

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 298**

51 Int. Cl.:

A61K 47/59 (2007.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
B82Y 10/00 (2011.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61K 47/69 (2007.01)
A61K 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2006 E 13175233 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2669269**

54 Título: **Partículas de liberación de óxido nítrico para agentes terapéuticos de óxido nítrico y aplicaciones biomédicas**

30 Prioridad:

27.05.2005 US 685578 P

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

14.11.2019

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (100.0%)
308 Bynum Hall, Campus Box 4105
Chapel Hill, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:

**SCHOENFISCH, MARK H.;
HO SHIN, JAE HO y
STASKO, NATHAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 731 298 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

Partículas de liberación de óxido nítrico para agentes terapéuticos de óxido nítrico y aplicaciones biomédicas

Campo técnico

- 5 La materia aquí descrita proporciona partículas liberadoras de óxido nítrico y su uso en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas como se define en las reivindicaciones. Más particularmente, en algunas realizaciones, la materia aquí descrita proporciona partículas que liberan óxido nítrico de manera controlada y dirigida, prolongando así los efectos terapéuticos del óxido nítrico y mejorando la especificidad del suministro de óxido nítrico a células y/o tejidos a los que va dirigido.

Abreviaturas

AFM	= microscopía de fuerza atómica
AEAP3 =	<i>N</i> -(6-aminoetil)-aminopropiltrimetoxisilano
AEMP3	= (aminoetilaminometil)-fenetil-trimetoxisilano
AHAP3	= <i>N</i> -(6-aminohexil)-aminopropiltrimetoxisilano
AiBN	= α , α' -azobisisobutironitrilo
atm	= atmósfera
BSA	= albúmina de suero bovino
°C	= grados centígrados
UFC	= unidades formadoras de colonias
CP/MAS	= polarización cruzada/rotación al ángulo mágico
CTAB	= bromuro de cetiltrimetilamonio
DET3	= <i>N</i> -[3-(trimetoxisilil)propil]-dietilentriamina
EtOH	= etanol
FA	= ácido fólico
FITC	= isotiocianato de fluoresceína
g	= gramos
GOx	= glucosa oxidasa
h	= horas
HPU	= poliuretano hidrófilo
MAP3	= metilaminopropiltrimetoxisilano
MeOH	= metanol
mg	= microgramo
μm	= micrómetros
min	= minutos
ml	= mililitro
% mol	= porcentaje en moles
MPC	= clúster protegido por monocapa
MRI	= imagen por resonancia magnética
MTMOS	= metiltrimetoxisilano
nA	= nanoamperio
NaOMe	= metóxido de sodio
nm	= nanómetro
RMN	= resonancia magnética nuclear
NO	= óxido nítrico
[NO] _m	= flujo máximo de liberación de óxido nítrico
O ₃	= ozono
OD	= densidad óptica
PAMAM	= poliamidoamina

pmol	= picomol
ppb	= partes por billón
PPI	= polipropilenimina
ppm	= partes por millón
TPU	= Poliuretano TECOFLEX®
TEM	= microscopía electrónica de transmisión
TEOS	= ortosilicato de tetraetilo
TGA	= análisis gravimétrico térmico
TMOS	= ortosilicato de tetrametilo
TMRM	= tetrametilrodamina
t[NO]	= cantidad total de óxido nítrico
UV	= ultravioleta
Vis	= visible

Antecedentes

El descubrimiento del papel multifacético del óxido nítrico (NO) en biología, fisiología y fisiopatología, véase Marletta, M.A., et al., *BioFactors*, 2, 219-225 (1990), ha llevado a la búsqueda de donadores de óxido nítrico capaces de la liberación controlada de óxido nítrico. Véase Keefer, L.K., *Chemtech*, 28, 30-35 (1998). Hasta la fecha, los investigadores han descubierto que el NO regula una variedad de procesos biológicos en los sistemas cardiovascular, gastrointestinal, genitourinario, respiratorio y nervioso central y periférico. Véase Ignarro, L. J., *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*; Academic Press: San Diego, 2000; y Ignarro, L. J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 84, 9265-9269 (1987). Además, el descubrimiento del NO como un vasodilatador y su identificación tanto como antibiótico así como un factor tumorocida han hecho del NO un candidato farmacéutico atractivo. Véase, por ejemplo, Radomski, M. W., et al., *Br. J. Pharmacol.*, 92, 639-646 (1987); Albina, J. E., y Reichner, J. S.; *Cancer Metas. Rev.*, 17, 19-53 (1998); Nablo, B. J., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 9712-9713 (2001); Cobbs, C. S., et al., *Cancer Res.*, 55, 727-730 (1995); Jenkins, D. C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 92, 4392-4396 (1995); y Thomsen, L. L., et al., *Br. J. Cancer.*, 72, 41-44 (1995).

Se han descrito varios donadores de óxido nítrico, siendo los más notables los N-diazeniodiolatos. En general, los donadores de NO N-diazeniodiolatos son moléculas pequeñas sintetizadas por la reacción de aminas con NO a presión elevada y se han usado, por ejemplo, para generar espontáneamente NO en una disolución acuosa. Véase Hrabie, J. A. y Keefer, L. K., *Chem. Rev.*, 102, 1135-1154 (2002).

Zhang et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 5015 - 5024 describen partículas de sílice de combustión que liberan óxido nítrico para ser usadas con fines terapéuticos.

El documento US 6,841,166 B1 describe partículas liberadoras de óxido nítrico hechas de sílice en donde se inmoviliza un grupo diazeniodiolato que libera NO en sílice de combustión. Las partículas obtenidas se pueden usar con fines terapéuticos.

Las estrategias terapéuticas para explorar las actividades de los donadores de óxido nítrico, por ejemplo, para matar células tumorales, son problemáticas en parte debido a que los sistemas de suministro de óxido nítrico conocidos en la técnica liberan o donan óxido nítrico indiscriminadamente. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de un sistema de suministro de óxido nítrico que libere o done óxido nítrico de una forma controlada y/o dirigida para facilitar una mejor comprensión de la función del NO en la fisiología y para proporcionar el desarrollo de terapias asociadas al NO.

Resumen

Según la invención, se proporciona una partícula liberadora de óxido nítrico, comprendiendo la partícula liberadora de óxido nítrico:

una red de sílice co-condensada que comprende un donador de óxido nítrico, en donde la red de sílice co-condensada se sintetiza a partir de la condensación de una mezcla de silanos que comprende un alcoxisilano y un aminoalcoxisilano para formar una red unida de siloxano, en donde las funciones aminoalcoxisilano están distribuidas por toda la partícula entera y en la superficie de la partícula.

En algunas realizaciones, la materia aquí descrita proporciona una partícula liberadora de óxido nítrico (NO) como se ha definido anteriormente, que comprende un donador de óxido nítrico, una región exterior y una región interior que tiene un volumen, el volumen de la región interior al menos parcialmente lleno por un núcleo de una red de sílice condensada que también se puede combinar con:

(a) un clúster metálico;

(b) una red dendrítica;

y

(c) una combinación de los mismos.

- 5 En algunas realizaciones, la región interior comprende además un conector orgánico seleccionado del grupo que consiste en un conector lábil que responde a cambios en el pH, un conector lábil sensible a la radiación electromagnética, un conector lábil susceptible a la degradación por acción enzimática, un conector hidrófobo, un conector anfifílico, y combinaciones de los mismos.

- 10 En algunas realizaciones, el donador de NO se selecciona del grupo que consiste en un diazeniodiolato, una nitrosamina, una hidroxilamina, un nitrosotiol, una hidroxilamina y una hidroxiurea. En algunas realizaciones, el donador de NO está unido covalentemente a una de la región interior, la región exterior, el núcleo, o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el donador de NO está encapsulado en una de la región interior, la región exterior, el núcleo o sus combinaciones. En algunas realizaciones, el donador de NO está asociado con parte de la partícula por una interacción no covalente seleccionada del grupo que consiste en interacciones de Van der Waals, fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno o combinaciones de las mismas.

- 15 En algunas realizaciones, la región exterior comprende uno o más restos químicos seleccionados del grupo que consiste en restos que modulan la cinética de liberación de óxido nítrico, afectan a la biocompatibilidad o la biodistribución de la partícula, proporcionan un suministro dirigido de la partícula, imparten una capacidad para la generación de imágenes o seguimiento de la partícula, afectan la solubilidad de la partícula, proporcionan un efecto terapéutico o combinaciones de los mismos.

20 En algunas realizaciones, el núcleo comprende un clúster metálico que comprende además un componente seleccionado del grupo que consiste en oro, platino, plata, magnetita, un punto cuántico, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el clúster metálico es un clúster de oro protegido por monocapa.

- 25 En algunas realizaciones, el núcleo comprende una red dendrítica seleccionada del grupo que consiste en un dendrímico de polipropilenimina, un dendrímico de poliamidoamina, un dendrímico de poli(éter arílico), un dendrímico de polipéptido, un dendrímico de poliéster, un dendrímico de poliamida, un políglicerol dendrítico y un dendrímico de triazina. En algunas realizaciones, la red dendrítica está hiperramificada.

- 30 De acuerdo con la invención, el núcleo es una red de sílice co-condensada sintetizada a partir de la condensación de una mezcla de silanos que comprende un alcoxisilano y un aminoalcoxisilano. En algunas realizaciones, el alcoxisilano es un tetraalcoxisilano de fórmula $\text{Si}(\text{OR})_4$, en donde R es alquilo, y el aminoalcoxisilano tiene una fórmula seleccionada de:

(a) un aminoalcoxisilano de fórmula $\text{R}''\text{-(NH-R}')_n\text{-Si}(\text{OR})_3$, en donde R es alquilo, R' es alquileo, alquileo ramificado o aralquileo, n es 1 o 2, y R'' se selecciona del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, arilo y alquilamina;

(b) un aminoalcoxisilano de fórmula $\text{NH}[\text{R}'\text{-Si}(\text{OR})_3]_2$, en donde R es alquilo y R' es alquileo;

- 35 (c) un aminoalcoxisilano en donde la amina está sustituida con un diazeniodiolato, teniendo dicho aminoalcoxisilano la fórmula $\text{R}''\text{-N}(\text{NONO-X}^+)\text{-R}'\text{-Si}(\text{OR})_3$, donde R es alquilo, R' es alquileo o aralquileo, R'' es alquilo o alquilamina, y X^+ es un catión seleccionado del grupo que consiste en Na^+ y K^+ ; y

(d) una combinación de los mismos.

- 40 En algunas realizaciones, la mezcla de silinos comprende entre aproximadamente 10% en moles y aproximadamente 99% en moles de tetraalcoxisilano y de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 90% en moles de aminoalcoxisilano. En algunas realizaciones, la mezcla de silanos comprende además de aproximadamente 0% en moles a aproximadamente 20% en moles de silano fluorado; de aproximadamente 0% en moles a aproximadamente 20% en moles de silano catiónico o aniónico; y de aproximadamente 0% en moles a aproximadamente 20% en moles de alquilsilano.

- 45 En algunas realizaciones, el tetraalcoxisilano se selecciona del grupo que consiste en ortosilicato de tetrametilo y ortosilicato de tetraetilo.

En algunas realizaciones, el aminoalcoxisilano se selecciona del grupo que consiste en:

N-(6-aminohexil)aminometiltrimetoxisilano;

N-(6-aminohexil)aminopropiltrimetoxisilano;

- 50 *N*-(6-aminoetil)aminopropiltrimetoxisilano;

- (3-trimetoxisililpropil)dielentriamina;
- (aminoetilaminometil)fenetiltrimetoxisilano;
- [3-(metilamino)propil]trimetoxisilano;
- N*-butilaminopropiltrimetoxisilano;
- 5 *N*-etilaminoisobutiltrimetoxisilano;
- N*-fenilaminopropiltrimetoxisilano;
- N*-ciclohexilaminopropiltrimetoxisilano;
- Bis[3-(trimetoxisilil)propil]amina; y
- Bis[(3-trimetoxisilil)propil]etilendiamina.
- 10 En algunas realizaciones, el silano fluorado se selecciona del grupo que consiste en (heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahidrodecil)trietoxisilano, (3,3,3-trifluoropropil)trimetoxisilano, y (perfluoroalquil)etiltrietoxisilano.
- En algunas realizaciones, el silano catiónico o aniónico se selecciona del grupo que consiste en:
- cloruro de *N-N*-didecil-*N*-metil-*N*-(3-trimetoxisilil)amonio;
- cloruro de octadecildimetil(3-trimetoxisililpropil)amonio;
- 15 fosfonato de 3-trihidroxisililpropilmetilo, sal sódica; y carboxiletilsilanotriol, sal sódica.
- En algunas realizaciones, el alquilsilano se selecciona del grupo que consiste en metiltrimetoxisilano, butiltrimetoxisilano, butiltrietoxisilano, propiltrimetoxisilano y octadeciltrimetoxisilano.
- En algunas realizaciones, la partícula liberadora de NO que comprende un núcleo de red de sílice co-condensada y el donador de NO, se sintetiza usando un método de "postcarga" en donde el donador de NO se forma después de la condensación de la red de sílice. En algunas realizaciones, la partícula liberadora de NO que comprende un núcleo de red de sílice co-condensada se sintetiza utilizando un método de "precarga" en donde el donador de NO se forma antes de la condensación de la red de sílice.
- 20
- En algunas realizaciones, el conector orgánico comprende un grupo funcional capaz de conferir un estado de activación/desactivación de la liberación de óxido nítrico a la partícula liberadora de óxido nítrico, en donde el grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en un éster, una hidrazona, un acetal, un tiopropionato, un resto fotolábil y una secuencia de aminoácidos sometida a degradación enzimática.
- 25
- En algunas realizaciones, el exterior comprende un resto capaz de suministrar la partícula liberadora de NO a un objetivo. En algunas realizaciones, el objetivo se selecciona de una célula, un tejido y un órgano. En algunas realizaciones, la célula es una célula cancerosa.
- 30
- En algunas realizaciones, el resto capaz de suministrar la partícula liberadora de NO al objetivo se selecciona del grupo que consiste en una proteína responsable de la interacción anticuerpo/antígeno, ácido fólico, guanidina, transferrina, una hormona, carbohidratos, un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos RGD, y péptidos TAT.
- 35
- En algunas realizaciones, el exterior comprende un resto seleccionado de un donador de óxido nítrico, un (poli)(óxido de etileno), un (poli)uretano, un copolímero de *N*-(2-hidroxi)propilmetacrilamida, copolímeros de lactida/glicólido (p. ej., poli(ácido láctico-co-glicólico, PLGA), un azúcar, un colorante orgánico fluorescente, un agente de contraste de MRI, un tiol, una cadena de alquilo terminada en metilo, un antibiótico, un agente terapéutico antineoplásico, un sulfonato, un carboxilato, un fosfato, una amina catiónica, una amina cuaternaria, y combinaciones de los mismos.
- 40
- En algunas realizaciones, la partícula liberadora de NO tiene un diámetro de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 1000 nm. En algunas realizaciones, la partícula tiene un núcleo de clúster metálico y el diámetro de la partícula es de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 5 nm. En algunas realizaciones, la partícula tiene un núcleo de red de sílice co-condensada y tiene un diámetro de entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 10 µm.
- 45
- En algunas realizaciones, la materia aquí descrita proporciona una formulación para suministrar óxido nítrico a un sujeto. En algunas realizaciones, la formulación se usa en medicina en un método que comprende administrar una cantidad efectiva de una partícula liberadora de NO al sujeto, comprendiendo dicha partícula un donador de NO, una región exterior y una región interior que tiene un volumen, el volumen de la región interior al menos parcialmente lleno por un núcleo de una red de sílice co-condensada que puede comprender además:

(a) un clúster metálico;

(b) una red dendrítica;

; y

(c) una combinación de los mismos.

5 En algunas realizaciones, la materia aquí descrita se va a usar en un método para tratar un estado de enfermedad en un sujeto que necesita tratamiento del mismo, en donde el método comprende administrar a un sujeto que necesita tratamiento una partícula liberadora de NO que comprende un donador de NO, una región exterior y una región interior que tiene un volumen, el volumen al menos parcialmente lleno por un núcleo de una red de sílice co-condensada que puede comprender además:

10 (a) un clúster metálico;

(b) una red dendrítica;

y

(c) una combinación de los mismos.

15 En algunas realizaciones, el estado de la enfermedad se selecciona de cáncer, una enfermedad cardiovascular, una infección microbiana, la agregación plaquetaria y adhesión plaquetaria causada por la exposición de la sangre a un dispositivo médico, afecciones patológicas resultantes de la proliferación celular anormal, rechazos de trasplantes, enfermedades autoinmunitarias, inflamación, enfermedades vasculares; tejido cicatricial, contracción de heridas, reestenosis, dolor, fiebre, trastornos gastrointestinales, trastornos respiratorios, disfunciones sexuales y enfermedades de transmisión sexual.

20 En algunas realizaciones, la materia aquí descrita proporciona películas poliméricas que contienen partículas liberadoras de NO. En algunas realizaciones, las películas poliméricas se pueden usar para recubrir dispositivos médicos. En algunas realizaciones, el dispositivo médico es uno de entre una endoprótesis arterial, un alambre guía, un catéter, una aguja de trocar, un anclaje óseo, un tornillo óseo, una placa protectora, un reemplazo de cadera o articulación, un cable eléctrico, un biosensor, una sonda, una sutura, un paño quirúrgico, un vendaje para heridas y una venda.

25 En algunas realizaciones, la materia aquí descrita proporciona un detergente que comprende una partícula liberadora de NO.

30 Por lo tanto, es un objeto de la materia aquí descrita proporcionar partículas liberadoras de óxido nítrico. Es otro objeto de la materia aquí descrita proporcionar partículas liberadoras de óxido nítrico para el suministro dirigido de óxido nítrico a una célula y/o tejido específicos. Otro objeto de la materia aquí descrita es proporcionar la capacidad de desencadenar la liberación de óxido nítrico de partículas liberadoras de óxido nítrico.

35 Ciertos objetos de la materia aquí descrita se han mencionado anteriormente en la presente memoria, los cuales son abordados en su totalidad o en parte por la materia aquí descrita, otros objetos y aspectos se harán evidentes a medida que la descripción avance cuando se considere en relación con los ejemplos adjuntos como se describe mejor en la presente memoria a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de una partícula liberadora de óxido nítrico (NO) que comprende un núcleo **CR**, una región interior **IR**, un conector **LK** que tiene una porción lábil **LP**, un donador de óxido nítrico (NO) **NO** y un exterior **EP**.

40 La Figura 2 es un esquema de síntesis para la preparación de las nanopartículas de oro de clúster protegido (MPC) por monocapa de liberación de NO aquí descritas.

La Figura 3 es una representación esquemática de la síntesis de partículas liberadoras de NO por la co-condensación de redes de sílice a partir de mezclas de alcoxisilanos y aminoalcoxisilanos, seguida de un tratamiento de la red de sílice co-condensada con NO gaseoso.

45 La Figura 4A es una representación esquemática de la extensión de la distribución del donador de NO en partículas de sílice modificadas con *N*-diazenioldiolato (esferas más oscuras) sintetizadas por un método de injerto de superficie.

50 La Figura 4B es una representación esquemática de la extensión de la distribución del donador de NO en partículas de sílice modificadas con *N*-diazenioldiolato (esferas más oscuras) sintetizadas por co-condensación "en un solo matraz" de redes de sílice de mezclas de silanos que comprenden alcoxisilanos y aminoalcoxisilanos.

- La Figura 5A es una representación esquemática de la síntesis de partículas de sílice co-condensadas liberadoras de NO usando un método de "postcarga", en donde los grupos amino de aminoalcoxisilanos se hacen reaccionar con NO gaseoso después de la co-condensación en una red de sílice.
- 5 La Figura 5B es una representación esquemática de la síntesis de partículas de sílice co-condensadas liberadoras de NO usando un método de "precarga", en donde los aminoalcoxisilanos reaccionan con NO gaseoso antes de la co-condensación para formar una red de sílice.
- La Figura 6A es la estructura del *N*-(2-aminoetil)-3-aminopropiltrimetoxisilano (AEAP3).
- La Figura 6B es la estructura del (aminoetilaminometil)feniltrimetoxisilano (AEMP3).
- La Figura 6C es la estructura del *N*-(6-aminohexil)aminopropiltrimetoxisilano (AHAP3).
- 10 La Figura 6D es la estructura de *N*-[3-(trimetoxisilil)propil]dietilentríamina (DET3).
- La Figura 7 es una representación esquemática de la síntesis con molde de redes de sílice co-condensadas mesoporosas usando micelas como agentes de molde para dirigir la formación de poros.
- La Figura 8 es una representación esquemática de una parte de la partícula liberadora de NO como se ha descrito antes para la figura 1, que muestra además que la parte lábil **LP** del conector **LK** se puede colocar a distancias variables del exterior de la partícula **EP**. La posición **A** está más alejada del exterior, la posición **B** está situada en el medio del conector y la posición **C** está más cerca del exterior de la partícula.
- 15 La Figura 9A muestra una estructura generalizada de un poliuretano con segmentos médicos. Las unidades blandas están representadas por elipses sombreadas, las unidades duras por rectángulos sombreados y las unidades de expansión por círculos sombreados.
- 20 La Figura 9B muestra la estructura del poliuretano TECOFLEX®, en donde *n* y *n'* son números enteros.
- La Figura 10A es un espectro de ¹H NMR de nanopartículas de oro funcionalizadas con hexanotiol.
- La Figura 10B es un espectro de ¹H NMR de nanopartículas de oro funcionalizadas con bromo. Los picos de -CH₂Br aparecen a 3.4 ppm.
- 25 La Figura 10C es un espectro de ¹H NMR de nanopartículas de oro funcionalizadas con etilendiamina. Los picos de -CH₂NH aparecen desde 2.5 a 3.0 ppm.
- La Figura 11 es un esquema para una síntesis en dos etapas de 11-bromo-1-undecanotiol.
- La Figura 12 es una representación esquemática de un método analítico para medir el óxido nítrico.
- La Figura 13 es una gráfica que muestra los perfiles de liberación de óxido nítrico de nanopartículas de oro de clúster protegido por monocapa (MPC) derivatizadas con varias diaminas. La línea a es el perfil de liberación de óxido nítrico de nanopartículas de oro de MPC no derivatizadas. La línea b es el perfil de liberación de óxido nítrico de nanopartículas de oro de MPC derivatizadas con etilendiamina al 14%. La línea c muestra el perfil de liberación de óxido nítrico de nanopartículas de oro de MPC derivatizadas con etilendiamina al 21%. La línea d muestra el perfil de liberación de óxido nítrico de nanopartículas de oro de MPC derivatizadas con etilendiamina al 21%. La línea e muestra el perfil de liberación de óxido nítrico de nanopartículas de oro de MPC derivatizadas con 21% de dietilentríamina. La línea f muestra el perfil de liberación de óxido nítrico de nanopartículas de oro de MPC derivatizadas con 21% de hexanodiamina.
- 30 La Figura 14 es una representación esquemática que muestra la liberación de óxido nítrico de nanopartículas de oro de clúster protegido por monocapa (MPC) funcionalizadas.
- 40 La Figura 15 es una representación esquemática de la estructura química del dendrímero de polipropilenoimina-hexadecaamina (DAB-Am-16).
- La Figura 16 es una representación esquemática de la estructura química del dendrímero de polipropilenoimino-tetrahexacontaamina (DAB-Am-64).
- La Figura 17 es una gráfica que muestra el perfil de liberación de óxido nítrico para DAB-C7-16 NaOMe/MeOH.
- La Figura 18 es una gráfica que muestra el perfil de liberación de óxido nítrico para DAB-C7-64 NaOMe/MeOH.
- 45 La Figura 19 es una ruta de síntesis para partículas de sílice liberadoras de NO de acuerdo con el método descrito por Zhang, H., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 5015 (2003).
- La Figura 20A es una imagen del microscopio de fuerza atómica (AFM) en modo contacto de sílice de control (solo TEOS).

- La Figura 20B es una imagen de microscopio de fuerza atómica (AFM) en modo contacto de sílice con 10% en moles de AHAP3 (resto TEOS).
- La Figura 20C es una ampliación de la imagen de microscopio de fuerza atómica (AFM) de la figura 29B que muestra una sola partícula.
- 5 La Figura 20D es una imagen de microscopio de fuerza atómica (AFM) en modo contacto de 10% en moles de AEAP3.
- La Figura 20E es una imagen de microscopio de fuerza atómica (AFM) en modo contacto de partículas de sílice con 17% en moles de AEAP3 en una superficie de mica.
- 10 La Figura 20F es una gráfica que muestra la relación entre el contenido de AEAP3 en el compuesto de sílice y el tamaño de partículas resultante.
- La Figura 21A es una gráfica que muestra los espectros de NMR de polarización cruzada/giro en ángulo mágico (CP/MAS) de ²⁹Si en estado sólido de sílice co-condensada con diferentes cantidades de AEAP3: (a) 0% de AEAP3 (control), (b) 10% en moles de AEAP3 (resto TEOS), (c) 13% en moles de AEAP3 (resto TEOS); y 17% en moles de AEAP3 (resto TEOS).
- 15 La Figura 21B es un esquema que muestra las estructuras relacionadas con los entornos químicos del silicio en la superficie de compuestos de sílice modificada con AEAP3.
- La Figura 21C es una gráfica del % de cobertura de superficie de ligandos amina co-condensados en comparación con el contenido de AEAP3 cargado durante la síntesis de compuestos de sílice modificados con AEAP3.
- 20 La Figura 22 es un perfil de liberación de NO de la liberación de NO de sílice co-condensada que contiene 10% en moles de AHAP3 (línea discontinua) y 17% en moles de AEAP3 (línea continua). El recuadro muestra una gráfica de la liberación total de NO a lo largo del tiempo de los mismos dos tipos de sílice.
- La Figura 23 es una gráfica de la liberación de NO de nanopartículas de sílice co-condensada que contienen AEAP3 en función del pH a 37°C. El recuadro es una gráfica de liberación total de NO.
- 25 La Figura 24A es una representación esquemática que muestra una sección transversal de una partícula de sílice mesoporosa liberadora de NO preparada mediante una síntesis con molde usando el tensioactivo bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como molde. El área sombreada representa una red de sílice co-condensada, mientras que los pequeños círculos sombreados representan donadores de NO en la red de sílice co-condensada. El área sin sombreado representa poros en la partícula formada a partir de la eliminación del molde de CTAB después de la reacción de condensación del silano.
- 30 La Figura 24B es una imagen de microscopio de fuerza atómica (AFM) en modo contacto de una partícula de *N*-(6-aminoetil)aminopropiltrimetoxisilano (AEAP3)-sílice mesoporosa preparada usando bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) como molde.
- La Figura 25 es una gráfica que muestra el perfil de liberación de óxido nítrico de *N*-(6-aminoetil)aminopropiltrimetoxisilano (AEAP3)-sílice (3 mg de partículas en disolución tampón de fosfato (PBS) a 37°C).
- 35 La Figura 26 es una gráfica de la citotoxicidad de la sílice de control (círculos oscuros) y liberadora de NO preparada con 45% en moles de AHAP3 (círculos blancos) en células tumorales epiteliales de ovario.
- La Figura 27 es una gráfica que muestra la citotoxicidad de las nanopartículas de sílice de control (cuadrados oscuros) y co-condensadas con MAP3 liberadoras de NO (cuadrados blancos) en células normales (T29, inmortalizadas), así como la citotoxicidad del control (círculos oscuros) y nanopartículas co-condensadas con MAP3 liberadoras de NO (círculos abiertos) en células tumorales (A2780).
- 40 La Figura 28 es una gráfica de barras que muestra el efecto del tamaño de partículas de sílice (75% en moles de MAP3, resto TEOS) sobre la citotoxicidad frente a líneas celulares T29 normales (barras sombreadas) y tumorales A2780 (barras rayadas). $P < 0,001$ en comparación con el grupo de control tratado con MAP3. La sílice de control con MAP3 (indicada por los paréntesis) no es liberadora de NO y tiene un diámetro de 80 nm, la sílice s-MAP3 tiene un diámetro de 80 nm, la sílice L-MAP3 tiene un diámetro de 350 nm.
- 45 La Figura 29A es una imagen de microscopio láser de barrido de células de cáncer de ovario A2780 tomada 5 minutos después de la incubación con nanopartículas de sílice de MAP3 marcadas con FITC.
- La Figura 29B es una imagen de microscopio láser de barrido de células de cáncer de ovario A2780 tomadas 60 minutos después de la incubación con nanopartículas de sílice de MAP3 marcadas con FITC.
- 50 La Figura 29C es una imagen de microscopio láser de barrido de células de cáncer de ovario A2780 tomadas 5

minutos después de la incubación con tinción mitocondrial con tetrametilrodamina (TMRM) a 100 nm.

La Figura 29D es una imagen de microscopio láser de barrido de células de cáncer de ovario A2780 tomada 60 minutos después de la incubación con tinción mitocondrial de tetrametilrodamina (TMRM) a 100 nm.

5 La Figura 30A es una fotografía que muestra las colonias de *P. aeruginosa* que se formaron sobre placas de agar nutritivo después de la incubación con disolución estéril tamponada con fosfato (PBS) a 37°C.

La Figura 30B es una fotografía que muestra las colonias de *P. aeruginosa* que se formaron sobre placas de agar nutritivo después de la incubación con nanopartículas de sílice con AEAP3 de control (no liberadoras de NO) a 37°C.

10 La Figura 30C es una fotografía que muestra las colonias de *P. aeruginosa* que se formaron sobre placas de agar nutritivo después de la incubación con nanopartículas de sílice con 45% en moles de AEAP3 liberadoras de NO a 37°C.

La Figura 31 es una gráfica que muestra la actividad bactericida in vitro de nanopartículas de sílice liberadoras de NO (45% en moles de AEAP3, resto TEOS) contra *P. aeruginosa* en función de la concentración de nanopartículas.

15 La Figura 32 es una representación esquemática de la síntesis de una nanopartícula liberadora de NO que tiene un núcleo de magnetita cubierto por una capa de sílice co-condensada que contiene grupos amina que pueden formar donadores de NO.

La Figura 33 es una imagen de microscopio de fuerza atómica (AFM) de magnetita/N-(6-aminohexil)aminopropiltrimetoxisilano (AHAP3, 10% en moles)-partículas de sílice funcionalizadas.

20 La Figura 34 es una gráfica que muestra el perfil de liberación de NO de partículas de núcleo de magnetita/sílice (línea inferior) en comparación con el perfil de liberación de NO de partículas que tienen núcleos de la misma composición de sílice sin magnetita (línea superior). El recuadro es una gráfica de la liberación total de NO.

La Figura 35A es una micrografía óptica de contraste de fase que muestra la adhesión de *P. aeruginosa* (áreas oscuras) a una película de control (un poliuretano no liberador de NO). Ampliación = 5x.

La Figura 35B es una micrografía óptica de contraste de fase que muestra la adhesión de *P. aeruginosa* (áreas oscuras) a una película que contiene partículas liberadoras de NO. Ampliación = 5x.

25 La Figura 36 es una representación esquemática de la estructura para un electrodo de Pt de un sensor de glucosa que tiene una capa liberadora de NO formada a partir de una película polimérica que comprende nanopartículas de sílice co-condensadas liberadoras de NO.

Descripción detallada

30 La materia objeto aquí descrita ahora se describirá más detalladamente en lo sucesivo con referencia a los ejemplos adjuntos, en los que se muestran realizaciones representativas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece la materia aquí descrita.

A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, una fórmula o nombre químico dado abarcará todos los estereoisómeros e isómeros ópticos, así como las mezclas racémicas donde existan dichos isómeros y mezclas.

35 Definiciones

Siguiendo el acuerdo de hace tiempo de la ley de patentes, los términos "un" y "una" significan "uno o más" cuando se usan en esta solicitud, incluidas las reivindicaciones.

El término "anfipático", como se usa en la presente memoria, se refiere a un resto químico que tiene una región hidrófoba y una región hidrófila.

40 El término "cáncer", como se usa en la presente memoria, se refiere a enfermedades causadas por la división celular no controlada y la capacidad de las células de metastatizar, o de establecer un nuevo crecimiento en sitios adicionales. Los términos "maligno", "malignidad", "neoplasia", "tumor" y sus variaciones se refieren a células cancerosas o grupos de células cancerosas.

45 Los tipos específicos de cáncer incluyen, pero no se limitan a cánceres de piel, cánceres de tejido conjuntivo, cánceres de tejido adiposo, cánceres de mama, cánceres de pulmón, cánceres de estómago, cánceres de páncreas, cánceres de ovario, cáncer de cuello uterino, cánceres de útero, cánceres anogenitales, cánceres de riñón, cánceres de vejiga, cánceres de colon, cánceres de próstata, cánceres del sistema nervioso central (CNS), cáncer de retina, cánceres de sangre y linfoides.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "radiación electromagnética" se refiere a las ondas eléctricas

y magnéticas tales como, por ejemplo, rayos gamma, rayos X, luz ultravioleta, luz visible, luz infrarroja, microondas, radar y ondas de radio.

5 El término "hidrófobo" se refiere a un compuesto o resto químico que, en cierta medida, repele o no interactúa con el agua a través de fuerzas no covalentes, tales como enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas. Un compuesto puede ser fuertemente hidrófobo o ligeramente hidrófobo. La constante dieléctrica calculada de un compuesto o grupo se puede usar para predecir el nivel o grado de hidrofobicidad del compuesto o resto. Los compuestos o restos con constantes dieléctricas inferiores serán más hidrófobos. En particular, un "conector hidrófobo" es uno que protegerá un conector lábil o un donador de NO en una partícula liberadora de NO de la exposición al agua cuando la partícula se coloca en un entorno acuoso durante un período de tiempo. Un conector más hidrófobo protegerá a un donador de NO o un conector lábil del agua durante un período de tiempo más prolongado.

El término "hidrófilo" se refiere a un compuesto o resto que interactuará con agua en cierta medida.

15 El término "ionizable" se refiere a un grupo que es electrónicamente neutro (es decir, sin carga) en un entorno químico particular (por ejemplo, a un pH particular), pero que puede ser ionizado y, por lo tanto, se convierte en cargado de manera positiva o negativa en otro entorno químico (p. ej., a un pH mayor o menor).

El término "mesoporoso", como se usa en la presente memoria, se refiere a un objeto, tal como una partícula, que comprende poros en el intervalo de entre aproximadamente 20-500 angstroms.

20 El término "metálico" se refiere a metales, aleaciones metálicas, sales metálicas y óxidos metálicos. Por lo tanto, el término metálico se refiere a partículas que comprenden iones metálicos, tales como, pero no limitados a oro, plata, cobre, platino y titanio, así como partículas semiconductoras y partículas magnéticas (p. ej., partículas que comprenden óxidos de hierro).

25 Las expresiones "nanocristal semiconductor" y "punto cuántico" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a nanopartículas semiconductoras que comprenden un material cristalino inorgánico que es luminiscente (es decir, que es capaz de emitir radiación electromagnética tras la excitación), e incluye un núcleo interno de uno o más primeros materiales semiconductores que está opcionalmente contenido dentro de un revestimiento o "cubierta" de un segundo material semiconductor. Un núcleo de nanocristal semiconductor rodeado por una cubierta semiconductor se conoce como un nanocristal semiconductor de "núcleo/cubierta". El material de cubierta circundante puede tener opcionalmente una energía de banda prohibida que es mayor que la energía de banda prohibida del material del núcleo y se puede seleccionar para tener un espaciado atómico cercano al del sustrato del núcleo.

30 Los materiales semiconductores adecuados para el núcleo y/o la cubierta incluyen, pero no se limitan a materiales que comprenden un primer elemento seleccionado de los grupos 2 y 12 de la Tabla periódica de los elementos y un segundo elemento seleccionado del grupo 16. Dichos materiales incluyen, pero no se limitan a, ZnS, ZnSe, ZnTe, CDs, CdSe, CdTe, HgS, HgSe, HgTe, MgS, MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, BaTe, y similares. Los materiales semiconductores adecuados también incluyen materiales que comprenden un primer elemento seleccionado del grupo 13 de la Tabla periódica de los elementos y un segundo elemento seleccionado del grupo 15. Dichos materiales incluyen, pero no se limitan a GaN, GaP, GaAs, GaSb, InN, InP, InAs, InSb, y similares. Los materiales semiconductores incluyen además materiales que comprenden un elemento del grupo 14 (Ge, Si y similares); materiales tales como PbS, PbSe y similares; y aleaciones y mezclas de los mismos. Como se usa en la presente memoria, toda referencia a la Tabla periódica de los elementos y grupos de la misma es al nuevo sistema IUPAC para numerar grupos de elementos, como se establece en el Handbook of Chemistry and Physics, Edición 81 (CRC Press, 2000).

45 Por "luminiscencia" se entiende el proceso de emisión de radiación electromagnética (luz) de un objeto. La luminiscencia se produce cuando un sistema experimenta una transición de un estado excitado a un estado de menor energía con la correspondiente liberación de energía en forma de un fotón. Estos estados de energía pueden ser electrónicos, vibracionales, rotacionales o cualquier combinación de los mismos. La transición responsable de la luminiscencia se puede estimular mediante la liberación de energía almacenada en el sistema químicamente o añadida al sistema desde una fuente externa. La fuente externa de energía puede ser de una variedad de tipos, incluyendo tipo químico, térmico, eléctrico, magnético, electromagnético y físico, o cualquier otro tipo de fuente de energía capaz de hacer que un sistema sea excitado a un estado de mayor energía que el estado fundamental. Por ejemplo, un sistema se puede excitar por absorción de un fotón de luz, colocándolo en un campo eléctrico o mediante una reacción química de oxidación-reducción. La energía de los fotones emitidos durante la luminiscencia puede estar en un intervalo de radiación de microondas de baja energía a radiación de rayos X de alta energía. Típicamente, la luminiscencia se refiere a fotones en el intervalo de radiación UV a IR.

55 El término "fluorescente" se refiere a un compuesto o grupo químico que emite luz después de la exposición a radiación electromagnética.

Las expresiones "donador de óxido nítrico" o "donador de NO" se refieren a las especies que donan, liberan y/o transfieren directa o indirectamente una especie óxido nítrico, y/o estimulan la producción endógena de óxido nítrico

in vivo y/o elevan los niveles endógenos de óxido nítrico in vivo de manera que la actividad biológica de las especies óxido nítrico se exprese en el sitio de acción deseado.

5 Las expresiones "liberación de óxido nítrico" o "donación de óxido nítrico" se refieren a los métodos de donación, liberación y/o transferencia directa o indirecta de cualquiera de las tres formas redox del monóxido de nitrógeno (NO^+ , NO^- , NO). En algunos casos, la liberación o donación de óxido nítrico se realiza de manera tal que la actividad biológica de las especies de monóxido de nitrógeno se expresa en el sitio de acción deseado.

La expresión "infección microbiana", como se usa en la presente memoria, se refiere a infecciones bacterianas, fúngicas, víricas y por levaduras.

10 El término "aproximadamente", como se usa en la presente memoria, cuando se refiere a un valor o a una cantidad de masa, peso, tiempo, volumen o porcentaje, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente de $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente $\pm 1\%$, y todavía más preferiblemente $\pm 0.1\%$ de la cantidad especificada, ya que dichas variaciones son adecuadas para llevar a cabo el método descrito.

15 El "paciente" o "sujeto" tratado en las muchas realizaciones descritas en la presente memoria es convenientemente un paciente humano, aunque debe entenderse que los principios de la materia aquí descrita indican que la materia aquí descrita es eficaz con respecto a todas las especies de vertebrados, incluyendo los mamíferos, que se pretende que estén incluidos en los términos "sujeto" y "paciente". En este contexto, se entiende que un mamífero incluye cualquier especie de mamífero en el que es deseable el tratamiento, en particular especies de mamíferos domésticos y agropecuarios, tales como caballos, vacas, cerdos, perros y gatos.

20 Como se usa en la presente memoria, el término "alquilo" se refiere a cadenas hidrocarbonadas C_{1-20} inclusive, lineales (es decir, "cadena recta"), ramificadas o cíclicas, saturadas o al menos parcialmente y en algunos casos totalmente insaturadas (es decir, alqueno y alquino), que incluyen, por ejemplo, grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, octilo, etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, octenilo, butadienilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, heptinilo y alenilo. "Ramificado" se refiere a un grupo alquilo en el que un grupo alquilo inferior, tal como metilo, etilo o propilo, está unido a una cadena de alquilo lineal. Los grupos
25 alquilo ramificados de ejemplo incluyen, pero no se limitan a isopropilo, isobutilo, terc-butilo, "alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono (es decir, un alquilo C_{1-8}), por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 átomos de carbono. "Alquilo superior" se refiere a un grupo alquilo que tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 átomos de carbono, p. ej., 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de carbono. En ciertas realizaciones, "alquilo" se refiere, en particular, a alquilos de cadena lineal C_{1-8} . En otras realizaciones, "alquilo" se refiere, en particular, a alquilos de cadena ramificada C_{1-8} .

30 Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos (un "alquilo sustituido") con uno o más sustituyentes de grupos alquilo, que pueden ser iguales o diferentes. La expresión "sustituyente de grupo alquilo" incluye, pero no se limita a alquilo, alquilo sustituido, halógeno, arilamino, acilo, hidroxilo, ariloxilo, alcoxilo, alquiltio, ariltio, aralquioxilo, aralquiltio, carboxilo, alcocarbonilo, oxo y cicloalquilo. Se pueden insertar opcionalmente a lo largo de la cadena de alquilo uno o más átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno sustituido o no sustituido, en donde el sustituyente del nitrógeno es hidrógeno, alquilo inferior (también denominado en la presente memoria "alquilaminoalquilo"), o arilo.

35 Por lo tanto, como se usa en la presente memoria, la expresión "alquilo sustituido" incluye grupos alquilo, como se definen en la presente memoria, en donde uno o más átomos o grupos funcionales del grupo alquilo se reemplazan por otro átomo o grupo funcional, incluyendo, por ejemplo, alquilo, alquilo sustituido, halógeno, arilo, arilo sustituido, alcoxilo, hidroxilo, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato y mercapto.

40 El término "arilo" se usa en la presente memoria para referirse a un sustituyente aromático que puede ser un solo anillo aromático, o múltiples anillos aromáticos que están condensados entre sí, unidos covalentemente, o unidos a un grupo común, tal como, por ejemplo, un resto metileno o etileno. El grupo de unión común también puede ser un carbonilo, como en benzofenona, u oxígeno, como en éter de difenilo, o nitrógeno, como en difenilamina. El término
45 "arilo" abarca específicamente compuestos aromáticos heterocíclicos. El(los) anillo(s) aromático(s) puede(n) comprender fenilo, naftilo, bifenilo, éter de difenilo, difenilamina y benzofenona, entre otros. En realizaciones particulares, el término "arilo" significa un grupo aromático cíclico que comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono, p. ej., 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de carbono, e incluye anillos aromáticos hidrocarbonados y heterocíclicos de 5 y 6 miembros.

50 El grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido (un "arilo sustituido") con uno o más sustituyentes de grupo arilo, que pueden ser iguales o diferentes, en donde "sustituyente del grupo arilo" incluye alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, aralquioxilo, carboxilo, acilo, halógeno, nitro, alcocarbonilo, ariloxicarbonilo, aralcoxicarbonilo, aciloxilo, acilamino, aroilamino, carbamoilo, alquilcarbamoilo, dialquilcarbamoilo, ariltio, alquiltio, alquilenilo y $-\text{NR}'\text{R}''$ en donde R' y R'' puede ser cada uno independientemente hidrógeno, alquilo,
55 alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido y aralquilo.

Por lo tanto, como se usa en el presente documento, la expresión "arilo sustituido" incluye grupos arilo, como se define en la presente memoria, en donde uno o más átomos o grupos funcionales del grupo arilo se reemplazan por otro átomo o grupo funcional, que incluye, por ejemplo, alquilo, alquilo sustituido, halógeno, arilo, arilo sustituido,

alcoxilo, hidroxilo, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato y mercapto.

Los ejemplos específicos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a ciclopentadienilo, fenilo, furano, tiofeno, pirrol, pirano, piridina, imidazol, bencimidazol, isotiazol, isoxazol, pirazol, pirazina, triazina, pirimidina, quinolina, isoquinoleína, indol, carbazol, y similares.

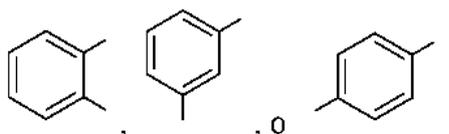
5 "Cíclico" y "cicloalquilo" se refieren a un sistema de anillo mono o multicíclico no aromático de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, p. ej., 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de carbono. El grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente parcialmente insaturado. El grupo cicloalquilo también puede estar opcionalmente sustituido con un sustituyente de grupo alquilo como se define la presente memoria, oxo y/o alquileo. Opcionalmente, se pueden insertar a lo largo de la cadena de alquilo cíclica uno o más átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno sustituido o no sustituido, en donde el sustituyente del nitrógeno es hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido, proporcionando así un grupo heterocíclico. Los anillos de cicloalquilo monocíclicos representativos incluyen ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo. Los anillos de cicloalquilo multicíclicos incluyen adamantilo, octahidronaftilo, decalina, alcanfor, canfano y noradamantilo.

15 "Alcoxilo" se refiere a un grupo alquil-O- en donde el alquilo es como se ha descrito previamente. El término "alcoxilo" como se usa en la presente memoria se puede referir, por ejemplo, a metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, butoxilo, *t*-butoxilo y pentoxilo. El término "oxialquilo" se puede usar de manera intercambiable con "alcoxilo".

"Aralquilo" se refiere a un grupo arilalquilo en donde el arilo y alquilo son como se han descrito previamente, e incluyen arilo sustituido y alquilo sustituido. Los grupos aralquilo de ejemplo incluyen bencilo, feniletilo y naftilmetilo.

20 "Alquileo" se refiere a un grupo hidrocarbonado alifático bivalente lineal o ramificado que tiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de carbono. El grupo alquileo puede ser lineal, ramificado o cíclico. El grupo alquileo también puede estar opcionalmente insaturado y/o sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo alquilo". Opcionalmente, se pueden insertar a lo largo del grupo alquileo uno o más átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno sustituido (también denominado en la presente memoria "alquilaminoalquilo"), en donde el sustituyente del nitrógeno es alquilo como se ha descrito previamente. Los grupos alquileo de ejemplo incluyen metileno (-CH₂-); etileno (-CH₂-CH₂-); propileno (-CH₂-CH₂-CH₂-); ciclohexileno (-C₆H₁₀-); -CH=CH-CH=CH-; -CH=CH-CH₂-; -(CH₂)_q-N(R)-(CH₂)_r-, en donde cada uno de q y r es independientemente un número entero de 0 a aproximadamente 20, por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20, y R es hidrógeno o alquilo inferior; metilendioxilo (-O-CH₂-O-); y etilendioxilo (-O-(CH₂)₂-O-). Un grupo alquileo puede tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 átomos de carbono y puede tener además 6-20 carbonos.

"Arileno" se refiere a un grupo arilo bivalente. Un arileno de ejemplo es el fenileno, que puede tener átomos de carbono en el anillo disponibles para unirse en las posiciones *orto*, *meta* o *para* uno con respecto al otro, es decir,



35 respectivamente. El grupo arileno también puede ser naftileno. El grupo arileno puede estar opcionalmente sustituido (un "arileno sustituido") con uno o más "sustituyentes del grupo arilo" como se define en la presente memoria, que pueden ser iguales o diferentes.

40 "Aralquileo" se refiere a un grupo bivalente que contiene tanto grupos alquilo como arilo. Por ejemplo, los grupos aralquileo pueden tener dos grupos alquilo y un grupo arilo (es decir, -alquil-aril-alquilo-), un grupo alquilo y un grupo arilo (es decir, -alquil-arilo-) o dos grupos arilo y un grupo alquilo (es decir, -aril-alquil-arilo-)

El término "amino" y "amina" se refieren a grupos que contienen nitrógeno tales como NR₃, NH₃, NHR₂ y NH₂R, en donde R puede ser alquilo, alquilo ramificado, cicloalquilo, arilo, alquileo, arileno, aralquileo. Por lo tanto, "amino", como se usa en la presente memoria, se puede referir a una amina primaria, una amina secundaria o una amina terciaria. En algunas realizaciones, un R de un grupo amino puede ser un diazeniodiolato (es decir, NONO-).

45 Las expresiones "amina catiónica" y "amina cuaternaria" se refieren a un grupo amino que tiene un grupo adicional (es decir, un cuarto), por ejemplo un hidrógeno o un grupo alquilo unido al nitrógeno. Por lo tanto, las aminas catiónicas y cuaternarias llevan una carga positiva.

El término "alquilamina" se refiere al grupo -alquil-NH₂.

El término "carbonilo" se refiere al grupo -(C=O)-.

50 El término "carboxilo" se refiere al grupo -COOH y el término "carboxilato" se refiere a un anión formado a partir de

un grupo carboxilo, es decir, $-\text{COO}^-$.

Los términos "halogeno-", "haluro" o "halógeno", como se usan en la presente memoria, se refieren a los grupos flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "hidroxilo" e "hidroxi" se refieren al grupo $-\text{OH}$.

5 El término "hidroxialquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo $-\text{OH}$.

El término "mercapto" o "tio" se refiere al grupo $-\text{SH}$.

El término "sililo" se refiere a grupos que comprenden átomos de silicio (Si).

Como se usa en la presente memoria, el término "alcoxisilano" se refiere a un compuesto que comprende uno, dos, tres o cuatro grupos alcoxi unidos a un átomo de silicio. Por ejemplo, tetraalcoxisilano se refiere a $\text{Si}(\text{OR})_4$, en donde R es alquilo. Cada grupo alquilo puede ser igual o diferente. Un "alquilsilano" se refiere a un alcoxisilano en donde uno o más de los grupos alcoxi se han reemplazado por un grupo alquilo. Por lo tanto, un alquilsilano comprende al menos un enlace alquil-Si. La expresión "silano fluorado" se refiere a un alquilsilano en donde uno de los grupos alquilo está sustituido con uno o más átomos de flúor. El término "silano catiónico o aniónico" se refiere a un alquilsilano en donde uno de los grupos alquilo está además sustituido con un sustituyente alquilo que tiene una carga positiva (es decir, catiónica) o negativa (es decir, aniónica), o se puede cargar (es decir, es ionizable) en un entorno particular (es decir, in vivo).

El término "silanol" se refiere al grupo Si-OH .

II. Partículas liberadoras de óxido nítrico

La materia aquí descrita proporciona partículas liberadoras de óxido nítrico y su uso en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas como se define en las reivindicaciones. En muchas realizaciones, las partículas aquí descritas liberan óxido nítrico de manera controlada y/o dirigida y, por lo tanto, mejoran y prolongan la acción biológica y la especificidad del óxido nítrico. En algunas realizaciones, las partículas liberadoras de óxido nítrico aquí descritas se pueden funcionalizar para proporcionar una nueva plataforma para el suministro de óxido nítrico a células y/o tejidos in vivo. Por lo tanto, las partículas liberadoras de óxido nítrico aquí descritas proporcionan un armazón único para la química del donador de óxido nítrico y la terapia de liberación de óxido nítrico.

Con referencia ahora a la figura 1, las partículas **P** aquí descritas, en algunas realizaciones, se pueden describir en términos de que comprenden un núcleo **CR**, un donador de óxido nítrico **NO**, un "interior" o "región interior" **IR** que comprende el área dentro del exterior y un "exterior" o una "región exterior" **ER**. Como se describe más detalladamente a continuación, el interior **IR** también puede contener el conector orgánico **OLK** que opcionalmente puede incluir una parte lábil o grupo **LP**.

La región exterior o exterior **ER** se puede definir como la funcionalidad química más externa de la partícula **P**. En algunas realizaciones, el exterior **ER** contiene un resto o restos que pueden controlar la cinética de liberación de óxido nítrico de la partícula **P**, alterar la biocompatibilidad de la partícula **P**, manipular la solubilidad de la partícula **P**, proporcionar el suministro dirigido de la partícula **P** a una ubicación deseada (p. ej., una célula, tejido u órgano específico) antes de la liberación de **NO**, proporcionar imágenes o seguimiento de la partícula **P**, o suministrar un agente terapéutico adicional (es decir, además del **NO**). Se puede decir que un exterior **ER** de este tipo controla una función de la partícula **P** que libera **NO**, o está "funcionalizado". En algunas realizaciones, los grupos químicos de la región exterior **ER** pueden controlar más de una de las funciones de la partícula **P** que libera **NO**, y el exterior **ER** se puede describir como "multifuncional". En algunas realizaciones, se pueden usar restos químicos u otras características estructurales por toda la partícula **P** (p. ej., en el núcleo **CR** o interior **IR**) para controlar un factor o factores relacionados con la cinética de liberación de **NO**, la solubilidad de las partículas, direccionamiento, generación de imágenes, seguimiento, capacidad terapéutica adicional o la biocompatibilidad y la partícula **P** completa se pueden describir como multifuncional.

Como se muestra en la figura 1, en algunas realizaciones, la región interior **IR** comprende un conector orgánico **LK**. Como se usa en la presente memoria, el término "conector orgánico" o "conector" se refiere a una unión orgánica que forma un puente en el espacio entre el núcleo de la partícula y el exterior de la partícula. En algunas realizaciones, como se describe más completamente a continuación, el conector orgánico **LK** puede comprender el grupo lábil **LP**. En algunas realizaciones, el conector orgánico **LK** puede ser algo o sustancialmente hidrófobo. En algunas realizaciones, el conector **LK** está ramificado. En algunas realizaciones, el conector **LK** está unido covalentemente a uno o más de los otros elementos de la partícula **P**, tales como el núcleo **CR**, exterior **ER** o donador de **NO** **NO**.

Las partículas de la materia aquí descrita pueden tener cualquier forma. Por lo tanto, las partículas pueden ser esféricas, elípticas o amorfas. El tamaño y la forma de las partículas están determinados, al menos en parte, por la naturaleza (es decir, la composición química) o el método de síntesis del núcleo. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula se puede manipular para afectar la cantidad o la velocidad de liberación de **NO**.

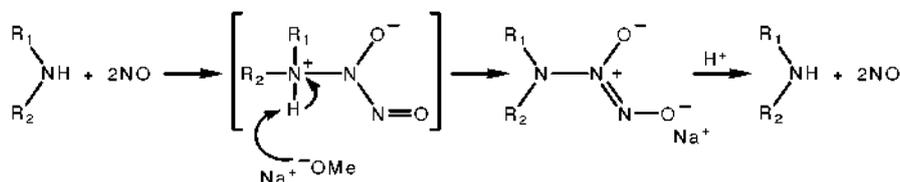
En algunas realizaciones, las partículas liberadoras de NO son nanopartículas. En algunas realizaciones, el término "nanopartícula" se refiere a una partícula que tiene un diámetro de entre aproximadamente 0.5 nm y aproximadamente 1000 nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 500 nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 200 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 50 nm.

En algunas realizaciones, las partículas son más grandes que 1000 nm. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la partícula es una micropartícula. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de hasta aproximadamente 25 micrómetros. En algunas realizaciones, la partícula puede tener un diámetro de hasta aproximadamente 100 micrómetros.

El donador de óxido nítrico puede ser parte del núcleo, el interior o el exterior de la partícula. El donador de NO se puede encapsular en uno del núcleo, el interior o el exterior. El donador de NO puede estar asociado con una región particular de la partícula a través de interacciones no covalentes tales como interacciones de Van der Waals, interacciones electrostáticas (tales como interacciones entre dipolos o entre grupos cargados), enlaces de hidrógeno o combinaciones de los mismos. Además, el donador de NO se puede unir covalentemente a uno del núcleo, el interior o el exterior. El porcentaje de composición del resto liberador de NO se puede variar mediante la unión covalente o mediante la encapsulación para impartir una carga útil efectiva de óxido nítrico para el resultado terapéutico u otro deseado.

El resto liberador de NO o el donador de NO están diseñados de tal manera que no alteren los otros descriptores de partículas mientras almacenan su cantidad de NO hasta que se produce la orientación adecuada de la partícula. La liberación de NO se puede iniciar térmicamente o por cualquiera de las estrategias de degradación para la parte lábil del conector, como se describe a continuación. Por lo tanto, el donador de NO puede ser cualquier resto capaz de liberar NO, incluyendo *N*-diazeniodiolatos nitrosaminas, hidroxil-nitrosaminas, nitrosotioles, hidroxilaminas, hidroxilureas, complejos metálicos, nitritos orgánicos y nitratos orgánicos. Véase Wang, P. G., et al., Nitric Oxide Donors: For Pharmaceutical and Biological Applications; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2005; y Wang, P. G., et al., *Chem. Rev.*, 102, 1091-1134 (2002).

En algunas realizaciones, el donador de NO es un *N*-diazeniodiolato (es decir, un 1-amino sustituido-diazeno-1,2-diolato). Los *N*-diazeniodiolatos son particularmente atractivos como donadores de NO debido a su capacidad para generar NO espontáneamente en condiciones biológicas. Véase Hrabie, J. A., y Keefer, L. K., *Chem. Rev.*, 102, 1135-1154 (2002); y Napoli, C. y Ignarro, L. J., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43, 97-123 (2003). Como se muestra en el esquema 1, a continuación, se sintetizaron varios compuestos de *N*-diazeniodiolatos usando una variedad de restos nucleófilos que abarcan aminas primarias y secundarias, poliaminas y aminoácidos secundarios. Véase Hrabie, J. A., y Keefer, L. K., *Chem. Rev.*, 102, 1135-1154 (2002). En la formación del *N*-diazeniodiolato, un equivalente de amina reacciona con dos equivalentes de óxido nítrico a presión elevada. Un base (p. ej., un alcóxido como metóxido) elimina un protón del nitrógeno de la amina para crear el grupo $[N(O)NO]^-$ aniónico, estabilizado. Aunque estables en condiciones ambientales, los *N*-diazeniodiolatos se descomponen espontáneamente en medios acuosos para generar NO a velocidades que dependen del pH, la temperatura y/o la estructura del resto amina. Por ejemplo, se ha desarrollado prolina modificada por *N*-diazeniodiolato (PROLI/NO), 2-(dimetilamino)-etilputreamina (DMAEP/NO), *N,N'*-dimetilhexanodiamina (DMHD/NO), y dietilentriamina (DETA/NO) como moléculas pequeñas donadoras de NO con diferentes semividas de liberación de NO en el intervalo de 2 segundos a 20 horas a pH 7.4 y 37°C. Véase Hrabie, J. A., y Keefer, L. K., *Chem. Rev.*, 102, 1135-1154 (2002); y Keefer, L. K., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43, 585-607 (2003).



Esquema 1. Síntesis y liberación de NO a partir de *N*-diazeniodiolatos.

Como se describe con más detalle inmediatamente a continuación, el "núcleo" de las partículas aquí descritas comprende una red de sílice co-condensada (es decir, unida por siloxano) que tiene funciones silano variables, y el núcleo puede incluir además, pero no se limita a: (a) un clúster metálico y (b) una red dendrítica.

II.A. Núcleos que comprenden clústeres metálicos

En algunas realizaciones, el núcleo de las partículas aquí descritas comprende además un clúster metálico. Los clústeres metálicos pueden comprender cualquier complejo metálico que pueda ser pasivado o "protegido" para una funcionalización adicional. Por ejemplo, los complejos metálicos protegidos se pueden formar, en algunas realizaciones, recubriéndolos con polímeros orgánicos o sílice. Los complejos metálicos también se pueden proteger

con monocapas de moléculas orgánicas en donde las moléculas orgánicas contienen una función que se coordina a o de otro modo forma un enlace covalente o no covalente con átomos metálicos en la superficie del complejo metálico.

5 Los complejos metálicos pueden ser metales, aleaciones metálicas, sales metálicas u óxidos metálicos. En algunas realizaciones, el complejo metálico comprende oro, plata, platino, óxido de hierro (es decir, FeO, Fe₂O₃ o Fe₃O₄), o partículas semiconductoras tales como CdSe, y similares. En algunas realizaciones, el óxido de hierro es magnetita (es decir, Fe₃O₄). En algunas realizaciones, el núcleo es un clúster de oro protegido por monocapa, que se puede formar por una variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen el método de Brust y el método de Schulz-Dobrick.

10 Las nanopartículas de oro de clúster protegido por monocapa (MPC) o MPC, véase Brust, M., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 801-802 (1994), han recibido mucha atención debido a su tamaño único (1 nm a 5 nm), estabilidad y diseño altamente funcional. Véase Feldheim, D. L. y Foss, C. A., eds, *Metal Nanoparticles - Synthesis Characterization, and Applications*, Marcel Dekker, Inc: New York, p. 360 (2000). Como se muestra en la Figura 2, el exterior de los MPC se puede alterar por intercambio del sitio en otros tioles que contienen los grupos funcionales deseados. Véase
15 Hostetler, MI, et al., *Langmuir*, 15, 3782-3789 (1999).

La funcionalización adicional de las partículas con moléculas receptoras para permitir interacciones específicas de anticuerpo-antígeno o ligando-receptor permite dirigirse a tejidos o células específicos. El tamaño y la estabilidad de las nanopartículas de oro de MPC liberadoras de NO proporciona una variedad de aplicaciones biomédicas y farmacéuticas que incluyen el diseño de sensores in vivo y cremas tópicas para mejorar la cicatrización de heridas
20 y/o dilatar los vasos sanguíneos debajo de la piel.

II.B. Núcleos que además comprenden dendrímeros

Los dendrímeros proporcionan un armazón único para la química del donador de óxido nítrico, por lo que el exterior dendrítico multivalente se puede funcionalizar para adaptarse a cualquiera de una serie de materiales, aplicaciones científicas o biomédicas.

25 Los dendrímeros son polímeros con estructuras densamente ramificadas que tienen un gran número de grupos reactivos. Un polímero dendrítico incluye varias capas o generaciones de unidades que se repiten que contienen todas uno o más puntos de ramificación. Los dendrímeros, incluyendo polímeros dendríticos hiperramificados, se preparan por reacciones de condensación de unidades monoméricas que tienen al menos dos grupos reactivos. Los dendrímeros en general consisten en grupos de superficie terminales, uniones de ramificaciones interiores que
30 tienen funcionalidades que se ramifican mayores o iguales a dos, y conectores divalentes que conectan covalentemente las uniones de ramificaciones vecinas.

Los dendrímeros se pueden preparar por síntesis convergente o divergente. La síntesis divergente de dendrímeros implica un procedimiento de crecimiento molecular que se produce a través de una serie consecutiva de adiciones de ramas por pasos geométricamente progresivos sobre ramas en una dirección radialmente hacia afuera para producir una disposición ordenada. Por lo tanto, se puede decir que cada macromolécula dendrítica incluye una célula central, una o más capas de células internas y una capa externa de células de superficie, en donde cada una de las células incluye una unión de una sola rama. Las células pueden ser iguales o diferentes en la estructura química y la funcionalidad que se ramifica. Las células de ramas de la superficie pueden contener grupos funcionales químicamente reactivos o pasivos. Se pueden usar grupos de superficie químicamente reactivos para la extensión adicional del crecimiento dendrítico o para la modificación de superficies moleculares dendríticas. Los grupos químicamente pasivos se pueden usar para modificar físicamente superficies dendríticas, tal como para
40 ajustar la proporción de terminales hidrófobos a hidrófilos, y/o para mejorar la solubilidad del polímero dendrítico para un disolvente particular.

La síntesis convergente de dendrímeros implica un procedimiento de crecimiento que comienza a partir de lo que se convertirá en la superficie del dendrón o dendrímero y progresa radialmente hacia un punto focal o núcleo. Los polímeros dendríticos pueden ser ideales o no ideales, es decir, imperfectos o defectuosos. Las imperfecciones normalmente son consecuencia de reacciones químicas incompletas o reacciones secundarias que compiten inevitables. En la práctica, los polímeros dendríticos reales son en general no ideales, es decir, contienen ciertas cantidades de imperfecciones estructurales.

50 Las redes dendríticas hiperramificadas se refieren a una clase de polímeros dendríticos que contienen altos niveles de ramificación irregular no ideal. Específicamente, los polímeros hiperramificados contienen un número relativamente alto de áreas de ramificación irregulares en las que no todas las unidades que se repiten contienen una unión de rama. La preparación y caracterización de dendrímeros, dendrones, polímeros aleatorios hiperramificados, polímeros controlados hiperramificados y polímeros arborescentes, es bien conocida. Los ejemplos de dendrímeros y dendrones, y los métodos para sintetizar los mismos se exponen en las patentes de EE.UU. Números 4,507,466; 4,558,120; 4,568,737; 4,587,329; 4,631,337; 4,694,064; 4,713,975; 4,737,550; 4,871,779 y 4,857,599. Se exponen ejemplos de polímeros hiperramificados y métodos de preparación de los mismos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5,418,301.

Los dendrímeros adecuados para usar como armazones del núcleo de las partículas aquí descritas incluyen dendrímero de polipropilenimina; dendrímero de poliamidoamina (PAMAM); dendrímero de poli(éter de arilo); dendrímero de polilisisina; dendrímero de poliéster; dendrímero de poliamida; poliglicerol dendrítico; y dendrímeros de triazina.

- 5 En algunas realizaciones, la materia aquí descrita proporciona una serie de conjugados de dendrímeros de polipropilenimina (PPI), que comprenden aminas secundarias exteriores. Los dendrímeros de PPI que contienen aminas secundarias se pueden sintetizar a partir de dendrímeros de PPI que tienen aminas primarias exteriores acilando las aminas primarias y reduciendo el carbonilo de los grupos amida resultantes para formar aminas secundarias. Alternativamente, las aminas primarias se pueden acilar con grupos que ya contienen una amina
10 secundaria. Por ejemplo, las aminas primarias exteriores de un dendrímero de PPI se pueden acilar con prolina.

El grupo funcional amina secundaria de los dendrímeros se convierte con altos rendimientos en un donador de óxido nítrico en presencia de una base fuerte y óxido nítrico gaseoso. Tal como se proporciona en la presente memoria, el tamaño del dendrímero y la funcionalidad de la superficie afectan tanto el porcentaje de conversión de la amina secundaria al donador de óxido nítrico como a la cinética de liberación del óxido nítrico.

- 15 II.C. Núcleos que comprenden adicionalmente redes de sílice co-condensadas

Las nanopartículas de sílice híbridas orgánicas-inorgánicas, compuestos cerámicos funcionalizados preparados a partir de dióxido de silicio, se han explorado para aplicaciones que abarcan la separación, marcaje biológico, diagnósticos y sistemas vehículo para el suministro controlado de fármacos, genes y proteínas. Véase Lai, C.-Y., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 4451-4459 (2003); Munoz, B., et al., *Chem. Mater.*, 15, 500-503 (2003); Roy, I., et al.,
20 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 279-284 (2005); Trewyn, B. G., et al., *Nano. Lett.*, 4, 2139-2143 (2004); y Yoshitake, H., *New. J. Chem.*, 29, 1107-1117 (2005). El potencial de administración de fármacos de las partículas de sílice ha recibido mucha atención debido a su versatilidad física y química y su naturaleza no tóxica. Véase Savari, A., y Hamoudi, S., *Chem. Mater.*, 13, 3151-3168 (2001); y Stein, A., et al., *Adv. Mater.*, 12, 1403-1419 (2000). Se ha descrito la síntesis de sílice híbrida orgánica-inorgánica modificada con grupos orgánicos reactivos (p. ej., aminas, carboxilatos, tioles, olefinas, haluros y epóxidos) capaces de una mayor funcionalización con moléculas
25 suministrables. Véase Savari, A., y Hamoudi, S., *Chem. Mater.*, 13, 3151-3168 (2001); y Stein, A., et al., *Adv. Mater.*, 12, 1403-1419 (2000). De hecho, se han desarrollado numerosos agentes de acoplamiento de silano con los restos funcionales mencionados anteriormente para injerto de superficie (a través de grupos de silanol libres) de fármacos y otros agentes terapéuticos. Véase Anwander, R., et al., *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 117, 135-142 (1998).

- 30 En un ejemplo, Meyerhoff y colaboradores han descrito el injerto de reactivos de sililación funcionalizados con amina en la superficie de sílice de combustión (partículas amorfas, 0.2 - 0.3 μm de diámetro). Véase Zhang, H., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 5015-5024 (2003). Las aminas unidas a la superficie después se convierten en *N*-diazenediolatos donadores de NO. La sílice liberadora de NO se usó como carga para la preparación de recubrimientos de polímeros de caucho de silicona con hemocompatibilidad mejorada.

- 35 La utilidad de dichos armazones como sistemas terapéuticos de suministro de NO permanece dificultada por múltiples razones. Dado que la modificación está restringida a la superficie exterior de las partículas, la capacidad de almacenamiento de NO está inherentemente limitada, el control sobre la cinética de liberación de NO es problemático y los restos donadores de NO son más susceptibles a la contaminación de especies reactivas (p. ej., radicales, peróxidos y metales de transición) en fluidos biológicos. Véase Keefer, L. K., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43, 585-607 (2003); Napoli, C., y Ignarro, L. J., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43, 97-123 (2003); y Zhou, Z., y Meyerhoff, M. E., *Biomacromolecules*, 6, 780-789 (2005).

Las partículas de la materia aquí descrita pueden comprender redes de sílice co-condensada que proporcionan sistemas de suministro de NO de mayor capacidad de almacenamiento de NO y una capacidad mejorada para controlar la cinética de liberación de NO. En algunas realizaciones, las partículas basadas en sílice liberadoras de
45 NO aquí descritas se preparan a través de una estrategia sintética "en un solo matraz". Véase Stein, A., et al., *Adv. Mater.* 12, 1403-1419 (2000); Hatton, B., et al., *Acc. Chem. Res.*, 38, 305-312 (2005); Lin, H.-P., y Mou, C.-Y., *Acc. Chem. Res.*, 35, 927-935 (2002). Por lo tanto, como se muestra en la figura 3, las partículas de sílice híbridas inorgánicas-orgánicas se preparan por un proceso sol-gel que implica la co-condensación de ortosilicato de tetraetilo (TEOS) u otro alcoxisilano con di- o tri-aminoalcoxisilanos. El proceso "sol-gel" implica dos tipos de reacciones químicas: una reacción de hidrólisis en la que un grupo alcoxi de un alcoxisilano se hidroliza a un silanol (es decir, un grupo hidroxilo unido al átomo de Si), seguido de una reacción de condensación en donde dos silanoles o un silanol y un alcoxisilano reaccionan para formar un enlace siloxano (es decir, Si-O-Si).

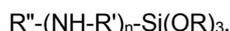
- La ventaja de un planteamiento de "un solo matraz" es que los precursores del donador de NO *N*-diazenediolato (es decir, los grupos amino del di- y tri-aminoalcoxisilano) se pueden distribuir uniformemente por toda la partícula en oposición a solo en la superficie como es el caso de las partículas de sílice modificadas con amina formadas a través de métodos de injerto de superficie. Véanse las figuras 4A y 4B. De hecho, la síntesis directa de "un solo matraz" proporciona una mejor estabilidad estructural y un control más directo sobre la cantidad de organoalcoxisilanos incorporados en la estructura de sílice. Véase Stein, A., et al., *Adv. Mater.*, 12, 1403-1419 (2000); y Lim, M. H., y Stein, A., *Chem. Mater.*, 11, 3285-3295 (1999). Además, también se pueden co-condensar

silanos adicionales que contienen una variedad de otros grupos funcionales en la estructura, afectando así al tamaño, la solubilidad o la porosidad de las partículas.

5 El núcleo de las nanopartículas comprende una red de silano co-condensada formada a partir de la co-condensación de un alcoxisilano y un aminoalcoxisilano. En algunas realizaciones, el aminoalcoxisilano se funcionaliza más después de la co-condensación por tratamiento con óxido nítrico, de modo que las aminas se transforman en *N*-diazenodiolato. Véase la figura 5A. En algunas realizaciones, el aminoalcoxisilano se "pretrata" o "precarga" con óxido nítrico antes de la co-condensación con el alcoxisilano. Véase la figura 5B. El método de "precarga" se puede usar para crear una partícula de sílice co-condensada más densamente funcionalizada con donadores de NO.

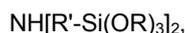
10 En algunas realizaciones, el alcoxisilano es un tetraalcoxisilano que tiene la fórmula $\text{Si}(\text{OR})_4$, en donde R es un grupo alquilo. Los grupos R pueden ser iguales o diferentes. En algunas realizaciones, el tetraalcoxisilano se selecciona de ortosilicato de tetrametilo (TMOS) u ortosilicato de tetraetilo (TEOS).

En algunas realizaciones, el aminoalcoxisilano tiene la fórmula:



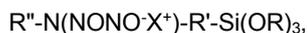
15 en donde R es alquilo, R' es alquileo, alquileo ramificado o aralquileo, n es 1 o 2, y R'' se selecciona del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, arilo y alquilamina. En algunas realizaciones, el aminoalcoxisilano se puede seleccionar de *N*-(6-aminoxihexil)aminopropiltrimetoxisilano (AHAP3); *N*-(6-aminoetil)aminopropiltrimetoxisilano; (3-trimetoxisililpropil)diethylentriamina (DET3); (aminoetilaminometil)feniltrimetoxisilano (AEMP3); [3-(metilamino)propil]trimetoxisilano; *N*-butilamino-propiltrimetoxisilano; *N*-etilaminoisobutiltrimetoxisilano; *N*-fenilamino-propiltrimetoxisilano; y *N*-ciclohexilaminopropiltrimetoxisilano. Las estructuras de aminoalcoxisilanos adecuados representativos se muestran en la figura 6.

En algunas realizaciones, el aminoalcoxisilano tiene la fórmula:



en donde R es alquilo y R' es alquileo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el aminoalcoxisilano se puede seleccionar de bis-[3-(trimetoxisilil)propil]amina y bis-[3-(trimetoxisilil)propil]etilendiamina.

25 En algunas realizaciones, como se ha descrito en lo que antecede, el aminoalcoxisilano se precarga para la liberación de NO y el grupo amino está sustituido con un diazenodiolato. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el aminoalcoxisilano tiene la fórmula:



30 en donde R es alquilo, R' es alquileo o aralquileo, R'' es alquilo o alquilamina, y X⁺ es un catión seleccionado del grupo que consiste en Na⁺, K⁺ y Li⁺.

La composición de la red de sílice (p. ej., la cantidad o la composición química del aminoalcoxisilano) y las condiciones de carga de óxido nítrico (p. ej., el disolvente y la base) se pueden variar para optimizar la cantidad y la duración de la liberación de óxido nítrico. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la composición de las partículas de sílice aquí descritas se puede modificar para regular la semivida de la liberación de NO de las partículas de sílice.

35 En algunas realizaciones, la hidrofobicidad de las partículas de sílice liberadoras de óxido nítrico se puede controlar mediante la co-condensación de precursores de silano que tienen una variedad de grupos funcionales en la red de sílice co-condensada. En algunas realizaciones, los otros precursores de silano se seleccionan del grupo que incluye, pero no se limita a alquilsilanos, silanos cargados positivamente, silanos cargados negativamente y silanos fluorados. En algunas realizaciones, los otros precursores de silano se pueden seleccionar de (heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahidrodecil)trietoxisilano; (3,3,3-trifluoro-propil)trimetoxisilano; (perfluoroalquil)etiltrimetoxisilano; cloruro de *N,N*-didecil-*N*-metil-*N*-(3-trimetoxisilil)amonio; cloruro de octadecildimetil-(3-trimetoxisililpropil)amonio; fosfonato de 3-trihidroxisililpropilmetilo, sal sódica; carboxiletíl-silanotriol, sal sódica; metiltrimetoxisilano; butiltrimetoxisilano; butiltrimetoxisilano; propiltrimetoxisilano; y octadeciltrimetoxisilano.

45 En algunas realizaciones, la red de sílice co-condensada comprende (es decir, se forma a partir de la condensación de una disolución que contiene) entre aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 99% en moles de tetraalcoxisilano; de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 90% en moles de aminoalcoxisilano; de aproximadamente 0% en moles a aproximadamente 20% en moles de silano fluorado; de aproximadamente 0% en moles a aproximadamente 20% en moles de silano catiónico o aniónico; y de aproximadamente 0% en moles a aproximadamente 20% en moles de alquilsilano.

50 En algunas realizaciones, la porosidad y la capacidad de liberación de NO de la red de sílice se pueden controlar por co-condensación de silanos en presencia de un componente molde. Dichos componentes molde pueden incluir tensioactivos y micelas. Después de la condensación de la red de sílice, se puede eliminar el componente molde, dejando poros en la sílice. La incorporación de poros en una partícula de sílice liberadora de NO puede aumentar la superficie específica disponible para la carga del donador de NO o puede servir para aumentar la velocidad de

liberación de NO al aumentar la accesibilidad del agua a los donadores de NO.

Por ejemplo, la figura 7 muestra la representación esquemática de la síntesis de una red de sílice mesoporosa usando micelas como moldes de poros. Como se muestra en la figura 7, las micelas se pueden autoasociar en un entorno de disolvente controlado para formar una estructura tridimensional ordenada, tal como una varilla micelar, o una matriz de múltiples varillas incluso más altamente estructurada. Las disoluciones que contienen mezclas de silanos se pueden introducir en la disolución de micelas y condensar, rodeando, pero sin penetrar, las varillas de micelas. Después de la condensación de la mezcla de silanos, las micelas se pueden eliminar de la sílice condensada mediante extracción con disolvente, dejando atrás los poros en la sílice.

En algunas realizaciones, la materia aquí descrita proporciona sílices funcionalizadas, sílices que se pueden elaborar más mediante una variedad de reacciones de acoplamiento químico conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, la sílice funcionalizada es una sílice modificada con amino. En algunas realizaciones, la sílice funcionalizada es una sílice modificada con epoxi.

En algunas realizaciones, la química de sílice aquí descrita se combina con la química de hidroxilamina. En algunas realizaciones, la química de sílice aquí descrita se combina con la química de la hidroxiurea.

III. Liberación activada de óxido nítrico de partículas liberadoras de óxido nítrico

Las técnicas de suministro controlado y/o dirigido típicamente mejoran la eficacia y/o seguridad de un agente activo al controlar la velocidad y/o el sitio de liberación del agente activo. En algunas realizaciones, la liberación de óxido nítrico a partir de las partículas liberadoras de óxido nítrico aquí descritas se puede iniciar o detener selectivamente (es decir, activar), según se desee.

En algunas realizaciones, el conector orgánico comprende una parte "lábil". En dichas realizaciones, la degradación activada del conector puede afectar el mecanismo, cantidad, velocidad y duración de la liberación de NO. Con referencia a las figuras 1 y 8, la parte lábil **LP** del conector **LK** se puede poner en posiciones variables **A**, **B** o **C**, en relación con el exterior **ER**, de modo que la posición del conector **LK** afecte además al mecanismo, cantidad, velocidad y duración de la liberación de NO. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la posición **A** de la figura 8 puede ser adyacente al donador de NO **NO** en interior **IR** de la partícula liberadora de NO **P** de la figura 1; la posición **B** puede estar situada centralmente entre el donador de NO **NO** y el exterior **ER**; y la posición **C** se puede situar muy cerca del exterior **ER**. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un grupo lábil **LP** en la posición **C** se puede degradar más rápidamente por las condiciones del entorno a las que está sometida la partícula **P**, a su vez exponiendo al donador de NO **NO** situado en interior **IR** de la partícula **P** a las mismas condiciones del entorno más pronto. Los grupos lábiles **LP** situados más profundamente en el interior de la partícula **IR** en las posiciones **A** o **B** pueden, en algunas realizaciones, proporcionar cinéticas de liberación prolongada o retardada.

En algunas realizaciones, la parte "lábil" del conector se puede degradar por exposición a un estímulo, p. ej., por un mecanismo de activación. En algunas realizaciones, el estímulo o mecanismo de activación se selecciona del grupo que incluye, pero no se limita a pH, luz y acción enzimática.

En realizaciones en las que la descomposición de la parte lábil del conector se activa por el pH, el conector comprende funciones, tales como ésteres, hidrazonas, acetales y/u otros grupos funcionales orgánicos, que responden a cambios en el pH. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el conector se descompone en un intervalo de pH predeterminado. Más en particular, en algunas realizaciones, los conectores están diseñados para usar el pH de mayor acidez dentro de un endosoma, siendo resultado la estructura celular de la internalización de una macromolécula por endocitosis.

En algunas realizaciones, la descomposición del conector se activa por exposición a la luz. En dichas realizaciones, la parte "lábil" se somete a fotoescisión, de manera que se construye un resto fotolábil en el conector variable que da como resultado la degradación de la estructura del conector tras la exposición a la luz.

En algunas realizaciones, se incorpora un sustrato enzimático en el conector para impartir especificidad del sistema a un entorno enzimático de interés deseado, seguido por la degradación del conector a través de la ruta enzimática de interés.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, la capacidad del conector se puede usar como una estrategia para controlar el mecanismo, cantidad, velocidad y duración de la liberación de NO del resto liberador de NO. Los conectores lábiles incluyen ésteres, hidrozonas, acetales, tiopropionatos, restos fotolábiles y secuencias de aminoácidos sometidas a degradación enzimática.

En algunas realizaciones, el conector orgánico es un conector hidrófobo. Un conector hidrófobo se puede seleccionar como un planteamiento para proteger al donador de NO, por ejemplo el diazeniodiolato, y/o el conector lábil del contacto con agua o protones cuando la partícula se pone en un ambiente acuoso. La longitud y la composición química exacta de un conector hidrófobo se pueden usar, por lo tanto, para controlar la cinética de liberación de NO. El término hidrófobo puede incluir grupos que son fuertemente hidrófobos (es decir, tienen una constante dieléctrica muy baja) o son solo algo hidrófobos (es decir, permitirían que el agua penetre lentamente en

el interior de la partícula).

Alternativamente, el conector orgánico puede ser anfífilo, que contiene grupos hidrófobos e hidrófilos. Dicho conector podría proporcionar canales en el interior de la partícula, mejorando así el acceso del disolvente a un conector lábil o un donador de NO.

- 5 La liberación de NO también se puede controlar por encapsulación del donador de NO en un sistema portador, tal como una nanopartícula o micropartícula, una célula, una célula fantasma, una lipoproteína, un liposoma, una micela, una microburbuja, una microesfera o una partícula hecha al menos parcialmente de polímeros naturales o sintéticos insolubles o biodegradables. En dicho sistema, el NO se puede liberar gradualmente a medida que el vehículo se degrada en el cuerpo. La velocidad de degradación típicamente varía respondiendo a las condiciones en el sujeto, tales como la temperatura, nivel de pH y actividad enzimática. Por lo tanto, mediante el uso de dichas técnicas de administración, se puede mantener una liberación sostenida del agente terapéutico durante largos períodos de tiempo.

IV. Funcionalización adicional de las partículas liberadoras de óxido nítrico

- 15 Como se proporciona en la presente memoria, el exterior, interior y/o núcleo de las partículas aquí descritas se pueden funcionalizar para impartir biocompatibilidad, alterar el comportamiento farmacocinético, transmitir funcionalidad de direccionamiento, añadir componentes terapéuticos adicionales e impartir capacidad de generación de imagen, relevante para el suministro y el estudio del NO como agente terapéutico. En algunas realizaciones, el exterior de la partícula se puede funcionalizar con uno o más restos químicos o biomoleculares.

- 20 El exterior puede ser de composición química uniforme o variable. En algunas realizaciones, la funcionalización del exterior de la partícula puede comprender la adición de una capa o recubrimiento que rodea el interior de la partícula. En algunas realizaciones, la funcionalización puede implicar la adición de uno o más grupos colgantes en puntos individuales en la periferia de la partícula. Por lo tanto, el exterior puede comprender uno o más antígenos colgantes para el direccionamiento de partículas como se describe más detalladamente a continuación. El exterior también puede comprender restos químicos individuales que afectan a la solubilidad, tales como grupos hidroxilo, tioles, cadenas alquílicas terminadas en metilo, sulfonatos, fosfatos, carboxilatos y aminas catiónicas o cuaternarias. Además, el exterior puede comprender una capa polimérica, por ejemplo un polímero hidrófilo para impartir solubilidad acuosa mejorada o un polímero biocompatible conocido. La capa polimérica puede ser un polímero biodegradable, que puede proteger al donador de NO del agua durante un período de tiempo cuando se usa in vivo o in vitro. Dicho recubrimiento de polímero puede afectar así a la cinética de liberación de NO permitiendo una liberación continua de NO a lo largo del tiempo a medida que el recubrimiento de polímero se degrada. Los polímeros adecuados para funcionalizar el exterior de las partículas aquí descritas incluyen: poli(óxido de etileno), (poli)uretanos, copolímeros de *N*-(2-hidroxipropil)metacrilamida y copolímeros de lactida/glicolida (p. ej., PLGA).

IV.A Partículas liberadoras de óxido nítrico para el suministro dirigido de óxido nítrico

- 35 En algunas realizaciones, la funcionalización adicional de la partícula permite dirigir a células, tejidos u órganos específicos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las partículas liberadoras de óxido nítrico aquí descritas se pueden modificar adicionalmente uniendo agentes de reconocimiento selectivo a la superficie o al exterior de las mismas. Dichos agentes de reconocimiento selectivo incluyen, pero no se limitan a ligandos moléculas pequeñas; biomoléculas, tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpos; y otros agentes tales como citoquinas, hormonas, carbohidratos, azúcares, vitaminas y péptidos.

- 40 No se requiere en todos los casos un resto director específico. En algunas realizaciones, el direccionamiento específico al sitio también puede incluir un planteamiento más pasivo, como el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) asociado con la vasculatura del tumor. El direccionamiento específico al sitio también se puede lograr mediante el uso de partículas liberadoras de NO que contienen conectores que activan la liberación del óxido nítrico solo tras el contacto con enzimas específicas de un estado de enfermedad o de un órgano o tejido en particular. Finalmente, el direccionamiento se puede lograr mediante el suministro localizado de las partículas, por ejemplo, vía tópica directamente en una herida, o mediante inyección directamente a un sitio del tumor.

- En general, cuando una partícula se dirige a células a través de un resto de la superficie celular, ésta se introduce en la célula por endocitosis mediada por receptor. Cualquier resto que se sepa que está localizado en la superficie de células diana (p. ej., células tumorales) tiene uso con las partículas aquí descritas. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo dirigido contra dicho resto de la superficie celular. Alternativamente, el resto que dirige puede ser un ligando dirigido a un receptor presente en la superficie celular o viceversa.

- 55 En realizaciones de partículas que usan un resto director específico (es decir, un resto asociado a la partícula diseñado para dirigir la partícula a una célula, tejido u órgano específico), el resto director está asociado opcionalmente con el exterior de la partícula. El resto director se puede conjugar directamente en el exterior a través de cualquier grupo reactivo útil en el exterior, tal como, por ejemplo, una amina, un alcohol, un carboxilato, un isocianato, un fosfato, un tiol, un haluro o un epóxido. Por ejemplo, un resto director que contiene o se derivatiza para contener una amina que no es necesaria para el reconocimiento del resto con la célula objetivo se puede acoplar directamente a un carboxilato presente en el exterior de la partícula usando la química de la carbodiimida. El

resto director también se puede unir a un grupo reactivo en el exterior de la partícula a través de un conector bifuncional corto, tal como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP, disponible en el mercado en Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, Estados Unidos de América). Alternativamente, se puede usar un conector bifuncional más largo, tal como un conector bifuncional basado en polietilenglicol (PEG) disponible en el mercado en EMD Biosciences, Inc. (La Jolla, California, Estados Unidos de América) o Shearwater Polymers (Huntsville, Alabama, Estados Unidos de América).

Los restos directores para usar para dirigirse a células de cáncer se pueden diseñar alrededor de antígenos específicos del tumor, que incluyen, pero no se limitan a antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de la próstata, tirosinasa, ras, un antígeno sializado de lewis, erb, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, MN, gp100, gp75, p97, proteinasa 3, una mucina, CD81, CID9, CD63, CD53, CD38, CO-029, CA125, GD2, GM2 y O-acetil GD3, M-TAA, M-fetal o M-urinario, son útiles con la materia aquí descrita. Alternativamente, el resto director se puede diseñar alrededor de un supresor tumoral, una citoquina, una quimioquina, un ligando de receptor específico de tumor, un receptor, un inductor de apoptosis o un agente de diferenciación. Además, dada la importancia del proceso de angiogénesis para el crecimiento de tumores, en algunas realizaciones, el resto director se puede desarrollar para dirigirse a un factor asociado con la angiogénesis. Por lo tanto, el resto director se puede diseñar para interactuar con factores de angiogénesis conocidos, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Véase Brannon-Peppas, L. y Blanchette, J. O., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1649-1659 (2004).

Las proteínas supresoras de tumores proporcionadas para dirigir incluyen, pero no se limitan a p16, p21, p27, p53, p73, Rb, tumor de Wilms (WT-1), DCC, neurofibromatosis tipo 1 (NF-1), supresor tumoral de la enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL), Maspin, Brush-1, BRCA-1, BRCA-2, el supresor de tumores múltiples (MTS), antígeno gp95/p97 del melanoma humano, antígeno G250 asociado con carcinoma de células renales, antígeno de pancarcinoma KS 1/4, antígeno de carcinoma de ovario (CA125), antígeno prostático específico, antígeno de melanoma gp75, CD9, CD63, CD53, CD37, R2, CD81, CO029, TI-1, L6 y SAS. Por supuesto, estos son simplemente supresores tumorales simplemente a modo de ejemplo y se prevé que en la materia aquí descrita se pueda usar junto con cualquier otro agente que sea o se convierta en conocido por los expertos en la técnica como supresores tumorales.

En algunas realizaciones, el direccionamiento se dirige a factores expresados por un oncogén. Estos incluyen, pero no se limitan a tirosina quinasas, tanto asociadas a membrana como formas citoplásmicas, tales como miembros de la familia Src, serina/treonina quinasas, tales como Mos, factor de crecimiento y receptores, tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDDG), GTPasas pequeñas (proteínas G) que incluyen la familia ras, proteínas quinasas dependientes de ciclina (cdk), miembros de la familia myc que incluyen c-myc, N-myc y L-myc y bcl-2 y miembros de la familia.

Las citoquinas a las que se pueden dirigir las partículas aquí descritas incluyen, pero no se limitan a IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, ILA 1, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, TNF, GM-CSF, interferón β e interferón γ . Las quimioquinas que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a M1P1 α , M1P1 β y RANTES.

Las enzimas a las que se pueden dirigir incluyen, pero no se limitan a citosina desaminasa, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, fenilalanina hidroxilasa, glucocerbrosidasa, esfingomielinasa, α -L-iduronidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, HSV timidina quinasa y timidina quinasa humana.

Los receptores y sus ligandos relacionados que tienen utilidad en el contexto de la materia aquí descrita incluyen, pero no se limitan al receptor de folato, receptor adrenérgico, receptor de la hormona del crecimiento, receptor de la hormona luteinizante, receptor de estrógeno, receptor del factor de crecimiento epidérmico, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, y similares. En algunas realizaciones, el resto director se selecciona del grupo que consiste en ácido fólico, guanidina, transferrina, carbohidratos y azúcares. En algunas realizaciones, el resto director es un péptido seleccionado del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos RGD y péptidos TAT.

Por ejemplo, el ácido fólico puede ser un resto director particularmente útil para dirigirse a células de cáncer. Las células tumorales cancerosas tienen una sobreexpresión de receptores de folato en su superficie celular. El ácido fólico (FA) se puede unir covalentemente al exterior de la nanopartícula, con un porcentaje de modificación variable, para impartir el suministro dirigido de FA de las nanopartículas liberadoras de NO. Debido a su pequeño tamaño, se pueden unir muchos ligandos de ácido fólico a la superficie de una partícula. Wiener ha descrito que los dendrímeros con ácido fólico unido se acumulan específicamente en la superficie y dentro de las células tumorales que expresan el receptor de folato de alta afinidad (hFR), mientras que las células de control que carecen de hFR no mostraban una acumulación significativa de dendrímeros derivatizados con folato. Véase Wiener, E.C. et al., *Invest. Radiol.*, 32 (12), 748-754 (1997). El ácido fólico se puede unir a aminos en el exterior de una partícula por una reacción de acoplamiento de carbodiimida.

Un resto director más grande, pero todavía relativamente pequeño, es el factor de crecimiento epidérmico (EGF), un péptido de una sola cadena con 53 restos de aminoácidos. Se ha demostrado que los dendrímeros de PAMAM conjugados con el EGF con el conector SPDP se unen a la superficie celular de las células de glioma humano y son endocitados, acumulándose en los lisosomas. Véase Capala, J., et al., *Bioconjugate Chem.*, 7 (1), 7-15 (1996). Dado

que la densidad del receptor de EGF es hasta 100 veces mayor en células de tumores cerebrales en comparación con células normales, el EGF proporciona un agente director útil para este tipo de tumores. Dado que el receptor de EGF también se sobreexpresa en el cáncer de mama y de colon, también se puede usar el EGF como agente director para estas células. De manera similar, los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) también se unen a los polipéptidos relativamente pequeños (FGF), y se sabe que muchos se expresan en niveles altos en líneas celulares de tumores de mama (particularmente FGF1, 2 y 4). Véase Penault-Llorca, F., et al., *Int. J. Cancer*, 61 (2), 170-176 (1995).

Las hormonas y sus receptores incluyen, pero no se limitan a hormona del crecimiento, prolactina, lactógeno placentario, hormona luteinizante, hormona foliculoestimulante, gonadotropina coriónica, hormona estimulante del tiroides, leptina, adrenocorticotropina (ACTH), angiotensina I, angiotensina II, β -endorfina, hormona estimulante de melanocitos β (β -MSH), colecistoquinina, endotelina I, galanina, péptido inhibidor gástrico (GIP), glucagón, insulina, amilina, lipotropinas, neurofisinas GLP-1 (7-37) y somatostatina.

La materia aquí descrita contempla que las vitaminas (tanto las vitaminas liposolubles como las no liposolubles) colocadas en el componente director del nanodispositivo se pueden usar para dirigirse a células que tienen receptores para, o que captan de otra forma, estas vitaminas. Particularmente preferidas para este aspecto son las vitaminas liposolubles, tales como la vitamina D y sus análogos, vitamina E, vitamina A y similares, o vitaminas solubles en agua tales como la vitamina C, y similares.

Se pueden generar anticuerpos para permitir dirigirse a antígenos o inmunógenos (p. ej., antígenos específicos de tumores, tejidos o patógenos) en varias dianas biológicas (p. ej., patógenos, células tumorales, tejido normal). En algunas realizaciones de la materia aquí descrita, el resto director es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo (p. ej., unidades Fab). Por lo tanto, los "anticuerpos" incluyen, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena única, fragmentos Fab y una biblioteca de expresión de Fab.

Un ejemplo de un antígeno bien estudiado encontrado en la superficie de muchos cánceres (incluyendo los tumores HER2 de mama) es la glicoproteína p185, que se expresa exclusivamente en células malignas. Véase Press, M.F., et al., *Oncogene* 5(7), 953-962 (1990). Los anticuerpos monoclonales anti-HER2 humanizados recombinantes (rhuMabHER2) están disponibles en el mercado con el nombre HERCEPTIN® de Genentech (South San Francisco, California, Estados Unidos de América). Otros anticuerpos representativos adecuados para su uso con la materia aquí descrita incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos tipo IgG, 60bca y J591, que se unen a CD14 y al antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), véase Baker, J.R., Jr., *Biomacromolecules*, 5, 2269-2274 (2004), que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad, y los anticuerpos F5 y C1, que se unen al factor de crecimiento ErbB2 de la línea celular de tumor de mama SK-BR-3.

Como se ha descrito en lo que antecede, la capacidad de una partícula para proporcionar suministro dirigido de NO no se limita a las realizaciones que implican agentes directores colgantes unidos al exterior de la partícula. También se pueden usar características de la partícula no asociadas al exterior para el direccionamiento. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se usa el efecto de permeabilidad y retención aumentado (EPR) en el direccionamiento. El efecto de EPR es la concentración selectiva de macromoléculas y partículas pequeñas en el microentorno del tumor, causada por la vasculatura hiperpermeable y el drenaje linfático deficiente de los tumores. Para mejorar la EPR, en algunas realizaciones, el exterior de la partícula se puede recubrir o conjugar con un polímero hidrofílico para mejorar la semivida en circulación de la partícula y desfavorecer la unión de las proteínas plasmáticas a la partícula.

En algunas realizaciones, el resto director puede ser un resto magnético, tal como magnetita. En algunas realizaciones, el núcleo de la partícula comprende magnetita. En algunas realizaciones, el núcleo de magnetita está recubierto además con una cubierta que contiene una red de sílice co-condensada que contiene o se puede funcionalizar para contener un donador de NO. Una vez administradas a un sujeto, las partículas magnéticas se pueden dirigir a su objetivo, es decir, el sitio de liberación de NO deseado, mediante la aplicación de un imán. Dicho imán se puede aplicar externamente (es decir, fuera del paciente o del sujeto).

Para ver estrategias de ejemplo adicionales para el suministro dirigida de fármacos, en particular, sistemas dirigidos para la terapia del cáncer, véase Brannon-Peppas, L. y Blanchette, J.O., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1649-1659 (2004) y patente de EE.UU. Nº 6,471,968, cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

IV.B. Generación de imágenes de partículas liberadoras de óxido nítrico

En algunas realizaciones, la partícula liberadora de NO puede comprender un resto para ayudar en la generación de imágenes o al seguimiento de las partículas in vivo o ex vivo. El seguimiento de las partículas puede ser útil para determinar la eficacia de la liberación de óxido nítrico para dirigirse a una enfermedad o para evaluar la especificidad del direccionamiento de la partícula. Un fragmento de generación de imagen o de seguimiento puede estar asociado con cualquiera del núcleo, el interior o el exterior de la partícula. En algunas realizaciones, el resto de generación de imágenes o seguimiento está unido covalentemente a uno del núcleo, el interior o el exterior de la partícula. En algunas realizaciones, el agente o resto de seguimiento es parte del núcleo, por ejemplo, en partículas que

contienen núcleos de puntos cuánticos.

En algunas realizaciones, el seguimiento del agente de generación de imágenes es una molécula fluorescente, un colorante orgánico o un radioisótopo.

5 En algunas realizaciones, el agente de generación de imágenes puede ser un agente de contraste de generación de imágenes por resonancia magnética (MRI). Por lo tanto, en algunas realizaciones, el exterior de la partícula se funcionalizará para contener un grupo capaz de quelarse con un ion paramagnético, por ejemplo, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), el grupo quelante del agente de MRI comúnmente usado Gd (III)-ácido dietilentriaminopentaacético (Gd (III)-DTPA). Otros iones paramagnéticos que pueden ser útiles en este contexto incluyen, pero no se limitan a gadolinio, manganeso, cobre, cromo, hierro, cobalto, erbio, níquel, europio, tecnecio, 10 indio, samario, disprosio, rutenio, iterbio, itrio, e iones de holmio y combinaciones de los mismos.

IV.C. Agentes terapéuticos adicionales

15 En algunas realizaciones, se pueden usar uno o más agentes terapéuticos adicionales en combinación con el donador de NO de las partículas aquí descritas. Dichos agentes adicionales se pueden incorporar en las propias partículas o formar parte de una formulación que comprende las partículas o dosis como una formulación separada antes, después o al mismo tiempo que una formulación que incluye las partículas. Dichos agentes terapéuticos adicionales incluyen, en particular, agentes terapéuticos antineoplásicos, agentes antimicrobianos, analgésicos, antiinflamatorios, vasodilatadores y supresores inmunitarios, así como cualquier otro agente terapéutico conocido que podría mejorar el alivio de la enfermedad o afección en tratamiento.

20 En realizaciones en donde el agente o agentes terapéuticos adicionales se incorporan en las partículas liberadoras de NO, el agente terapéutico adicional se puede asociar con cualquiera del exterior, el interior o el núcleo de la partícula. Por ejemplo, los agentes adicionales se pueden encapsular en el núcleo o con conectores en la parte interior de la partícula. Los agentes adicionales también se pueden unir covalentemente al núcleo, al interior o al exterior de las partículas. Además, la unión del agente adicional puede incluir una estrategia de liberación activada, en donde los agentes adicionales se pueden unir a la partícula por un conector lábil que libera el agente tras el contacto con agua, un aumento del pH, o escisión enzimática o fotolítica, preferiblemente en el sitio de acción deseado (p. ej., una célula tumoral, etc.).

25 La selección de agentes terapéuticos adicionales para usar en combinación con una partícula liberadora de NO dependerá de varios factores que incluyen, pero no se limitan al tipo de enfermedad, la edad y el estado de salud general del sujeto, la agresividad del progreso de la enfermedad y la capacidad del sujeto para tolerar los agentes que componen la combinación.

30 Se puede usar una variedad de compuestos químicos, también descritos como agentes "antineoplásicos" o "agentes quimioterapéuticos" en combinación con o incorporados en las partículas liberadoras de NO aquí descritas usadas en el tratamiento del cáncer. Dichos compuestos quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a agentes alquilantes, intercaladores de ADN, inhibidores de la síntesis de proteínas, inhibidores de la síntesis de ADN o ARN, análogos de bases de ADN, inhibidores de la topoisomerasa, agentes antiangiogénesis e inhibidores de la telomerasa o compuestos de unión a ADN teloméricos. Por ejemplo, los agentes alquilantes adecuados incluyen sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodizepá, carboquona, meturedépá y uredepá; etileniminas y metilmelaminas, tales como altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolmelamina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, 35 clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreuro del óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida y mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina.

40 Los antibióticos utilizados en el tratamiento del cáncer incluyen dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, sulfato de bleomicina, mitomicina, plicamicina y estreptozocina. Los antimetabolitos quimioterapéuticos incluyen mercaptopurina, tioguanina, cladribina, fosfato de fludarabina, fluorouracilo (5-FU), floxuridina, citarabina, pentostatina, metotrexato y azatioprina, aciclovir, adenina β -1-D-arabinósido, ametofterina, aminopterina, 2-aminopurina, afidicolina, 8-aza-guanina, azaserina, 6-azauracilo, 2'-azido-2'-desoxinucleósidos, 5-bromodesoxicidina, citosina β -1-D-arabinósido, di-azoxinorleucina, didesoxinucleósidos, 5-fluorodesoxicidina, 5-fluorodesociuridina e hidroxiaurea.

45 Los inhibidores de la síntesis de proteínas quimioterapéuticas incluyen abrina, ácido aurintricarboxílico, cloranfenicol, colicina E3, cicloheximida, toxina diftérica, edina A, emetina, eritromicina, etionina, fluoruro, 5-fluorotriptófano, ácido fusídico, difosfato de guanilil-metileno e imidofosfato de guanililo, kanamicina, kasugamicina, kirromicina y O-metil-treonina. Los inhibidores adicionales de la síntesis de proteínas incluyen modeccina, neomicina, norvalina, pactamicina, paromomicina, puromicina, ricina, toxina shiga, showdomicina, esparsomicina, espectinomicina, 50 estreptomycin, tetraciclina, tiostreptón y trimetoprim. Los inhibidores de la síntesis de ADN, incluyendo agentes alquilantes tales como dimetilsulfato, mitomicina C, mostazas de nitrógeno y azufre, agentes intercalantes, tales como colorantes de acridina, actinomicinas, adriamicina, antracenos, benzopireno, bromuro de etidio, diyoduro de propidio-entrelazado, y agentes tales como distamicina y la netropsina, se pueden usar como parte de los

tratamientos para el cáncer aquí descritos. Los inhibidores de la topoisomerasa, tales como cumermicina, ácido nalidíxico, novobiocina y ácido oxolínico, los inhibidores de la división celular, que incluyen colcemida, colchicina, vinblastina y vincristina; y los inhibidores de la síntesis de ARN, que incluyen actinomicina D, α -amanitina y otras amatoxinas fúngicas, cordicepina (3'-desoxiadenosina), dicloro-ribofuranosilbencimidazol, rifampicina, estreptovaricina y estreptolidigina, también se pueden combinar con o incorporar en las partículas de la materia aquí descrita para proporcionar un tratamiento adecuado contra el cáncer.

Por lo tanto, los agentes quimioterapéuticos actuales que se pueden usar como parte de o en combinación con las partículas liberadoras de NO aquí descritas, incluyen, adrimicina, 5-fluorouracilo (5FU), etopósido, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina, cisplatino, peróxido de hidrógeno, carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, bisulfano, nitrosurea, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, tamoxifeno, taxol, transplatino, vinblastina y metotrexato, y similares.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "agente antimicrobiano" se refiere a cualquier agente que mata, inhibe el crecimiento o previene el crecimiento de una bacteria, hongo, levadura o virus. Los agentes antimicrobianos adecuados que se pueden incorporar en las partículas liberadoras de NO aquí descritas para ayudar en el tratamiento o la prevención de una infección microbiana incluyen, pero no se limitan a antibióticos tales como vancomicina, bleomicina, pentostatina, mitoxantrona, mitomicina, dactinomicina, plicamicina y amikacina. Otros agentes antimicrobianos incluyen agentes antibacterianos como el 2-p-sulfanililaminoetanol, 4,4'-sulfanilidianilina, ácido 4-sulfanilamidosalicílico, acediasulfona, acetosulfona, amikacina, amoxicilina, amfotericina B, ampicilina, apalcilina, apiciclina, apramicina, arbekacina, aspoxicilina, azidamfenicol, azitromicina, aztreonam, bacitracina, bambemicina(s), biapenem, brodimoprim, butirosina, capreomicina, carbenicilina, carbomicina, carumonam, cefadroxil, cefamandol, cefatrizina, cefbuperazona, cefclidina, cefdinir, cefditoren, cefepima, cefetamet, cefixima, cefmenoxima, cefiniox, cefodizima, cefonicid, cefoperazona, ceforanida, cefotaxima, cefotetan, cefotiam, ceftazidim, cefpimizol, cefpiramida, cefpiroma, cefprozil, cefroxadina, ceftazidima, cefteteram, ceftibuteno, ceftriaxona, cefuzonam, cefalexina, cefaloglicina, cefalosporina C, cefradina, cloranfenicol, clortetraciclina, ciprofloxacina, claritromicina, clinafloxacin, clindamicina, clindamicina fosfato, clomociclina, colistina, ciclacilina, dapsona, demeclociclina, diatimosulfona, dibekacina, dihidroestreptomina, diritromicina, doxiciclina, enoxacina, enviomicina, epicilina, eritromicina, flomoxef, fortimicina(s), gentamicina(s), glucosulfona solasulfona, gramicidina S, gramicidina(s), grepafloxacin, guameciclina, hetacilina, imipenem, isepamicina, josamicina, kanamicina(s), leucomicina(s), lincomicina, lomefloxacin, lucensomicina, limeciclina, meclociclina, meropenem, metaciclina, micronomicina, midecamicina(s), minociclina, moxalactam, mupirocina, nadifloxacina, natamicina, neomicina, netilmicina, norfloxacina, oleandomicina, oxitetraciclina, p-sulfanililbencilamina, panipenem, paromomicina, pazufloxacina, penicilina N, pipaciclina, ácido pipemídico, polimixina, primicina, quinacilina, ribostamicina, rifamida, rifampina, rifamicina SV, rifapentina, rifaximin, ristocetina, ritipenem, rokitamicina, rolitetraciclina, rosaramicina, roxitromicina, salazosulfadimidina, sanciclina, sisomicina, esparfloxacina, espectinomicina, espiramicina, estreptomina, succisulfona, sulfacrisoidina, ácido sulfalóxico, sulfamidocrisoidina, ácido sulfanílico, sulfoxona, teicoplanina, temafloxacina, temociclina, tetraciclina, tetroxoprim, tianfenicol, tiazolsulfona, tiostrepton, ticarcilina, tigemonam, tobramicina, tosufloxacina, trimetoprim, trospectomicina, trovafloxacina, tuberactinomicina y vancomicina. Los agentes antimicrobianos también pueden incluir antimicóticos, tales como anfotericina B, azaserina, candicidina(s), clorfenesina, dermostatina(s), filipina, fungicromina, mepartricina, nistatina, oligomicina(s), perimicina A, tubercidina, imidazoles y griesofulvina.

V. Métodos de tratamiento

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la materia aquí descrita proporciona una formulación farmacéutica que se usa en un método para el suministro de óxido nítrico a un sujeto, que en algunas realizaciones está destinada a tratar una enfermedad o afección en un sujeto que necesita tratamiento. En algunas realizaciones, la materia aquí descrita proporciona una formulación farmacéutica que se usa en un método para el suministro dirigido de óxido nítrico a un sitio específico en un sujeto. Dicho sitio puede ser células, tejidos u órganos específicos. Por lo tanto, la materia aquí descrita proporciona una formulación farmacéutica que se usa en un método para tratar el cáncer, enfermedades cardiovasculares e infecciones microbianas; para la inhibición de la agregación plaquetaria y la adhesión plaquetaria causada por la exposición de la sangre a un dispositivo médico; para el tratamiento de afecciones patológicas que resultan de la proliferación celular anormal; rechazos de trasplantes, enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias, proliferativas, hiperproliferativas, vasculares; para reducir el tejido cicatricial o para inhibir la contracción de heridas, incluyendo el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la reestenosis mediante la administración del donador de óxido nítrico opcionalmente en combinación con al menos un agente terapéutico adicional. La materia aquí descrita también proporciona una formulación farmacéutica que se usa en un método para tratar la inflamación, dolor, fiebre, trastornos gastrointestinales, trastornos respiratorios, disfunciones sexuales y enfermedades de transmisión sexual.

V.A. Sujetos

En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica que se usa en un método de la materia aquí descrita puede ser útil para el tratamiento de un sujeto, como se define en la presente memoria. El sujeto tratado en la materia aquí descrita en sus numerosas realizaciones es un sujeto humano, aunque debe entenderse que los principios de la materia aquí descrita indican que la materia aquí descrita es eficaz con respecto a todas las especies de

vertebrados, incluyendo mamíferos, que se pretende que estén incluidos en el término "sujeto". En este contexto, se entiende que un mamífero incluye cualquier especie de mamífero en el que es deseable el tratamiento, en particular especies de mamíferos domésticos y agropecuarios.

5 Por consiguiente, el término "sujeto", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier especie de invertebrado o vertebrado. Los métodos de la materia aquí descrita son particularmente útiles en el tratamiento de vertebrados de sangre caliente. Por lo tanto, la materia aquí descrita se refiere a mamíferos y aves. Más particularmente, se proporciona el tratamiento y/o diagnóstico de mamíferos, tales como seres humanos, así como aquellos mamíferos de importancia debido a que están en peligro (tal como los tigres siberianos), de importancia económica (animales criados en granjas para el consumo humano) y/o importancia social (animales mantenidos como mascotas o en zoológicos) para seres humanos, por ejemplo, carnívoros que no sean seres humanos (tales como perros y gatos), cerdos (lechones, puercos y jabalíes), rumiantes (tales como ganado, bueyes, ovejas, jirafas, venados, cabras, bisontes y camellos) y caballos. También se proporciona el tratamiento de aves, que incluye el tratamiento de los tipos de aves que están en peligro de extinción, mantenidos en zoológicos, así como aves de corral, y más en particular aves de corral domesticadas, p. ej., gallináceas, tales como pavos, pollos, patos, gansos, pintadas, y similares, ya que también son de importancia económica para los seres humanos. Por lo tanto, se proporciona el tratamiento del ganado, incluyendo, pero no limitado a cerdos domésticos (lechones y puercos), rumiantes, caballos, aves de corral y similares.

V.B. Formulaciones

20 Las composiciones terapéuticas aquí descritas, en algunas realizaciones, comprenden una composición que incluye una nanopartícula liberadora de óxido nítrico aquí descrita y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones adecuadas incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, antibióticos bactericidas y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con los fluidos corporales del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

25 En algunas realizaciones, las composiciones terapéuticas aquí descritas comprenden un agente terapéutico adicional en combinación con las nanopartículas liberadoras de óxido nítrico, en donde el agente terapéutico adicional tiene propiedades terapéuticas adicionales deseadas o mejora las propiedades terapéuticas de las nanopartículas liberadoras de óxido nítrico. El agente terapéutico adicional se puede administrar en la misma composición terapéutica o en una diferente. Por lo tanto, la expresión "en combinación" puede referirse a la administración de agentes activos en una composición única o en una o más composiciones separadas.

30 Las composiciones usadas en los métodos aquí descritos pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril exenta de pirógenos, antes de usar.

35 Las composiciones terapéuticas se pueden presentar en contenedores de dosis unitarias o de dosis múltiples, por ejemplo ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en condiciones congeladas o liofilizadas (congelado-secado) que requieren solo la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes de usar.

40 Para la administración oral, las composiciones pueden tomar la forma, por ejemplo, de comprimidos o cápsulas preparadas por una técnica convencional con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (p. ej., almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un agente terapéutico se puede formular en combinación con hidroclorotiazida y como un núcleo de pH estabilizado que tiene un recubrimiento entérico o de liberación retardada que protege al agente terapéutico hasta que llega al órgano objetivo.

45 Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma, por ejemplo, de disoluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para la constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de usar. Dichas preparaciones líquidas se pueden preparar por técnicas convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej., p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según corresponda. Las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para proporcionar la liberación controlada del compuesto activo. Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

Los compuestos también se pueden formular como una preparación para implante o inyección. Por lo tanto, por

ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (p. ej., como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles (p. ej., como una sal poco soluble). Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales (p. ej., supositorios o enemas de retención que contienen bases de supositorio convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos), cremas o lociones, o parches transdérmicos.

También se proporcionan formulaciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración como un aerosol por inhalación. Estas formulaciones comprenden una solución o suspensión de una partícula liberadora de NO descrita en la presente memoria. La formulación deseada se puede poner en una cámara pequeña y nebulizar. La nebulización se puede lograr mediante aire comprimido o energía ultrasónica para formar una pluralidad de gotitas líquidas o partículas sólidas que comprenden las partículas liberadoras de NO. Por ejemplo, las partículas liberadoras de NO aquí descritas se pueden administrar por inhalación para tratar infecciones bacterianas relacionadas con la fibrosis quística. Las infecciones bacterianas relacionadas con la fibrosis quística incluyen, pero no se limitan a infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

V.C. dosis

El término "cantidad eficaz" se usa en la presente memoria para referirse a una cantidad de la composición terapéutica (p. ej., una composición que comprende una partícula liberadora de óxido nítrico) suficiente para producir una respuesta biológica medible. Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en una composición activa de la materia aquí descrita se pueden variar para administrar una cantidad del(de los) compuesto(s) activo(s) que sea eficaz para lograr la respuesta deseada para un sujeto y/o aplicación en particular. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad de la composición, la formulación, la vía de administración, la combinación con otros fármacos o tratamientos, la gravedad de la afección que se está tratando y la condición física y el historial médico anterior del sujeto que se va a tratar. Preferiblemente, se administra una dosis mínima, y la dosis se aumenta gradualmente en ausencia de toxicidad limitante de la dosis hasta una cantidad mínimamente eficaz. Los expertos en la técnica de la medicina conocen la determinación y el ajuste de una dosis eficaz, así como la evaluación de cuándo y cómo realizar dichos ajustes.

Para la administración de una composición como se describe en la presente memoria, se pueden llevar a cabo métodos convencionales de extrapolación de dosis humanas basadas en dosis administradas a un modelo animal murino usando el factor de conversión para convertir la dosis de ratón en dosis humana: dosis humana por kg = dosis de ratón por kgX12. Véase Freireich et al., *Cancer Chemother Rep.* 50, 219-244 (1966). Las dosis de medicamentos también se pueden dar en miligramos por metro cuadrado de superficie corporal, ya que este método, en lugar del peso corporal, logra una buena correlación con ciertas funciones metabólicas y de excreción. Además, el área de la superficie corporal se puede utilizar como un denominador común para la dosificación de fármacos en adultos y niños, así como en diferentes especies animales. Véase Freireich et al., *Cancer Chemother Rep.* 50, 219-244 (1966). Brevemente, para expresar una dosis en mg/kg en cualquier especie dada como la dosis equivalente de mg/m², multiplique la dosis por el factor km adecuado. En un adulto humano, 100 mg/kg es equivalente a 100 mg/kgX37 kg/m² = 3700 mg/m².

Para obtener orientación adicional con respecto a la formulación y la dosis, consulte las patentes de EE.UU. Números 5,326,902; 5,234,933; Publicación Internacional PCT N° WO 93/25521; Berkow et al., *The Merck Manual of Medical Information*, Home ed., Merck Research Laboratories: Whitehouse Station, Nueva Jersey (1997); Goodman et al., *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª ed. McGraw-Hill Health Professions Division: Nueva York (1996); Ebadi, *CRC Desk Reference of Pharmacology Clinical*, CRC Press, Boca Raton, Florida (1998); Katzung, *Basic & Clinical Pharmacology*, 8ª ed. Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Pub. División: Nueva York (2001); Remington et al., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15ª ed. Mack Pub. Co.: Easton, Pennsylvania (1975); y Speight et al., *Avery's Drug Treatment: A Guide to the Properties, Choice, Therapeutic Use and Economic Value of Drugs in Disease Management*, 4ª ed. Adis International: Auckland/Filadelfia (1997); Duch et al., *Toxicol. Lett.*, 100-101, 255-263 (1998).

V.D. Vías de administración

Los métodos adecuados para administrar a un sujeto una composición de la materia aquí descrita incluyen, pero no se limitan a, administración sistémica, administración parenteral (incluyendo administración intravascular, intramuscular, intraarterial), suministro oral, suministro bucal, administración subcutánea, inhalación, instilación intratraqueal, implante quirúrgico, suministro transdérmico, inyección local e inyección/bombardeo de hipervelocidad. Cuando sea aplicable, la infusión continua puede mejorar la acumulación de fármaco en un sitio objetivo (véase, p. ej., la patente de EE.UU. N° 6,180,082).

El modo particular de administración del fármaco usado de acuerdo con los métodos de la materia aquí descrita depende de varios factores, que incluyen, pero no se limitan al agente y/o el vehículo usados, la gravedad de la enfermedad que se va a tratar y los mecanismos para el metabolismo o eliminación del agente activo tras la administración.

VI. Composiciones que contienen partículas liberadoras de NO

En algunas realizaciones, las partículas liberadoras de NO se pueden incorporar en películas poliméricas. Dicha incorporación puede ser mediante inserción física de las partículas en las superficies del polímero, por la asociación electrostática de las partículas sobre las superficies poliméricas, o por unión covalente de las partículas a los grupos reactivos en la superficie de un polímero. Alternativamente, las partículas se pueden mezclar en una disolución de precursor de polímero líquido, quedando atrapadas en la matriz del polímero cuando el polímero se cura. Los grupos polimerizables también se pueden usar para funcionalizar el exterior de las partículas, con lo cual, las partículas se pueden copolimerizar en un polímero durante el proceso de polimerización. Los polímeros adecuados en los que se pueden incorporar las partículas liberadoras de NO incluyen poliolefinas, tales como poliestireno, polipropileno, polietileno, politetrafluoroetileno y polivinilideno, así como poliésteres, poliéteres, poliuretanos y similares. En particular, los poliuretanos pueden incluir poliuretanos médicamente segmentados. En la figura 9A se muestra una estructura generalizada para un poliuretano segmentado médicamente. Dichos poliuretanos pueden incluir segmentos duros, es decir, restos que son relativamente rígidos, y segmentos blandos, es decir, restos que tienen más grados de libertad que pueden existir en una serie de conformaciones alternativas que se interconvierten. Los poliuretanos segmentados médicamente también pueden incluir uno o más restos expansores, tales como cadenas de alquileo, que añaden longitud o peso adicional al polímero. Dichos poliuretanos también son generalmente no tóxicos. Un ejemplo de un poliuretano segmentado médicamente es TECOFLEX®. Véase la figura 9B.

Las películas poliméricas que contienen partículas liberadoras de NO se pueden usar para recubrir una variedad de artículos, en particular herramientas quirúrgicas, sensores biológicos e implantes médicos para prevenir la adhesión de plaquetas, prevenir infecciones bacterianas y actuar como vasodilatadores. Estos artículos pueden ser útiles en dispositivos médicos vasculares, dispositivos médicos urológicos, dispositivos médicos biliares, dispositivos médicos gastrointestinales, dispositivos médicos adaptados para la colocación en sitios quirúrgicos y dispositivos médicos adaptados para la colocación en heridas o aberturas de la piel. Por lo tanto, los polímeros se pueden usar para recubrir prótesis endovasculares arteriales, alambres de guía, catéteres, agujas de trocar, anclas para huesos, tornillos para huesos, placas protectoras, reemplazos de cadera y articulaciones, cables eléctricos, biosensores, sondas, suturas, cortinas quirúrgicas, vendajes para heridas y vendas.

En algunas realizaciones, el dispositivo que se está recubriendo puede tener una superficie metálica, tal como, por ejemplo, acero inoxidable, níquel, titanio, aluminio, cobre, oro, plata, platino y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las películas o polímeros que contienen las partículas liberadoras de NO se pueden usar para recubrir superficies no metálicas, tales como de vidrio o fibra (p. ej., tela o papel)

Además, los polímeros que contienen partículas liberadoras de NO se pueden usar para formar los dispositivos, ellos mismos. Por ejemplo, los polímeros se pueden transformar en bolsas de almacenamiento para sangre o tejido o como vendajes para heridas.

Además, las partículas liberadoras de NO se pueden incorporar en detergentes, tales como, pero no limitados a jabones antimicrobianos. Por ejemplo, la liberación de NO en partículas insertadas en jabones en barra se puede desencadenar por contacto con agua y/o una caída en el pH durante el uso. A medida que la superficie exterior de la barra se desgasta o se disuelve, las partículas adicionales dentro de la superficie de la barra quedan expuestas para usos posteriores de la barra. Las partículas liberadoras de NO también se pueden suspender en jabones líquidos. Dichos jabones o detergentes se pueden usar para la higiene personal o para proporcionar tratamientos antimicrobianos para las fibras. Dichos jabones o detergentes también se pueden usar para tratar superficies domésticas o cualquier superficie en un hospital u otro entorno médico que pueda estar expuesto a microbios tales como bacterias, hongos o virus.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se han incluido para proporcionar orientación a un experto en la técnica para practicar realizaciones representativas de la materia aquí descrita.

Ejemplo 1

Síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas con aminas

Se funcionalizaron nanopartículas de oro con aminas en un procedimiento de dos etapas intercambiando en primer lugar ligandos de tiol funcionalizados con Br sobre el núcleo de la nanopartícula de oro con la posterior adición de amina mediante una reacción con Br. Véase la figura 2. Se obtuvieron los espectros de ¹H NMR de las muestras para cada etapa de la síntesis, tal como se presenta en la Figura 10.

Más particularmente, las nanopartículas de oro se sintetizaron por el método de Brust, mediante la reacción de la sal de tetracloroaurato de hidrógeno con hexanotiol en presencia de borohidruro de sodio. Véase Hostetler, M. I., et al., *Langmuir*, 14, 17-30 (1998). Después de 30 minutos, la reacción se inactivó con agua. Las nanopartículas se recogieron por filtración y se lavaron con acetonitrilo, después se funcionalizaron con alcanotioles terminados en bromo por el método de intercambio de sitio. Véase Hostetler, MI, et al., *Langmuir*, 15, 3782-3789 (1999).

Se añadió el ligando terminado en bromo entrante (11-bromo-1-undecanotiol como se sintetiza en el ejemplo 2, descrito en la presente memoria a continuación), véase Troughton, B.B., et al., *Langmuir*, 4, 365-385 (1988), (relación de alcanotiol terminado en bromo a metilo 3:1) a una disolución de nanopartículas de oro en cloruro de metileno y se agitó durante 30 min. El disolvente se eliminó por evaporación rotatoria y las nanopartículas de oro se purificaron con acetonitrilo. La extensión del intercambio de ligandos, seguida por NMR, se controló variando el tiempo de reacción y/o la concentración de bromo-alcanotiol. Las nanopartículas de oro bromofuncionalizadas después se disolvieron en tolueno o cloruro de metileno y se hicieron reaccionar con etilendiamina, butilamina, hexanodiamina o dietilentriamina. La desaparición del pico de $-CH_2Br$ en los espectros de NMR de las nanopartículas funcionalizadas indicaba la finalización de la reacción (véase la figura 10). Las nanopartículas de oro funcionalizadas con amina después se suspendieron en una disolución de metanol y una base de metóxido de sodio y se presurizaron a 5 atm de NO durante 3 días con agitación constante para facilitar la síntesis de donadores de NO diazeniodiolato. Los clústeres protegidos por monocapa modificados con N-diazeniodiolato (MPC) se filtraron, se lavaron con exceso de metanol y se almacenaron a $-4^\circ C$ hasta su uso.

El tamaño y la estabilidad de las nanopartículas de oro de MPC se caracterizaron por análisis gravimétrico térmico (TGA), espectroscopía UV-Vis y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se determinó que el contenido orgánico de las nanopartículas de oro modificadas con hexanodiamina era aproximadamente del 22%, un valor consistente con informes previos para los hexanotiol-MPC compuestos por 140 átomos de oro (núcleo) protegidos por 53 ligandos de tiol. Véase Hostetler, M. I., et al., *Langmuir*, 14, 17-30 (1998).

Debido a que el NO es altamente reactivo y podría romper los enlaces de azufre con oro, véase Hrabie, J.A. y Keefer, L.K., *Chemical Reviews*, 102, 1135-1154 (2002), la estabilidad de los hexanotiol-MPC después de la exposición a altas presiones de NO se evaluó usando TGA y espectroscopía UV-Vis para garantizar que las condiciones necesarias para la formación de diazeniodiolato no comprometan la integridad de las nanopartículas. Tanto el contenido orgánico de las nanopartículas (según lo estudiado por TGA) como los espectros de UV-Vis permanecieron iguales después de la exposición al NO, lo que indica una influencia insignificante en la estabilidad de la monocapa. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión confirmaron además que el diámetro del núcleo de las nanopartículas permanecía constante (2.1 ± 0.9 nm) independientemente de la derivatización con amina o la formación de diazeniodiolato. Estos estudios sugieren que la integridad estructural de las nanopartículas de oro de MPC no se estaba comprometida por las condiciones necesarias para sintetizar el donador de NO e introducir la capacidad de liberación de NO.

30 Ejemplo 2

Síntesis de 11-bromo-1-undecanotiol

El 11-bromo-1-undecanotiol se sintetizó en dos etapas (véase la figura 11). Primero, el 11-bromo-1-undeceno (5.0 g) se convirtió en un tioacetato por reacción con AIBN (1.5 g) y ácido tioacético (10 ml) en tolueno (50 ml). La reacción se llevó a cabo en atmósfera de Ar y se calentó a reflujo durante 2 h. La disolución se lavó con exceso de agua y el tolueno se separó por evaporación rotatoria. El tioacetato se convirtió en un tiol por exposición del 11-bromo-1-undecanotioacetato a HCl seco. Se añadió gota a gota cloruro de acetilo (6 ml) a metanol seco en un baño de hielo en atmósfera de Ar. La solución se dejó calentar a temperatura ambiente y la reacción avanzó durante aproximadamente 6 h. Se añadieron cloruro de metileno y agua y la capa de cloruro de metileno se lavó varias veces con agua. El disolvente se separó por evaporación rotatoria.

40 Ejemplo 3

Procedimiento general para medir la liberación de óxido nítrico

La liberación de óxido nítrico de las partículas liberadoras de NO aquí descritas se midió de acuerdo con el siguiente procedimiento general. Con referencia ahora a la figura 12, se dispuso un volumen predeterminado de disolución tampón de fosfato (PBS) (pH 7,4, $37^\circ C$) en un recipiente, p. ej., un matraz de fondo redondo. El recipiente se selló, dejando una entrada para nitrógeno gaseoso y una salida para una mezcla de nitrógeno y óxido nítrico. La salida estaba en comunicación fluida con un analizador de óxido nítrico por quimioluminiscencia. Se inyectó una parte alícuota de una disolución que contenía una especie diazeniodiolato en el tampón de PBS. El analizador de óxido nítrico por quimioluminiscencia medía la cantidad de NO que reaccionaba con el ozono (O_3) para formar NO_2^* excitado, que emitía radiación electromagnética (hv) como se muestra en el esquema 2.



Esquema 2. Medición de NO por quimioluminiscencia.

Ejemplo 4. Medición de la liberación de óxido nítrico de nanopartículas de oro protegidas por monocapa derivatizadas con amina

55 La liberación de óxido nítrico se midió en disolución salina tamponada con fosfato a temperatura y pH fisiológicos

usando un analizador de óxido nítrico por quimioluminiscencia Sievers NOA™ (Boulder, Colorado, Estados Unidos de América). Tal como se presenta en la tabla 1, a continuación y en la figura 13, la liberación de NO para las nanopartículas de oro modificadas con diazeniodiolato se podía ajustar variando el número y/o la estructura química de los ligandos de amina sustituida. En la figura 14 se muestra un esquema que muestra la liberación de óxido nítrico de una nanopartícula de oro de clúster protegido por monocapa (MPC) funcionalizada.

Tabla 1. Propiedades de liberación de óxido nítrico de nanopartículas de oro protegidas por monocapa derivatizadas con amina.

Ligando	% Amina	Semivida (min)	Longevidad de la liberación (min)	NO total (pmol/mg)
Hexano	-	2	55	400
Butilamina	21	15	60	2 000
Etilendiamina	14	78	200	9 750
Etilendiamina	21	88	300	19 300
Hexanodiamina	21	68	600	87 000
Dietilentriamina	21	63	360	38 000

Ejemplo 5

Resultados de partículas liberadoras de NO que comprenden nanopartículas de oro protegidas por monocapa

Con referencia una vez más a la tabla 1 y la figura 13, el aumento de la concentración de ligando etilendiamina de 14 a 21% conducía a un aumento correspondiente en la liberación total de NO (de 9 750 a 19 300 pmol de NO/mg de MPC) y la duración de la liberación de NO (de 200 a 300 min). Sin estar ligado a ninguna teoría particular de operación, se sugiere que la liberación elevada de NO se atribuye a una mayor formación de donador de NO debido a una mayor concentración de aminas. También se midió una pequeña cantidad de NO (400 pmol/mg) de los controles de hexanotiol MPC. Esta liberación de NO era insignificante en periodos mayores de 5 min, lo que sugiere que una pequeña cantidad de NO probablemente se intercala dentro de las cadenas de alquilo hidrófobas en las condiciones necesarias para la síntesis de diazeniodiolato (5 atm NO), pero dicho NO se libera rápidamente tras la inmersión en disolución.

Los MPC modificados con diazeniodiolato también liberaban niveles bajos de NO bajo una corriente caliente (37°C) de nitrógeno gaseoso, lo que sugiere un posible mecanismo de disociación térmica. El nivel de liberación de NO, sin embargo, fue mayor en el tampón, lo que sugiere que las nanopartículas modificadas con *N*-diazeniodiolato experimentan disociación tanto dirigida por protones como térmica. Los MPC modificados con diazeniodiolato conservaban las características completas de liberación de NO cuando se almacenaban en atmósfera de nitrógeno a -4°C durante hasta 14 días (el período más largo investigado).

La liberación de NO de los MPC modificados con diazeniodiolato también se podía ajustar variando la estructura del precursor de amina. El aumento de la longitud de la cadena de alquilo que separa los nitrógenos de dos a seis unidades de metileno conducía a un aumento en la cantidad total de NO liberado (véase la tabla 1 y la figura 13, d y f) (de 19 300 a 87 000 pmol de NO/mg de MPC para MPC modificados con etilendiamina y con hexanodiamina, respectivamente), lo que sugiere una relación de liberación de NO/estructura del diazeniodiolato.

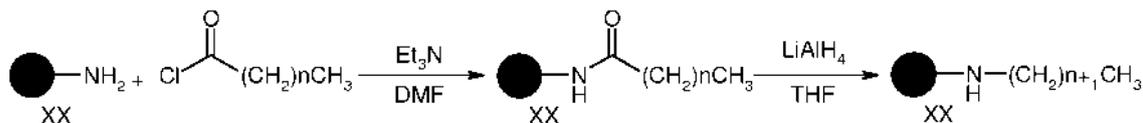
De hecho, los datos de semivida (tabla 1) muestran que la separación de las aminas da como resultado también una liberación más rápida de NO, análoga a la conducta de disociación descrita para moléculas pequeñas de diazeniodiolatos. Véase Hrabie, J. A., et al., *J. Org. Chem.*, 58, 1472-1476 (1993); Davies, K. M., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 5473-5481 (2001).

La cantidad total de NO liberado de los MPC modificados con dietilentriamina (38 000 pmol de NO/mg) estaba entre la medida para los MPC modificados con etilendiamina y hexanodiamina. La presencia de una amina secundaria adicional en la dietilentriamina probablemente explica el aumento de formación de donador de NO (y la capacidad de liberación) en relación con la etilendiamina, aunque la longitud de la cadena de alquilo que separa los nitrógenos sigue siendo corta (dos unidades de metileno).

Los MPC modificados con butilamina, un derivado de monoamina secundaria, se caracterizaron por la liberación más baja de NO total de todas los MPC modificados con amina estudiados. La formación de diazeniodiolato es facilitada por la amina adicional. Véase Hrabie, J. A., et al., *J. Org. Chem.*, 58, 1472-1476 (1993); Davies, K. M., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 5473-5481 (2001). En particular, se calculó que la eficiencia de conversión del diazeniodiolato para los MPC modificados con amina era inferior al 1%, independientemente de la estructura de la amina.

Ejemplo 6.

Preparación de dendrímeros liberadores de óxido nítrico

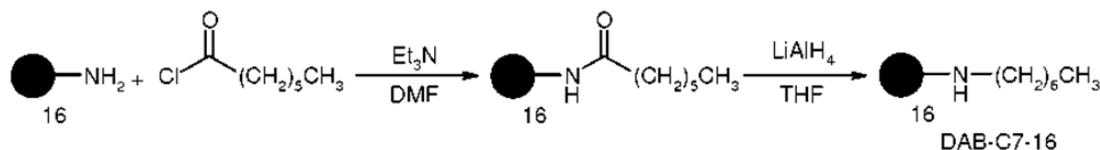


Esquema 3. Procedimiento general para dendrímeros con colas lipófilas.

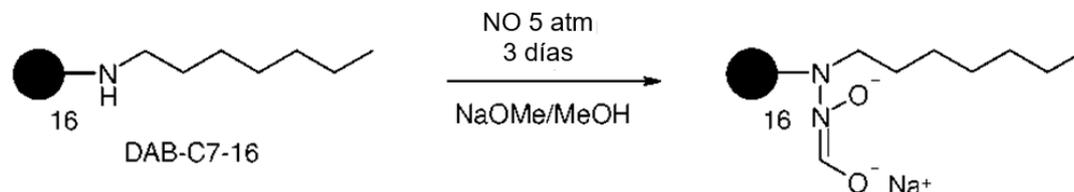
5 El dendrímero de polipropilenimina hexadecaamina (DAB-Am-16, disponible en Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos de América) (véase la figura 15) se cargó con 5 atm de óxido nítrico durante tres días en presencia de metóxido de sodio (NaOMe). Este procedimiento dio 0.74 moles de óxido nítrico/mol de dendrímero (conversión de 2.3%) y se liberaron 2.3×10^{-8} moles de óxido nítrico.

10 El dendrímero de polipropilenimina tetrahexacontaamina (DAB-Am-64, disponible en Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos de América) (véase la figura 16) se cargó con 5 atm de óxido nítrico durante tres días en presencia de NaOMe. Este procedimiento dio 4.94 moles de óxido nítrico/mol de dendrímero (conversión de 3.9%) y se liberaron 1.18×10^{-8} moles de óxido nítrico.

15 El DAB-C7-16 (véase el esquema 4 a continuación) se cargó con 5 atm de óxido nítrico durante tres días en presencia de NaOMe/MeOH (Esquema 5). Este procedimiento dio 12 moles de NO/mol de dendrímero (conversión de 37.9%) y se liberaron 3.74×10^{-7} moles de NO.



Esquema 4. Preparación de DAB-C7-16

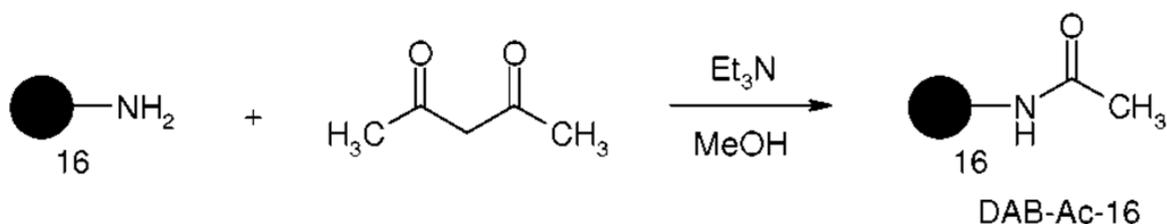


Esquema 5. Preparación de diazeniodiolato de DAB-C7-16

20 DAB-C7-64 se cargó con 5 atm de óxido nítrico durante tres días en presencia de NaOMe/MeOH. Este procedimiento dio 45 moles de NO/mol de dendrímero (conversión de 35.6%) y se liberaron 1.48×10^{-7} moles de NO.

25 En la figura 17 se muestra una gráfica que muestra la liberación de óxido nítrico frente al tiempo para DAB-C7-16 NaOMe/MeOH. Del mismo modo, en la figura 18 se muestra una gráfica que muestra la liberación de óxido nítrico frente al tiempo para DAB-C7-64 NaOMe /MeOH.

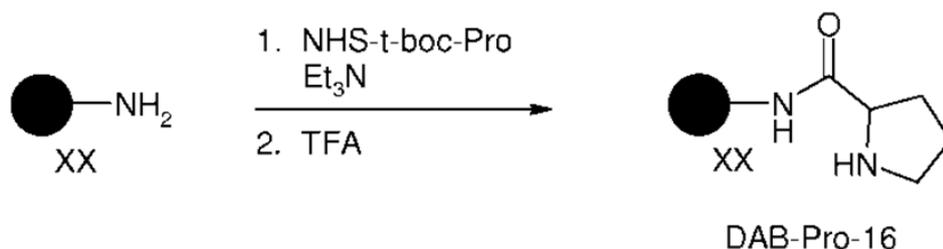
El DAB-Ac-16 (esquema 6) se cargó con 5 atm de óxido nítrico durante tres días en presencia de NaOMe. Este procedimiento dio 0.039 moles de NO/mol de dendrímero (conversión de 0.12%) y se liberaron 4.95×10^{-10} moles de NO.



30 Esquema 6. Preparación de DAB-Ac-16

El DAB-Ac-64 se cargó con 5 atm de óxido nítrico durante tres días en presencia de NaOMe. Este procedimiento dio 0.22 moles de NO/mol de dendrímero (conversión de 0.17%) y se liberaron 3.75×10^{-10} moles de NO.

El DAB-Pro-16 (esquema 7) se cargó con 5 atm de óxido nítrico durante tres días en presencia de NaOMe. Este procedimiento dio 42 moles de NO/mol de dendrímero (conversión de 130%) y se liberaron 1.92×10^{-7} moles de NO.



5

Esquema 7. Preparación de DAB-Pro-16

El DAB-Pro-64 se cargó con 5 atm de óxido nítrico durante tres días en presencia de NaOMe. Este procedimiento dio 480 moles de NO/mol de dendrímero (conversión de 377%) y se liberaron 4.79×10^{-7} moles de NO.

Ejemplo 7

10 Medición de la liberación de óxido nítrico de dendrímeros derivatizados con amina

La liberación de NO de dendrímeros derivatizados con amina sintetizados como se describe en el ejemplo 6 se midió de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 3. Los resultados se resumen a continuación en la tabla 2.

Tabla 2. Resumen de la liberación de óxido nítrico de dendrímeros derivatizados con amina

Especies de diazeniodiolato	NO liberado (mmol de NO/g)	$t_{1/2}$ (min)	moles de NO/mol de dendrímero	Estructura de la amina
DAB-Ac-16	0.016	1.4	0.04	grupo terminal
DAB-Ac-64	0.02	2.5	0.22	
DAB-Am-16	0.44	12	0.74	primaria
DAB-Am-64	0.69	29	4.94	
DAB-C7-16	3.4	80	12	secundaria
DAB-C7-64	3.2	90	45	
DAB-Pro-16	13	150	42	secundaria
DAB-Pro-64	36	117	480	

Ejemplo 8

15 Medición de la Liberación de óxido nítrico de materiales de diazeniodiolato

La liberación de NO de una variedad de materiales liberadores de NO se midió de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 3. Los resultados se resumen a continuación en la tabla 3. Las partículas de sílice de combustión con diazeniodiolato se prepararon como se describe en el ejemplo 9, a continuación, injertando en la superficie de la sílice de combustión *N*-(6-aminohexil)-3-aminopropiltrimetoxisilano, seguido de formación de diazeniodiolato de la amina secundaria con NO gaseoso.

20

Tabla 3. Resumen de la liberación de óxido nítrico de materiales de diazeniodiolato

Especies de diazeniodiolato	NO liberado (mmol de NO/g)	$t_{1/2}$ (min)
Proteínas (albúmina de suero bovino (BSA))	0.54	7.2E4
Sílice de combustión (2N[6]-N ₂ O ₂)	0.56	43
Sol-geles (20% AHAP3)	0.24	45
Polimetacrilato (C2-ED)	0.94	60

Ejemplo 9

Ruta de síntesis para partículas de sílice liberadoras de NO

Con referencia ahora a la figura 19, se preparan partículas de sílice liberadoras de NO con un tamaño de partículas en el intervalo de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 300 nm, siguiendo el método descrito por Zhang, H., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 5015 (2003).

Ejemplo 10

Síntesis de sílice basada en la co-condensación de precursores de donadores de NO

Reactivos y materiales: el ortosilicato de tetraetilo (TEOS), tetrametilsilano (TMS) y metóxido de sodio (NaOMe) se adquirieron en Fluka (Buchs, Suiza). Los silanos incluyendo (aminoetilaminometil)feniltrimetoxisilano (AEMP3), *N*-(6-aminohexil)aminopropiltrimetoxisilano (AHAP3), *N*-(2-aminoetil)-3-aminopropiltrimetoxisilano (AEAP3), y *N*-[3-(trimetoxisilil)propil]diethylentriamina (DET3) se adquirieron en Gelest (Tullytown, Pennsylvania, Estados Unidos de América). La *N,N*-dimetilformamida (DMF) se adquirió de Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, Estados Unidos de América). El metanol (MeOH), etanol (EtOH), tolueno y la disolución de amoníaco (NH₄OH, 30% en peso en agua) se adquirieron en Fisher Scientific (Fair Lawn, Nueva Jersey, Estados Unidos de América). El óxido nítrico (NO, 99,5%), argón (Ar) y nitrógeno (N₂) gaseosos se obtuvieron de AGA Gas (Maumee, Ohio, Estados Unidos de América) o Nacional Welders Supply (Raleigh, Carolina del Norte, Estados Unidos de América). Otros disolventes y productos químicos eran de calidad reactivo analítico y se usaron tal como se recibieron. Se usó un sistema Millipore Milli-Q UV Gradient A10 (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, Estados Unidos de América) para purificar agua destilada hasta una resistividad final de 18,2 MΩ·cm y un contenido orgánico total de ≤6 ppb.

Síntesis de nanopartículas de sílice liberadoras de óxido nítrico: se prepararon disoluciones de silano mezclando 2.78 mmol (620 μl) de TEOS con diferentes concentraciones de AEAP3, AHAP3, AEMP3 o DET3 (0 - 0.70 mmol que corresponde a 0 - 20% en moles, resto TEOS) durante 10 min. La disolución de silano después se combinó con 22 ml de EtOH y 6 ml de amoníaco (30% en peso en agua) y se agitó enérgicamente durante 30 minutos en condiciones ambientales. El precipitado blanco se recogió por centrifugación (5000 rpm, 5 min), se lavó con EtOH abundantemente y se secó a vacío durante la noche.

La sílice funcionalizada con amina resultante se volvió a suspender en 18 ml de DMF y 2 ml de MeOH en presencia de NaOMe (0.32 - 0.70 mmol; añadiendo una cantidad equimolar de NaOMe correspondiente al contenido de amina secundaria de los compuestos de sílice) y se puso en viales de 10 ml equipados con una barra de agitación. Los viales se colocaron en una botella de Parr (200 ml), se conectaron a un reactor interno de NO y se lavaron por barrido con Ar seis veces para eliminar el oxígeno de la suspensión. La botella de reacción después se cargó con NO a 5 atm y se selló durante 3 d mientras se agitaba. El NO gaseoso se purificó sobre pellets de KOH durante 2 h para eliminar los productos de degradación del NO en trazas. Antes de retirar las partículas de sílice, el NO sin reaccionar se purgó de la cámara con Ar. Las partículas de sílice modificadas con *N*-diazenioldiolato se recogieron por centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos, se lavaron abundantemente con etanol, se secaron en condiciones ambientales durante 1 hora y se almacenaron en un recipiente sellado a -20°C hasta su uso.

Ejemplo 11

Caracterización de la sílice funcionalizada.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (NMR) ²⁹Si de giro en ángulo mágico/polarización (CP/MAS) en estado sólido se obtuvieron a 293 K en un espectrómetro Bruker 360 MHz DMX (Billerica, Massachusetts, Estados Unidos de América) equipado con imanes de gran diámetro (sondas de resonancia doble de gradiente de campo pulsado de triple eje). Las partículas de compuestos de sílice (0, 10, 13 y 17% en moles de AEAP3, resto TEOS) se empaquetaron en rotores de 4 mm (frecuencia de doble resonancia de 71.548 MHz) y se hicieron girar a una velocidad de 8.0 kHz. Los desplazamientos químicos se determinaron en ppm en relación con una referencia externa de TMS.

Para la generación de imágenes por microscopía de fuerza atómica (AFM), las partículas de sílice se suspendieron en tolueno, se depositaron sobre una superficie de mica recién escindida y se secaron en condiciones ambientales durante 3 h. Las imágenes de AFM en modo contacto se obtuvieron en aire usando un microscopio de fuerza atómica con sonda de fuerza molecular 3D (Asylum Research; Santa Barbara, California, Estados Unidos de América) controlado con un software MFP-3D llevado a cabo con Igor Pro (Wavemetrics; Lake Oswego, Oregon, Estados Unidos de América). Se utilizaron cantilevers triangulares de nitruro de silicio con una constante de resorte nominal de 0.12 N/m⁻¹ y una frecuencia de resonancia de 20 kHz (Veeco; Santa Barbara, California, Estados Unidos de América) para adquirir imágenes de altura/topografía a una velocidad de barrido de 0.5 Hz.

Se midieron los perfiles de liberación de óxido nítrico de las nanopartículas de sílice modificadas con *N*-diazenioldiolato en disolución salina tamponada con fosfato desoxigenada (PBS, 0.01 M; 37°C) a un pH de 3.3, 4.3, 5.3, 6.0, 7.4 y 9.5 usando un analizador de óxido nítrico Sievers NOA de quimioluminiscencia 280i (Boulder, Colorado, Estados Unidos de América). El óxido nítrico liberado de la sílice se transportó al analizador mediante una

corriente de N₂ (200 ml/min) que pasó a través de la celda de reacción. El instrumento se calibró con aire (0 ppm de NO) se pasó a través de un filtro cero y 24.1 ppm de NO de referencia gaseoso (resto N₂, adquirido en AGA Gas).

5 La superficie específica y el volumen de poros de la sílice se determinaron mediante isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno (véase Huh, S., et al., *Chem. Mater.*, 15, 4247-4256 (2003)) recogidas con un analizado de superficie específica y tamaño de poros Beckman Coulter SA3100 (Fullerton, California, Estados Unidos de América). La superficie específica y el volumen de poros se calcularon usando los métodos de Brunauer-Emmett-Teller (BET) y Barrett-Joyner-Halenda (BJH). Antes de las mediciones, todas las muestras de sílice se desgasificaron a 200°C durante 3 h.

Ejemplo 12

10 Características físicas de las nanopartículas de sílice liberadoras de NO basadas en la co-condensación de precursores de donadores de NO

15 El tamaño de las nanopartículas de sílice se podía ajustar variando el tipo y la concentración de aminoalcoxisilano usado. En las figuras 20A-20E se muestran imágenes de microscopio de fuerza atómica (AFM) de modo contacto de esferas de sílice que tienen diferentes composiciones de silano. El diámetro de las partículas de sílice de control (solo TEOS) era de 250 ± 20 nm. Al alterar la disolución de TEOS para incluir un 10% en moles de AHAP3, el diámetro de las partículas disminuía a 20 ± 2 nm. Las partículas de sílice preparadas a partir de AEAP3 y TEOS eran aproximadamente dos veces más grandes ($d = 500 \pm 45$ nm) que los controles. A medida que el % en moles de AEAP3 aumentaba de 10 a 17% en moles (resto TEOS), el diámetro de la partícula disminuía a 92 ± 16 nm, poniendo de manifiesto una relación pseudo-lineal entre el tamaño de sílice y la concentración de aminoalcoxisilano (figura 20F). Se observaron tendencias similares en el tamaño para cada sistema de aminoalcoxisilano estudiado. El tamaño de las partículas no se alteró después de la síntesis de *N*-diazenioldiolato, lo que indicaba que la integridad estructural de las partículas de sílice no estaba comprometida por las condiciones necesarias para formar el donador de NO e introducir la capacidad de liberación de NO.

25 Como se muestra en las Figuras 21A-21C, se usó la resonancia magnética nuclear (NMR) de ²⁹Si en estado sólido para confirmar la incorporación de funciones aminoalcoxi dentro de la red de sílice y para determinar la cobertura de la superficie (SC) de dichos ligandos. Se usaron técnicas de polarización cruzada y giro en ángulo mágico (CP/MAS) para aumentar la resolución de la señal y la sensibilidad. Se analizaron las partículas de sílice de control y funcionalizadas con amina preparadas a partir de 0 a 17% en moles de AEAP3 (resto TEOS). Para sílice control de TEOS, se observaron tres picos distintos en el espectro de NMR de ²⁹Si a -90, -101 y -109 ppm, respectivamente, representativos de siliconas Q² (silanol geminal; -O₂Si(OH)₂), Q³ (silanol simple; -O₃Si(OH)), y Q⁴ (siloxano; -O₄Si). Véase Huh, S., et al., *Chem. Mater.*, 15, 4247-4256 (2003); y Albert, K., y Bayer, E. J., *J. Chromatogr.*, 544, 345-370 (1991). Para las partículas de sílice modificadas con aminoalcoxisilano, se observaron cinco picos en los espectros, lo que indica tres entornos químicos de silicio adicionales (gráficas b-d en la figura 21A). Los picos a los desplazamientos químicos de aproximadamente -52 y -65 ppm son representativos de silicio conectado a estructuras T² (-O₂Si(OH)R) y T³ (-O₃SiR), respectivamente (donde R es un grupo aminoetilaminopropilo). Véase Huh, S., et al., *Chem. Mater.*, 15, 4247-4256 (2003); y Albert, K., y Bayer, E. J., *J. Chromatogr.*, 544, 345-370 (1991). La presencia de bandas de Tⁿ sugiere la existencia de enlaces covalentes entre los grupos aminoalcoxi y la cadena principal de sílice. Las líneas de resonancia que representan Q², Q³ y Q⁴ también se asignaron en las posiciones esperadas. A medida que el contenido de AEAP3 aumentaba de 10 a 17% en moles, la cobertura de la superficie de los ligandos de aminoalcoxi [SC = (T² + T³)/(T² + T³ + Q² + Q³); véase See Huh, S., et al., *Chem. Mater.*, 15, 4247-4256 (2003); y Radu, D.R. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 1640-1641 (2004)] aumentaba de 21 a 37%, respectivamente. Véase la figura 21C. Es de destacar que el análisis cuantitativo de estas estructuras es complicado porque la intensidad de cada pico depende de la eficiencia de la polarización cruzada y del tiempo de relajación del protón. Véase Bruch, M. D., y Fatunmbi, H. O., *J. Chromatogr. A*, 1021, 61-70 (2003).

45 La superficie específica y el volumen de poros de las nanopartículas de sílice se evaluaron mediante isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno, como se ha descrito previamente. Véase Huh, S., et al., *Chem. Mater.*, 15, 4247-4256 (2003). Como se esperaba, la sílice funcionalizada con amina demostró ser no porosa con superficies específicas (S_{BET}) de 10 a 20 m²g⁻¹ y volúmenes de poros (V_p) de 0,02 a 0,06 ml·g⁻¹ (a $p/p_0 = 0,98$).

Ejemplo 13

50 Resultados de las nanopartículas de sílice liberadoras de NO basadas en la co-condensación de precursores de donadores de NO

Las características de liberación de NO que incluyen la cantidad total de NO (t[NO]), la semivida de liberación de NO (t_{1/2}), el flujo máximo de liberación de NO ([NO]_m) y el tiempo necesario (t_m) para alcanzar [NO]_m, se evaluaron en función de la estructura y cantidad de aminoalcoxisilano. Los resultados se resumen en la tabla 4, a continuación.

55

Tabla 4. Propiedades de liberación de NO de partículas de sílice preparadas basadas en la co-condensación de precursores de donadores de NO^a

Tipo de ligando	% en moles	t[NO] (nmol/mg)	T ^{1/2} (h)	[NO] _m (ppb/mg)	t _m (h)
AEP3	10	145 ± 10	12 ± 4	14 ± 3	8 ± 1
AEP3	13	392 ± 15	6 ± 1.5	92 ± 5	4 ± 1
AEP3	17	600 ± 25	3.4 ± 0.4	140 ± 10	2.1 ± 0.3
AHAP3	10	380 ± 20	0.85 ± 0.05	370 ± 10	0.35 ± 0.05
AEMP3	10	53 ± 3	6.0 ± 0.2	10 ± 2	0.12 ± 0.01
AEMP3	13	81 ± 3	6.5 ± 0.3	22 ± 2	0.10 ± 0.01
AEMP3	17	118 ± 5	5.7 ± 0.5	32 ± 2	0.11 ± 0.02
AEMP3	20	170 ± 10	5.4 ± 0.3	40 ± 3	0.11 ± 0.01
DET3	10	120 ± 5	4.0 ± 0.2	22 ± 2	1.6 ± 0.1

^an es al menos 3.

La liberación de NO se midió en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) a temperatura (37°C) y pH (7.4) fisiológicos usando un analizador de óxido nítrico por quimioluminiscencia. Véase Beckman, J. S., y Conger, K. A., *Methods Companion Methods Enzymol.*, 7, 35-39 (1995). Se comparan los perfiles de liberación de NO de dos nanopartículas de sílice representativas (10 y 17% en moles de AHAP3 y AEAP3, respectivamente, resto TEOS) en la figura 22. En particular, la "carga útil" de NO y las velocidades de liberación se vieron afectadas significativamente por la concentración y la estructura química de los ligandos amina usados para preparar las nanopartículas de sílice. De los cuatro sistemas de aminoalcoxilano estudiados (p. ej., AEAP3, AHAP3, AEMP3 y DET3), la sílice AEAP3 liberó la mayor cantidad total de NO. El aumento del % en moles de AEAP3 de 10 a 17% en moles conducía a un aumento correspondiente tanto en t[NO] como en [NO]_m (de 145 a 600 nmol/mg y de 14 a 140 ppb/mg, respectivamente). Sin embargo, tanto t_{1/2} como t_m disminuían al aumentar la concentración de aminoalcoxilano (de 12 a 3.4 h y de 8.0 a 2.1 h para 10 a 17% en moles de AEAP3, respectivamente). Se siguieron liberando niveles significativos de NO durante hasta 30 h, aunque a una velocidad menor tanto para 10 como 17% en moles de AEAP3.

Una posibilidad es que dicho comportamiento de liberación de NO se pueda atribuir al tamaño de la partícula. El diámetro y las superficies específicas calculadas para algunas de las partículas aquí descritas se muestran a continuación en la tabla 5. A medida que el diámetro de la partícula disminuye para un aminoalcoxilano dado (al aumentar la concentración de aminoalcoxilano), se espera una menor distancia de difusión del agua a los ligandos donadores de NO internos. Como tal, la liberación de NO se hace más rápida, ya que la descomposición del N-diazeniodiolato en NO es una función de la absorción de agua. En particular, las propiedades de liberación de NO de estas partículas de sílice se desvían de las de las moléculas pequeñas de N-diazeniodiolato y sílice liberadora de NO preparada por injerto de superficie. De hecho, t_{1/2} de la sílice de AHAP3 se encontró que era 0,85 h, más largo que t_{1/2} de 0.05 y 0.72 h para los análogos de molécula pequeña de DMHD/NO y los donadores de NO de sílice injertados en la superficie preparados con N-(6-aminohehexil)-3-aminopropiltrimetoxisilano (véase Zhang, H., y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 5015-5024 (2003)), respectivamente, preparados usando precursores de aminas similares (es decir, ligandos de aminohehexilamino). Del mismo modo, t_{1/2} de las partículas de sílice basadas en AEAP3 preparadas por una síntesis de "un solo matraz" era de 3.4 - 12 h, mientras que t_{1/2} de la superficie de sílice AEAP3 injertada (designada 2N[2] en Zhang, H., et al.) se describió como 2.4 h. Véase Zhang, H., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 5015-5024 (2003).

Tabla 5. Diámetros y superficies específicas de partículas de sílice preparadas basadas en la co-condensación de precursores de donadores de NO.

Tipo de ligando	% en moles ^c	d _{AFM} (nm)	A _{BET} (m ² /g)
AEP3	10	500	9
AEP3	13	210	10
AEP3	17	92	14
AHAP3	10	20	17
Ninguno (control)	0	250	500

El efecto del pH en la cinética de liberación de NO de los armazones de sílice también se evaluó, como se muestra en la figura 23. Consistente con el comportamiento de las moléculas pequeñas de *N*-diazenuodiolato (véase Davies, K.M., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 5473-5481 (2001)), la liberación de NO se aceleraba en condiciones ácidas (pH 3.3). A la inversa, la liberación de NO se reducía considerablemente a un pH elevado (9.5), lo que demuestra un método simple para almacenar y transportar nanopartículas de donadores de NO sin deterioro significativo del *N*-diazenuodiolato. El $t[NO]$ era similar en todos los valores de pH, pero la cinética de liberación de NO aumentó notablemente a un pH más bajo. Se observó un aumento de nueve veces del flujo máximo de NO liberado ($[NO]_m$) a pH 3.3 en comparación con el de pH 7.4. Dicho comportamiento, combinado con la disociación dependiente del pH de los *N*-diazenuodiolatos parece confirmar que el mecanismo dominante de la liberación de NO para los armazones de sílice es iniciado por protones.

Ejemplo 14

Uso de CTAB como un molde en la síntesis de partículas de sílice de AEAP3 mesoporosas liberadoras de NO

Se usó bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como molde en la síntesis de sílice de AEAP3 mesoporosa. La sílice mesoporosa se preparó como se ha descrito antes en el ejemplo 10, usando 10% en moles de AEAP3. Además, la disolución de silanos de AEAP3/TEOS contenía 0.01 M de CTAB. Después de la condensación de la mezcla de silanos, las partículas se trataron con HCl 1 M en EtOH a 75°C durante 24 h para eliminar el CTAB. En la figura 24A se muestra una representación esquemática que muestra una vista en sección transversal propuesta de una partícula de sílice mesoporosa liberadora de NO.

Las partículas se analizaron usando microscopía de fuerza atómica como se describe en el ejemplo 11. Véase la figura 24B. La liberación de óxido nítrico también se midió como se describe en el ejemplo 11. En la figura 25 se muestra la liberación de óxido nítrico (ppb) frente al tiempo (h) para 3 mg de las partículas mesoporosas en PBS a 37°C.

Ejemplo 15

Síntesis de partículas de sílice basadas en la co-condensación de donadores de NO precargados

Aunque los niveles de liberación de NO de las nanopartículas de sílice preparadas a partir de la co-condensación de precursores de donadores de NO (que también se pueden denominar una "carga postsíntesis" o simplemente "postcarga") eran significativamente mayores que los de las moléculas pequeñas de diazeniodiolatos, el contenido de aminoalcoxisilano usado para preparar las nanopartículas se limitó a <20% en moles debido a la agregación de partículas a concentraciones más altas de aminosilano. Sin estar vinculado a ninguna teoría particular, se cree que la agregación se puede atribuir a las interacciones entre las aminas y los silanoles adyacentes y/u otras aminas a través de enlaces de hidrógeno.

Para aumentar la concentración de aminoalcoxisilanos y, por lo tanto, el contenido de donador de NO de las partículas, una estrategia adicional para sintetizar las nanopartículas de sílice de la materia aquí descrita implica la co-condensación de silanos que contienen diazeniodiolatos. Por lo tanto, a diferencia del método descrito en el ejemplo 10, donde las nanopartículas de sílice se sintetizaron primero y después se presurizaron ("cargaron") con el NO gaseoso necesario para formar donadores de NO diazeniodiolato (que también se puede denominar "carga postsíntesis" o simplemente "postcarga"), los diazeniumdiolates también se pueden formar antes de la co-condensación de los nanocompuestos de sílice (es decir, "precarga"). Véase la figura 5B.

En resumen, se preparó una disolución de aminoalcoxisilano disolviendo una cantidad adecuada de aminoalcoxisilano en una mezcla de EtOH, MeOH y NaOMe. La disolución en agitación se cargó con NO (5 atm, 3 d) para formar aminoalcoxisilanos modificados con diazeniodiolato. Después las disoluciones de silanos se prepararon mezclando TEOS con diferentes proporciones (10-75% en moles, resto TEOS) de aminoalcoxisilano modificado con diazeniodiolato. La disolución de silano se añadió a un disolvente de EtOH en presencia de un catalizador de amoniaco. El precipitado blanco resultante se recogió por centrifugación, se lavó con EtOH, se secó en condiciones ambientales y se almacenó en un recipiente sellado a -20°C hasta su uso. Los resultados sugieren que la estrategia de precarga reduce la agregación debido a que los aminoalcoxisilanos se convierten primero en diazeniodiolato, evitando así la interacción de los sitios de aminas durante la formación de partículas. Como tal, el planteamiento se puede usar para facilitar un mayor acceso de NaOMe y NO a los precursores de aminas, lo que da como resultado altos rendimientos de NO por mol de precursor de aminoalcoxisilano.

Ejemplo 16

Propiedades de liberación de NO de partículas preparadas a partir de co-condensación de donadores de NO precargados

Las propiedades de liberación de NO de las nanopartículas de sílice modificadas con diazeniodiolato preparadas por el planteamiento de precarga descrito en el ejemplo 15 se resumen a continuación en la tabla 6. En especial, tanto el NO total liberado ($t[NO]$) como la cantidad máxima de NO liberado ($[NO]_m$) aumentaron considerablemente en comparación con la sílice liberadora de NO preparada por el método de postcarga con concentraciones idénticas de

aminoalcoxilano (véase la tabla 4). Por ejemplo, $t[\text{NO}]$ y $[\text{NO}]_m$ para 17% en moles de AEAP3 aumentaron de 600 a 800 nmol/mg y de 140 a 1200 ppb/mg, respectivamente. Sin estar ligado a ninguna teoría en particular, las cantidades elevadas de liberación de NO podrían ser el resultado de una distribución más homogénea de los donadores de NO diazeniodiolato por toda la partícula de sílice, como se muestra en la figura 5B. Más importante aún, el planteamiento de precarga permite un aumento en el contenido de aminoalcoxilano de hasta 45% en moles sin agregación, lo que da como resultado aumentos concomitantes en $t[\text{NO}]$ y $[\text{NO}]_m$.

El metilaminopropil-trimetoxisilano (MAP3), un aminoalcoxilano que contiene una amina secundaria terminada en metilo, también se usó para preparar partículas de sílice liberadoras de NO. Al eliminar las aminas primarias y el potencial de interacciones por enlaces de hidrógeno, se pueden sintetizar partículas con concentraciones de aminoalcoxilano MAP3 de hasta 75% en moles y tamaños en el intervalo de 80 a 400 nm dependiendo del disolvente empleado durante la síntesis. Además, el aumento del % en moles de MAP3 de 10 a 75% en moles conducía a un aumento correspondiente en las características de liberación de NO (p. ej., $t[\text{NO}]$ aumentó de 1 600 a 10 200 nmol/mg). Además, la liberación de NO de las partículas de sílice basadas en MAP3 se caracterizó por un estallido de liberación inicial de NO mayor y una semivida de liberación de NO global más corta (33 000-177 000 ppb/mg y ~5 min, respectivamente).

Tabla 6. Propiedades de liberación de NO de partículas preparadas a partir de donadores de NO precargados

Tipo de ligando	% en moles	$t[\text{NO}]$ (nmol/mg)	$T^{1/2}$ (h)	$[\text{NO}]_m$ (ppb/mg)	t_m (h)
AEP3	17	800	1.13	1 200	0.12
AEP3	25	1200	1.45	1 600	0.13
AEP3	35	1500	1.83	1 400	0.13
AEP3	45	1700	2.17	1 300	0.13
AHAP3	10	600	0.25	3 400	0.05
AHAP3	25	1600	0.30	9 500	0.05
AHAP3	35	2600	0.35	14 500	0.08
AHAP3	45	3800	0.27	21 700	0.13
MAP3	45	1600	0.08	33 000	0.05
MAP3	55	2900	0.08	60 000	0.05
MAP3	65	5800	0.08	134 000	0.05
MAP3	75	10 200	0.07	177 000	0.05

Ejemplo 17

Estudios de células de cáncer de ovario

Para evaluar el potencial tumoricida de nanopartículas de sílice donadoras de NO, se analizó la citotoxicidad del control y las partículas de sílice liberadoras de NO en células epiteliales de ovario humanas inmortalizadas normales (T29) y cancerosas (A2780 y OVCAR-3). Los ensayos de viabilidad celular de MTT se realizaron como se describe a continuación. Se usó el ensayo de proliferación de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) para determinar las sensibilidades relativas de las células OVCAR-3 a PYRRO/NO. Las células se sembraron en 6 repeticiones con $1-5 \times 10^3$ células/pocillo en placas de microvaloración de 96 pocillos, se incubaron durante la noche y se expusieron a concentraciones de disoluciones de donador de NO y control de pirrolidina durante 48 h. Después el medio de liberación de NO se retiró y se reemplazó por una disolución de MTT, después de lo cual las células se incubaron durante 4 horas adicionales a 37°C. Después de la eliminación del MTT, se añadió DMSO, y la absorción de la disolución se midió a 560 nm usando un lector de microplacas.

Como se muestra en la figura 26, las células tumorales epiteliales de ovario A2780 se trataron con dosis variables de control y sílice de AHAP3 liberadora de NO (0.013-1.0 mg/ml) durante 48 h. La viabilidad de las células A2780 se redujo tras la exposición a sílice de AH AP3 liberadora de NO en dosis bajas, y la proliferación de células A2780 se inhibió casi por completo con la sílice de AHAP3 liberadora de NO en una dosis de 0,50 mg/ml [concentración inhibidora mínima (MIC) a <5% de supervivencia; correspondiente a NO 0.75 mM]. Además, la dosis de IC_{50} (concentración inhibidora de 50%) de sílice de AHAP3 donadora de NO era de 0.02 mg/ml (NO 0,03 mM). En especial, las concentraciones inhibidoras de la sílice liberadora de NO demostraron ser significativamente más bajas que las de donadores de NO moléculas pequeñas (p. ej., MIC e IC_{50} para PYRRO/NO eran NO 4,4 y 2 mM, respectivamente).

Las nanopartículas de sílice de control también presentaban efectos citotóxicos contra las células tumorales (IC_{50} = 0.12 mg/ml), aunque menos que la de sus homólogas liberadoras de NO. Sin estar limitados por ninguna teoría particular, la citotoxicidad indeseable de los vehículos de control podría ser el resultado de aminas primarias libres

en la superficie de las estructuras de sílice, ya que dichos grupos tienen propiedades citotóxicas conocidas. Véase Shi, X., et al., *Colloids Surf. A*, 272, 139-150 (2006). Para reducir la citotoxicidad de las nanopartículas de control y liberadoras de NO con aminos primarias, se empleó el aminosilano MAP3 (que contiene solo aminos secundarias) para crear vehículos más biocompatibles. Como se esperaba, la citotoxicidad de los controles de MAP3 contra las células inmortalizadas (T29) y tumorales (A2780) era baja, mientras que la sílice de MAP3 liberadora de NO presentaba citotoxicidad contra las células T29 y A2780. Véase la figura 27. Las células de adenocarcinoma ovárico OVCAR-3 también mostraron tendencias citotóxicas similares con concentraciones crecientes de nanopartículas de sílice liberadoras de NO.

Para investigar si el tamaño de las nanopartículas afecta a la citotoxicidad, se sintetizaron dos nanopartículas de sílice (75% en moles de MAP3, resto TEOS) de diferentes tamaños de partículas (80 y 350 nm de diámetro, en lo sucesivo denominadas s-MAP3 y L-MAP3, respectivamente). El diámetro de la sílice se puede ajustar fácilmente variando el sistema de disolvente (p. ej., alcohol) durante el proceso de sol-gel. Véase Harris, M. T., et al., *J. Non-Cryst. Solids*, 121, 397-403 (1990). El aumento del peso molecular (MW) del alcohol usado durante la síntesis conducía a un aumento correspondiente en el tamaño de partículas (p. ej., se usó etanol al 100% (v/v) y una mezcla de etanol/butanol al 50/50% (v/v) para preparar S-MAP3 y L-MAP3, respectivamente). La viabilidad celular se determinó incubando T29 y A2780 con partículas de MAP3 de control que no liberan NO (80 nm), S-MAP3 o L-MAP3 (0,4 mg/ml) durante 48 h. Véase la figura 28. En particular, la sílice liberadora de NO de pequeño diámetro (s-MAP3) demostró ser citotóxica contra células tanto inmortalizadas (T29) como de cáncer (A2780) (12 ± 1.1 y $5 \pm 0.2\%$ de supervivencia, respectivamente). En contraste, la sílice liberadora de NO más grande (L-MAP3) era significativamente más citotóxica para las células tumorales que las células sanas (37 ± 2.0 frente a $6 \pm 1.2\%$ de supervivencia para T29 y A2780, respectivamente). La toxicidad reducida de los vehículos de suministro de NO más grandes contra células T29 representa un paso importante hacia el desarrollo de nanodispositivos capaces de liberar concentraciones tumorocidas de NO con un efecto mínimo en las células sanas.

Ejemplo 18

25 Captación celular

La captación celular de partículas de sílice liberadoras de NO se estudió usando microscopía de fluorescencia confocal. En resumen, las células de cáncer de ovario A2780 se pusieron en placas hasta confluencia de ~20% en placas de microscopía de fondo de vidrio MET-TEC® y se incubaron durante la noche. Antes de la generación de imágenes, el tampón de incubación se desechó y se reemplazó con el tampón de generación de imágenes Krebs-Henseleit [ácido *N*-hidroxiethylpiperazina-*N*'2-etanosulfónico 10 mM (HEPES), pH 7.4] que contiene colorante tetrametilrodamina 100 nM (TMRM) para seleccionar la tinción de las mitocondrias de las células de cáncer A2780 (30 min de incubación). Las nanopartículas de sílice liberadoras de NO se marcaron de manera fluorescente por la co-condensación de tres precursores de silano: aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) modificado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), MAP3 con diazeniodiolato y TEOS.

Se usó un microscopio láser de barrido Zeiss (LSM 510; Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, Alemania) para realizar las mediciones de fluorescencia. La fluorescencia roja de TMRM (excitación con láser de helio-neón a 543 nm) se controló a los 5 min y a los 60 min para proporcionar un mapa de la ubicación intracelular de las mitocondrias y un esquema de los núcleos A2780. Véanse las figuras 29C y 29D. Se añadió una parte alícuota de 100 μ l de nanopartículas de sílice de MAP3 liberadoras de NO marcadas con FITC disueltas en el tampón de generación de imágenes directamente a las células en la etapa del microscopio, produciendo una concentración de nanopartículas de 0.1 mg/ml. Inmediatamente, se observó la fluorescencia verde de las nanopartículas de sílice marcadas con FITC (excitación láser de argón a 488 nm) a 520 nm, dando como resultado el perfil de las células de cáncer A2780. Las imágenes confocales se recogieron a intervalos de 5 minutos para controlar la captación celular de las nanopartículas fluorescentes verdes. La figura 29A muestra las células después de 5 minutos de incubación con las partículas de sílice de MAP3 marcadas con FITC. Después de 1 h, se observó una acumulación intracelular sustancial de nanopartículas. Véase la figura 29B. Además, la característica de fluorescencia roja de viabilidad mitocondrial estaba ausente en una serie de células después de 60 minutos (véase Fig. 29D), y las células parecían estar reduciendo su tamaño, lo que indica la muerte celular.

Ejemplo 19

50 Estudios de actividad antimicrobiana

Pseudomonas aeruginosa (ATCC nº 19143, de American Type Culture Collection Company, Manassas, Virginia, Estados Unidos de América), un patógeno oportunista Gram negativo, se cultivó en caldo de soja triptico (TSB) hasta una densidad óptica ($OD_{\lambda=600\text{ nm}}$) de aproximadamente 0,2 (correspondiente a $\sim 1.0 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias [UFC]/ml, confirmadas por diluciones seriadas). Después de sedimentar las bacterias por centrifugación, se descartaron los medios de cultivo TSB y las bacterias se resuspendieron en disolución salina tamponada con fosfato estéril (PBS, pH 7.4). La concentración de bacterias se ajustó a 10^3 UFC/ml mediante diluciones seriadas de 10 veces en PBS. Se dispensaron porciones de esta suspensión bacteriana (200 μ l) en viales de micropipetas estériles y se añadieron a cada vial 200 ml de nanopartículas de sílice de 45% en moles de AEAP3 liberadoras de NO (1 mg/ml), nanopartículas de sílice de AEAP3 de control (sin liberación de NO) (1 mg/ml) o PBS estéril (blanco).

Después de la incubación a 37°C durante 1 h, se pusieron 100 µl de cada suspensión en placas de nutriente de agar de soja tréptico, que se incubaron a 37°C durante la noche. Al día siguiente, se contaron las colonias de bacterias que se formaron en cada placa y se tomaron fotografías de placas de nutrientes representativas. Como se muestra en la figura 30, la liberación de óxido nítrico de las nanopartículas de sílice dio lugar a una drástica reducción en el número de células bacterianas viables (figura 30C), en comparación con las nanopartículas de sílice del blanco (figura 30A) y de control (sin liberación de NO) (figura 30B). Cuantitativamente, se formaron aproximadamente el mismo número (~360) de colonias en las placas que representan las suspensiones de blanco y de control. Solo se formaron 9 colonias a partir de la suspensión a la que se añadieron nanopartículas de sílice liberadoras de NO. Esto representa una disminución de 98% en el número de células bacterianas viables entre las suspensiones a las que se añadieron nanopartículas liberadoras de NO en comparación con las suspensiones de blanco y de control.

Para evaluar de forma más cuantitativa la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de sílice liberadoras de NO, la concentración de bacterias se ajustó a 10^3 UFC/ml mediante diluciones seriadas en PBS y los cultivos se expusieron a nanopartículas de sílice de control (no liberadoras de NO), nanopartículas de sílice liberadoras de NO o PBS estéril (blanco). Después de la incubación durante 1 hora a 37°C, se pusieron 100 µl de cada suspensión en placas de nutrientes de agar de soja tréptico y se incubaron durante la noche. Como se muestra en la figura 31, la liberación de NO a partir de nanopartículas de sílice dio como resultado una reducción drástica en el número de células bacterianas viables. Con una concentración de 2 mg/ml, las nanopartículas liberadoras de NO tenían un aumento significativo de la actividad bactericida frente a los controles ($p = 9.5 \times 10^{-4}$). La cantidad de NO liberado durante el período de incubación de 1 h era de aproximadamente 1 mmol de NO, según se determinó por quimioluminiscencia. Por lo tanto, las nanopartículas de sílice presentadas en la presente memoria, presentan actividad bactericida in vitro y representan un vehículo para suministrar concentraciones de NO para matar microorganismos relevantes para heridas infectadas.

Ejemplo 20

Síntesis de nanopartículas de sílice magnéticas liberadoras de NO

Las nanopartículas de sílice liberadoras de NO magnéticas se prepararon de acuerdo con la síntesis que se muestra en la Fig. 32. En resumen, se adaptó el método del ejemplo 10 mediante la inclusión de partículas de magnetita (Fe_3O_4) que tenían diámetros de entre aproximadamente 20 nm y 30 nm en una disolución que contenía TEOS y ya sea 10% en moles de AHAP3 o 17% en moles de AEAP3. Tras la co-condensación de los silanos, las partículas de magnetita se cubrieron con una cubierta de sílice. Después las partículas se sometieron a NO para formar diazeniodiolatos.

En la figura 33 se muestran imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) de las partículas de magnetita/sílice-AHAP3. El diámetro de las partículas se midió como 85 ± 11 nm. Los perfiles de liberación de NO de las partículas se muestran en la figura 34. Los experimentos con disoluciones de PBS que contienen las partículas de magnetita/sílice indican que la aplicación de un imán puede controlar el movimiento de las partículas.

Ejemplo 21

Películas de poliuretano que contienen nanopartículas de sílice liberadoras de NO

Las nanopartículas de sílice liberadoras de NO se incorporaron en películas de poliuretano preparadas añadiendo entre aproximadamente 3 mg y aproximadamente 18 mg de partículas liberadoras de NO a disoluciones de precursor de polímero que contenían 10 mg de poliuretano TECOFLEX® (TPU)/poliuretano hidrófilo (HPU) 1:1 (p/p) en 500 µl de THF y etanol antes de la polimerización.

La película preparada añadiendo 6 mg de nanopartículas a la disolución precursora de polímero se ensayó para determinar su capacidad para resistir la adhesión bacteriana como se ha descrito previamente. Véase Marxer, S. M., et al., *Chem. Mater.*, 15, 4193-4199 (2003). Las películas se trataron previamente para iniciar la liberación constante de NO y posteriormente se sumergieron en una suspensión celular que contenía *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC n° 19143, de American Type Culture Collection Company, Manassas, Virginia, Estados Unidos de América), a 37°C durante 30 min. La superficie de la película se enjuagó con agua y se fijó en una disolución de glutaraldehído al 2% durante 15 minutos. Las imágenes de las superficies se obtuvieron usando microscopía de contraste de fase usando un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200 (Carl Zeiss Optical, Chester, Virginia, Estados Unidos de América). En las figuras 35A y 35B se muestran micrografías ópticas de contraste de fase de películas de control y la película que contiene partículas liberadoras de NO.

Ejemplo 22

Sensor de glucosa con una capa liberadora de NO

Los biosensores de glucosa basados en glucosa oxidasa pueden detectar la glucosa en sangre a través de la electrooxidación del peróxido de hidrógeno generado por la reacción de glucosa y oxígeno catalizada por la glucosa oxidasa (GOx). Como se muestra esquemáticamente en la figura 36, se preparó un sensor de glucosa que tenía una capa liberadora de NO. El sensor **3600** proporciona cuatro capas apiladas sobre un electrodo de Pt **3602**. La capa

más interior **3604** se forma a partir de la condensación de una disolución que contiene 25 µl de MTMOS, 6 mg de glucosa oxidasa (GOx), 100 µl de EtOH, y 50 µl de H₂O. Cubriendo la capa de GOx **3604** hay una capa protectora **3606** preparada a partir de la polimerización de una mezcla de precursores de poliuretano hidrófobo TECOFLEX® (TPU) y poliuretano hidrófilo (HPU) 1:1 (p/p) (es decir, una mezcla de TPU/HPU). La capa **3608** de liberadora de NO se preparó a partir de la polimerización de una disolución que contenía 10 mg de TPU/HPU y 6 mg de nanopartículas de sílice modificadas con diazeniodiolato en 500 µl de THF/EtOH. Sobre la capa liberadora de NO **3608** se monta además una capa de barrera de TPU/HPU **3610** preparada a partir de una mezcla de 10 mg de TPU/HPU en 500 µl de THF/EtOH.

Continuando con la figura 36, el recuadro muestra las interacciones en la interfase de la capa **3608** liberadora de NO y la capa protectora externa **3610**, en donde partículas de sílice liberadoras de NO **3620** que tienen grupos diazeniodiolato **3622** liberan óxido nítrico **3624** mientras que las moléculas de glucosa **3626** son absorbidas en la capa liberadora de NO **3608** en su camino hacia la capa **3604** que contiene GOx.

Para evaluar la respuesta del sensor de glucosa que tiene capas liberadoras de NO, también se prepararon dos electrodos de control: un sensor de control que tenía solo una capa protectora y una capa de GOx, y un sensor que contenía las cuatro capas preparadas solo con nanopartículas de sílice que no contenían donadores de NO. La sensibilidad de los diversos sensores se evaluó en PBS (0.05 M, pH 7.4) usando un potencial aplicado de +7 V frente a Ag/AgCl. La sensibilidad del control, del sensor de dos capas se determinó como 54.5 nA/mM (r = 0.9980), la del sensor de cuatro capas sin nanopartículas de sílice liberadoras de NO era 61.3 nA/mM (r = 0.9938) y la del sensor con la capa liberadora de NO era 57.9 nA/mM (r = 0.9989). Estos resultados indican que la liberación de NO no interfiere con la detección de glucosa basada en GOx.

Referencias

Las referencias que se enumeran a continuación, así como todas las referencias citadas en la memoria descriptiva, se incorporan en la presente memoria por referencia en la medida en que complementan, explican, proporcionan antecedentes o enseñan metodologías, técnicas y/o composiciones empleadas en la presente memoria.

- Albert, K., y Bayer, E. J., *J. Chromatogr.*, 544, 345-370 (1991).
- Albina, J. E., y Reichner, J. S., *Cane. Metas. Rev.*, 17, 19-53 (1998).
- Anwander, R., et al., *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 117, 135-142 (1998).
- Baker, J. R., Jr., *Biomacromolecules*, 5, 2269-2274 (2004).
- Beckman, J. S., y Conger, K. A., *Methods Companion Methods Enzymol.*, 7, 35-39 (1995).
- Brannon-Peppas, L. y Blanchette, J. O., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1649-1659 (2004).
- Bruch, M. D., y Fatunmbi, H. O., *J. Chromatogr. A.*, 1021, 61-71 (2003).
- Brust, M., *J. of the Chem. Soc., Chem. Comm.*, 801-802 (1994).
- Capala, J., et al., *Bioconjugate Chem.*, 7(1), 7-15 (1996).
- Cobbs, C. S., et al., *Cancer Res.*, 55, 727-730 (1995).
- Davies, K. M., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 5473-5481 (2001).
- Diodati, J. G., et al., *Thrombosis and Haemostasis*, 70, 654-658 (1993).
- Feldheim, D. L. y Foss, C. A., eds, *Metal Nanoparticles - Synthesis Characterization, and Applications*. Marcel Dekker, Inc: Nueva York, p. 360 (2000).
- Freireich et al., *Cancer Chemother Rep.* 50, 219-244 (1966).
- Frost, M. C., et al., *Biomaterials*, 26, 1685-1693 (2005).
- Harris, M. T., et al., *J. Non-Cryst. Solids*, 121, 397-403 (1990).
- Hatton, B., et al., *Acc. Chem. Res.*, 38, 305-312 (2005).
- Hostetler, M. I., et al., *Langmuir*, 15, 3782-3789 (1999).
- Hostetler, M. I., et al., *Langmuir*, 14, 17-30 (1998).
- Hrabie, J. A., et al., *J. Org. Chem.*, 58, 1472-1476 (1993).

- Hrabie, J. A. y Keefer, L. K., *Chem. Rev.*, 102, 1135-1154 (2002).
- Huh, S., et al., *Chem. Mater.*, 15, 4247-4256 (2003).
- Ignarro, L. J., *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*; Academic Press: San Diego (2000).
- Ignarro, L. J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 84, 9265-9269 (1987).
- 5 Jenkins, D. C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 92, 4392-4396 (1995).
- Keefer, L. K., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43, 585-607 (2003).
- Keefer, L. K., *Chemtech*, 28, 30-35 (1998).
- Lai, C.-Y., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 4451-4459 (2003).
- Lim, M. H., y Stein, A., *Chem. Mater.*, 11, 3285-3295 (1999).
- 10 Lin, H.-P., y Mou, C.-Y., *Acc. Chem. Res.*, 35, 927-935 (2002).
- Marletta, M. A., et al., *BioFactors*, 2, 219-225 (1990).
- Marxer, S. M., et al., *Chem. Mater.*, 15, 4193-4199 (2003).
- Munoz, B., et al., *Chem. Mater.*, 15, 500-503 (2003).
- Nablo, B. J., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 9712-9713 (2001).
- 15 Napoli, C. e Ignarro, L. J., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43, 97-123 (2003).
- Penault-Llorca, F., et al., *Int. J. Cancer*, 61(2), 170-176 (1995).
- Press, M.F., et al., *Oncogene* 5(7), 953-962 (1990).
- Radomski, M. W., et al., *Br. J. of Pharmacology*, 101, 145-749 (1992).
- Radu, D. R., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 1640-1641 (2004).
- 20 Roy, I., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 102, 279-284 (2005).
- Sayari, A., y Hamoudi, S., *Chem. Mater.*, 13, 3151-3168 (2001).
- Shi, X., et al., *Colloids Surf. A.*, 272, 139-150 (2006).
- Stein, A., et al., *Adv. Mater.*, 12, 1403-1419 (2000).
- Thomsen, L. L., et al., *Br. J. Cancer.*, 72, 41-44 (1995).
- 25 Trewyn, B. G., et al., *Nano. Lett.*, 4, 2139-2143 (2004).
- Troughton, B. B., et al., *Langmuir*, 4, 365-385 (1988).
- Wang, P. G., et al., *Nitric Oxide Donors: For Pharmaceutical and Biological Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany (2005).
- Wang, P. G., et al., *Chem. Rev.*, 102, 1091-1134 (2002).
- 30 Wiener, E.C. et al., *Invest. Radiol.*, 32 (12), 748-754 (1997).
- Wiener, E.C., et al., *Magn. Reson. Med.* 31(1), 1-8 (1994).
- Yoshitake, H., *New. J. Chem.*, 29, 1107-1117 (2005).
- Zhang, H., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 5015-5024 (2003).
- Zhou, Z., y Meyerhoff, M. E., *Biomacromolecules*, 6, 780-789 (2005).

REIVINDICACIONES

1. Una partícula liberadora de óxido nítrico, comprendiendo la partícula liberadora de óxido nítrico:
- una red de sílice co-condensada que comprende un donador de óxido nítrico, en donde la red de sílice co-condensada se sintetiza a partir de la condensación de una mezcla de silanos que comprende un alcoxisilano y un aminoalcoxisilano para formar una red unida de siloxano, en donde las funciones aminoalcoxisilano están distribuidas por toda la partícula entera y en la superficie de la partícula.
2. La partícula liberadora de óxido nítrico de la reivindicación 1, en donde la red de sílice co-condensada comprende un conector orgánico seleccionado del grupo que consiste en:
- (a) un conector lábil que responde a los cambios en el pH;
- (b) un conector lábil sensible a la radiación electromagnética;
- (c) un conector lábil susceptible de degradación por acción enzimática;
- (d) un conector hidrófobo;
- (e) un conector anfífilico; y
- (f) una combinación de los mismos.
3. La partícula liberadora de óxido nítrico de la reivindicación 1, en donde el donador de óxido nítrico se selecciona del grupo que consiste en un diazeniodiolato, una nitrosamina, una hidroxil-nitrosamina, un nitrosotiol, una hidroxilamina, una hidroxilurea y combinaciones de las mismas.
4. La partícula liberadora de óxido nítrico de la reivindicación 1, en donde el donador de óxido nítrico está unido covalentemente a la red de sílice co-condensada.
5. La partícula liberadora de óxido nítrico de la reivindicación 1, que comprende además una región exterior que comprende uno o más restos químicos seleccionados del grupo que consiste en:
- (a) un resto que modula la cinética de liberación de óxido nítrico;
- (b) un resto que afecta la biocompatibilidad de la partícula;
- (c) un resto que afecta la biodistribución de la partícula;
- (d) un resto que proporciona el suministro dirigido de la partícula;
- (e) un resto que imparte una capacidad para generar imágenes o seguir la partícula;
- (f) un resto que afecta a la solubilidad de la partícula;
- (g) un agente terapéutico; y
- (h) una combinación de los mismos.
6. La partícula liberadora de óxido nítrico de la reivindicación 1, en donde el alcoxisilano comprende un tetraalcoxisilano de fórmula $\text{Si}(\text{OR})_4$, en donde R es alquilo; y el aminoalcoxisilano se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) un aminoalcoxisilano de fórmula $\text{R}''\text{-(NH-R}')_n\text{-Si}(\text{OR})_3$, en donde R es alquilo, R' es alquileo, alquileo ramificado o aralquileo, n es 1 o 2, y R'' se selecciona del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, arilo y alquilamina;
- (b) un aminoalcoxisilano de fórmula $\text{NH}[\text{R}'\text{-Si}(\text{OR})_3]_2$, en donde R es alquilo y R' es alquileo;
- (c) un aminoalcoxisilano en donde la amina está sustituida con un diazeniodiolato, teniendo dicho aminoalcoxisilano la fórmula $\text{R}''\text{-N}(\text{NONO}''\text{X}^+)\text{-R}'\text{-Si}(\text{OR})_3$, en donde R es alquilo, R' es alquileo o aralquileo, R'' es alquilo o alquilamina, y X⁺ es un catión seleccionado del grupo que consiste en Na⁺ y K⁺;
- (d) una combinación de los mismos.
7. La partícula liberadora de óxido nítrico de la reivindicación 6, en donde la mezcla de silanos comprende entre aproximadamente 10% en moles y aproximadamente 99% en moles del tetraalcoxisilano y de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 90% en moles del aminoalcoxisilano.
8. La partícula liberadora de óxido nítrico de la reivindicación 7, en donde la mezcla de silanos comprende además de aproximadamente 0% en moles a aproximadamente 20% en moles de un silano fluorado; de aproximadamente

0% en moles a aproximadamente 20% en moles de un silano catiónico o aniónico; y de aproximadamente 0% en moles a aproximadamente 20% en moles de un alquilsilano.

5 9. La partícula liberadora de óxido nítrico de la reivindicación 6, en donde el tetraalcoxisilano se selecciona del grupo que consiste en ortosilicato de tetrametilo y ortosilicato de tetraetilo; y/o el aminoalcoxisilano se selecciona del grupo que consiste en:

N-(6-aminohexil)aminometiltrimetoxisilano;

N-(6-aminohexil)aminopropiltrimetoxisilano;

N-(6-aminoetil)aminopropiltrimetoxisilano;

(3-trimetoxisililpropil)dietilentriamina;

10 (aminoetilaminometil)fenetiltrimetoxisilano;

[3-(metilamino)propil]trimetoxisilano;

N-butilaminopropiltrimetoxisilano;

N-etilaminoisobutiltrimetoxisilano;

N-fenilaminopropiltrimetoxisilano;

15 *N*-ciclohexilaminopropiltrimetoxisilano;

Bis[3-(trimetoxisilil)propil]amina; y

Bis[(3-trimetoxisilil)propil]etilendiamina.

10. La partícula liberadora de óxido nítrico de la reivindicación 8, en donde el silano fluorado se selecciona del grupo que consiste en:

20 (heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahidrodecil)trietoxisilano;

(3,3,3-trifluoropropil)trimetoxisilano; y

(perfluoroalquil)etiltrietoxisilano; y/o

el silano catiónico o aniónico se selecciona del grupo que consiste en:

cloruro de *N-N*-didecil-*N*-metil-*N*-(3-trimetoxisilil)amonio;

25 cloruro de octadecildimetil(3-trimetoxisililpropil)amonio;

fosfonato de 3-trihidroxisililpropilmetilo, sal sódica; y carboxiletilsilanotriol, sal sódica; y/o el alquilsilano se selecciona del grupo que consiste en metiltrimetoxisilano, butiltrimetoxisilano, butiltrietoxisilano, propiltrimetoxisilano y octadeciltrimetoxisilano.

30 11. La partícula liberadora de óxido nítrico de la reivindicación 1, en donde el donador de NO se forma por un método seleccionado de:

(a) un método de postcarga, en donde el donador de óxido nítrico se forma después de la condensación de la mezcla de silanos; y

(b) un método de precarga, en donde el donador de óxido nítrico se forma a partir del aminoalcoxisilano antes de la condensación de la mezcla de silanos.

35 12. Una partícula liberadora de óxido nítrico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para usar en medicina.

40 13. Partícula liberadora de óxido nítrico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para usar en un método para administrar una cantidad efectiva de la partícula liberadora de óxido nítrico al sujeto para tratar un estado de enfermedad, en donde el estado de enfermedad se selecciona del grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad cardiovascular, una infección microbiana; agregación plaquetaria y adhesión plaquetaria causadas por la exposición de la sangre a un dispositivo médico; afecciones patológicas resultantes de la proliferación celular anormal; rechazos de trasplantes, enfermedades autoinmunitarias, inflamación, enfermedades vasculares; tejido cicatricial; contracción de heridas, reestenosis, dolor, fiebre, trastornos gastrointestinales, trastornos respiratorios, disfunciones sexuales y enfermedades de transmisión sexual.

14. Una formulación farmacéutica que comprende:

(a) una partícula liberadora de óxido nítrico que comprende:

5 una red de sílice co-condensada que comprende un donador de óxido nítrico, en donde la red de sílice co-condensada se sintetiza a partir de la condensación de una mezcla de silanos que comprende un alcoxisilano y un aminoalcoxisilano para formar una red unida de siloxano, en donde las funciones aminoalcoxisilano están distribuidas por toda la partícula entera y en la superficie de la partícula; y

(b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. Una película polimérica liberadora de óxido nítrico que comprende un polímero orgánico y una partícula liberadora de óxido nítrico, comprendiendo dicha partícula liberadora de óxido nítrico:

10 una red de sílice co-condensada que comprende un donador de óxido nítrico, en donde la red de sílice co-condensada se sintetiza a partir de la condensación de una mezcla de silanos que comprende un alcoxisilano y un aminoalcoxisilano para formar una red unida de siloxano, en donde las funciones aminoalcoxisilano están distribuidas por toda la partícula entera y en la superficie de la partícula.

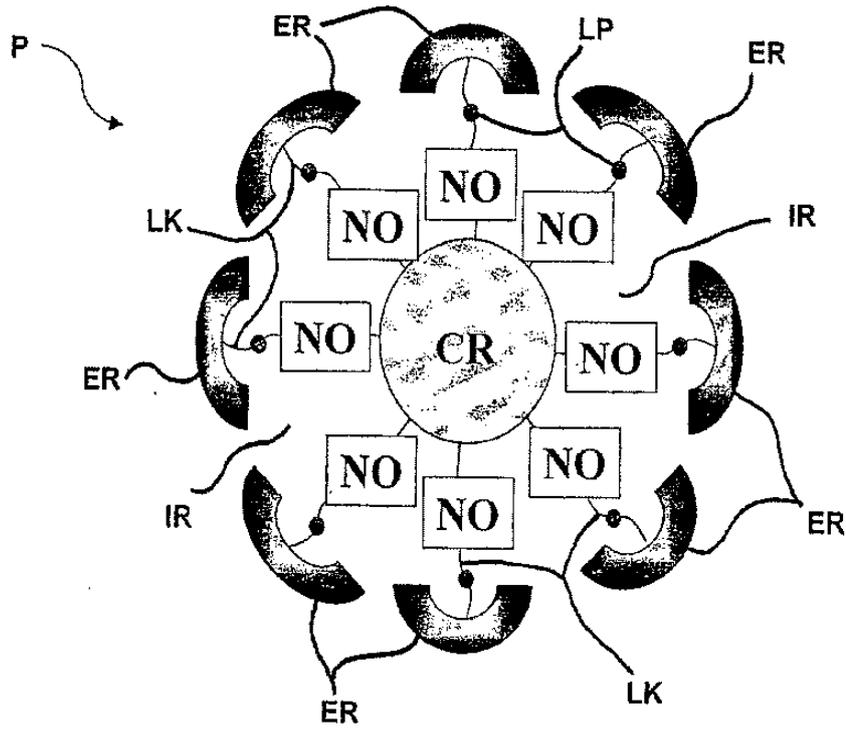


Fig. 1

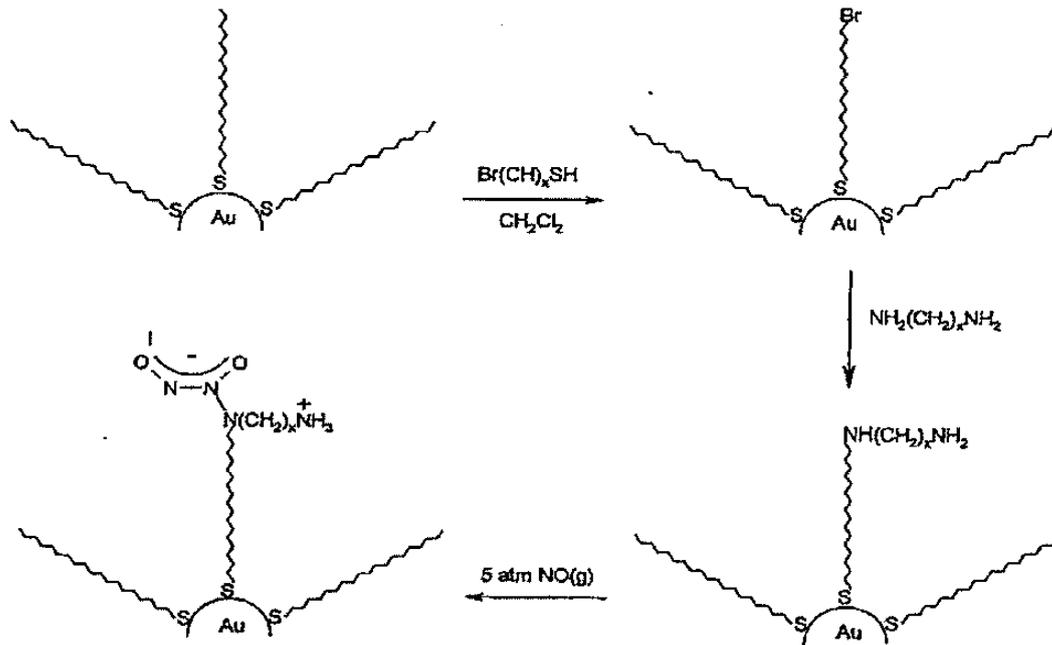


Fig 2

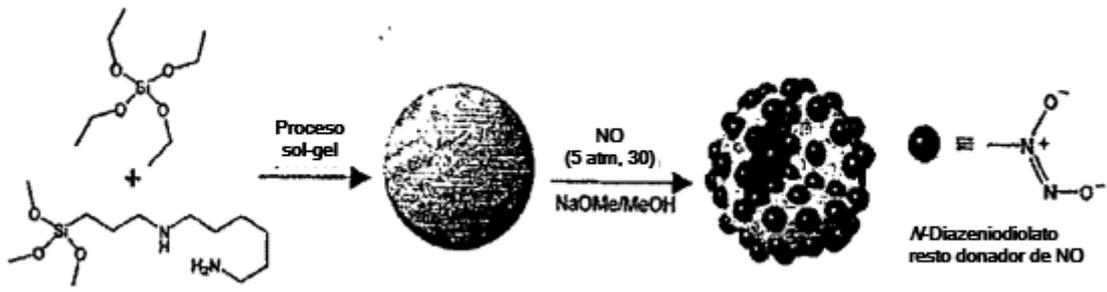
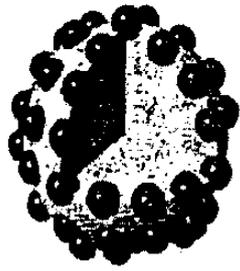
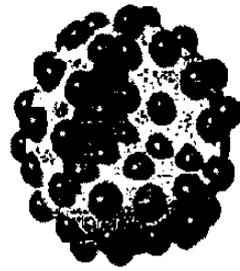


Fig.3



A



B

Fig. 4

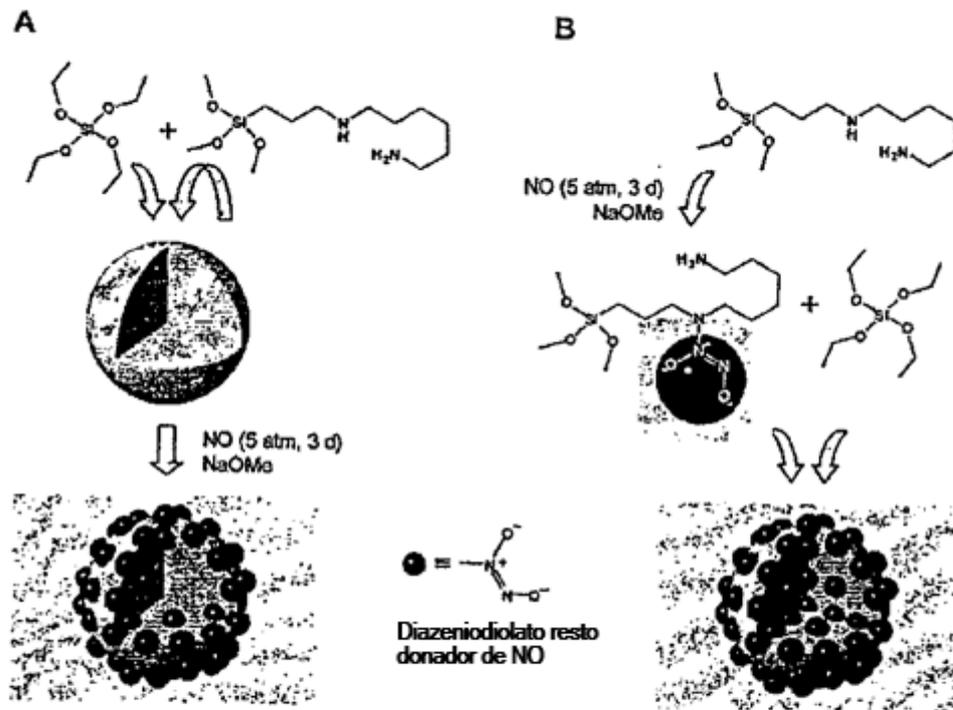


Fig.5

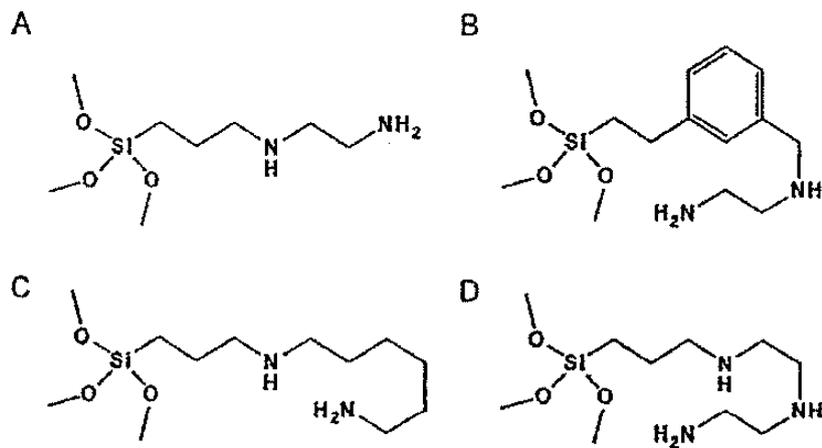


Fig. 6

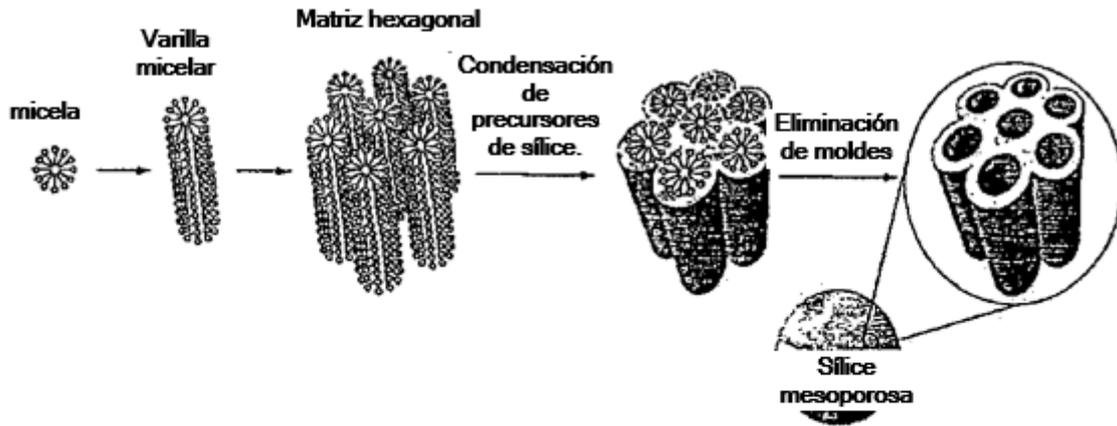


Fig.7

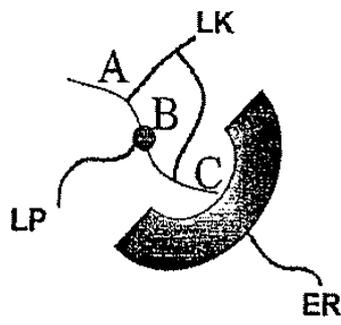
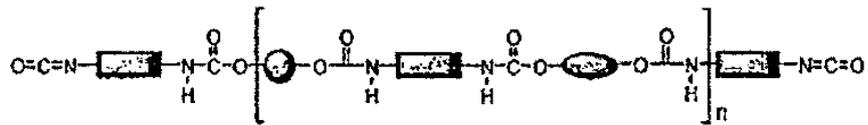


Fig. 8

A



B

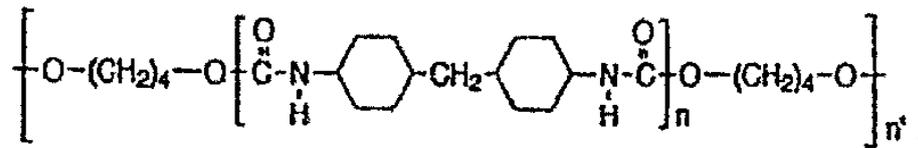


Fig.9

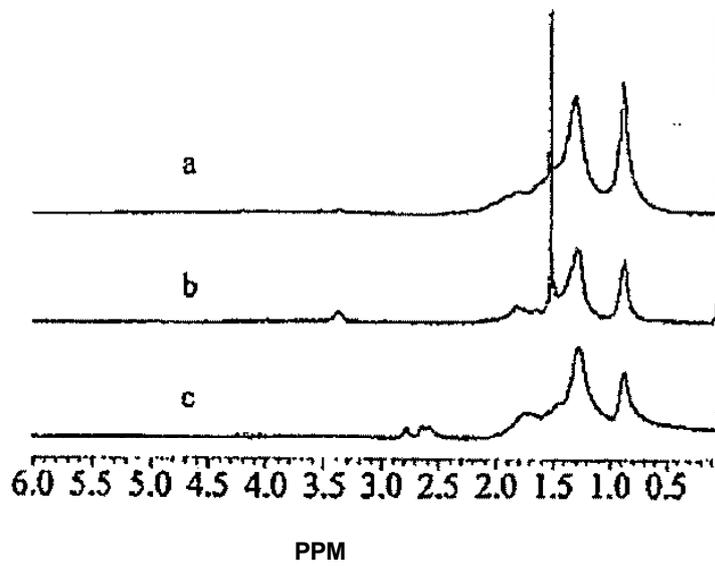
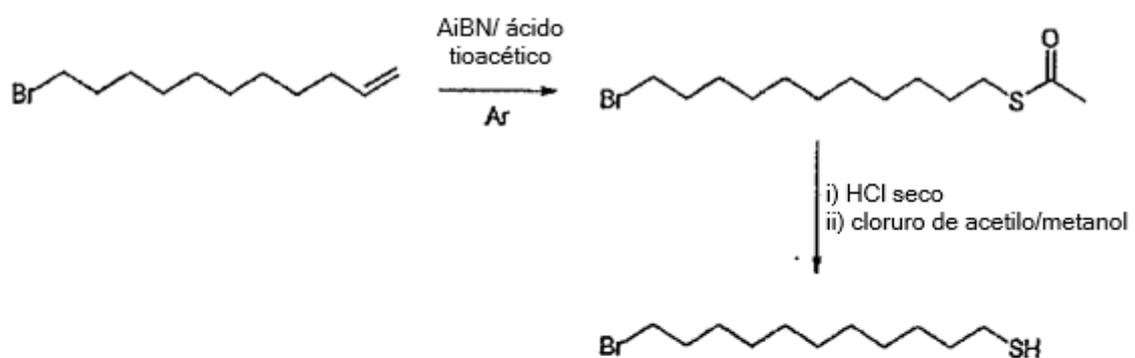


Fig.10

*Fig. 11*

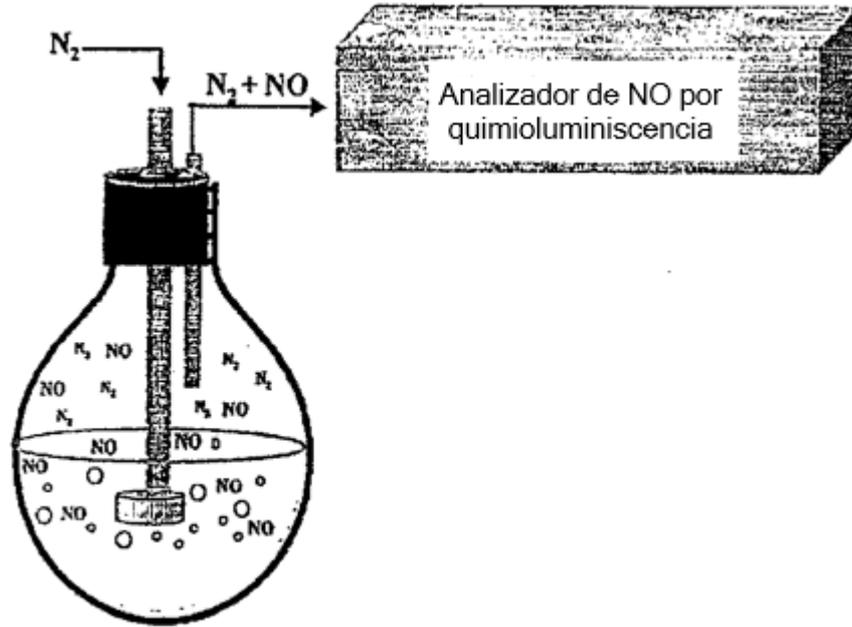


Fig.12

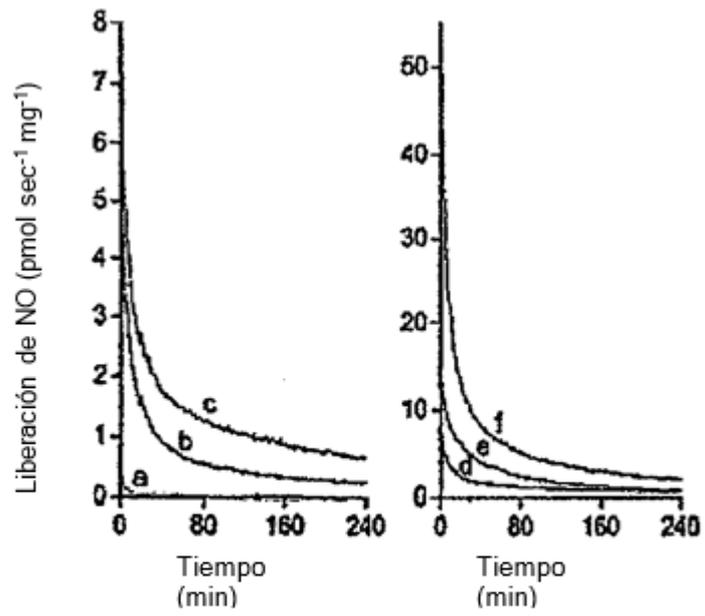


Fig. 13

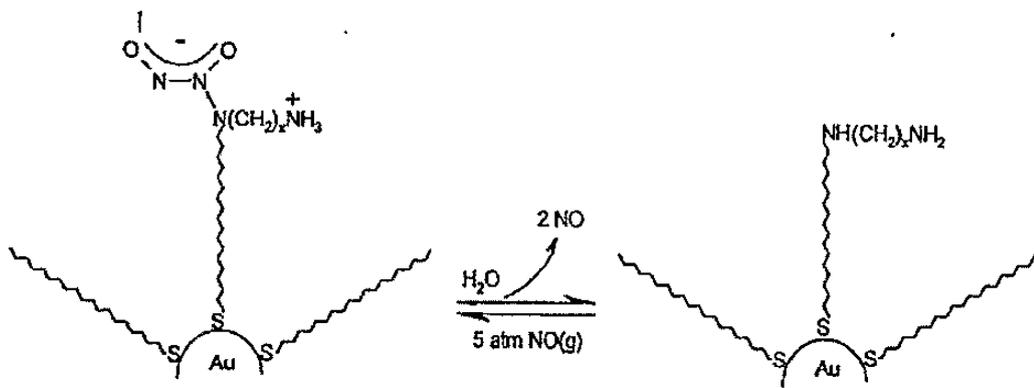


Fig. 14

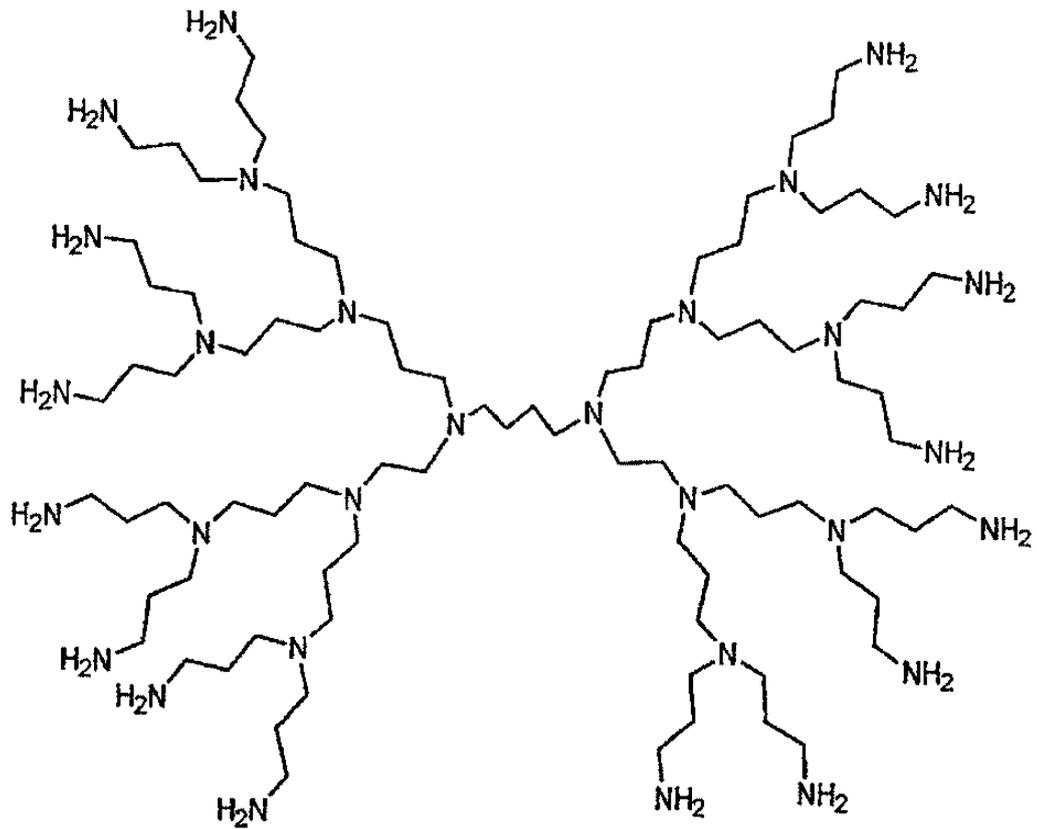


Fig. 15

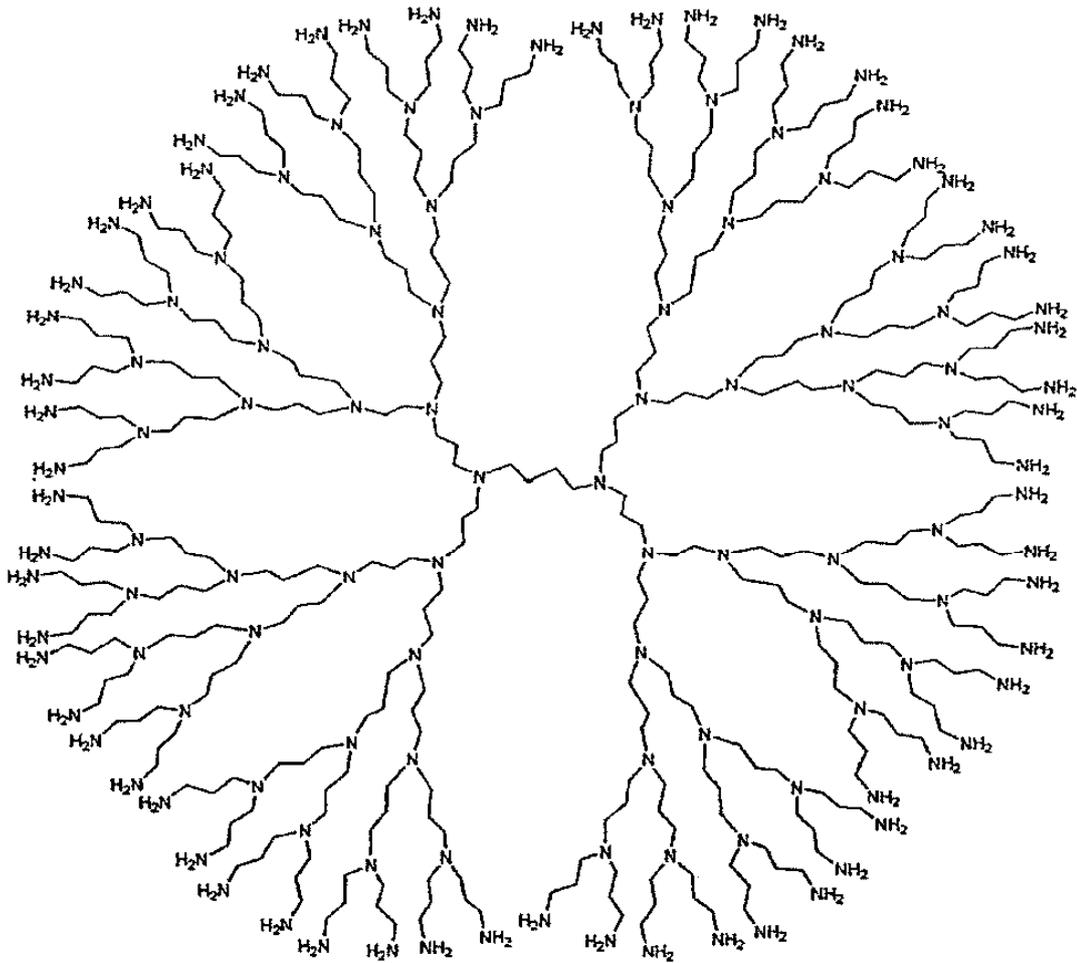


Fig. 16

DAB-C7-16 NaOMe/MeOH

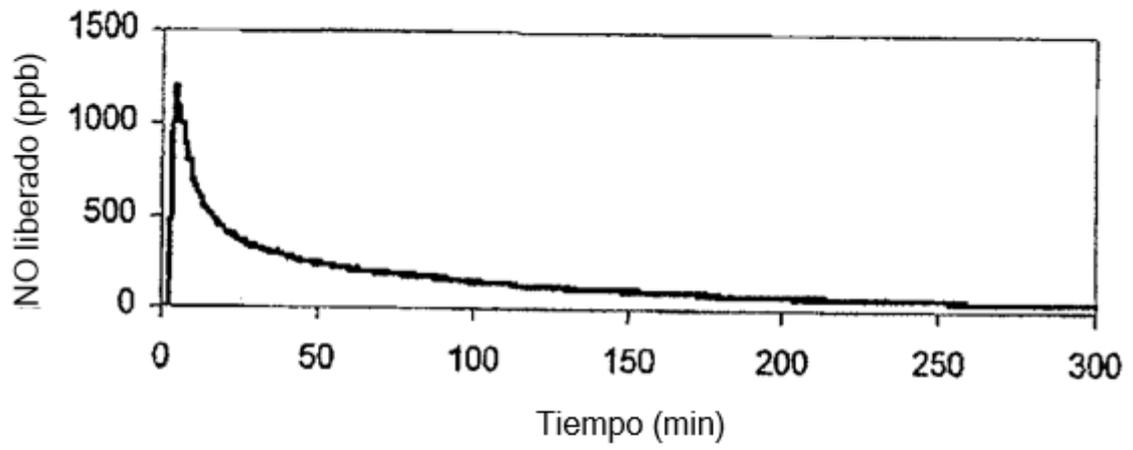


Fig.17

DAB-C7-64 NaOMe/MeOH

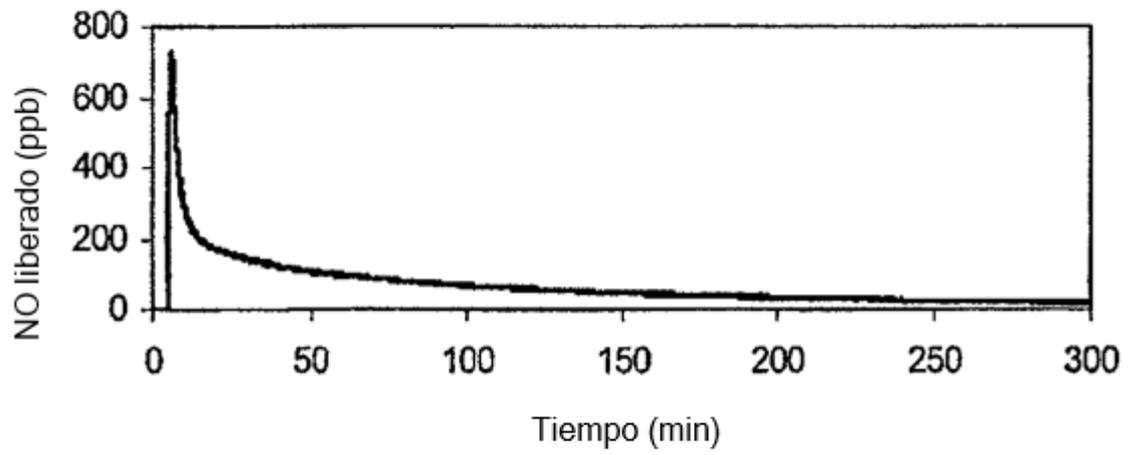
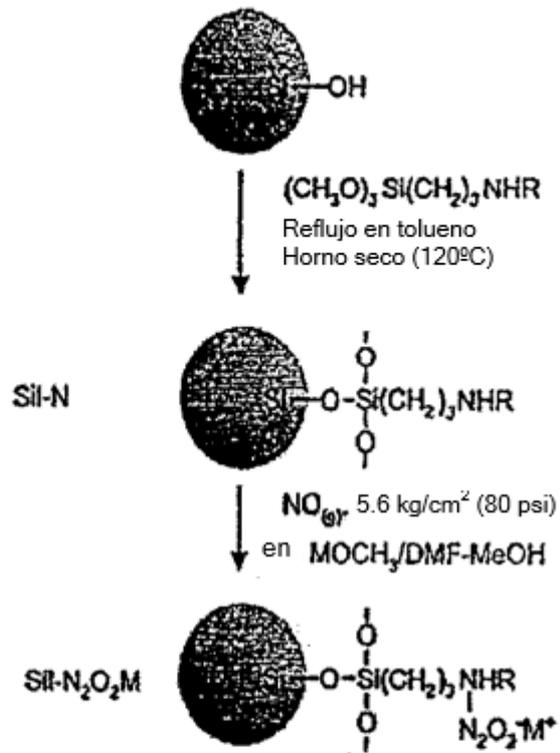


Fig.18



$\text{R} = \text{H}, \text{CH}_3, (\text{CH}_2)_2\text{NH}_2, \text{o} \cdot (\text{CH}_2)_6\text{NH}_2; \text{M}^+ = \text{Na}^+, \text{K}^+, \text{o} \cdot \text{Li}^+$

Fig. 19

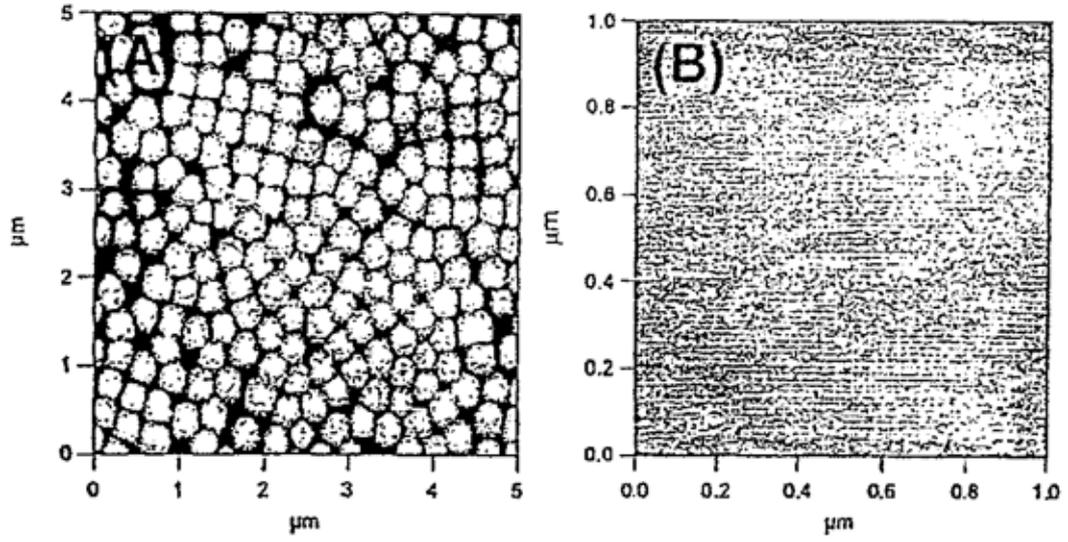


Fig.20A y B

(C)

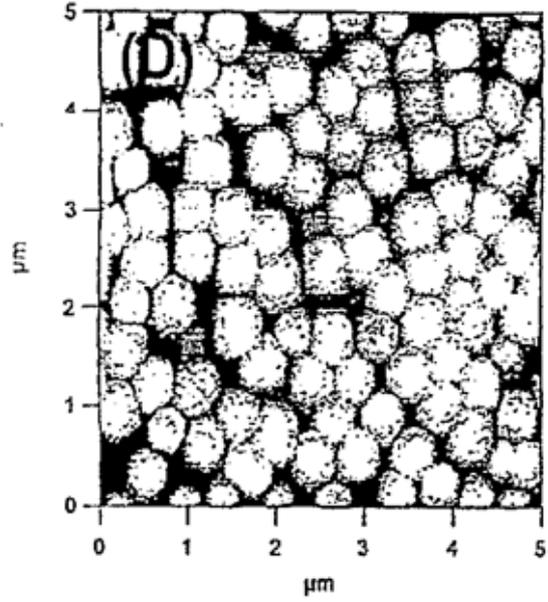
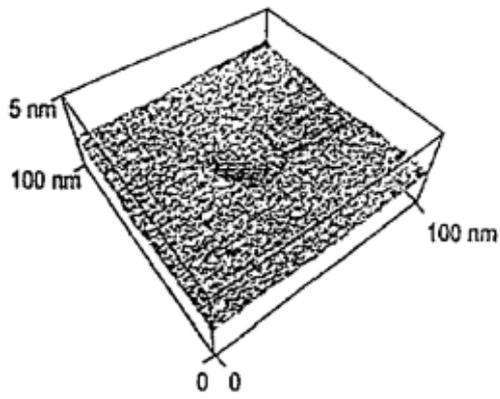
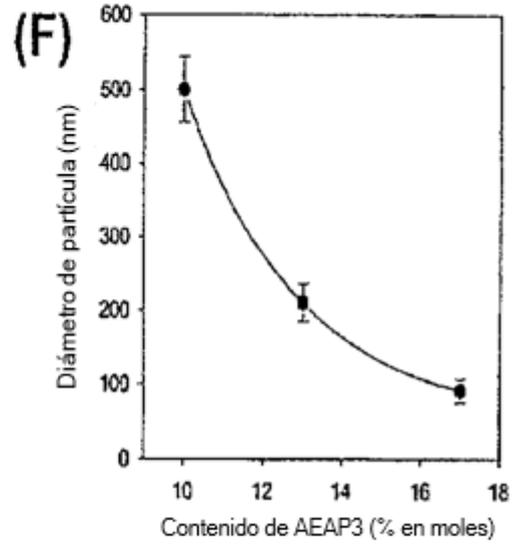
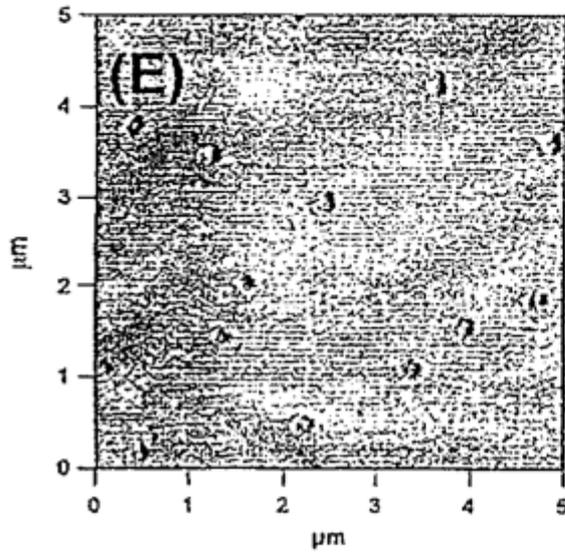


Fig.20C y D



Figs. 20E y F

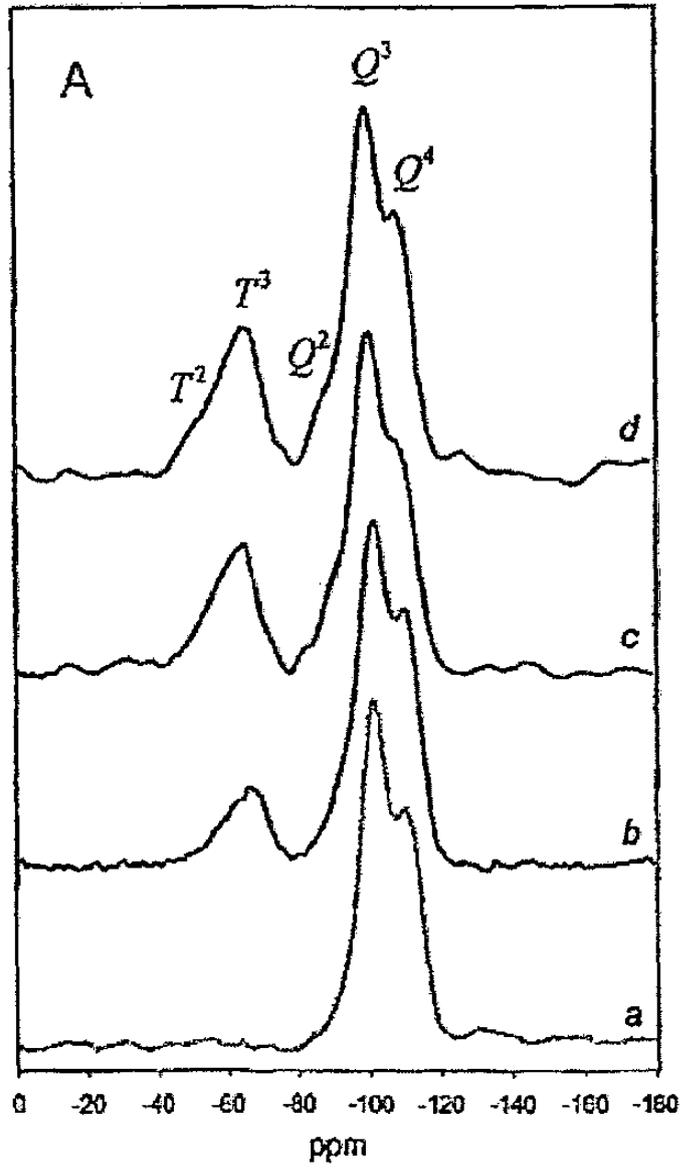


Fig. 21A

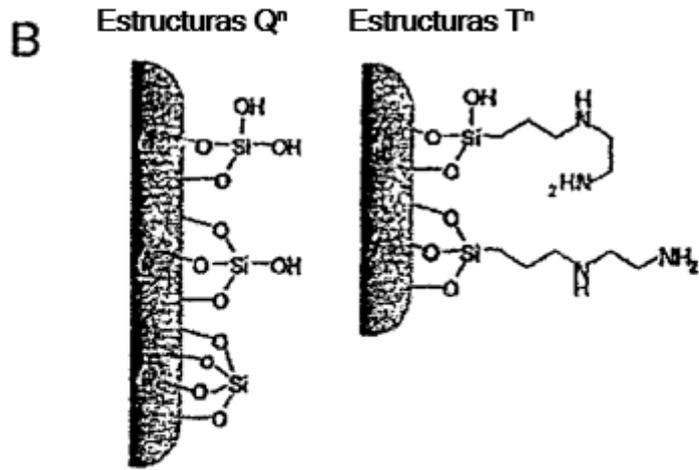
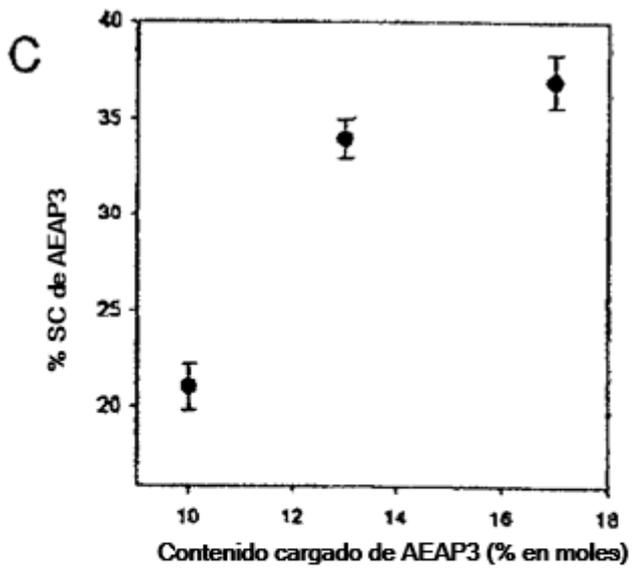


Fig.21 B y C



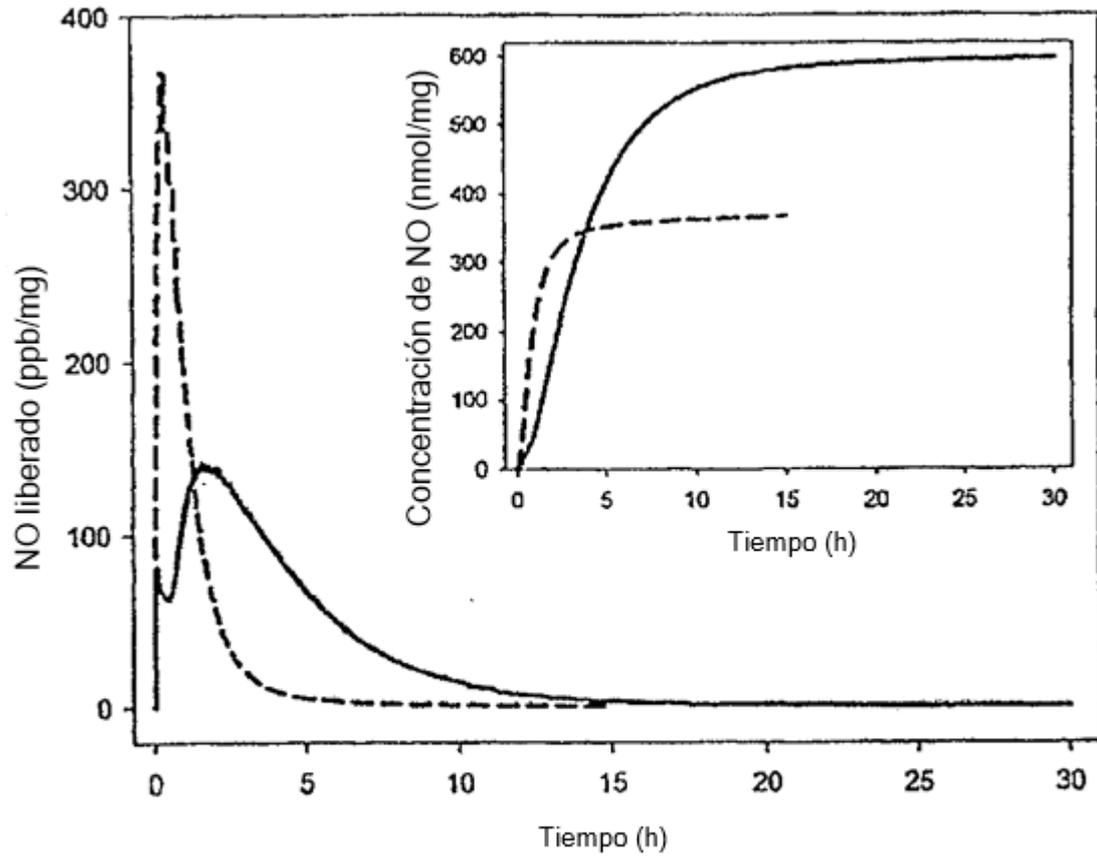


Fig.22

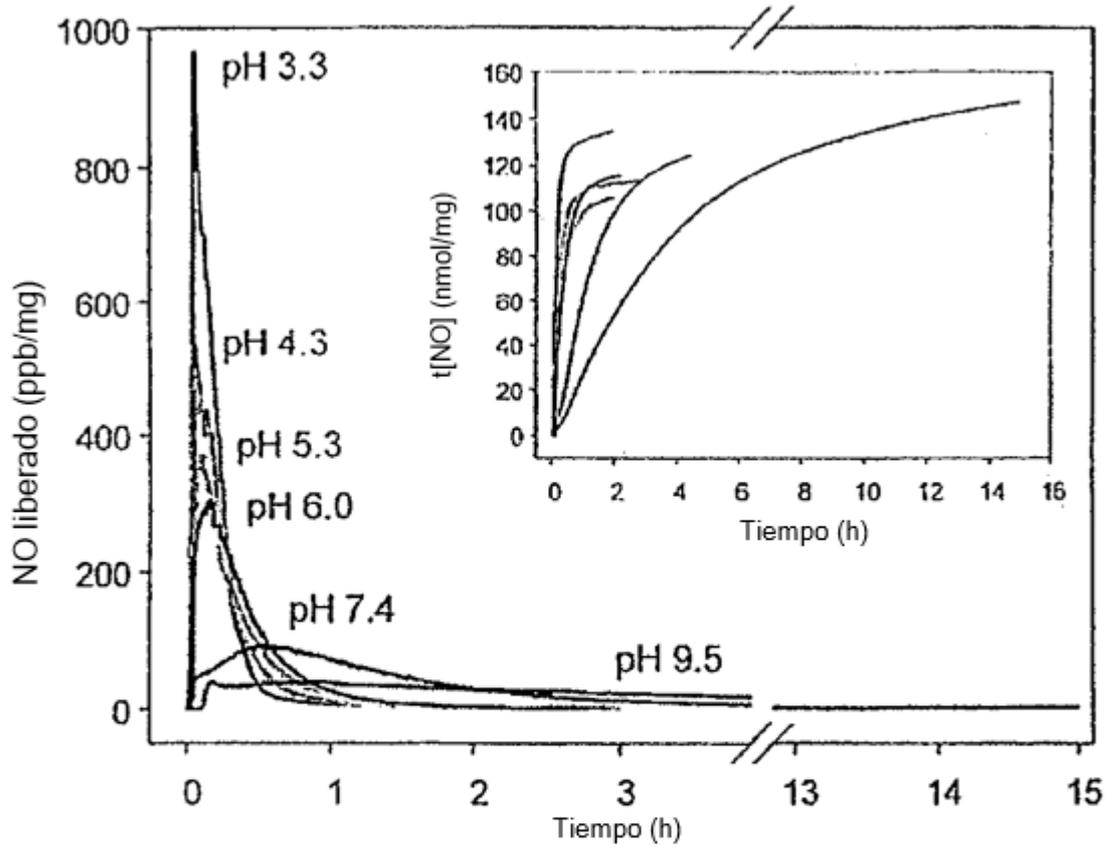


Fig.23

A

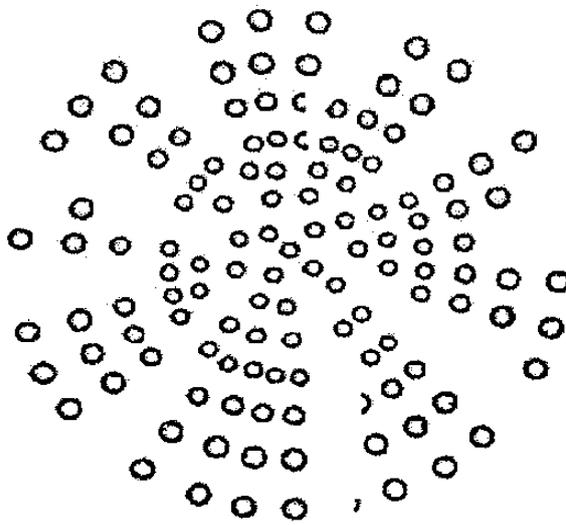


Fig. 24A

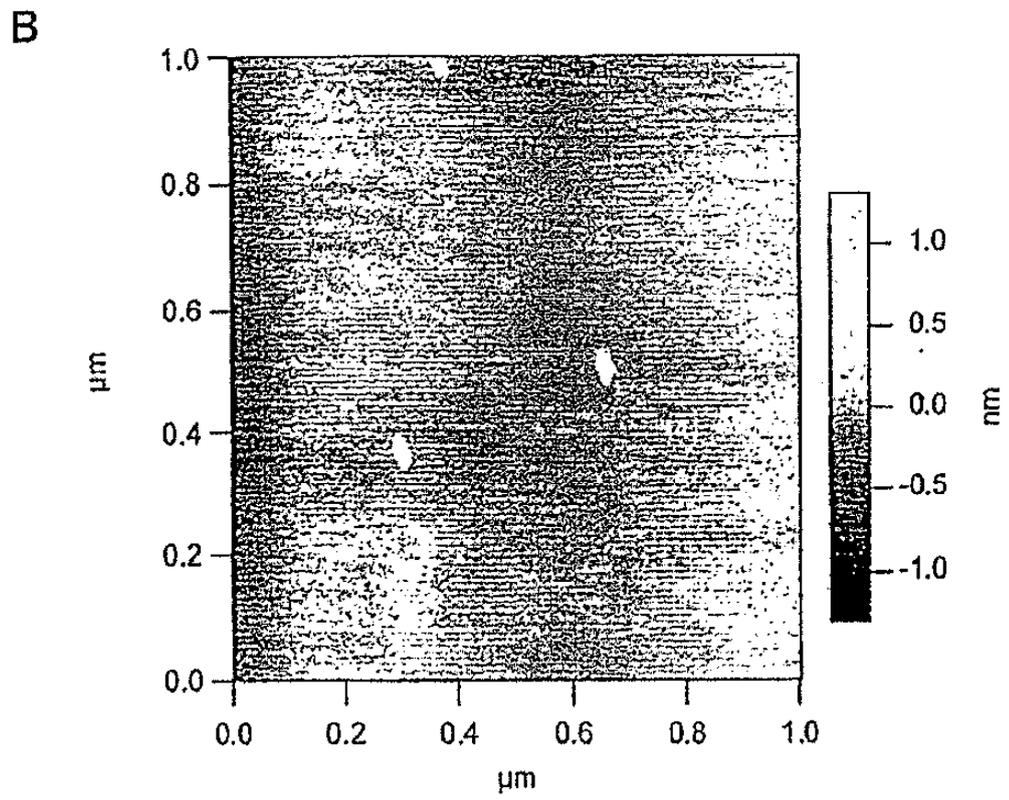


Fig. 24B

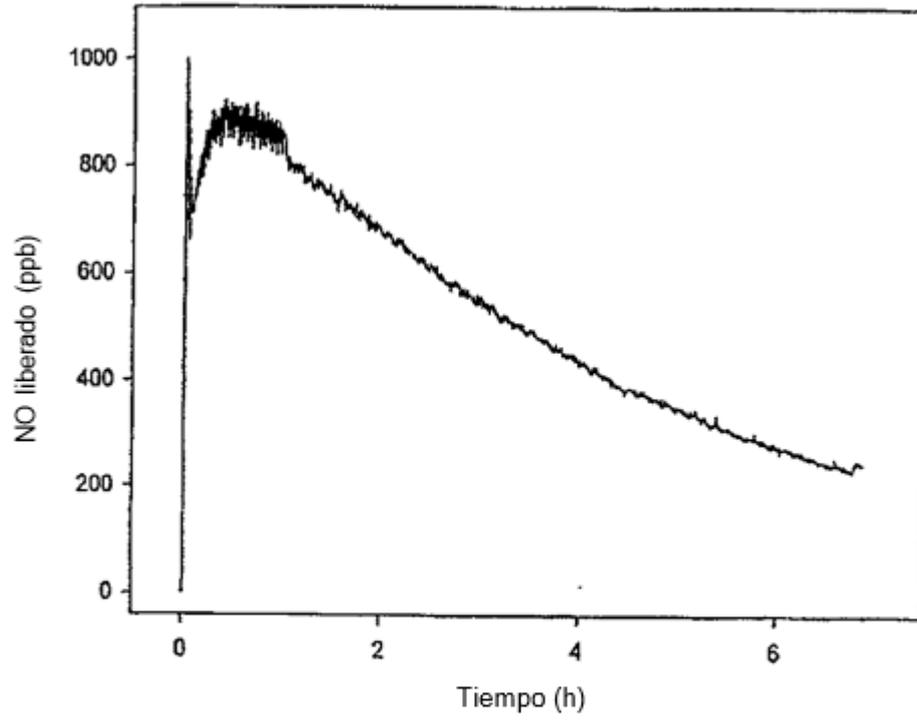


Fig.25

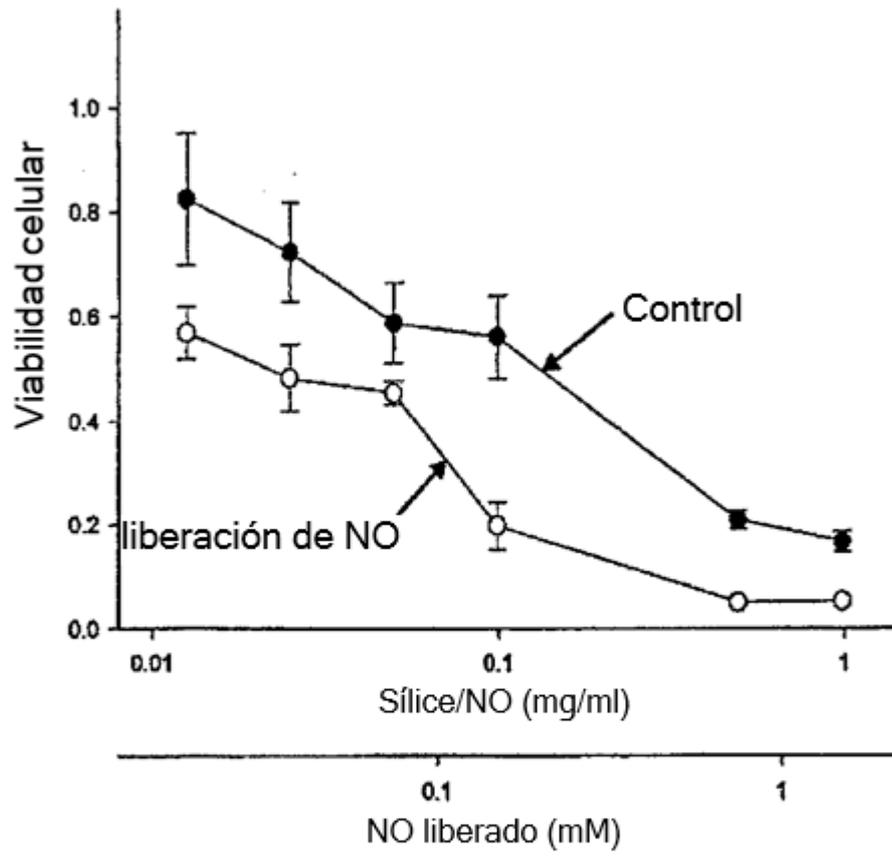


Fig.26

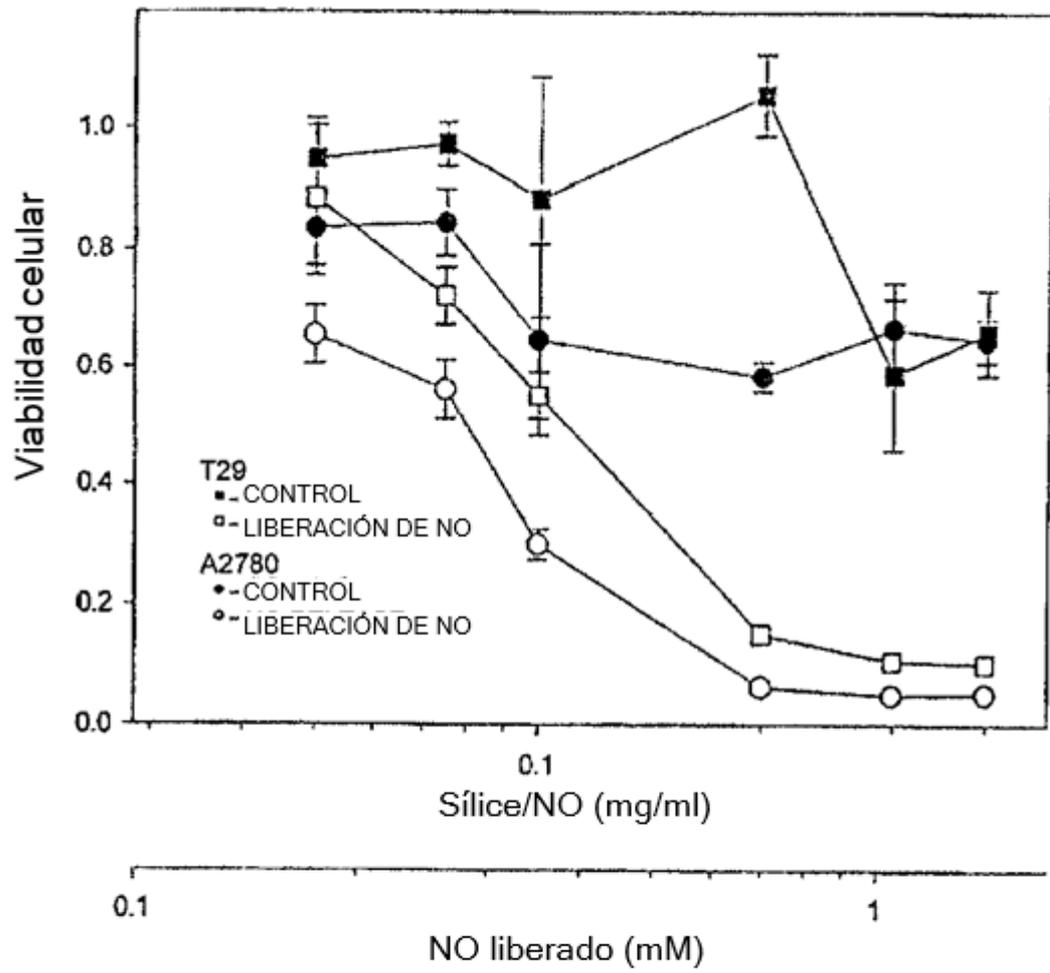


Fig.27

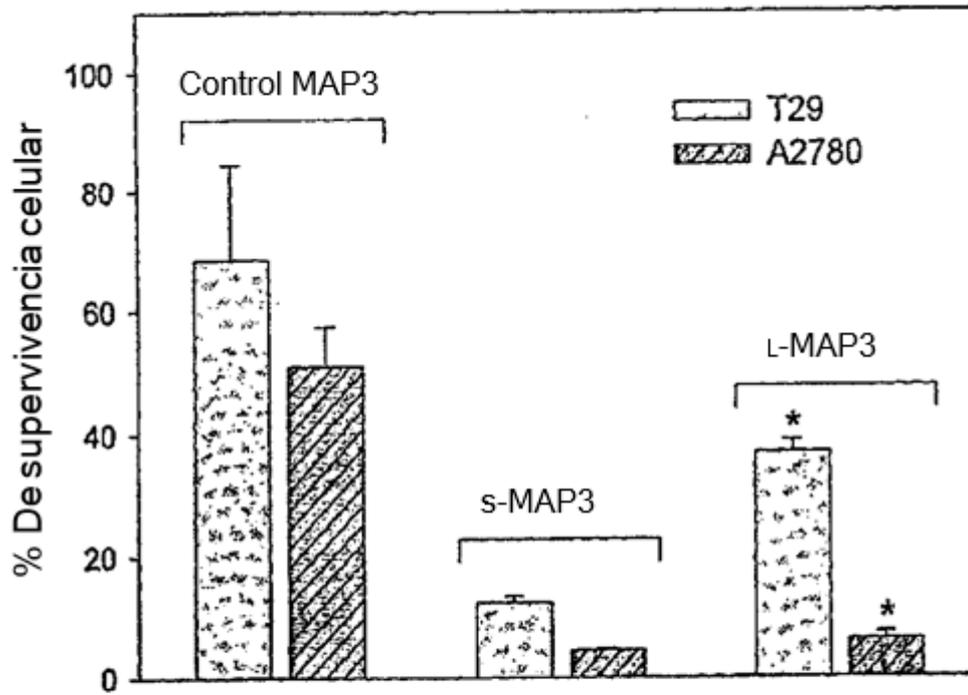


Fig.28

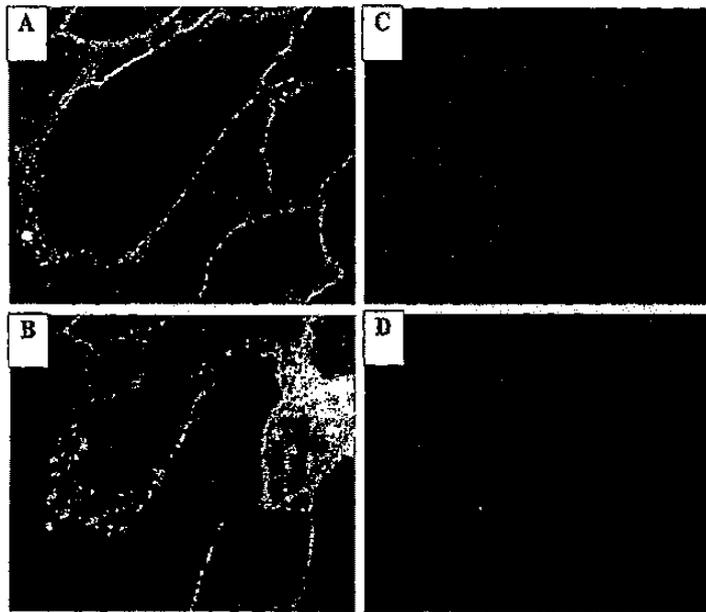


Fig. 29

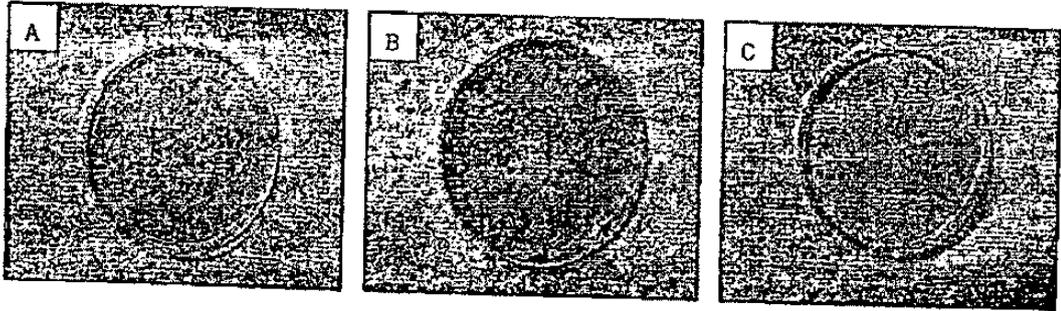


Fig. 30

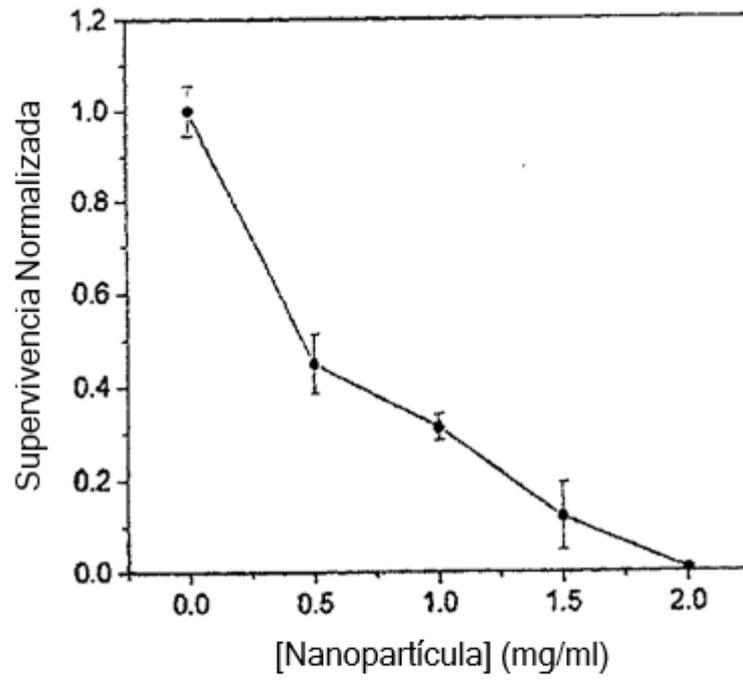


Fig.31

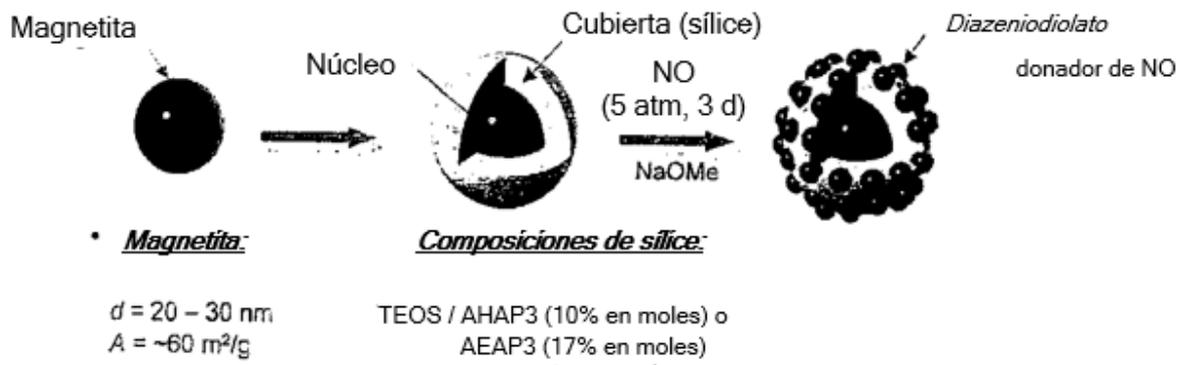


Fig.32

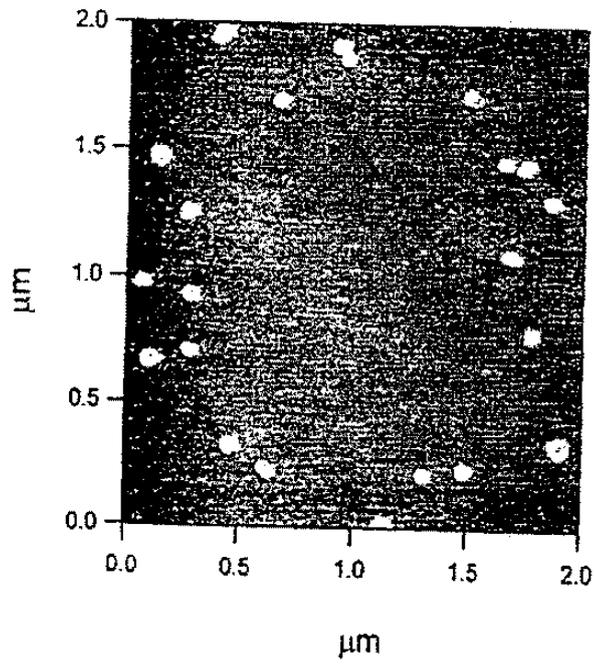


Fig. 33

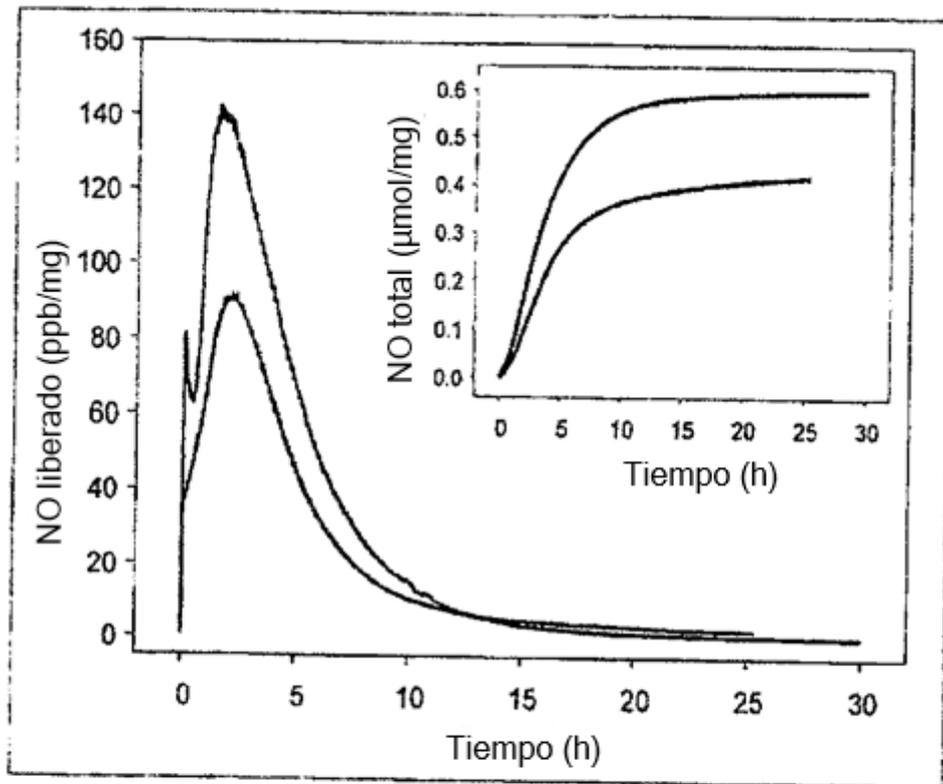


Fig.34

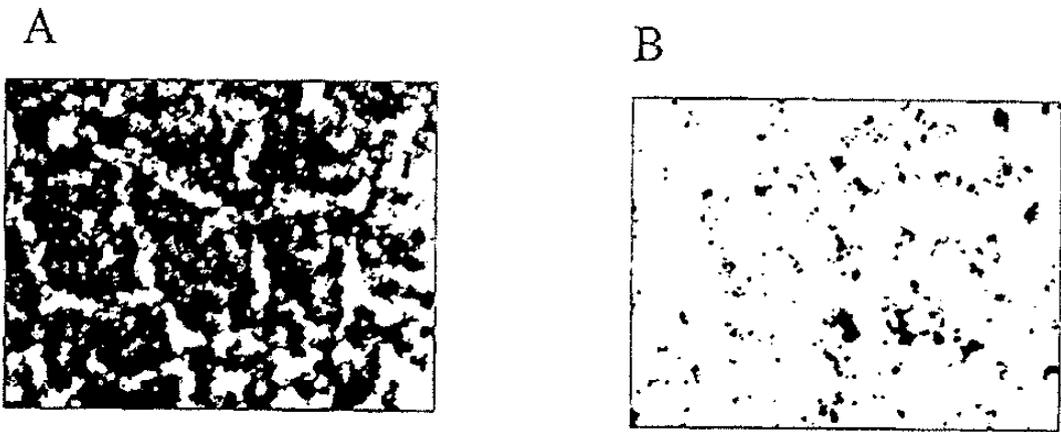


Fig. 35

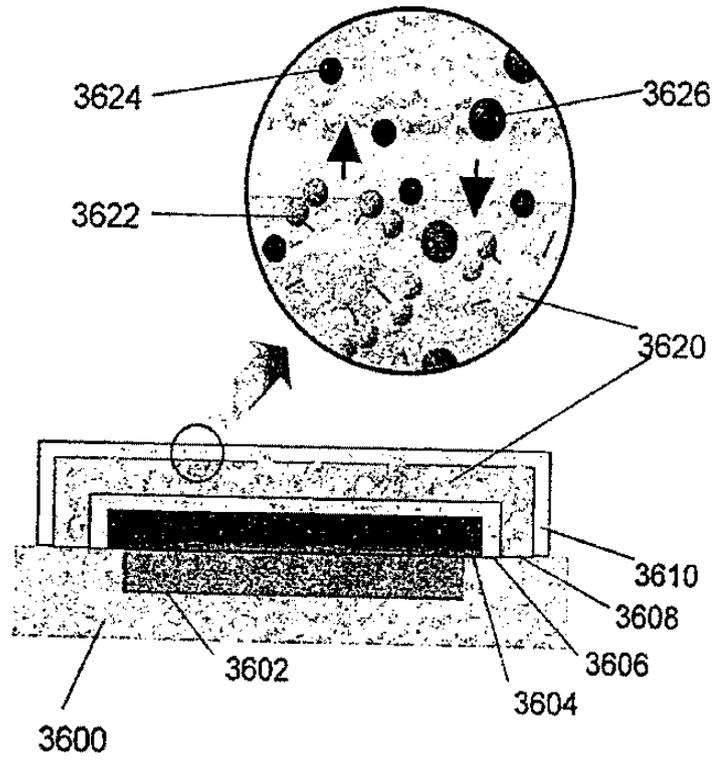


Fig. 36