu y ámbito de esta solicitud, en la medida en que están cubiertos por las presentes reivindicaciones. Además, cualquier elemento o limitación de cualquier invención o realización del mismo divulgada en el presente documento se puede combinar con cualquiera y/o todos los otros elementos o limitaciones (individualmente o en cualquier combinación) o cualquier otra invención o realización del mismo divulgada en el presente documento, en la medida en que están cubiertos por las presentes reivindicaciones.

Ejemplo 1. Síntesis de HO-PEG-lys-urea-glu (protegido) mediante conjugación covalente de lys-urea-glu (protegido) a HO-PEG-CO₂H

Los materiales utilizados para la síntesis y purificación de HO-PEG-lys-urea-glu (protegido) incluyeron α -hidroxietil- ω -carboxipentilo, poli(etilenglicol) (peso molecular promedio = 5 kg/mol, Actividad terminal = 98 %) (HO-PEG-CO₂H, NOF America Corporation, White Plains, Nueva York); Diprop-2-en-1-il *N*-[6-ammonio-1-oxo-1-(prop-2-en-1-iloxi)hex- an-2-il]carbamoil]glutamato trifluoroacetato (lys-urea-glu(protegido), Organix, Woburn, MA); *N*-(3-dimetilaminopro- pil)-*N'*-etil carbodiimida ($\geq 97,0$ %) (EDC, Sigma-Aldrich); *N*-Etil Di-isopropilamina (99,5 %) (DIEA, Sigma-Aldrich); *N*-hidroxisuccinimida (98 %) (NHS, Sigma-Aldrich); Cloroformo (anhidro, ≥ 99 %) Sigma-Aldrich); Etanol (Absoluto $\geq 99,5$ %) (Sigma-Aldrich).

La instrumentación utilizada para la caracterización en proceso y el tratamiento de HO-PEG-lys-urea-glu (protegido) incluyó el espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker de 400 MHz para el análisis espectroscópico de RMN de protones; Atmósferas de vacío en caja de guantes de nitrógeno seco (<1 ppm de agua); Bomba de vacío Edwards RV5 y un horno VWR para secado al vacío; Sistema de diafiltración por ultrafiltración (UFDF) basado en una bomba peristáltica (Masterson), Filtro de membrana de celulosa regenerada (Millipore, área superficial = 0,1 m², MMWCO 3 kDa) y tubos de PTFE expandido (Chem-Sure); Evaporador rotatorio (Buchi); Conjunto de filtración a vacío de 2 l Millipore y filtros de membrana Millipore 0,2 μ m Fluoropore (PTFE); Sistema de cromatografía de exclusión por tamaño Waters equipada con detector de índice de refracción y columnas HR1, HR3 y HR4 (7,8 X 300 mm, Intervalo del peso molecular 100 - 5000 Da, 500 - 30.000 Da, 5000 - 600.000 Da, respectivamente). La masa molar promedio en número y en peso se determinó usando patrone de calibración de poli(etilenglicol) de Patrones Shodex, (Kawasaki, Japón) de la masa molar máxima (Mp = 960, 1400, 4290, 7130, 12900, 20600 Da).

Procedimiento experimental: Todos los reactivos (HO-PEG-CO₂H, lys-urea-glu(protegido), EDC, NHS, DIEA y cloroformo anhidro) se transfirieron a una caja de guantes de nitrógeno seco y posteriormente se pesaron o transfirieron (usando pipetas volumétricas o jeringas en microlitros) en viales de reacción de 20 ml en argón a temperatura ambiente. Se añadió NHS (230 mg, 2 mmol) a una solución de HO-PEG-CO₂H (1 g, 0,2 mmol) en cloroformo anhidro (5 ml) (solución A). Se disolvió GL2P (1,106 g, 2 mmol) en cloroformo anhidro (5 ml), luego se añadieron EDC (354 μ l, 2 mmol) y DIEA (685 μ l, 4 mmol) a esta solución (solución B). La solución B se añadió a la solución A y el vial de reacción (solución AB) se cerró en argón. La solución AB se movió después a una campana extractora ventilada y se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 2 horas en oscuridad (el vial de reacción se envolvió en papel de aluminio). La solución AB se diluyó con etanol (100 ml), produciendo una composición disolvente de etanol/cloroformo (10: 1) (Solución C). La solución C se diafiltró frente a 29 diavolumenes (1,5 l) de una mezcla de disolventes binarios de etanol/cloroformo (9: 1 en volumen) a un caudal de 800 ml/min y una contrapresión de 30-40 psi aplicada ajustando adecuadamente una válvula de bola de 1/4 de vuelta. En estas condiciones de UFDF, el caudal del permeado es de aproximadamente 5 ml/min. El disolvente se eliminó de la solución retenida (solución CR) mediante evaporación rotatoria a 35 °C y a continuación se secó a vacío a temperatura ambiente durante 18 horas para obtener el producto bruto (770 mg, 70 %). El producto en bruto se disolvió en 7,7 ml de cloroformo (100 mg/ml, solución D). La solución D se añadió gota a gota a 150 ml de precipitante de éter/hexano (70/30) mientras se agitaba. El producto precipitado se recuperó mediante filtración usando un filtro de membrana de PTFE de 0,2 micrómetros en un aparato de filtración al vacío Millipore. El producto purificado, HO-PEG-lys-urea-glu (protegido) (polvo blanco, 700 mg, 91 %) se obtuvo mediante secado al vacío a temperatura ambiente durante 24 horas para eliminar los disolventes residuales.

Ejemplo 2. Caracterización de HO-PEG-lys-urea-glu (protegido) para determinar la funcionalización de final en % mol con PEG con agente de direccionamiento de lys-urea-glu y su masa molar

La identidad de HO-PEG-lys-urea-glu (protegido) se determinó mediante RMN de ¹H en D₂O usando los siguientes parámetros del instrumento: intensidad de campo de RMN = 400 MHz; Número de barridos= 128; Retraso del pulso = 5 s; Secuencia de pulso = 7 μ s. Las asignaciones de los picos de RMN son las siguientes: Alil sp² CH (3H multiplete, 5,9 - 6,03ppm), alil sp² CH₂ (6H, dos dobletes superpuestos, 5,27 - 5,4ppm), alil sp³ CH₂ (6H, dos dobletes superpuestos, 4,6 - 4,7ppm), PEG terminal CH₂-OH (2H triplete, 3,85 - 3,92ppm), PEG óxido de etileno CH₂ (aprox. 408H según un M_n KDa, singlete 3,7ppm), PEG terminal CH₂ epsilon a CONH- lys-urea-glu (2H triplete, 3,5 - 3,55ppm), lisina CH₂ epsilon C (2H dos tripletes, 3,05 - 3,14ppm y 3,15 - 3,22 ppm), PEG terminal CH₂ alfa a CONH-lys-urea-glu y PEG terminal CH₂ alfa a COOH de PEG desacoplado (2H multiplete, 2,15 - 2,3 ppm), ácido glutámico CH₂ gamma C (dos 2H tripletes superpuestos 2,5 - 2,6 ppm), ácido glutámico CH₂ beta C (dos 1H multipletes, 1,8 - 2,1ppm), lisina CH₂ beta C (1H multiplete, 1,67 - 1,8ppm). Los multipletes superpuestos entre 1,3 y 1,67 ppm se asignaron a (a) lisina CH₂ beta C (1H), (b) lisina CH₂ gamma C (2H), (c) lisina CH₂ delta C (2H), (d) PEG terminal CH₂'s beta y delta a CONH-lys-urea-glu (2H cada), (e) PEG terminal CH₂ gamma a CONH-lys-urea- glu (2H). La incorporación de Lys-urea-glu en el producto de HO-PEG-lys-urea-glu(protegido) se estimó usando la proporción del multiplete del ligando entre 1,95 - 2,1 ppm y el multiplete PEG entre 2,15 - 2,3 ppm, produciendo un 82 % de incorporación de lys-urea. glu (protegido) en el conjugado HO-PEG-lys-urea-glu (protegido).

Véase la figura 1 para conocer los espectros de RMN de protones de HO-PEG-lys-urea-glu (protegido), Números de lote 11-189-1 y 11-176-1.

El peso molecular de HO-PEG-lys-urea-glu (protegido) se determinó mediante cromatografía de exclusión por

tamaño usando detección de índice de refracción y cloroformo como disolvente de elución. Temperatura de la columna = 30 °C, Temperatura del detector del IR = 35 °C, Concentración de la muestra = 10 mg/ml, Volumen de inyección = 10 µl. El peso molecular promedio en número y en peso (M_n y M_w) se obtuvo con respecto a los estrechos patrones dispersos de poli(etilenglicol) del Servicio de patrones de polímeros, EE.UU., (Warwick, Rhode Island). Un ajuste polinómico de cuarto orden ($R^2 = 0,99957$; Error estándar = 0,02) rindió $M_n = 5200$ Da; $M_w = 5700$ Da; $M_w/M_n = 1,1$ para HO-PEG-lys-urea-glu(protegido).

Véase la figura 2 para los cromatogramas de exclusión por tamaño (SEC) de HO-PEG-lys-urea-glu (protegido), números de lote 11-189-1 (marcados 44-44-6 para análisis SEC y 11-176-1).

Ejemplo 3. Síntesis de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegida) por polimerización de apertura de anillo de D, L-lactida usando HO-PEG-lys-urea-glu (protegido) como macroiniciador y 2-etilhexanoato de estaño (II) como catalizador de polimerización

Los materiales utilizados en la síntesis de PLA-PEG-lys-urea-glu (protegido) incluían HO-PEG-lys-urea-glu (protegido), sintetizados como se describe en el Ejemplo 1; 2-etilhexanoato de estaño (II) (95 %) ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$, Sigma-Aldrich); D, L-lactida ($\geq 99,5$ %, Altasorb, Piedmont, SC); Hexano, anhidro (95 % de DriSolv, EMD) en la reacción de polimerización y Hexano (Chromasolv., ≥ 95 %, Sigma) para la precipitación de procesamiento; Éter dietílico ($\geq 99,0$ %, Sigma);

La instrumentación utilizada para la caracterización en proceso y el tratamiento/reacción de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido) incluyó el espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker de 400 MHz para el análisis espectroscópico de RMN de protones en Spectral Data Services, Champaign, IL; Atmósferas de vacío en caja de guantes de nitrógeno seco (<1 ppm de agua); El carrusel de reacción en paralelo de 12 posiciones (Brinkmann-Hiedolph) equipado con una placa de agitación de múltiples posiciones y controlador de temperatura de estado sólido (placa de multiagitación IKA y controlador de temperatura con circuito de retroalimentación; tubos de reacción Schlenk equipados con un brazo lateral de polietileno de Teflón. Bomba de vacío Edwards RV5 y un horno VWR para secado al vacío; Evaporador rotatorio (Buchi); Sistema de cromatografía de exclusión por tamaño Waters equipada con detector de índice de refracción y columnas HR1, HR3 y HR4 (7,8 X 300 mm, Intervalo del peso molecular 100 - 5000 Da, 500 - 30.000 Da, 5000 - 600.000 Da, respectivamente). La masa molar promedio en número y en peso se determinó usando patrones de calibración de poli(estireno) de Patrones Shodex, (Kawasaki, Japón) de la masa molar máxima ($M_p = 1200, 3900, 12800, 31.400, 55.100$ y 197.000 Da).

Procedimiento experimental: Todos los reactivos (HO-PEG-lys-urea-glu (protegido), $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, d, l-lactida, hexano anhidro) se transfirieron a una caja de guantes de argón seco y posteriormente se manipularon en nitrógeno seco a temperatura ambiente. Se pesó HO-PEG-lys-urea-glu (200 mg, 4×10^{-2} mmol) y lactida (800 mg, 5,55 mmol) se pesaron en el tubo de reacción (que contiene una barra de agitación magnética de tamaño adecuado) y se sellaron con septo en argón seco (mezcla A). Se pesó $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (250mg) en un vial de vidrio de 6 ml y se disolvió en hexano anhidro (2,5 ml) para producir una solución de 100 mg/ml (B) y se selló con septo en nitrógeno seco. La mezcla A se retiró a una campana extractora ventilada y se secó bajo una corriente constante de argón seco durante 1 hora a temperatura ambiente usando un colector de gas argón equipado con agujas de 8 pulgadas como entradas de gas de argón. Los brazos laterales del tubo de reacción Schlenk se conectaron a un burbujeador de aceite de silicona para servir como salida de gas de argón. Los tubos Schlenk se sellaron posteriormente al detener el flujo de entrada de argón desde el colector de gas argón y la salida de gas del brazo lateral a través del brazo lateral del tubo Schlenk utilizando el tapón de tope de Teflón. Se colocaron tubos Schlenk sellados en un baño de aceite de silicona a 130 °C y agitador magnético para obtener una masa fundida de monómero de lactida incolora transparente (aproximadamente 10 minutos). La solución B (80 ul) se introdujo a través de una jeringa de 500 ul a través del sello del septo. La mezcla de reacción (C) se dejó en agitación a 130 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, el tubo de Schlenk se abrió en aire y el sedimento de polímero se disolvió en 5 ml de diclorometano agitando en vórtice durante 1 hora a temperatura ambiente (solución D). La solución D se transfirió a un vial de vidrio de 20 ml y se aclaró el tubo de Schlenk con una porción de $2 \times 2,5$ ml de diclorometano recién preparado. El lavado se combinó con la solución D. Esta solución ligeramente turbia se filtró usando filtros de jeringa de PTFE de 0,45 micrómetros para obtener una solución transparente incolora (Solución E). La solución E se añadió gota a gota a éter dietílico/hexano (70/30) (200 ml) mientras se agitaba a temperatura ambiente. El precipitado turbio se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el polímero se coagulara y sedimentara en el fondo del vaso de precipitados. El sobrenadante transparente se decantó y el producto polimérico pegajoso (700 mg, 70 %) se transfirió a un vial de vidrio con una espátula y posteriormente se secó al vacío a temperatura ambiente durante 18 horas.

Ejemplo 4. Caracterización de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido) para determinar la funcionalización de final en % mol con PEG con agente de direccionamiento de lys-urea-glu y su masa molar

La identidad de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido) se determinó mediante RMN de ^1H en cloroformo-d usando los siguientes parámetros del instrumento: intensidad de campo de RMN = 400 MHz; Número de barridos= 128; Retraso del pulso = 5 s; Secuencia de pulso = 7 µs. Las asignaciones de los picos de RMN son las siguientes: Lactida metino CH (^1H multiplete, 5,1 - 5,3 ppm), Lactida metilo CH_3 (3H multiplete, 1,45 - 1,65), PEG óxido de etileno CH_2 (aprox. 408H basado en $M_n=5$ KDa, singlete 3,55 - 3,8), alil sp^2 CH (3H multiplete, 5,8 - 6,0ppm). La masa molar promedio

en número (M_n) de PLA-PEG-lys-urea-glu (protegido) se determinó por espectroscopia de RMN de protones utilizando una relación de PEG y poli(d, l-lactida). Comparación de las intensidades de alil sp^2 CH (3H multiplete, 5,8 - 6,0 ppm) pico y la lactida metino CH (1H multiplete, 5,1 - 5,3 ppm) pico dio un M_n (PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido)) = 20,100 Da suponiendo PEG M_n = 5 kg/mol.

- 5 Véase la figura 3 para conocer los espectros de RMN de protones de PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido), números de lote 11-187-1, 11-188-1 y 11-198-1.

El peso molecular de PLA-PEG-lys-urea-glu (protegido) se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando detección de índice de refracción y cloroformo como disolvente de elución. Temperatura de la columna = 30 °C, Temperatura del detector del IR = 35 °C, Concentración de la muestra = 10 mg/ml, Volumen de inyección = 10 μ l. Los M_n y M_w se obtuvieron con relación a patrones de poliestireno dispersos estrechos (patrones Shodex, Kawasaki, Japón). Un ajuste polinómico de cuarto orden ($R^2 = 0,999977$; Error estándar = 0,009) rindió M_n = 20700 Da; M_w = 25400 Da; M_w/M_n = 1,23 para PLA-PEG-PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido).

Véase la figura 4 para los cromatogramas de exclusión por tamaño (SEC) de HO-PEG-lys-urea-glu (protegido), números de lote 11-189-1 (marcados 44-44-6 para análisis SEC y 11-176-1).

15 **Ejemplo 5. Síntesis de PLA-PEG-lys-urea-glu mediante la eliminación de los grupos protectores de alilo de PLA-PEG-lys-urea-glu (protegido) usando tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0)**

Los materiales utilizados en la síntesis de PLA-PEG-lys-urea-glu incluían PLA-PEG-lys-urea-glu (protegido), sintetizados como se describe en el Ejemplo 3;

20 Tetrakis(trifenilfosfeno)paladio (0)(99 %) (Pd-tetraquis, Sigma); Morfolina (99,5 %, Sigma); Diclorometano (Anhidro, \geq 99,8 %, Sigma); Éter dietílico (\geq 99,0 %, Sigma); Hexano (Chromasolv., \geq 95 %, Sigma).

La instrumentación y el equipo utilizados para los procedimientos de procesamiento y la caracterización en proceso incluyeron un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker de 400 MHz para el análisis espectroscópico de RMN de protones; Bomba de vacío Edwards RV5 y un horno VWR para secado al vacío; Evaporador rotatorio (Buchi).

25 Procedimiento experimental: PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido) (1000 mg, $4,76 \times 10^{-2}$ mmol) se disolvió en diclorometano anhidro (4 ml) en aire ambiente (Solución A). Se disolvió Pd-tetrakis (55 mg, $4,76 \times 10^{-2}$ mmol) en diclorometano anhidro (4 ml) también en aire ambiente (Solución B). Se añadió morfolina (41,5 mg o 45,2 μ l, 0,476 mmol) a la solución A, a esto le siguió inmediatamente la adición de la Solución B a la Solución A. Se usó diclorometano (2 ml) para aclarar el vial de la Solución B y esta solución de aclarado se combinó con la Solución A para asegurar la transferencia cuantitativa del Pd-tetrakis a la mezcla de reacción (C). La mezcla C se dejó en agitación cerrada y en la oscuridad (el vial de reacción se envolvió en papel de aluminio) a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción C se abrió al aire y se añadió gota a gota a éter dietílico/hexano (70/30, (v/v)) (200 ml) a temperatura ambiente mientras se agitaba. La suspensión de polímero resultante se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el polímero se coagulara y sedimentara en el fondo del vaso de precipitados. El sobrenadante transparente se separó por decantación y el polímero pegajoso se transfirió usando una espátula a un vial de vidrio. El producto de PLA-PEG-lys-urea-glu (800 mg, 80 %) se secó al vacío durante 18 horas a temperatura ambiente.

Ejemplo 6. Eliminación de paladio de PLA-PEG-lys-urea-glu utilizando resina de barrido con paladio trimercapto triazida funcional

40 Se disolvió PLA-PEG-lys-urea-glu (1050 mg) en diclorometano (30 ml) para producir una solución de 35 mg/ml. La resina depuradora de paladio (TMT, 5 g en una columna de 60 ml) se solvató con diclorometano (10 ml) y se añadió una solución de PLA-PEG-lys-urea-glu (30 ml). El eluyente se recogió por gravedad y la columna se aclaró con diclorometano adicional (40 ml). Las fracciones eluyentes principal y de aclarado se combinaron y el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria para recuperar el polímero. El polímero se disolvió posteriormente en diclorometano (10,5 ml, solución de 100 mg/ml) y se añadió gota a gota a 70/30 de éter/hexano (210 ml). La suspensión de polímero resultante se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el polímero se coagulara y sedimentara en el fondo del vaso de precipitados. El sobrenadante transparente se separó por decantación y el polímero PLA-PEG-lys-urea-glu pegajoso se transfirió usando una espátula a un vial de vidrio (940 mg, 90 %).

50 **Ejemplo 7. Caracterización de PLA-PEG-lys-urea-glu para determinar la eficacia de la desprotección, la masa molar y el contenido residual de paladio**

La identidad de PLA-PEG-lys-urea-glu se determinó mediante RMN de 1H en cloroformo-d usando los siguientes parámetros del instrumento: intensidad de campo de RMN = 400 MHz; Número de barridos= 128; Retraso del pulso = 5 s; Secuencia de pulso = 7 μ s. Las asignaciones de los picos de RMN son las siguientes: Lactida metino CH (1H multiplete, 5,1 - 5,3 ppm), Lactida metilo CH_3 (3H multiplete, 1,45 - 1,7, PEG óxido de etileno CH_2 (aprox. 408H basado en $M_n=5$ KDa, singlete 3,55 - 3,8), alil residual sp^2 CH (3H multiplete, 5,8 - 6,0 ppm).

La eficacia de la reacción de desprotección también se determinó mediante RMN como 95 % (eliminación de alilo). Esto se calculó usando la relación de la intensidad del pico de alilo residual en el espectro de producto PLA-PEG-lys-urea-glu a la del pico correspondiente en el espectro del material de partida (PLA-PEG-lys-urea-glu (protegido)).

- 5 La masa molar promedio en número (M_n) de PLA-PEG-lys-urea-glu se estimó mediante RMN usando la relación de PEG a poli(d, l-lactida). La comparación de las intensidades del PEG óxido de etileno CH_2 (408H, singlete 3,55 - 3,8) pico y la lactida metino CH (1H multiplete, 5,1 - 5,3 ppm) pico dio un M_n (PLA-PEG-lys-urea-glu = 21.400 Da suponiendo PEG M_n = 5 kg/mol.

El contenido de paladio en el producto PLA-PEG-lys-urea-glu se determinó mediante espectrometría ICP y encontró <5 ppm.

- 10 La masa molar de PLA-PEG-lys-urea-glu se estimó mediante la medición de la viscosimetría inherente (VI) en dimetilsulfóxido y cloroformo (0,309 dl/g y 0,198 dl/g, respectivamente). La VI del precursor protegido PLA-PEG-lys-urea-glu (protegido) se determinó en dimetilsulfóxido (0,217 dl/g). Se observó una pequeña disminución en la viscosidad de 0,217 dl a 0,198 dl/g y puede atribuirse a las diferencias en las interacciones del disolvente del polímero como resultado de la naturaleza más polar de lys-urea-glu con respecto al precursor protegido de alilo.

- 15 Véase la figura 5 para conocer los espectros de RMN de protones de PLA-PEG-lys-urea-glu bruto (antes de la eliminación del paladio), números de lote 11-187-1, 11-188-1 y 11-198-1.

Véase la figura 6 para conocer los espectros de RMN de protones de PLA-PEG-lys-urea-glu purificado (después de la eliminación del paladio), número de lote 44-49-1.

- 20 Véase la figura 7 para conocer la viscosidad inherente de PLA-PEG-lys-urea-glu purificado (después de la eliminación del paladio), lote número 44-49-1 y el precursor protegido PLA-PEG-lys-urea-glu(protegido)

Véase la figura 8 para consultar el contenido de paladio en el lote de PLA-PEG-lys-urea-glu crudo (antes de la eliminación del paladio) número 44-48-1 (código de la muestra 11-204-1) y en el lote purificado (después de la eliminación del paladio) de PLA-PEG-lys-urea-glu número 44-49-1 (código de la muestra 11-204-2) determinado por espectrometría ICP.

25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una nanopartícula que comprende:
 - proporcionar un agente de direccionamiento (AD);
 - proteger grupos funcionales de dicho agente de direccionamiento;
 - 5 proporcionar un polímero de poli(etilenglicol) (PEG) funcionalizado;
 - hacer reaccionar el polímero de poli(etilenglicol) funcionalizado con el agente de direccionamiento protegido (PRO-TA) para formar un complejo de agente de direccionamiento-polímero de PEG;
 - conjuguar el complejo de agente direccionamiento-polímero de PEG con un segundo polímero para formar un
 - complejo de agente de direccionamiento-polímero de PEG-segundo polímero; y
 - 10 mezclar el complejo de agente de direccionamiento-polímero de PEG-segundo polímero con un segundo polímero y un agente terapéutico para formar una nanopartícula.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el poli(etilenglicol) es heterobifuncional y dicho agente de direccionamiento está unido covalentemente al extremo α de dicho poli(etilenglicol) y al menos un grupo funcional iniciador de la polimerización está presente en el extremo ω de dicho poli(etilenglicol).
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicho al menos un grupo funcional iniciador de la polimerización es un grupo hidroxilo (-OH) o un grupo amina (-NH₂) en el extremo ω libre que reacciona con un segundo polímero.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el segundo polímero comprende una mezcla de dos o más polímeros y contiene al menos un grupo funcional que reacciona con el grupo funcional presente en el extremo ω libre de dicho poli(etilenglicol) y dicho a al menos un grupo funcional de dicha mezcla de dos o más polímeros es un
- 20 grupo hidroxilo, un grupo NHS o un grupo amina.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el segundo polímero o el copolímero es un copolímero de poliéster que contiene al menos un grupo funcional seleccionado de un grupo hidroxilo, un grupo NHS o un grupo amina y que reacciona con el grupo funcional presente en el extremo libre ω de dicho poli(etilenglicol).
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el segundo polímero o el copolímero es un copolímero de poliéster que contiene al menos un grupo funcional seleccionado de un grupo hidroxilo, un grupo NHS o un grupo amina y que reacciona con el grupo funcional presente en el extremo libre ω de dicho poli(etilenglicol).
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicho copolímero de poliéster comprende un heteropolímero o un homopolímero.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicho heteropolímero comprende unidades de ácido láctico y de ácido glicólico o unidades de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) y poli(lactida-co-glicólido) (PLGA); y dicho homopolímero comprende unidades de ácido glicólico (PGA), unidades de ácido láctico (PLA), unidades de ácido poli-L-láctico, unidades de ácido poli-D-láctico, unidades de ácido poli-D,L-láctico, unidades de poli-L-lactida, unidades de poli-D-lactida o unidades de poli-D,L-lactida.
- 35 9. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicho copolímero de poliéster se selecciona de polihidroxiácidos; polímeros y copolímeros PEGilados de lactida y unidades de glicólido, PLA PEGilado, PGA PEGilado, PLGA PEGilado, polianhidridos, 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(4-hidroxi-L-prolina éster), poli[ácido α -(4-aminobutil)-L-glicólico] o derivados de los mismos.
- 40 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el grupo funcional en el agente de direccionamiento es un grupo ácido carboxílico libre o un grupo hidroxilo libre y el grupo ácido carboxílico libre o el grupo hidroxilo libre está protegido antes de hacer reaccionar el polímero funcionalizado de poli(etilenglicol) con el agente de direccionamiento para formar un complejo de agente de direccionamiento-polímero de PEG.
- 45 11. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho grupo funcional de dicho segundo polímero es:
 - a) un grupo amina que reacciona con un grupo hidroxilo o un grupo de ácido carboxílico en dicho complejo de agente de direccionamiento-PEG; o
 - b) un grupo hidroxilo o un grupo NHS que reacciona con un grupo amina en dicho complejo de agente de direccionamiento-PEG.
- 50 12. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicho grupo funcional de dicho segundo polímero o dicho copolímero es:
 - a) un grupo amina que reacciona con un grupo hidroxilo o un grupo de ácido carboxílico en dicho complejo de agente de direccionamiento-PEG; o
 - b) un grupo NHS o un grupo hidroxilo que reacciona con un grupo amina en dicho complejo de agente de direccionamiento-PEG.

13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho segundo polímero es una mezcla de al menos dos polímeros que pueden ser el mismo polímero o un polímero diferente, en el que el primero de dichos al menos dos polímeros contiene al menos un grupo hidroxilo o un grupo NHS como grupo funcional y el segundo de dichos al menos dos polímeros contiene al menos un grupo amina como dicho grupo funcional.
- 5 14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho agente terapéutico es un antibiótico, un agente anticanceroso, agente antivírico, un agente antiinflamatorio, un agente de diagnóstico, un antígeno de vacuna o un compuesto nutracéutico.
- 10 15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho al menos un agente de direccionamiento se selecciona de anticuerpos, ligandos de antígeno prostático específico de membrana (PMSA) y polipéptidos que se unen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor de somatostatina (SSTR), receptor del factor de crecimiento insulínico, receptores del ácido fólico, receptor HER2, receptor de interleucina 13, receptor peptídico liberador de gastrina, CD30, receptor peptídico intestinal vasoactivo, receptor de gastrina, antígeno prostático específico y/o el receptor de estrógeno.
- 15 16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento se realiza en un medio acuoso o en un disolvente orgánico.

FIG. 1A

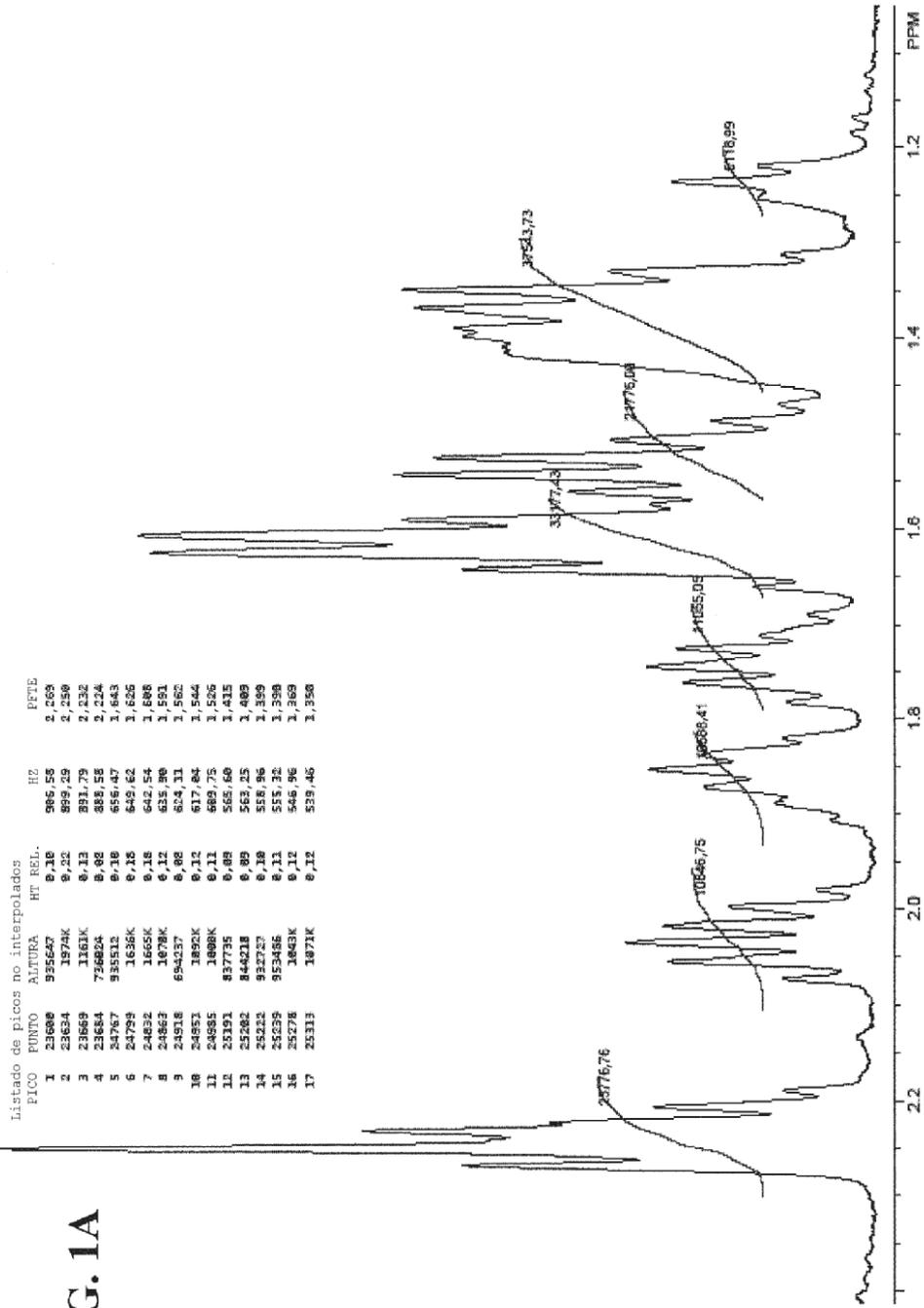
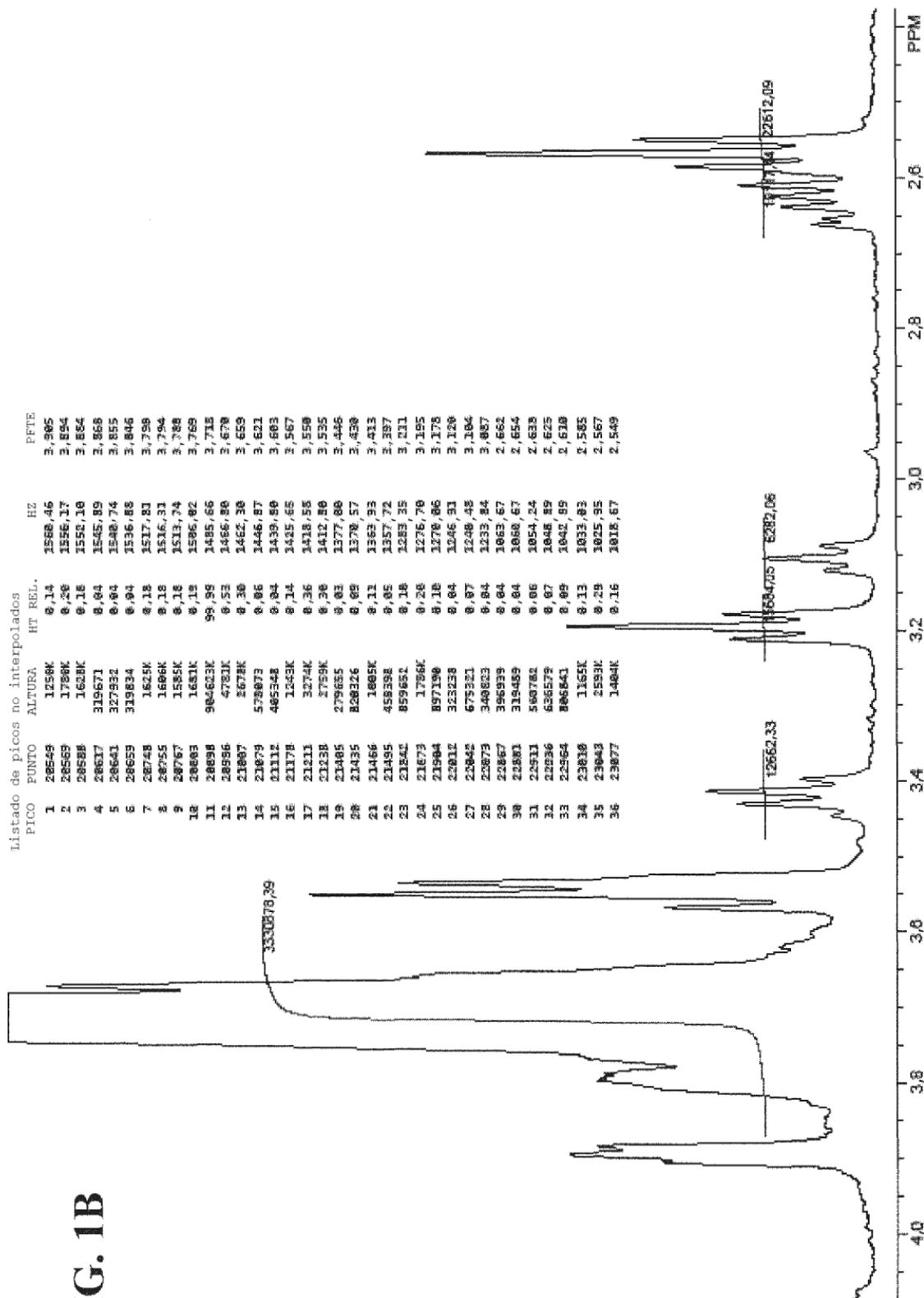
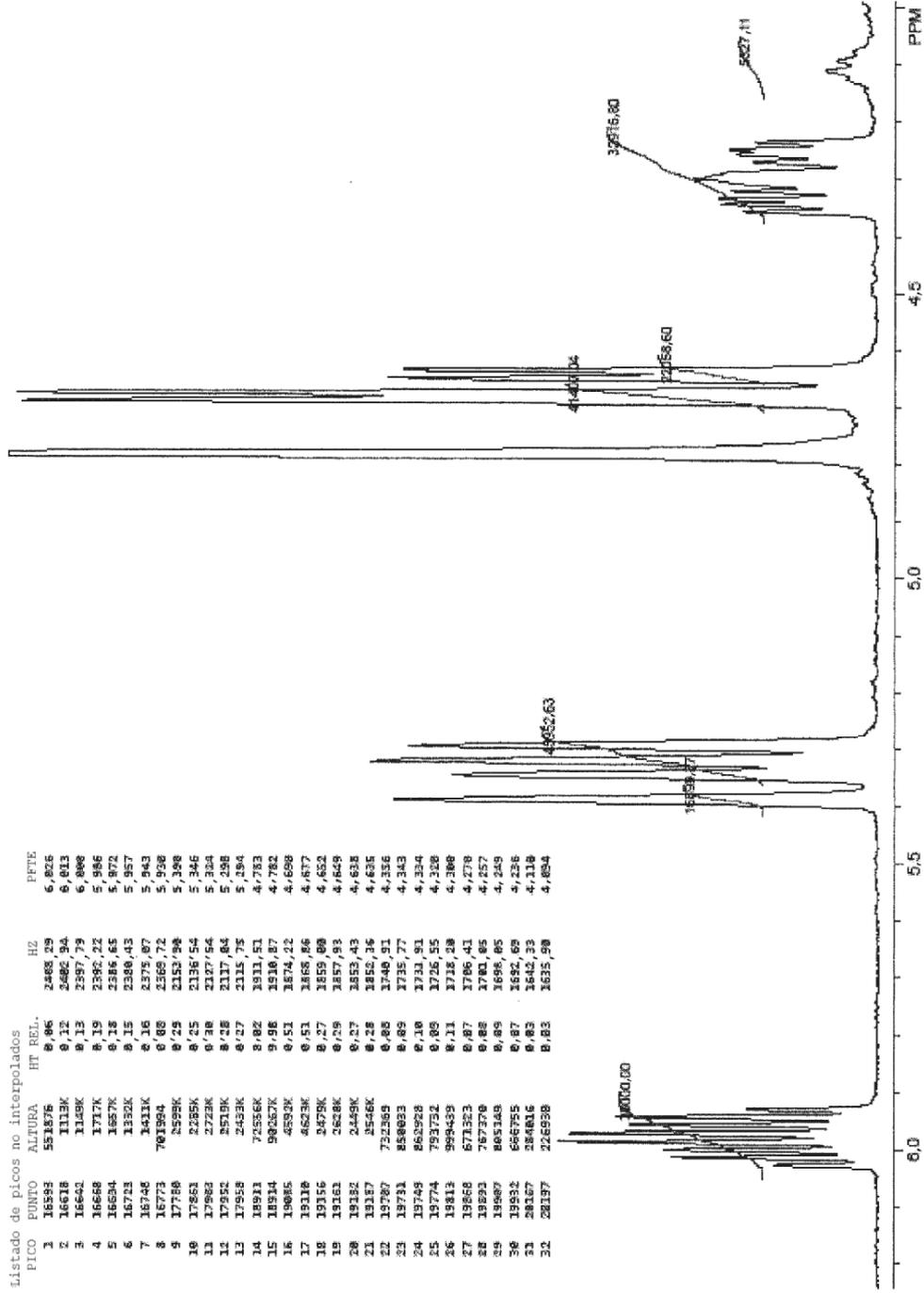


FIG. 1B





Listado de picos no interpolados

PICO	PUNTO	ALTURA	HT REL.	FTE	HZ
1	16595	551576	0,86	6,826	2482,29
2	16618	11136	0,12	6,813	2482,94
3	16642	11496	0,13	6,808	2387,79
4	16668	17176	0,19	5,986	2382,22
5	16694	16576	0,18	5,972	2386,65
6	16723	11322	0,15	5,957	2389,43
7	16748	14116	0,16	5,943	2375,07
8	16773	701994	0,68	5,938	2369,72
9	17789	25296	0,29	5,398	2153,94
10	17863	21856	0,25	5,366	2136,54
11	17982	27296	0,30	5,363	2137,64
12	17955	25196	0,28	5,358	2117,04
13	17958	24336	0,27	5,354	2115,75
14	18911	725566	3,62	4,783	1911,51
15	18914	593676	3,08	4,782	1910,87
16	19085	45926	0,51	4,688	1874,22
17	19116	46236	0,51	4,677	1868,86
18	19156	24796	0,27	4,652	1859,09
19	19162	26286	0,29	4,649	1857,93
20	19182	24496	0,27	4,638	1853,43
21	19187	25466	0,28	4,635	1852,36
22	19787	752369	0,88	4,356	1740,91
23	19791	858033	0,89	4,343	1735,77
24	19748	863928	0,10	4,334	1731,91
25	19774	793734	0,88	4,338	1726,55
26	19813	889439	0,31	4,288	1718,28
27	19866	671323	0,87	4,278	1706,41
28	19891	767376	0,88	4,257	1701,85
29	19889	865148	0,89	4,259	1696,05
30	19932	666755	0,87	4,236	1682,69
31	20167	284616	0,83	4,118	1642,33
32	20197	226938	0,83	4,094	1635,90

FIG. 1C

Resultados de GPC

	Nombre de la muestra	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Poli-dispersidad	Área (µl/s)
1	11-176-1	5650	6254	6207	7886	12855	1,106953	900755
2	11-176-1	6150	6992	6530	10624	25873	1,136821	896309

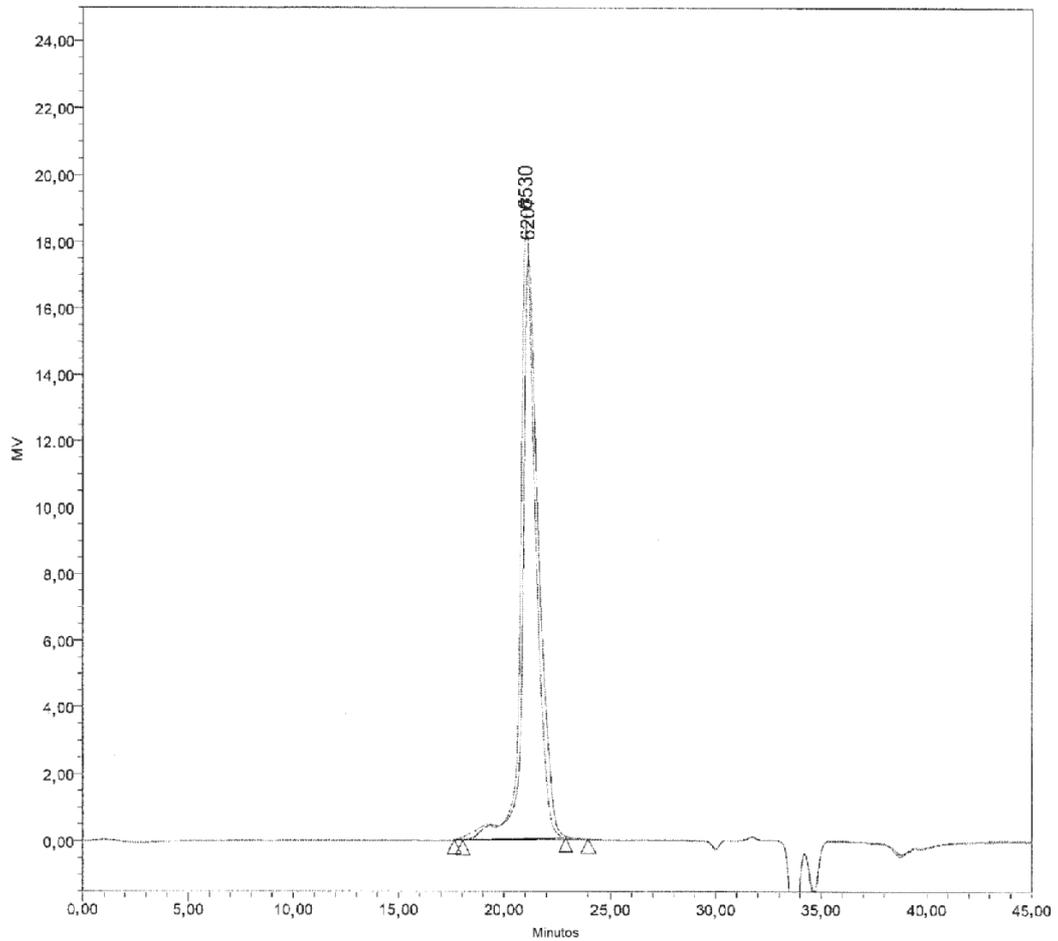


FIG. 2A

Resultados de GPC

	Nombre de la muestra	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Poli-dispersidad	Área (μl/s)
1	44-44-6	5744	6987	5561	21172	124257	1,216394	2481892
2	44-44-6	5772	8347	5570	151210	1125097	1,445918	2499828

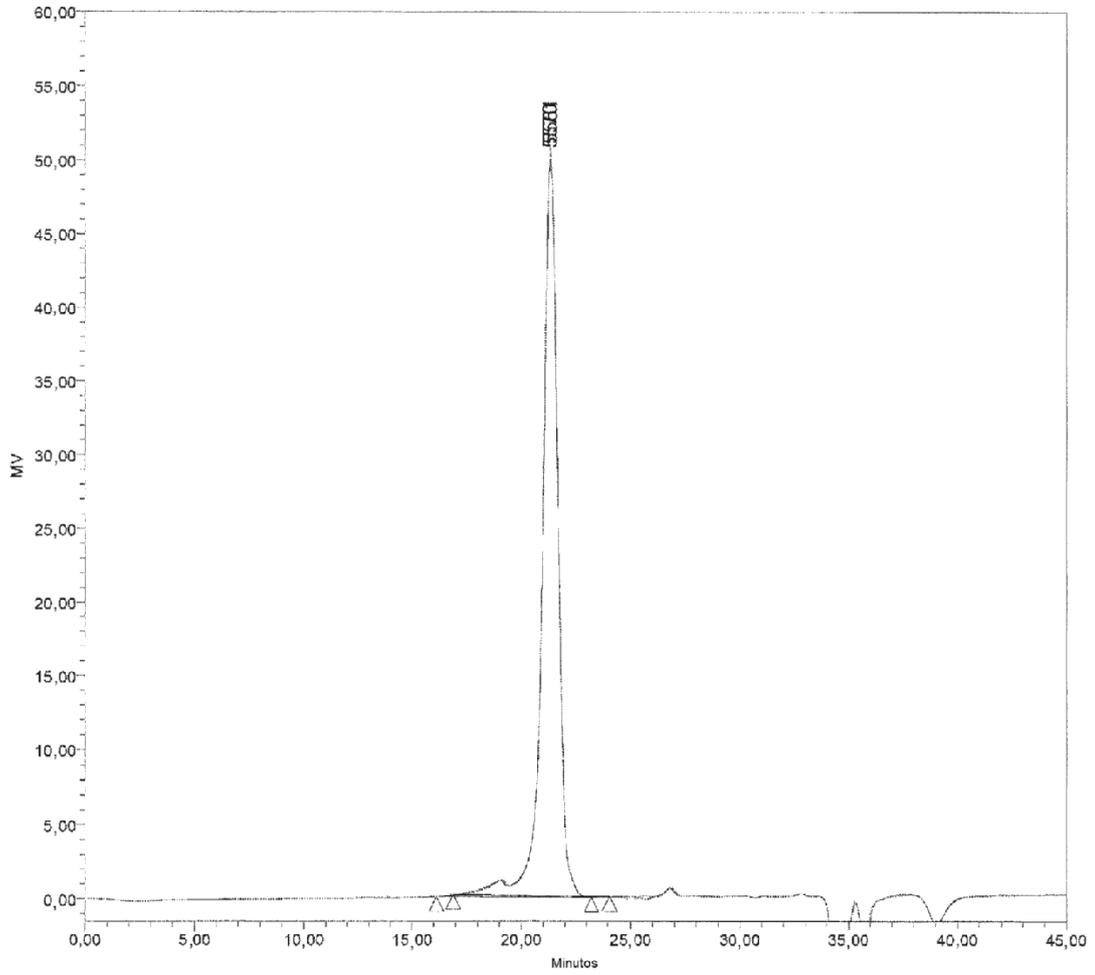
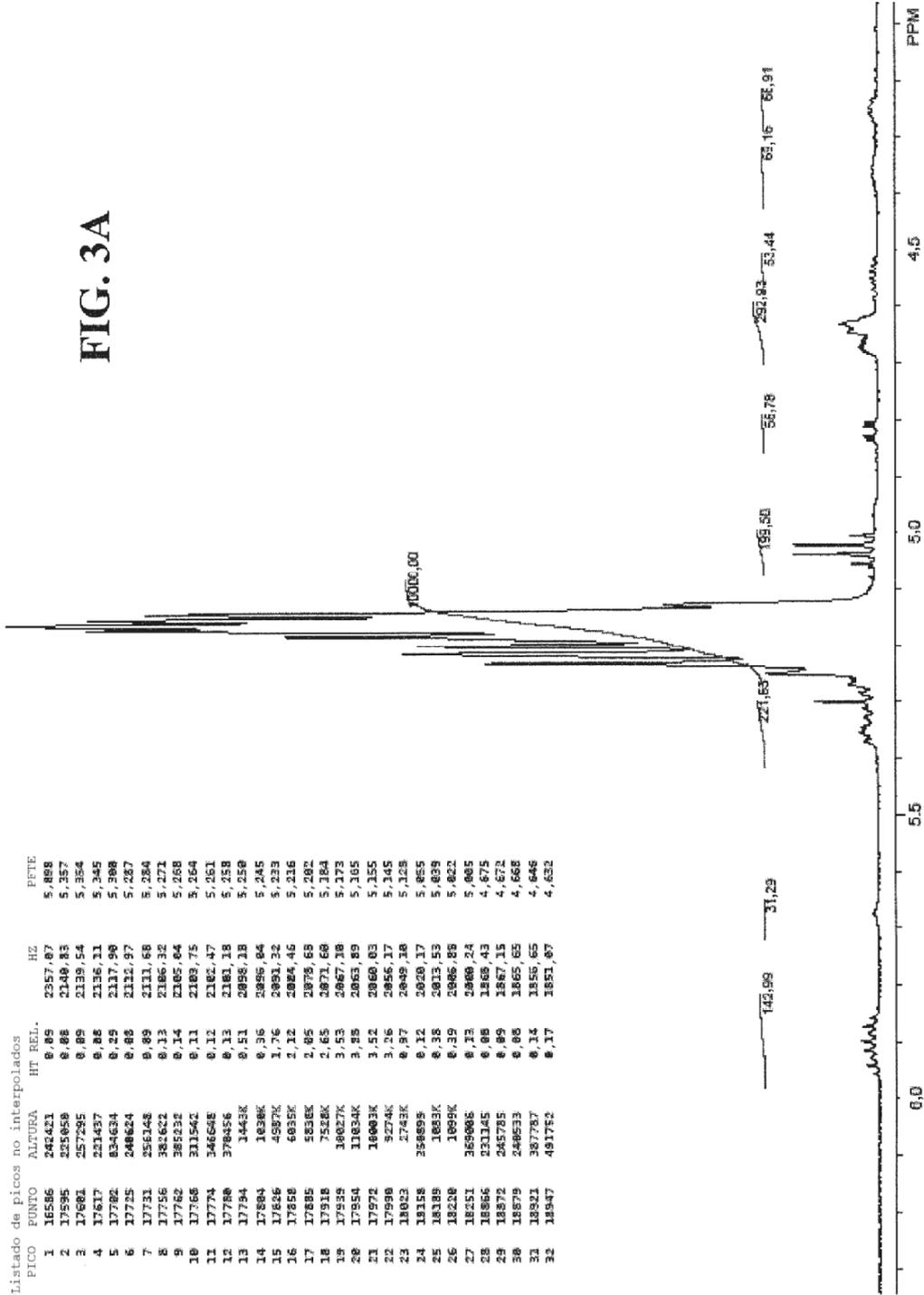
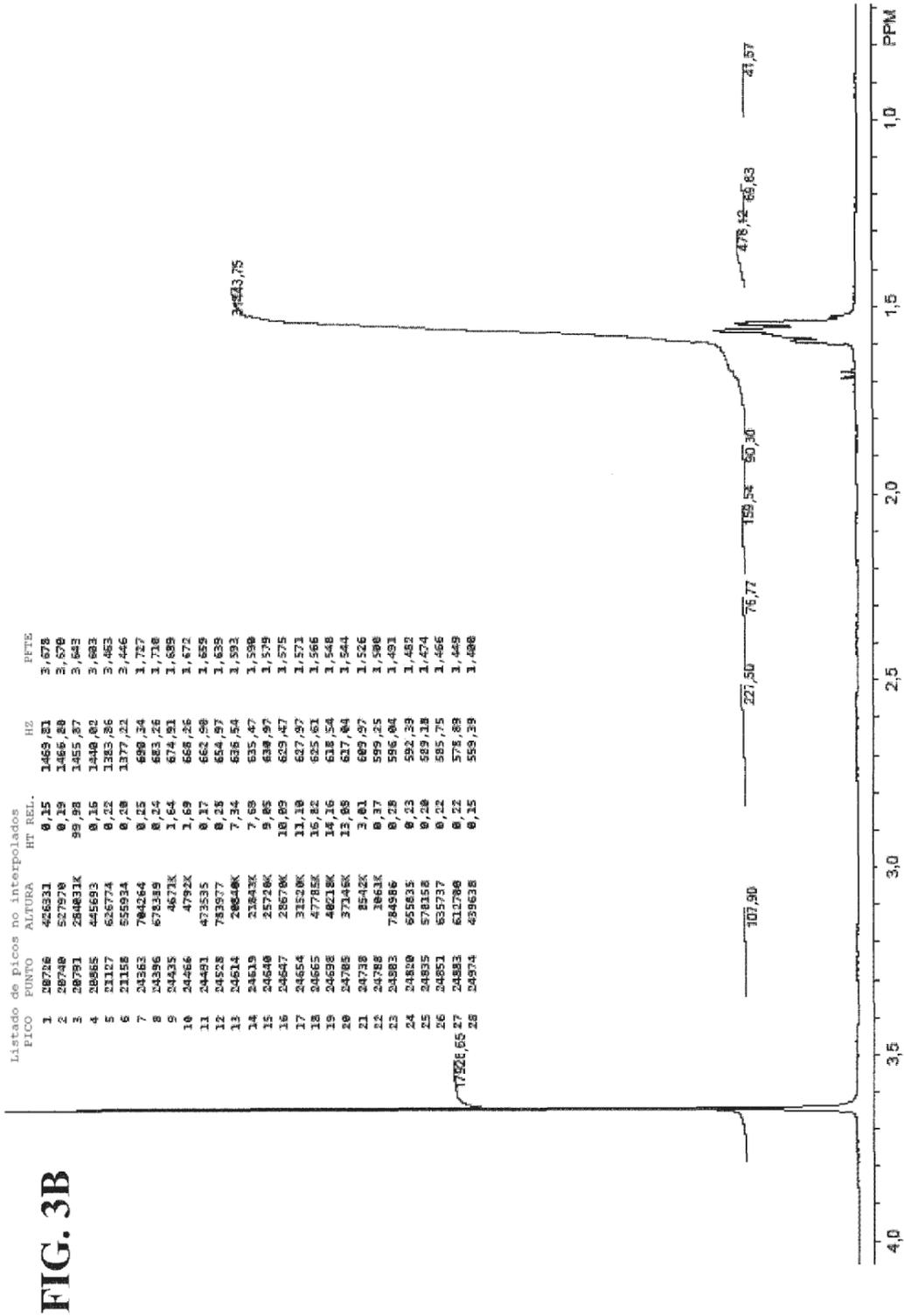
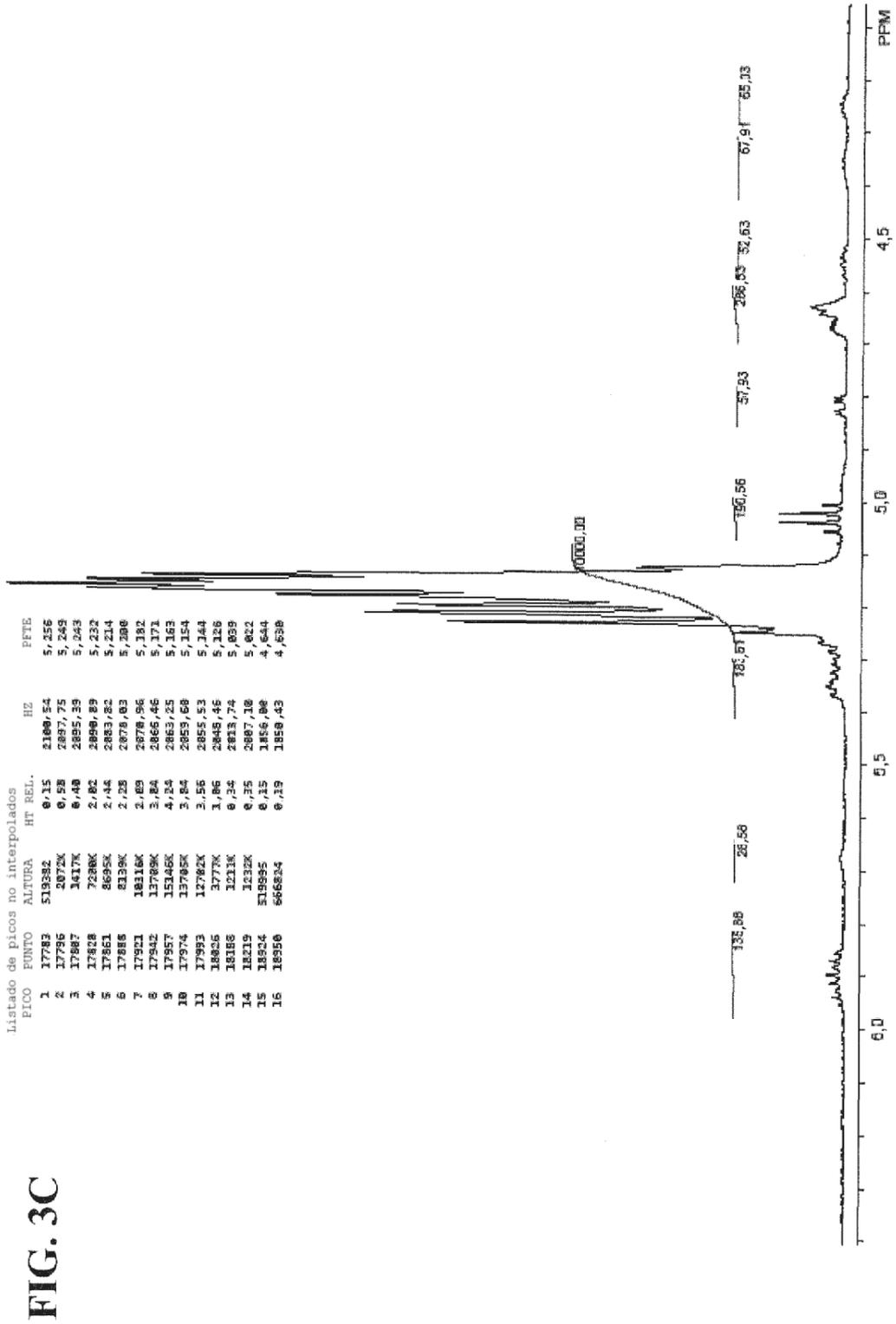


FIG. 2B

FIG. 3A







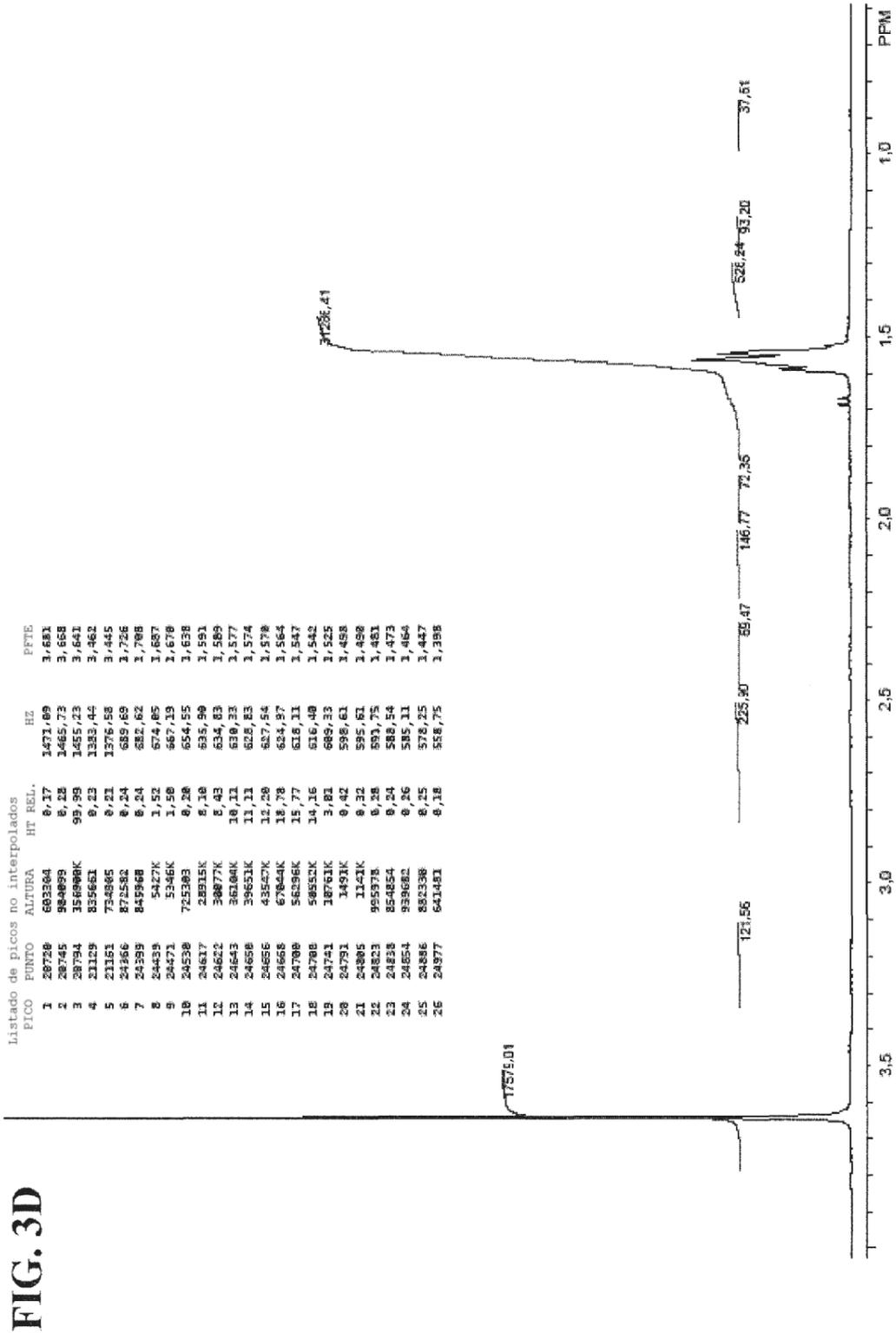
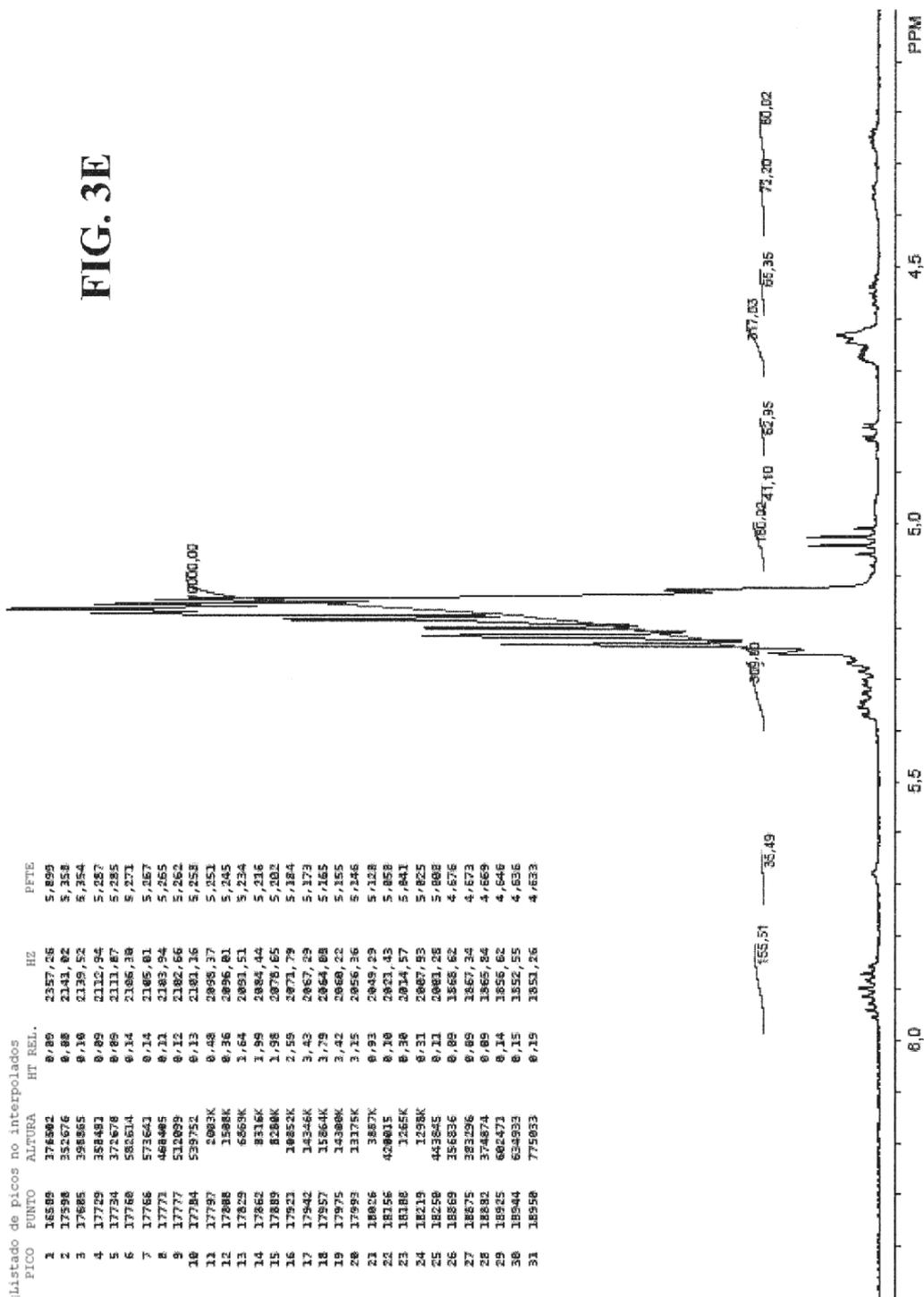
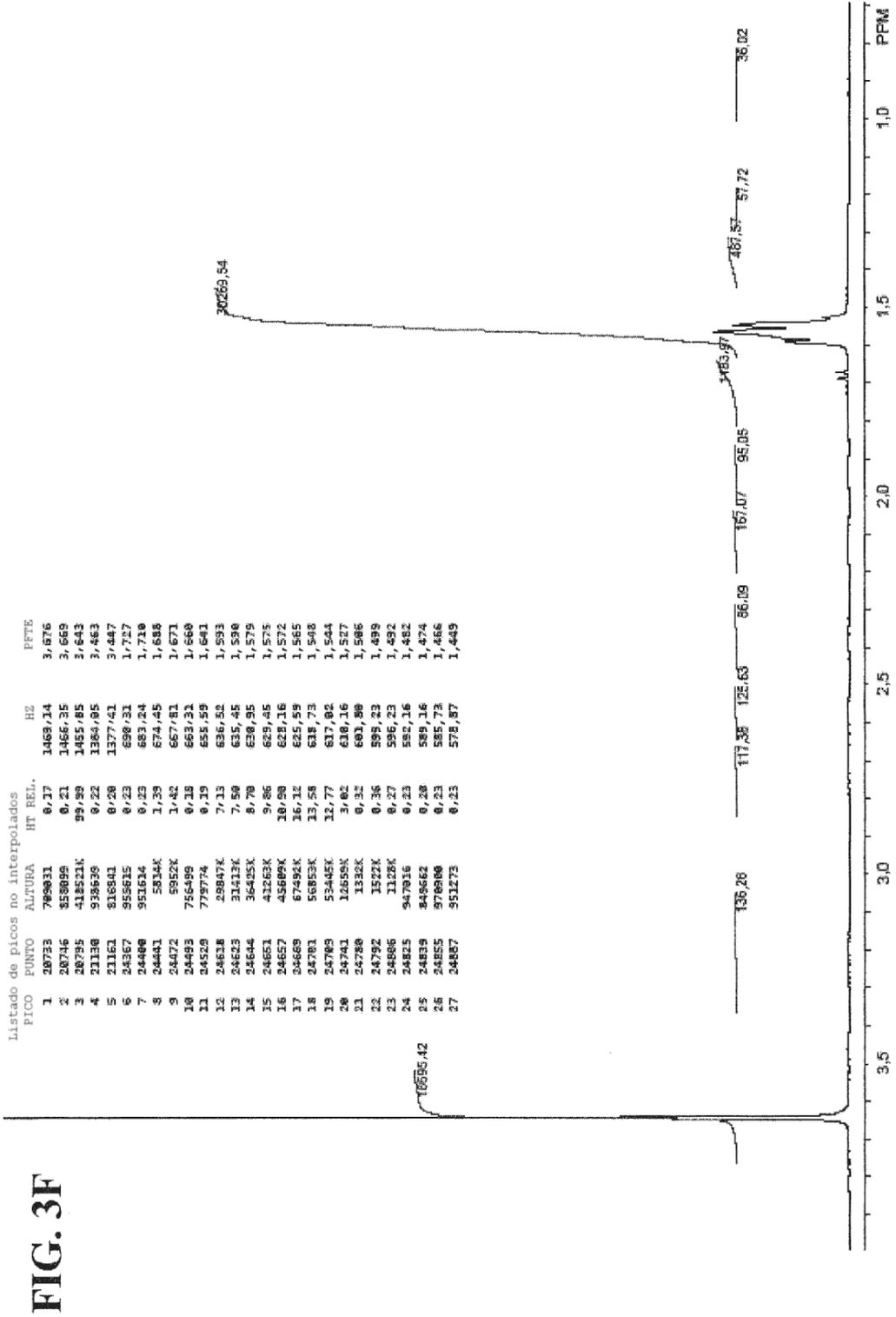


FIG. 3E





Resultados de GPC

	Nombre de la muestra	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Poli-dispersidad	Área (μl/s)
1	11-187-1	17932	31382	28944	54646	92865	1,750072	125487
2	11-188-1	17452	29711	28240	48234	73135	1,702407	174329
3	11-198-1	17045	29148	26443	48733	77936	1,710106	107828

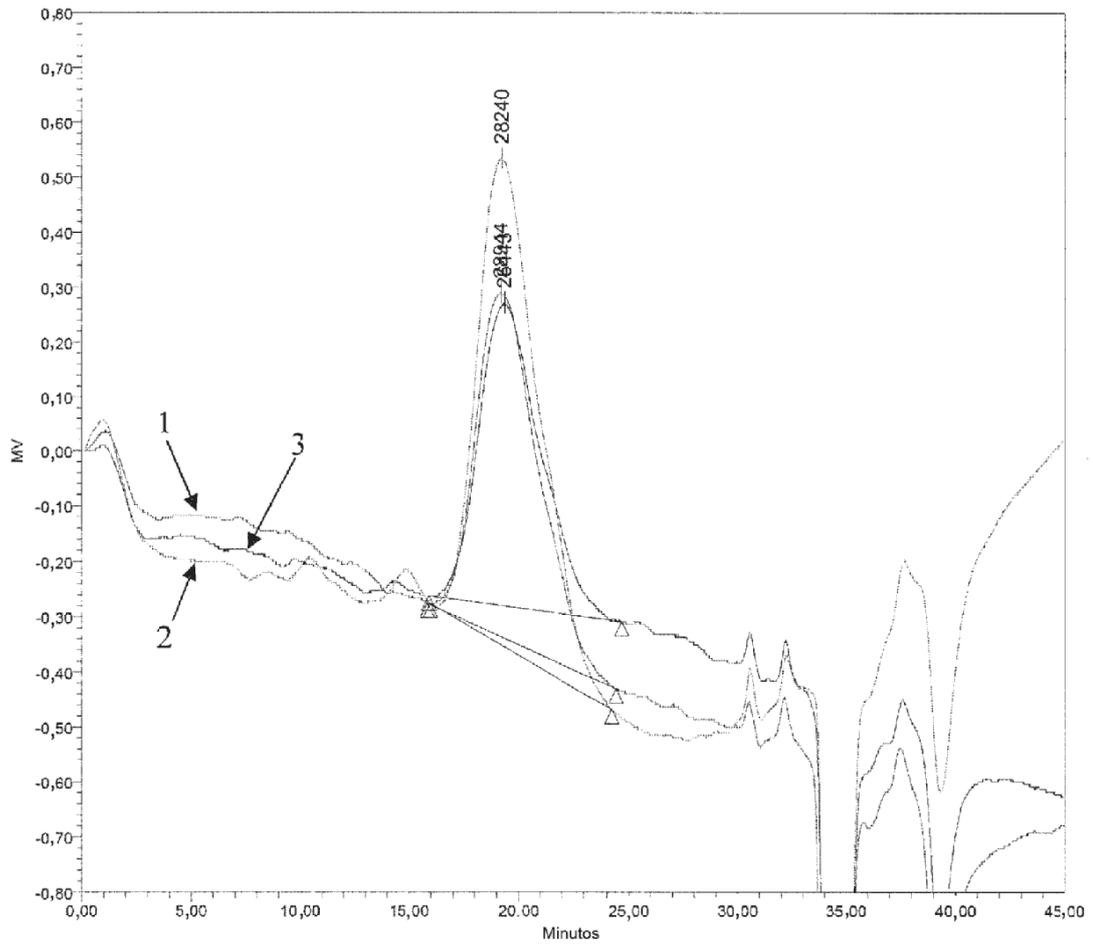
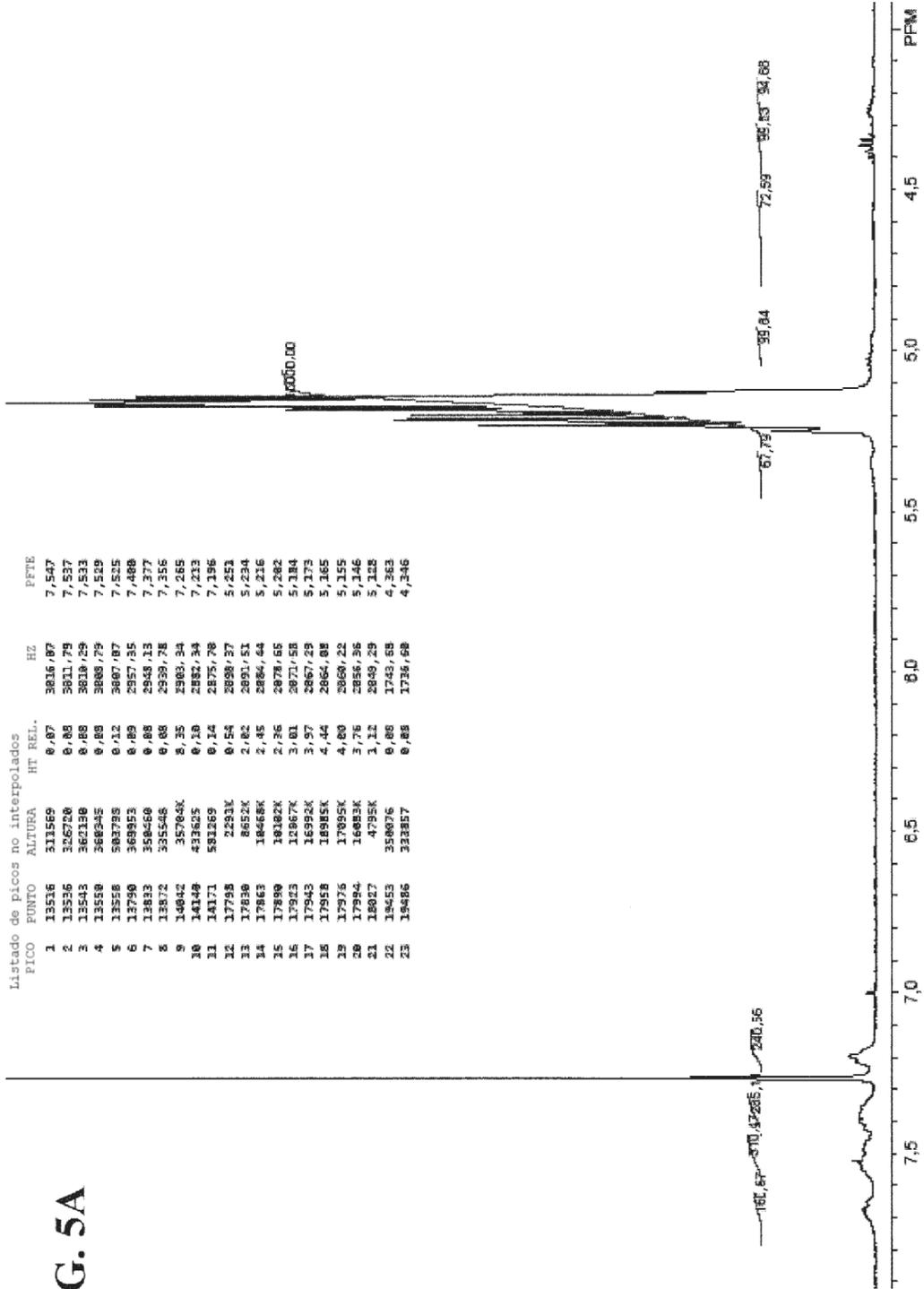
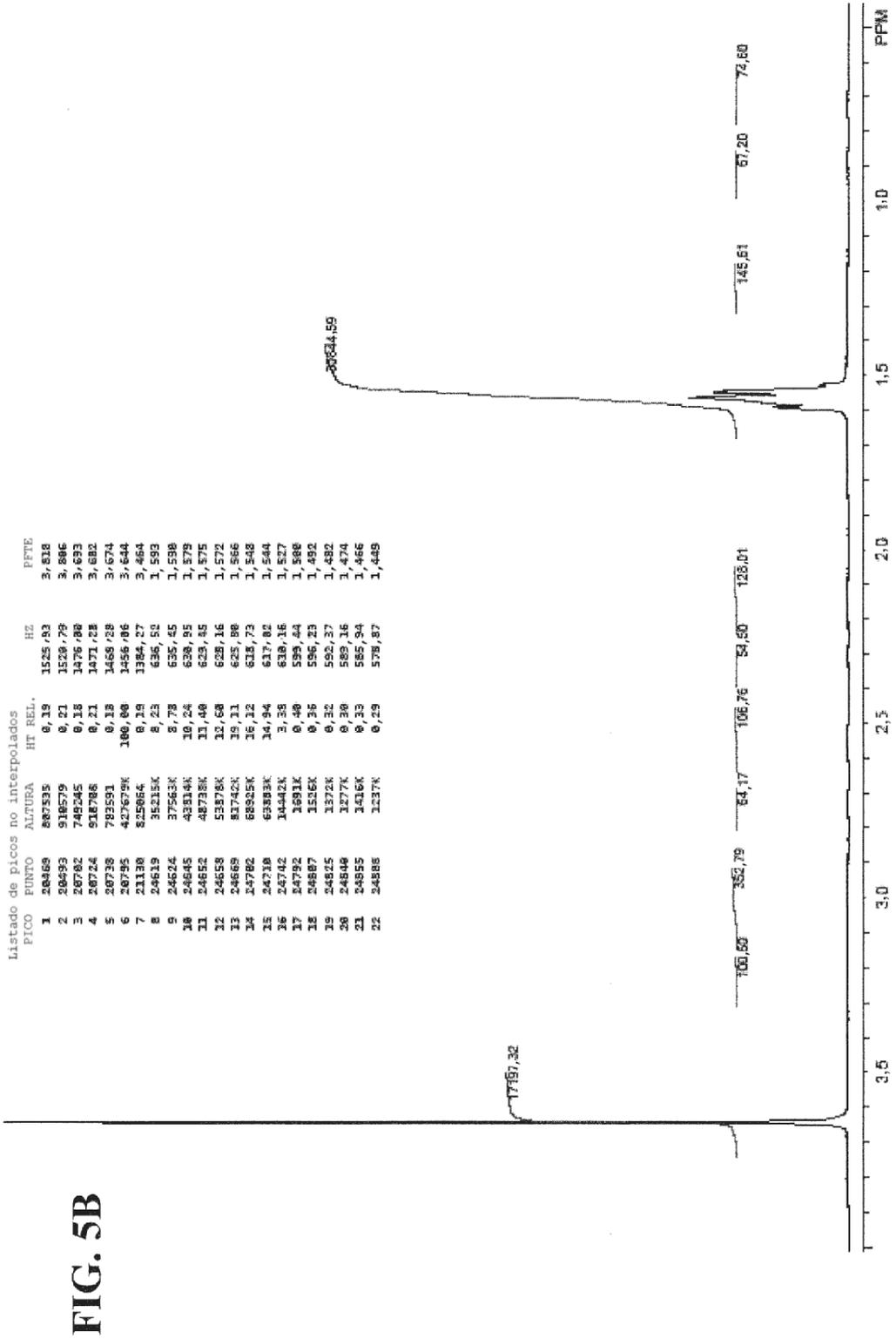
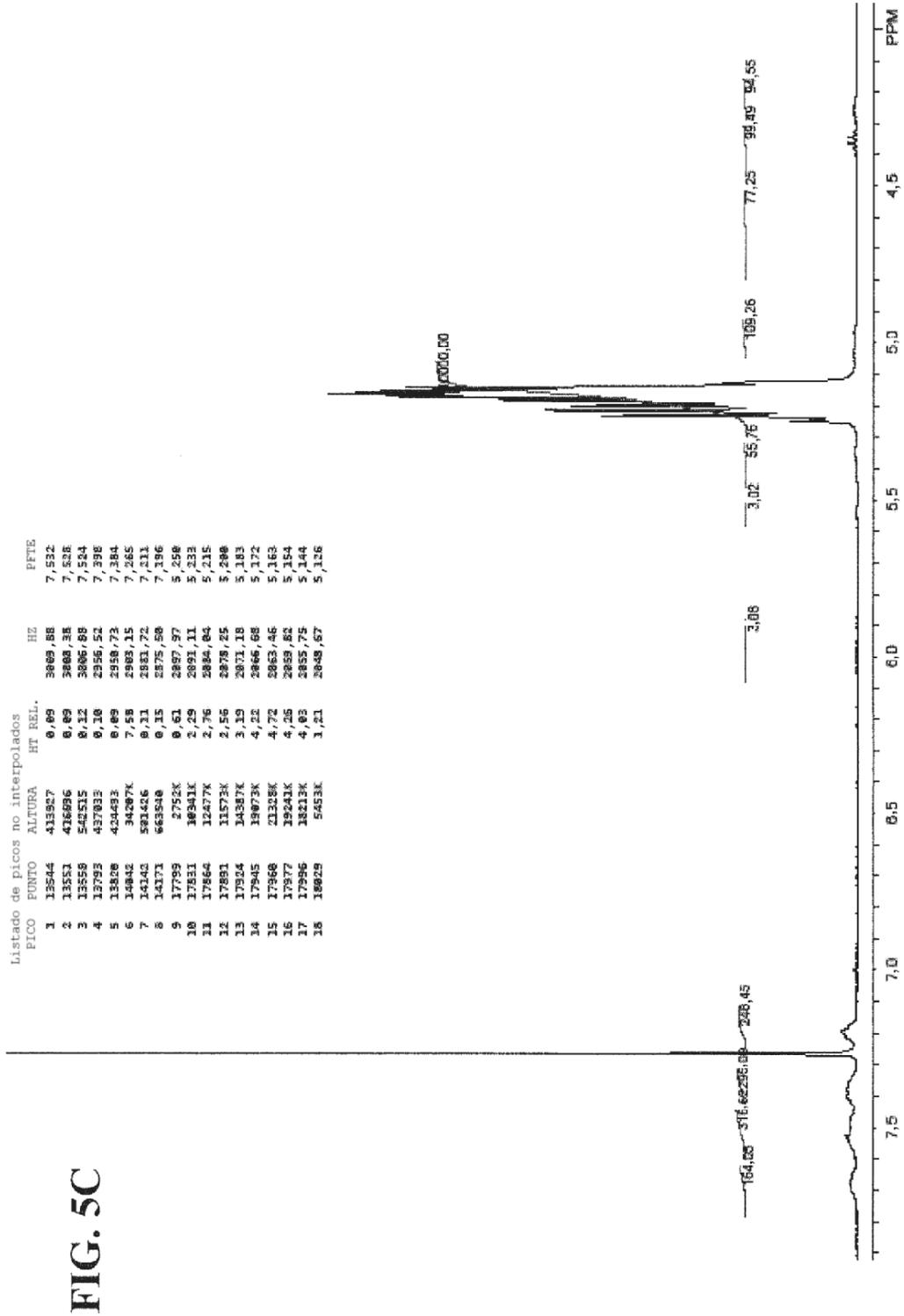


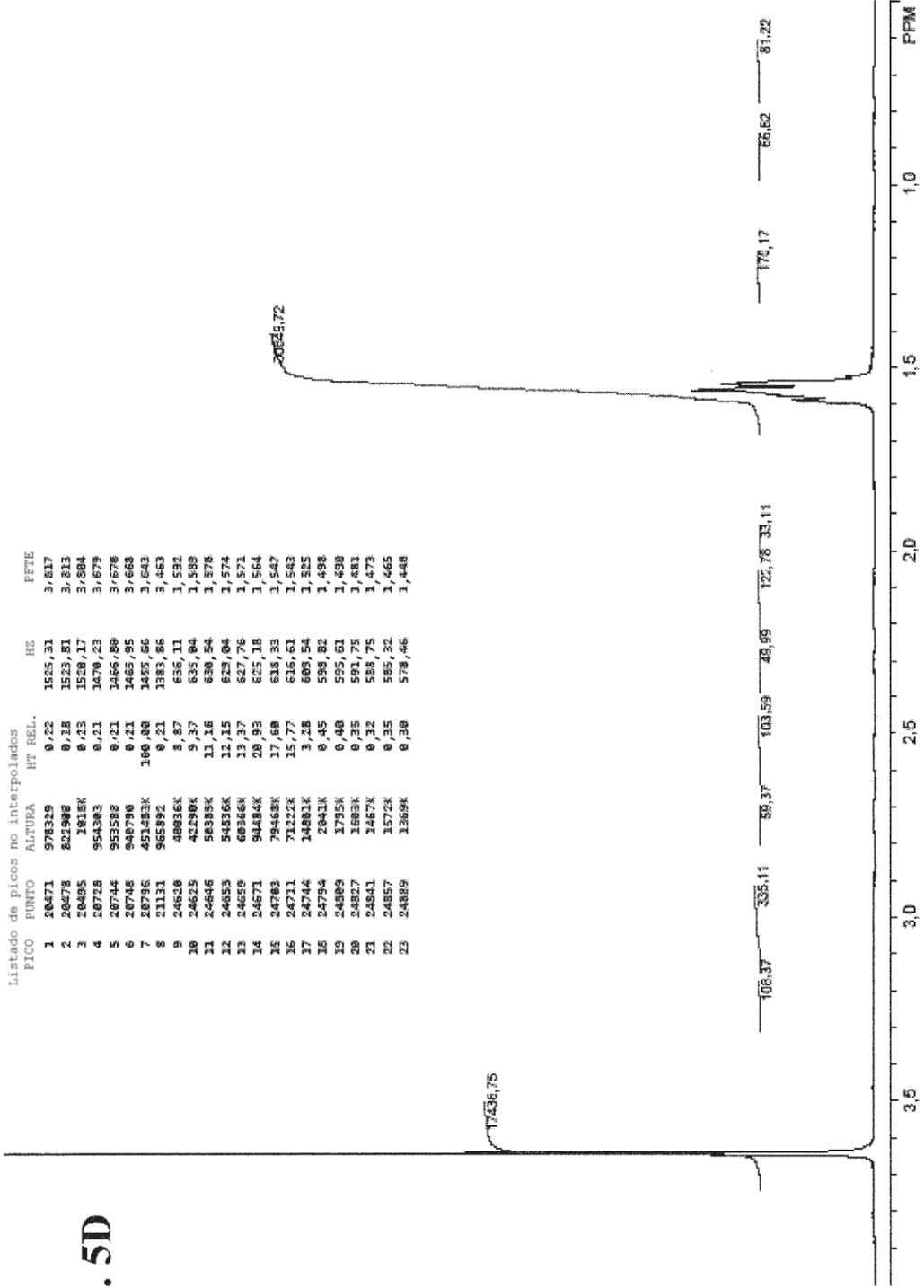
FIG. 4

FIG. 5A









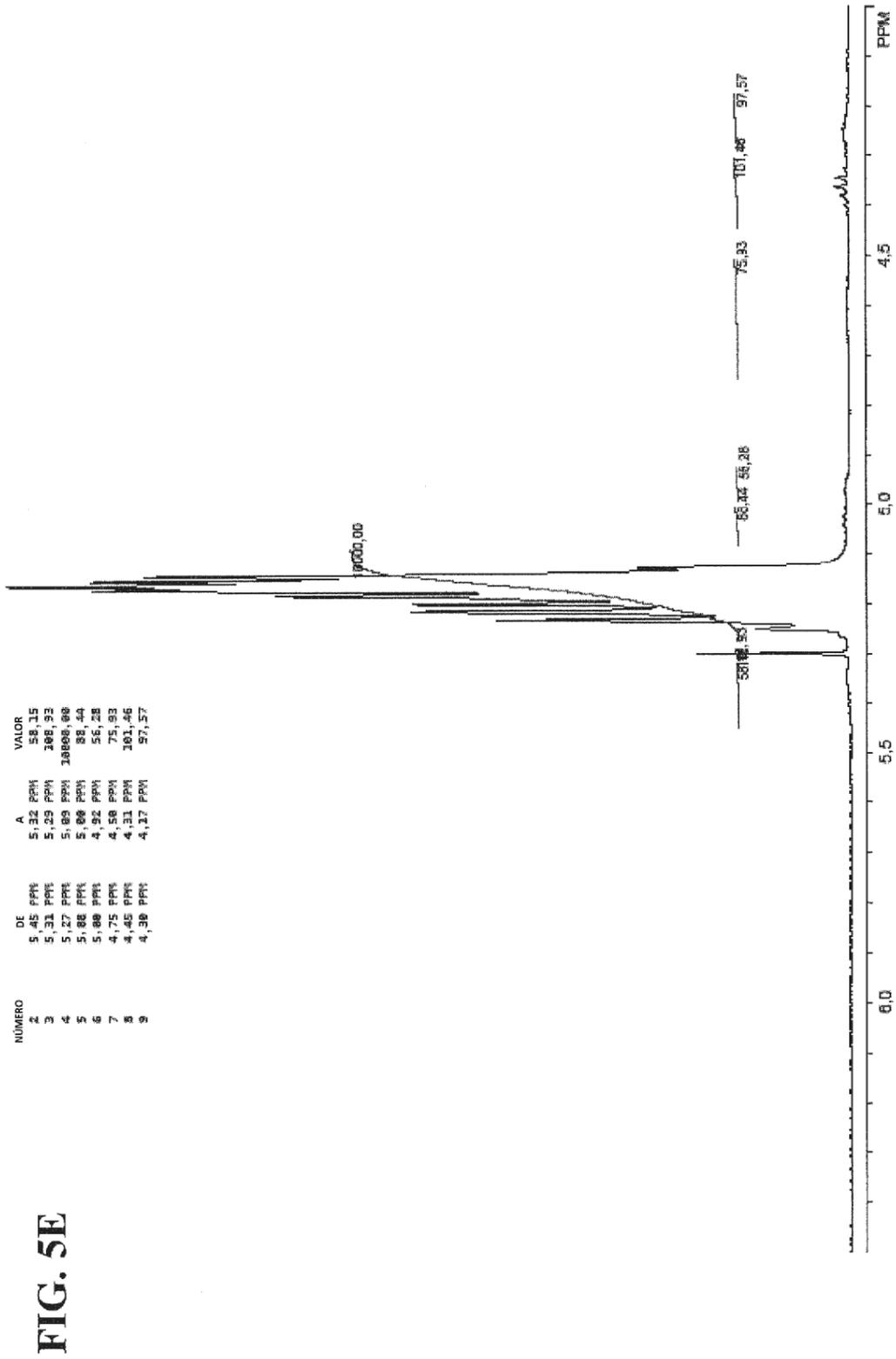


FIG. 5F

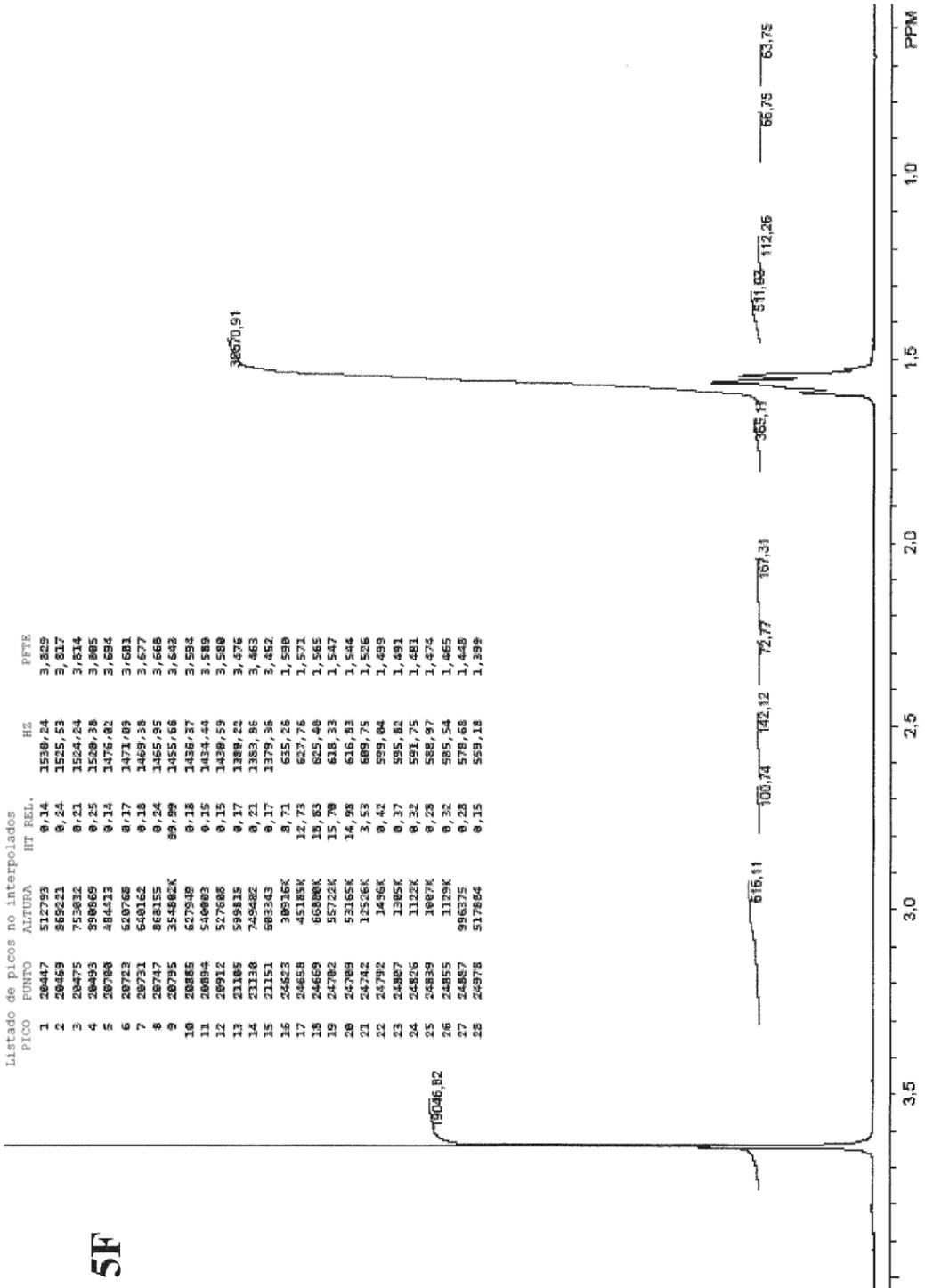


FIG. 6A

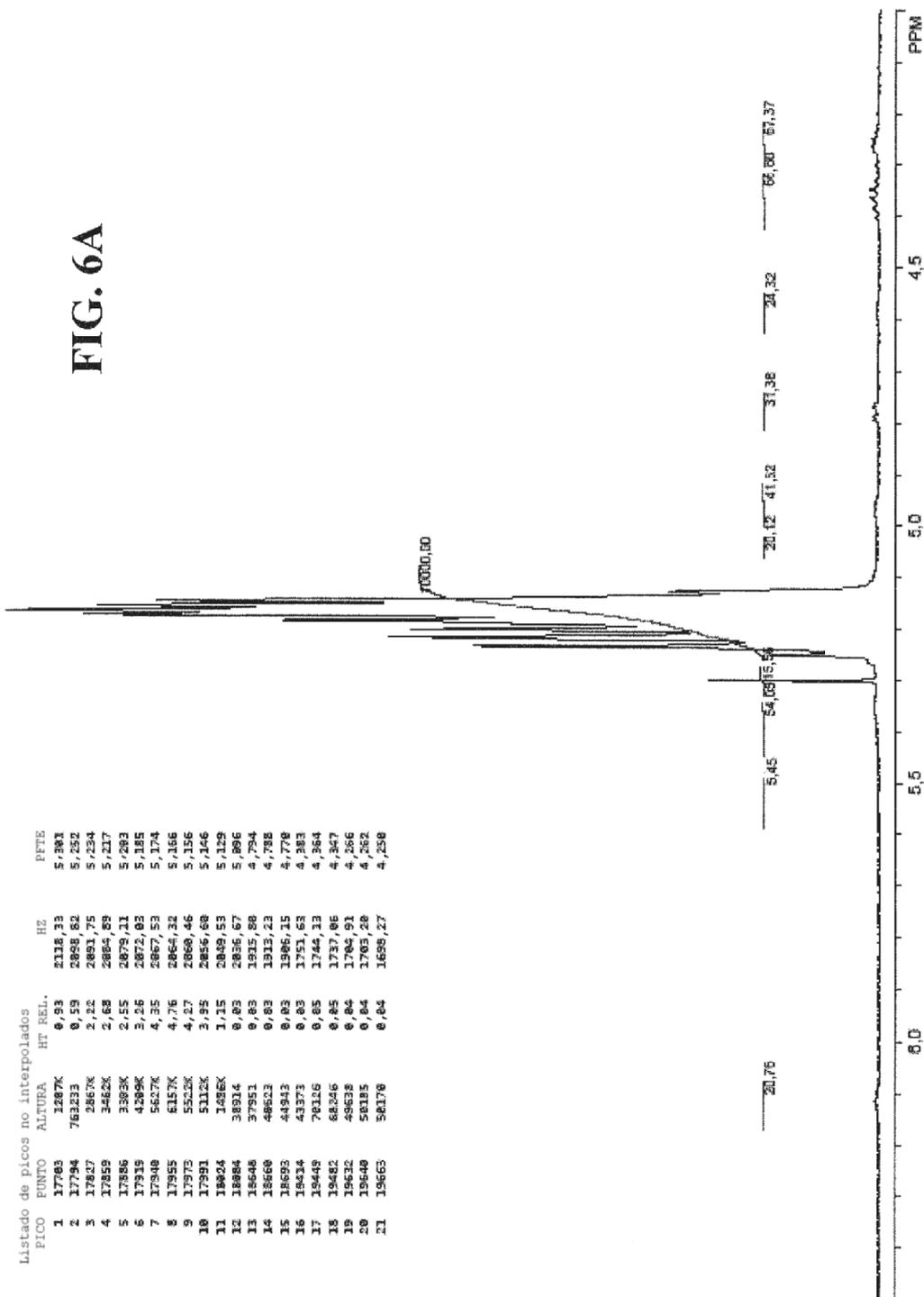
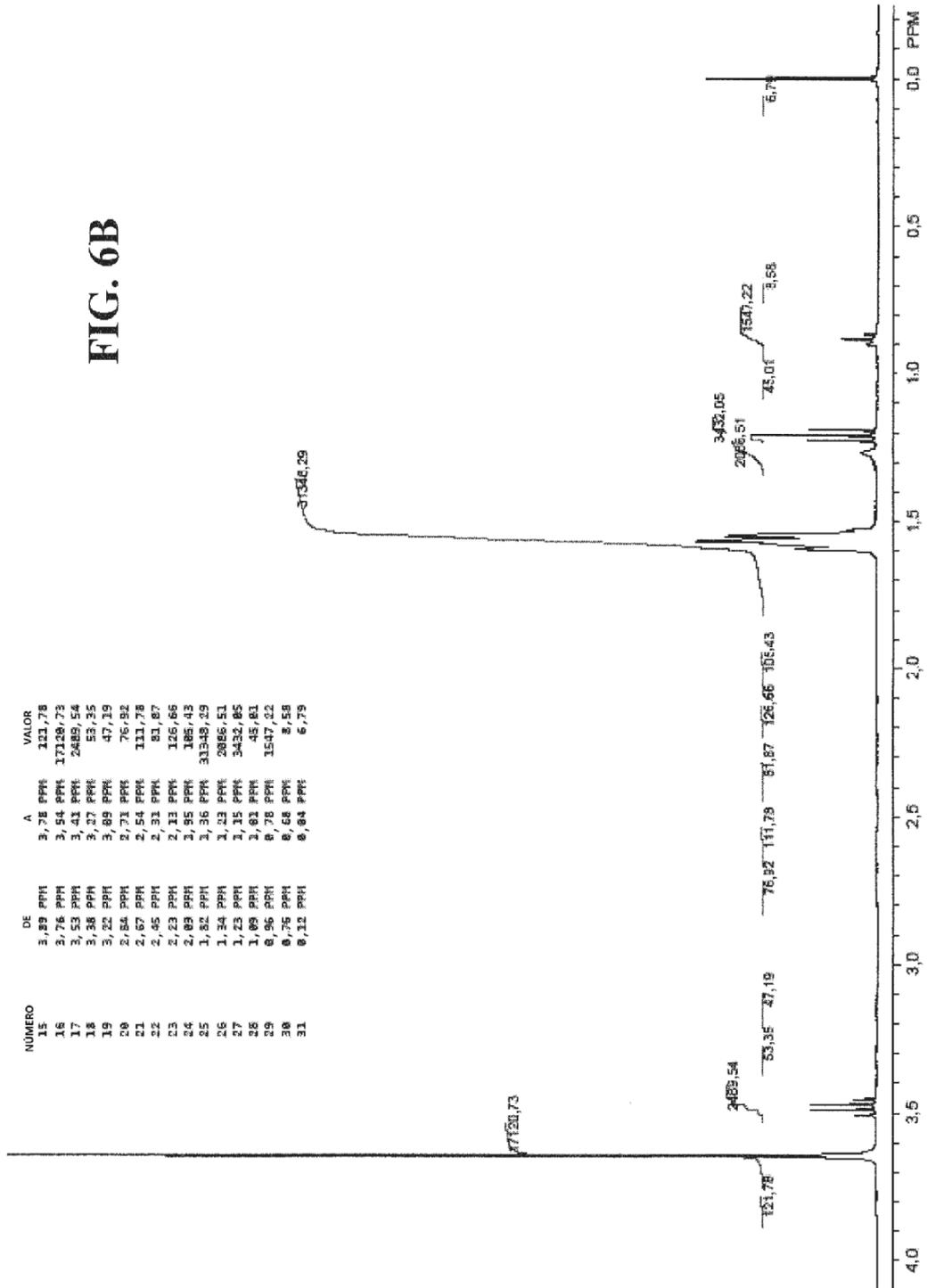


FIG. 6B



Muestra	Descripción de la muestra	Disolvente de polímero en análisis de VI	Conc. de polímero g/dl	Viscosidad inherente		Promedio	Desviación estándar
				Ensayo 1 dl/g	Ensayo 2 dl/g		
11-196-6	Código/lote PLA-PEG-lys-urea (protegido)	DMSO	0,1	0,229	0,205	0,217	0,016
44-49-1	PLA-PEG-lys-urea-glu	DMSO	0,1	0,198	0,198	0,198	0
44-49-1	PLA-PEG-lys-urea-glu	Cloroformo	0,1	0,303	0,314	0,309	0,008

FIG. 7

ID DE LA MUESTRA	ID DEL LAB	ANÁLISIS	RESULTADO(S)	RESULTADOS POR DUPLICADO
11-204-1	G-8391	Paladio	3780 ppm	3880 ppm
11-204-2	G-8392	Paladio	3,8 ppm	2,7 ppm

FIG. 8