

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 800**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 47/34</b>	(2007.01)
<b>A61K 47/36</b>	(2006.01)
<b>C08G 79/08</b>	(2006.01)
<b>C08G 73/02</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/51</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/68</b>	(2007.01)
<b>A61K 47/69</b>	(2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2013 PCT/US2013/028681**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14133549**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2013 E 13876452 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2961788**

54 Título: **Nanopartículas estabilizadas con composiciones de ácido nitrofenilborónico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.01.2020**

73 Titular/es:  
**CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
(100.0%)  
1200 East California Boulevard M/C 6-32  
Pasadena, CA 91125, US**

72 Inventor/es:  
**DAVIS, MARK E. y  
HAN, HAN**

74 Agente/Representante:  
**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 737 800 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Nanopartículas estabilizadas con composiciones de ácido nitrofenilborónico

## Campo técnico

5 La presente divulgación se refiere a nanopartículas portadoras y, en particular, a nanopartículas adecuadas para aportar compuestos de interés, y a composiciones relacionadas.

## Antecedentes

El aporte eficaz de compuestos de interés a células, tejidos, órganos y organismos ha constituido un desafío en la biomedicina, la formación de imágenes y otros campos en los que es deseable el aporte de moléculas de diversos tamaños y dimensiones a una diana predeterminada.

10 Ya sea para exámenes patológicos, tratamientos terapéuticos o para estudios de biología fundamental, existen diversos métodos conocidos y utilizados para aportar diversas clases de biomateriales y biomoléculas que están normalmente asociados con una actividad biológica y/o química de interés.

15 A medida que aumenta el número de moléculas adecuadas para ser utilizadas como agentes químicos o biológicos (por ejemplo fármacos, productos biológicos, agentes terapéuticos o de formación de imágenes), se ha demostrado que el desarrollo de un sistema de aporte adecuado para ser utilizado con compuestos de diversas complejidades, dimensiones y naturalezas químicas constituye un desafío particular.

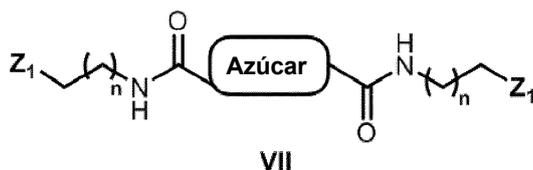
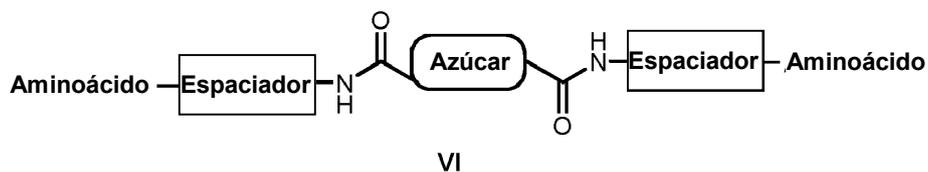
Las nanopartículas son estructuras útiles como vehículo para aportar agentes con diversos métodos de aporte. Existen diversos sistemas de aporte de nanopartículas, que utilizan una serie de estrategias diferentes para empaquetar, transportar y aportar un agente a dianas específicas.

20 El documento US2010/0040556 describe nanopartículas portadoras que comprenden un polímero que contiene un poliol acoplado con un polímero que contiene un ácido borónico, configuradas para presentar el polímero que contiene un ácido borónico a un entorno externo a la nanopartícula, y composiciones, métodos y sistemas relacionados.

## Compendio

25 En la presente memoria se proporcionan nanopartículas y composiciones, métodos y sistemas relacionados, que en diversas realizaciones proporcionan una herramienta multifuncional para el aporte eficaz y específico de un compuesto de interés. En particular, en diversas realizaciones, las nanopartículas descritas en la presente memoria se pueden usar como un sistema flexible para transportar y aportar una amplia gama de moléculas de diversos tamaños, dimensiones y naturalezas químicas a dianas predeterminadas.

30 De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona una nanopartícula que comprende un polímero que contiene un poliol y un polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico, en donde el polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico está conjugado con el polímero que contiene un poliol a través de un enlace éster de borato reversible, y en donde el polímero que contiene el poliol se deriva del acoplamiento de un compuesto de la Fórmula A con un compuesto de la Fórmula B; en donde el compuesto de la Fórmula A es:



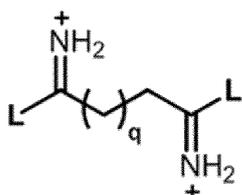
35

, 0

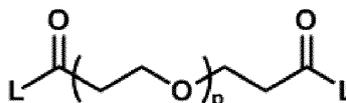


VIII

en donde el espaciador se selecciona independientemente entre cualquier grupo orgánico; el aminoácido se selecciona entre cualquier grupo orgánico que porte una amina libre y un grupo de ácido carboxílico libre; n es 1-20; y Z<sub>1</sub> se selecciona independientemente entre -NH<sub>2</sub>, -OH, -SH, y -COOH; y el compuesto de la Fórmula B es:



(XXIII)



(XIV)

5

en donde q es un número de 1 a 20; p es un número de 20 a 200; y US2010/0040556 L es un grupo lábil.

Uno o más compuestos de interés pueden ser transportados por la nanopartícula, como parte de o unidos al polímero que contiene un poliol y/o al polímero que contiene un ácido borónico.

10 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se describe una composición. La composición comprende una nanopartícula de acuerdo con el aspecto de la invención arriba descrito y un vehículo y/o excipiente adecuado.

En la presente memoria se describe un método para aportar un compuesto a una diana. El método comprende poner en contacto la diana con una nanopartícula descrita en la presente memoria, en donde el compuesto está incluido en el polímero que contiene un poliol o en el polímero que contiene un ácido borónico de la nanopartícula descrita en la presente memoria.

15 En la presente memoria se describe un sistema para aportar un compuesto a una diana. El sistema comprende al menos un polímero que contiene un poliol y un polímero que contiene un ácido borónico capaz de unirse recíprocamente a través de un enlace covalente reversible, para ser ensamblado en una nanopartícula descrita en la presente memoria que comprende el compuesto.

20 En la presente memoria se describe un método para administrar un compuesto a un individuo. El método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una nanopartícula descrita en la presente memoria, en donde el compuesto está incluido en el polímero que contiene un poliol y/o en el polímero que contiene un ácido borónico.

25 En la presente memoria se describe un sistema para administrar un compuesto a un individuo. El sistema comprende al menos un polímero que contiene un poliol y un polímero que contiene un ácido borónico capaz de unirse recíprocamente a través de un enlace covalente reversible, para ser ensamblado en una nanopartícula descrita en la presente memoria que une el compuesto que ha de ser administrado al individuo de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria.

30 En la presente memoria se describe un método para preparar una nanopartícula que comprende un polímero que contiene un poliol y un polímero que contiene un ácido borónico. El método comprende poner en contacto el polímero que contiene polioles con el polímero que contiene un ácido borónico durante un tiempo y bajo condiciones que permiten el acoplamiento del polímero que contiene polioles con el polímero que contiene un ácido borónico.

Se describen diversos polímeros que contienen un ácido borónico, que se ilustran en detalle en las siguientes secciones de la presente divulgación.

Se describen diversos polímeros que contienen polioles, que se ilustran en detalle en las siguientes secciones de la presente divulgación.

35 En la presente memoria también se describen nanopartículas que tienen un polímero que contiene un poliol, que se conjugan con polímeros que tienen un grupo de ácido nitrofenilborónico, lo que mejora la estabilidad de la nanopartícula al reducir su pKa.

En la presente memoria se describen nanopartículas guiadas que, en algunas realizaciones, pueden tener un solo ligando guiado que es capaz de promover el aporte de la nanopartícula a una diana particular, como una célula que expresa un compañero de unión para el ligando guiado de la partícula. Las nanopartículas guiadas de este tipo tienen ventajas sobre las nanopartículas con una pluralidad de ligandos guiados, como tener un tamaño total más pequeño, ya que tienen menos ligandos de superficie, y tienen menos ligandos para mediar la unión no específica a través de interacciones basadas en la avidéz, en lugar de interacciones basadas en afinidad. Además, las nanopartículas que contienen o portan un agente terapéutico se pueden guiar con éxito al lugar de interés (como una célula o tejido) utilizando solamente un único ligando guiado, aportando de este modo el agente terapéutico a la diana en una relación de ligando guiado-agente terapéutico muy alta. Este aspecto de las nanopartículas descritas puede aumentar significativamente la eficacia de la producción de dichos agentes terapéuticos, al tiempo que reduce la necesidad de emplear una gran cantidad de anticuerpos costosos para mediar en el guiado.

Las nanopartículas descritas en la presente memoria y las composiciones, métodos y sistemas relacionados se pueden usar en diversas realizaciones como una estructura molecular flexible adecuada para transportar compuestos de diversos tamaños, dimensiones y naturalezas químicas.

Las nanopartículas descritas en la presente memoria y las composiciones, métodos y sistemas relacionados se pueden usar en diversas realizaciones como sistemas de aporte que pueden proporcionar protección del compuesto transportado contra degradación, reconocimiento por el sistema inmunitario y pérdida debida a combinación con proteínas séricas o células sanguíneas.

Las nanopartículas descritas en la presente memoria y las composiciones, métodos y sistemas relacionados se pueden usar en diversas realizaciones como sistemas de aporte caracterizados por la estabilización estérica y/o la capacidad de aportar el compuesto a dianas específicas como tejidos, tipos específicos de células dentro de un tejido e incluso ubicaciones intracelulares específicas dentro de ciertos tipos de células.

Las nanopartículas descritas en la presente memoria y las composiciones, métodos y sistemas relacionados se pueden diseñar en diversas realizaciones para liberar un compuesto transportado de una manera controlable, incluyendo la liberación controlada de múltiples compuestos dentro de una misma nanopartícula a diferentes velocidades y/o en diferentes momentos.

Las nanopartículas descritas en la presente memoria y las composiciones, métodos y sistemas relacionados se pueden usar en diversas realizaciones para aportar compuestos con especificidad y/o selectividad mejoradas durante el guiado y/o el reconocimiento mejorado del compuesto por la diana en comparación con determinados sistemas de la técnica.

Las nanopartículas descritas en la presente memoria y las composiciones, métodos y sistemas relacionados se pueden usar en diversas realizaciones en relación con aplicaciones en las que es deseable el aporte controlado de un compuesto de interés, que incluyen, pero no se limitan a, aplicaciones médicas, tales como aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y clínicas. Algunas aplicaciones adicionales comprenden análisis biológicos, aplicaciones veterinarias y aporte de compuestos de interés en organismos distintos a los animales, y en particular en plantas.

Los detalles de una o más realizaciones de la divulgación se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción detallada y los ejemplos mostrados más abajo. Otras características, objetos y ventajas se evidenciarán a partir de la descripción detallada, los ejemplos y los dibujos, y de las reivindicaciones adjuntas.

### Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que están incorporados en esta memoria descriptiva y constituyen una parte de la misma, ilustran una o más realizaciones de la presente divulgación y, junto con la descripción detallada y los ejemplos, sirven para explicar los principios y las implementaciones de la divulgación.

La Figura 1 muestra una representación esquemática de una nanopartícula y un método relacionado para la formación pertinente en ausencia de un compuesto que contiene ácido borónico. El panel A muestra una representación esquemática de un polímero que contiene un poliol (MAP, 4) y un compuesto de interés (ácido nucleico) de acuerdo con una realización descrita en la presente memoria. El panel B muestra una nanopartícula formada al ensamblar el polímero que contiene un poliol y el compuesto que se muestran en el panel A.

La Figura 2 muestra una representación esquemática de una nanopartícula y un método de producción relacionado de acuerdo con una realización de la presente divulgación. El panel A muestra un polímero que contiene un poliol (MAP, 4) y un polímero que contiene un ácido borónico (BA-PEG, 6) junto con una molécula de interés (ácido nucleico) de acuerdo con una realización de la presente divulgación. El panel B muestra una nanopartícula estabilizada pegilada con BA formada al ensamblar los polímeros y el compuesto que se muestran en el panel A.

La Figura 3 muestra la formación de un complejo que comprende polímeros que contienen polioles y un compuesto de interés de acuerdo con una realización descrita en la presente memoria. En particular, la Figura 3 muestra los resultados de un ensayo de retardo en gel MAP con ADN plasmídico de acuerdo con una realización de la presente divulgación. En la Pista 1 está cargada una escalera de ADN. Las Pistas 2-8 muestran ADN plasmídico combinado

con MAP con una relación de carga aumentada incrementalmente. La relación de carga se define como la cantidad de cargas positivas en el MAP dividida por la cantidad de cargas negativas en el ácido nucleico.

5 La Figura 4 muestra la formación de un complejo que comprende polímeros que contienen polioles y un compuesto de interés de acuerdo con una realización descrita en la presente memoria. En particular, la Figura 4 muestra los resultados de un ensayo de retardo en gel MAP con ARNip de acuerdo con una realización de la presente divulgación. En la Pista 1 está cargada una escalera de ADN. Las Pistas 2-8 muestran ARNip combinado con MAP de una relación de carga aumentada incrementalmente.

10 La Figura 5 muestra propiedades de nanopartículas de acuerdo con algunas realizaciones descritas en la presente memoria. En particular, la Figura 5 muestra un diagrama que ilustra un gráfico del tamaño de partícula (determinado a partir de mediciones de dispersión dinámica de la luz (DLS)) frente a la relación de carga y del potencial zeta (una propiedad relacionada con la carga superficial de la nanopartícula) frente a la relación de carga para nanopartículas de plásmido MAP de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

15 La Figura 6 muestra propiedades de nanopartículas de acuerdo con algunas realizaciones descritas en la presente memoria. En particular, la Figura 6 muestra un diagrama que ilustra un gráfico del tamaño de partícula (DLS) frente a la relación de carga, y del potencial zeta frente a la relación de carga para nanopartículas de plásmido MAP PEGilado con BA de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

20 La Figura 7 muestra la estabilidad de sal de nanopartículas de plásmido MAP PEGilado con BA de acuerdo con una realización descrita en la presente memoria. Gráfico A: 5:1 BA-PEG + np + 1X PBS después de 5 minutos; Gráfico B: 5:1 BA-PEG + np, dializado 3X con 100 kDa + 1X PBS después de 5 minutos; Gráfico C: 5:1 prePEGilado con BA-PEG + 1X PBS después de 5 minutos; Gráfico D: 5:1 prePEGilado con BA-PEG, dializado 3X con 100 kDa + PBS después de 5 min.

25 La Figura 8 muestra el aporte de un agente a células humanas *in vitro* con nanopartículas de acuerdo con una realización descrita en la presente memoria. En particular, la Figura 8 muestra un diagrama que ilustra un gráfico de unidades de luz relativas (RLU), que son una medida de la cantidad de proteína luciferasa expresada a partir del plásmido pGL3 que ha sido aportado a las células frente a la relación de carga para una transfección MAP/pGL3 en células HeLa de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

30 La Figura 9 muestra el aporte de un agente a una diana con nanopartículas de acuerdo con una realización descrita en la presente memoria. En particular, la Figura 9 muestra un diagrama que ilustra un gráfico de la supervivencia celular frente a la relación de carga después de una transfección MAP/pGL3 de acuerdo con una realización de la presente divulgación. Los datos de supervivencia corresponden a los experimentos mostrados en la Figura 8.

35 La Figura 10 muestra el aporte de múltiples compuestos a una diana con nanopartículas de acuerdo con una realización descrita en la presente memoria. En particular, la Figura 10 muestra un diagrama que ilustra un gráfico de unidades de luz relativas (RLU) frente al tipo de partícula para una cotransfección de partículas de MAP que contienen pGL3 y siGL3 en una relación de carga de 5 +/- en células HeLa de acuerdo con una realización descrita en la presente memoria. La expresión siCON indica un ARNip con una secuencia de control.

La Figura 11 muestra el aporte de un compuesto a una diana con nanopartículas de acuerdo con una realización descrita en la presente memoria. En particular, la Figura 11 muestra un gráfico de las unidades de luz relativas (RLU) frente a la concentración de siGL3 para un aporte de MAP/siGL3 en una relación de carga de 5 +/- en células HeLa-Luc de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

40 La Figura 12 muestra una representación esquemática de una síntesis de un polímero que contiene un ácido borónico que presenta un ligando guiado de acuerdo con algunas realizaciones descritas en la presente memoria. En particular, la Figura 12 muestra un esquema para una síntesis de ácido borónico-disulfuro de PEG-transferrina de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

45 La Figura 13 muestra una representación esquemática de una síntesis de una nanopartícula de acuerdo con algunas realizaciones descritas en la presente memoria. En particular, la Figura 13 muestra un esquema para una formulación de una nanopartícula con polímero de camptotecina-ácido mícico (polímero de CPT-ácido mícico) en agua de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

50 La Figura 14 muestra una tabla que resume los tamaños de partículas y los potenciales zeta de nanopartículas formadas a partir del polímero de CPT-ácido mícico conjugado en agua, preparadas de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

La Figura 15 muestra una representación esquemática de una síntesis de una nanopartícula de acuerdo con algunas realizaciones descritas en la presente memoria. En particular, la Figura 15 muestra una formulación de una nanopartícula PEGilada con ácido borónico con polímero de CPT-ácido mícico y ácido borónico-disulfuro-PEG<sub>5000</sub> en agua de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

55 La Figura 16 muestra la estabilidad de sal de MAP-4/ARNip estabilizado sin PEG, nitroPEG-PEG y con 0,25% en

moles de Herceptin-PEG-nitroPBA. Formulado en una relación de carga 3 (+/-), se añadió 10x PBS a los 5 minutos, de modo que la solución resultante estaba en 1x PBS.

5 Las Figuras 17A y 17B muestran la absorción en células de (A) nanopartículas de MAP-CPT guiadas en una proporción creciente de Herceptin®-PEG-nitroPBA con respecto a nanopartícula en BT-474, (B) nanopartículas de MAP-CPT medianas o nanopartículas de MAP-CPT guiadas con o sin Herceptin® libre (10 mg/ml) en líneas celulares BT-474 (barras sombreadas) y MCF-7 (barras abiertas).

10 Las Figuras 18A y 18B muestran la farmacocinética plasmática de nanopartículas de MAP-CPT cortas, medianas y largas y nanopartículas de MAP-CPT guiadas en ratones BALB/c en inyecciones de 10 mg de CPT/kg. Como comparación se muestra CPT libre inyectada a razón de 10 mg/kg en ratones CD2F1. (A) Concentración plasmática de CPT unida a polímero en función del tiempo. (B) Concentración plasmática de CPT no conjugada en función del tiempo.

15 Las Figuras 19A-D muestran la biodistribución de nanopartículas de MAP-CPT (5 mg de CPT/kg) y MAP-CPT guiada (5 mg de CPT/kg, 29 mg de Herceptin®/kg) después de 4 y 24 h de tratamiento. (A) Porcentaje de dosis inyectada (ID) de CPT total por gramo de tumor, corazón, hígado, bazo, riñón o pulmón. (B) Porcentaje de CPT total en cada órgano no conjugada en tumor, corazón, hígado, bazo, riñón y pulmón. (C) Concentración total de CPT en plasma. (D) Porcentaje de la CPT total no conjugada en plasma.

20 La Figura 20 representa la microscopía de inmunofluorescencia confocal de secciones de tumor BT-474 tomadas de ratones desnudos NCr tratados con (A) MAP-CPT (5 mg de CPT/kg) a las 4 horas. (B) MAP-CPT (5 mg de CPT/kg) a las 24 horas. (C) MAP-CPT guiado (5 mg de CPT/kg, 29 mg de Herceptin®/kg) a las 4 horas. (D) MAP-CPT guiado (5 mg de CPT/kg, 29 mg de Herceptin®/kg) a las 24 horas. Emisión en panel izquierdo 440 nm (CPT, rosa), emisión en panel central izquierdo 519 nm (MAP, verde), emisión en panel central derecho 647 nm (Herceptin®, azul), superposición de imágenes en panel derecho.

25 La Figura 21 muestra el estudio de eficacia antitumoral en ratones desnudos NCr con tumores de xenoinjerto BT-474. Volumen medio del tumor en función del tiempo, los grupos que contenían Herceptin recibieron 2 dosis semanales, todos los demás grupos recibieron 3 dosis semanales.

La Figura 22 muestra los resultados de la eficacia antitumoral para ratones desnudos NCr tratados con (A) Herceptin a razón de 5,9 mg/kg. (B) Nanopartículas de MAP-CPT guiadas (5,9 mg de Herceptin®/kg y 1 mg de CPT/kg).

### Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

30 En la presente memoria se proporcionan nanopartículas y composiciones, métodos y sistemas relacionados que pueden ser utilizados en relación con el aporte de un compuesto de interés (en la presente memoria también carga) incluido en las nanopartículas, métodos para producir las nanopartículas descritas, métodos de tratamiento que utilizan las nanopartículas descritas, y *kits* para el ensamblaje de las nanopartículas descritas.

35 El término "nanopartícula", tal como se usa en la presente memoria, indica una estructura compuesta de dimensiones a nanoescala. En particular, las nanopartículas consisten normalmente en partículas con un tamaño dentro del intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000 nm y por lo general son esféricas, aunque son posibles diferentes morfologías dependiendo de la composición de las nanopartículas. La parte de la nanopartícula que está en contacto con un entorno externo a la nanopartícula se identifica generalmente como la superficie de la nanopartícula. En las nanopartículas descritas en la presente memoria, la limitación de tamaño se puede restringir a dos dimensiones, de modo que las nanopartículas descritas en la presente memoria incluyen una estructura compuesta que tiene un diámetro de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000 nm, dependiendo el diámetro específico de la composición de la nanopartícula y del uso previsto de la nanopartícula de acuerdo con el diseño experimental. Por ejemplo, las nanopartículas que han de ser utilizadas en diversas aplicaciones terapéuticas tienen normalmente un tamaño de aproximadamente 200 nm o menos, y las que se usan en particular para el aporte asociado a un tratamiento de cáncer tienen normalmente un diámetro de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nm. La expresión "nanopartícula guiada" denota una nanopartícula que está conjugada con un agente o ligando guiado.

45 Otras propiedades adicionales deseables de la nanopartícula, como las cargas superficiales y la estabilización estérica, también pueden variar en vista de la aplicación específica de interés. Algunas de las propiedades ejemplares que pueden ser deseables en aplicaciones clínicas, como el tratamiento del cáncer, se han descrito en la literatura científica. Los expertos pueden identificar propiedades adicionales después de leer la presente divulgación. Las dimensiones y propiedades de las nanopartículas se pueden detectar mediante técnicas conocidas en este campo. Las técnicas ejemplares para detectar dimensiones de las partículas incluyen, pero no se limitan a, la dispersión dinámica de la luz (DLS) y una variedad de microscopías, como la microscopía electrónica por transmisión (TEM) y la microscopía de fuerzas atómicas (AFM). Las técnicas ejemplares para detectar la morfología de las partículas incluyen, pero no se limitan a, TEM y AFM. Las técnicas ejemplares para detectar las cargas superficiales de la nanopartícula incluyen, pero no se limitan a, el método de potencial zeta. Algunas técnicas adicionales adecuadas para detectar otras propiedades químicas comprenden RMN por <sup>1</sup>H, <sup>11</sup>B, y <sup>13</sup>C y <sup>19</sup>F, espectroscopías UV/Vis e infrarrojo/Raman y espectroscopía de fluorescencia (cuando la nanopartícula se usa en combinación con marcadores fluorescentes) y técnicas adicionales identificables por los expertos.

Las nanopartículas y las composiciones, métodos y sistemas relacionados descritos en la presente memoria pueden ser utilizados para aportar un compuesto de interés, y en particular un agente, a una diana predeterminada.

5 Los términos "aportar" y "aporte", tal como se utilizan en la presente memoria, indican la actividad de influir en la ubicación espacial de un compuesto, y en particular controlar dicha ubicación. Por consiguiente, el aporte de un compuesto en el sentido de la presente divulgación indica la capacidad de influir en el posicionamiento y el movimiento del compuesto en un momento determinado bajo un cierto conjunto de condiciones, de modo que el posicionamiento y el movimiento del compuesto bajo esas condiciones se alteran con respecto al posicionamiento y el movimiento que tendría el compuesto en otro caso.

10 En particular, el aporte de un compuesto con respecto a un punto final de referencia indica la capacidad de controlar el posicionamiento y el movimiento del compuesto de tal modo que el compuesto se posicione finalmente en el punto final de referencia seleccionado. En un sistema *in vitro*, el aporte de un compuesto se asocia generalmente a una modificación correspondiente de las propiedades y actividades químicas y/o biológicas detectables del compuesto. En un sistema *in vivo*, el aporte de un compuesto también se asocia típicamente con la modificación de la farmacocinética y posiblemente la farmacodinámica del compuesto.

15 La farmacocinética de un compuesto indica la absorción, distribución, metabolismo y excreción del compuesto del sistema, normalmente proporcionados por el cuerpo de un individuo. En particular, el término "absorción" indica el proceso de una sustancia que entra en el cuerpo, el término "distribución" indica la dispersión o diseminación de sustancias en los fluidos y tejidos del cuerpo, el término "metabolismo" indica la transformación irreversible de los compuestos originales en metabolitos derivados, y el término "excreción" indica la eliminación de las sustancias del cuerpo. Si el compuesto está en una formulación, la farmacocinética también comprende la liberación del compuesto de la formulación, lo que indica el proceso de liberación del compuesto, normalmente un fármaco, de la formulación. El término "farmacodinámica" indica los efectos fisiológicos de un compuesto en el cuerpo o en microorganismos o parásitos dentro del cuerpo o sobre el mismo y los mecanismos de acción del fármaco y la relación entre la concentración y el efecto del fármaco. Los expertos podrán identificar las técnicas y procedimientos adecuados para detectar características y propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de un compuesto de interés y en particular de un agente de interés tal como un fármaco.

20

25

30 El término "agente", tal como se utiliza en la presente memoria, indica un compuesto capaz de mostrar una actividad química o biológica asociada a la diana. La expresión "actividad química", tal como se utiliza en la presente memoria, indica la capacidad de la molécula para realizar una reacción química. La expresión "actividad biológica", tal como se utiliza en la presente memoria, indica la capacidad de la molécula para influir en una materia viva. Las actividades químicas ejemplares de agentes comprenden la formación de una interacción covalente o electrostática. Las actividades biológicas ejemplares de agentes comprenden la producción y secreción de moléculas endógenas, la absorción y metabolización de moléculas endógenas o exógenas, y la activación o desactivación de la expresión genética, incluida la transcripción y traducción de un gen de interés.

35 El término "diana", tal como se utiliza en la presente memoria, indica un sistema biológico de interés, incluyendo organismos vivos unicelulares o pluricelulares o cualquier parte de los mismos, e incluye sistemas biológicos *in vitro* o *in vivo* o cualquier parte de los mismos.

40 Las nanopartículas descritas en la presente memoria incluyen un polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico acoplado a un polímero que contiene un polioliol, estando configurada la nanopartícula para presentar el polímero que contiene el ácido nitrofenilborónico a un entorno externo a la nanopartícula.

45 El término "polímero", tal como se utiliza en la presente memoria, indica una molécula grande compuesta por unidades estructurales repetitivas, normalmente conectadas por enlaces químicos covalentes. Un polímero adecuado puede ser lineal y/o ramificado, y puede adoptar la forma de un homopolímero o un copolímero. Si se usa un copolímero, el copolímero puede ser un copolímero aleatorio o un copolímero ramificado. Los polímeros ejemplares comprenden polímeros dispersables en agua y en particular polímeros solubles en agua. Por ejemplo, los polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, polisacáridos, poliésteres, poliamidas, poliéteres, policarbonatos, poliacrilatos, etc. Para utilidades y aplicaciones terapéuticas y/o farmacéuticas, el polímero debería tener un perfil de toxicidad bajo y, en particular, no ser tóxico o citotóxico. Los polímeros adecuados incluyen polímeros que tienen un peso molecular de aproximadamente 500.000 o menos. En particular, los polímeros adecuados pueden tener un peso molecular de aproximadamente 100.000 o menos.

50

55 Las expresiones "polímero que contiene un polioliol" o "polímero de polioliol(es)", tal como se utilizan en la presente memoria, indican un polímero que presenta múltiples grupos funcionales hidroxilo. En particular, el polímero que contiene un polioliol adecuado para formar las nanopartículas descritas en la presente memoria comprende polímeros que presentan al menos una parte de los grupos funcionales hidroxilo para una interacción de acoplamiento con al menos un ácido borónico de un polímero que contiene un ácido borónico. De acuerdo con la invención, el ácido borónico es un ácido nitrofenilborónico.

El término "presentar", tal como se utiliza se usa en la presente memoria con referencia a un compuesto o grupo funcional, indica la unión realizada para mantener la reactividad química del compuesto o grupo funcional unido. Por

consiguiente, un grupo funcional presentado en una superficie puede realizar, en las condiciones apropiadas, una o más reacciones químicas que caracterizan químicamente el grupo funcional.

5 Las unidades estructurales que forman polímeros que contienen polioles comprenden polioles monoméricos tales como pentaeritritol, etilenglicol y glicerina. Los polímeros ejemplares que contienen polioles comprenden poliésteres, poliéteres y polisacáridos. Los poliéteres ejemplares adecuados incluyen, pero no se limitan a, dioles y, en particular,  
 10 dioles con la fórmula general  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p\text{-H}$ , con  $p \geq 1$ , como polietilenglicol, polipropilenglicol y poli(tetrametilen éter) glicol. A modo de ejemplo, los polisacáridos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ciclodextrinas, almidón, glucógeno, celulosa, quitina y  $\beta$ -glucanos. Los poliésteres ejemplares adecuados incluyen, pero no se limitan a, policarbonato, polibutirato y tereftalato de polietileno, todos terminados con grupos terminales hidroxilo. Los polímeros  
 15 ejemplares que contienen polioles comprenden polímeros con un peso molecular de aproximadamente 500.000 o menos y, en particular, de aproximadamente 300 a aproximadamente 100.000.

Diversos polímeros que contienen polioles están disponibles comercialmente y/o se pueden producir utilizando técnicas y procedimientos identificables por los expertos. Algunos procedimientos ejemplares para la síntesis de un  
 20 polímero de polioliol ejemplar se han descrito previamente en la literatura científica, y otros están ilustrados en los Ejemplos 1-4. Los expertos podrán identificar procedimientos adicionales para producir polímeros que contienen polioles en vista de la presente divulgación.

Las expresiones "polímero que contiene un ácido borónico" o "polímero de BA", tal como se utilizan en la presente memoria, indican un polímero que contiene al menos un grupo de ácido borónico presentado para unirse a un grupo hidroxilo de un polímero que contiene polioles. En particular, los polímeros que contienen ácidos borónicos de las  
 25 nanopartículas descritas en la presente memoria incluyen un polímero que comprende en al menos una unidad estructural un ácido borónico sustituido con alquilo o arilo que contiene un enlace químico de carbono a boro. Algunos polímeros de BA adecuados comprenden polímeros en los que el ácido borónico está en una unidad estructural terminal o en cualquier otra posición adecuada para proporcionar al polímero resultante propiedades hidrófilas. Algunos polímeros ejemplares que contienen polioles comprenden polímeros con un peso molecular de  
 30 aproximadamente 40.000 o menos y en particular de aproximadamente 20.000 o menos, o de aproximadamente 10.000 o menos. De acuerdo con la invención, el ácido borónico es un ácido nitrofenilborónico.

Diversos polímeros que contienen ácidos borónicos están disponibles comercialmente y/o se pueden producir usando técnicas y procedimientos identificables por los expertos. Algunos procedimientos ejemplares para la síntesis de un  
 35 polímero de polioliol ejemplar se han descrito previamente en la literatura científica, y otros nuevos están ilustrados en los Ejemplos 5-8. Los expertos podrán identificar procedimientos adicionales para producir polímeros de BA en vista de la presente divulgación. De acuerdo con la presente invención, el ácido borónico es un ácido nitrofenilborónico.

En las nanopartículas descritas en la presente memoria, los polioles están acoplados a los polímeros de BA. Los términos "acoplado" o "acoplamiento", tal como se utilizan en la presente memoria con referencia a la unión entre dos  
 40 moléculas, indican una interacción que forma un enlace covalente reversible. De acuerdo con la presente invención, el polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico está conjugado con el polímero que contiene un polioliol con un enlace éster de borato reversible. En particular, en presencia de un medio adecuado, un ácido borónico presentado en el polímero de BA interactúa con grupos hidroxilo de los polioles a través de una interacción covalente por pares rápida y reversible para formar ésteres borónicos en un medio adecuado. El medio adecuado incluye agua y diversas  
 45 soluciones acuosas y medios orgánicos adicionales identificables por los expertos. En particular, cuando se ponen en contacto en un medio acuoso, los polímeros de BA y los polímeros de polioles reaccionan, produciendo agua como producto secundario. La interacción del polioliol con ácido borónico es generalmente más favorable en soluciones acuosas, pero se sabe que también tiene lugar en medios orgánicos. Además, los ésteres cíclicos formados con 1,2 y 1,3 dioles son generalmente más estables que sus equivalentes de ésteres acíclicos.

Por consiguiente, en una nanopartícula descrita en la presente memoria, al menos un ácido borónico del polímero que  
 50 contiene un ácido borónico está unido a grupos hidroxilo del polímero que contiene un polioliol con un enlace covalente reversible. La formación de un éster borónico entre los polímeros de BA y los polímeros de polioles se puede detectar mediante métodos y técnicas identificables por los expertos, como la resonancia magnética nuclear por boro-11 (RMN  $^{11}\text{B}$ ), la titulación potenciométrica, UV/Vis y las técnicas de detección fluorescente, dependiendo la técnica elegida de la naturaleza química específica y de las propiedades del ácido borónico y el polioliol que componen la nanopartícula.

Una nanopartícula resultante de las interacciones de acoplamiento de un polímero de BA descrito en la presente memoria con un polímero de polioliol descrito en la presente memoria presenta el polímero de BA en la superficie de la  
 55 partícula. En diversas realizaciones, las nanopartículas pueden tener un diámetro de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000 nm y una morfología esférica, aunque las dimensiones y la morfología de la partícula están determinadas en gran medida por el polímero de BA específico y los polímeros de polioliol utilizados para formar las nanopartículas y por los compuestos que son transportados sobre las nanopartículas de acuerdo con la presente divulgación.

En diversas realizaciones, el compuesto de interés transportado por la nanopartícula forma parte del polímero de BA y/o de los polímeros de polioliol. Algunos ejemplos de dichas realizaciones se proporcionan mediante nanopartículas en las que uno o más átomos de un polímero están reemplazados por un isótopo específico, por ejemplo,  $^{19}\text{F}$  y  $^{10}\text{B}$ , y por

lo tanto son adecuados como agentes para obtener imágenes de la diana y/o proporcionar tratamiento de radiación a la diana.

En diversas realizaciones, el compuesto de interés transportado por la nanopartícula está unido a un polímero, normalmente un polímero de polioliol, a través de un enlace covalente o no covalente. Algunos ejemplos de dichas realizaciones se proporcionan mediante nanopartículas en las que uno o más restos en al menos uno del polímero de polioliol y el polímero de BA se unen a uno o más compuestos de interés.

Los términos "unir", "unido" o "unión", tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a conectar o unificar mediante un enlace, grupo de enlace, fuerza o vínculo para mantener dos o más componentes juntos, lo que abarca una unión directa o indirecta tal como, por ejemplo, cuando un primer compuesto está unido directamente a un segundo compuesto, y las realizaciones en las que uno o más compuestos intermedios, y en particular moléculas, están dispuestos entre el primer compuesto y el segundo compuesto.

En particular, en algunas realizaciones se puede unir un compuesto al polímero de polioliol o polímero de BA a través de un enlace covalente del compuesto con restos adecuados del polímero. Algunos ejemplos de enlaces covalentes se ilustran en el Ejemplo 19, donde la unión del fármaco camptotecina con el polímero del ácido mícico se realiza a través de un enlace éster biodegradable, y en el Ejemplo 9, en donde la unión de transferrina con BA-PEG<sub>5000</sub> se realiza a través de pegilación de la transferrina.

En algunas realizaciones, el polímero se puede diseñar o modificar para permitir la unión de un compuesto específico de interés, por ejemplo, añadiendo uno o más grupos funcionales capaces de unir específicamente un grupo funcional correspondiente en el compuesto de interés. Por ejemplo, en diversas realizaciones es posible PEGilar la nanopartícula con un BA-PEG-X, donde X puede ser un grupo de maleimida o yodoacetilo o cualquier grupo lábil que reaccione específicamente con un tiol o no específicamente con una amina. El compuesto que ha de ser unido puede reaccionar entonces con los grupos maleimida o yodoacetilo después de la modificación para expresar un grupo funcional tiol. El compuesto que ha de ser unido también se puede modificar con aldehídos o grupos cetona y éstos pueden reaccionar a través de una reacción de condensación con los dioles en los polioles para producir acetales o cetales.

En algunas realizaciones, un compuesto de interés se puede unir al polímero de polioliol o al polímero de BA a través de enlaces no covalentes, tales como enlaces iónicos e interacciones intermoleculares, entre un compuesto que ha de ser unido y un resto adecuado del polímero. En el Ejemplo 10 se ilustran enlaces no covalentes ejemplares.

Un compuesto de interés se puede unir a la nanopartícula antes, durante o después de la formación de la nanopartícula, por ejemplo a través de la modificación de un polímero y/o de cualquier compuesto unido en el material compuesto en forma de partículas. En la sección de Ejemplos se ilustran procedimientos ejemplares para realizar la unión de un compuesto en la nanopartícula. Los expertos pueden identificar procedimientos adicionales para unir un compuesto a un polímero de BA, polímero de polioliol u otros componentes de la nanopartícula descrita en la presente memoria (por ejemplo, un compuesto de interés previamente introducido) después de leer la presente divulgación.

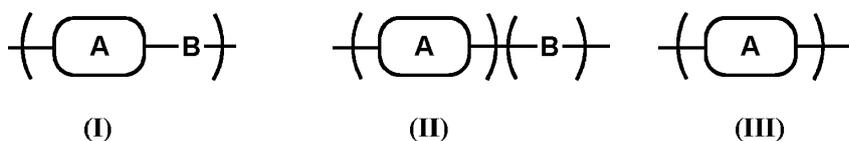
En algunas realizaciones, al menos un compuesto de interés unido a un polímero de BA presentado en la nanopartícula descrita en la presente memoria es un agente que puede ser utilizado como un ligando guiado. En particular, en diversas realizaciones, la nanopartícula une al polímero de BA uno o más agentes que han de ser utilizados como un ligando guiado, y al polímero de polioliol y/o el polímero de BA, uno o más agentes que han de ser aportados a una diana de elección.

Las expresiones "ligando guiado" o "agente guiado", tal como se utilizan en la presente divulgación, indican cualquier molécula que pueda ser presentada sobre la superficie de una nanopartícula con el fin de aplicarla a una diana específica, y en particular el reconocimiento celular específico, por ejemplo posibilitando la unión del receptor celular de la nanopartícula. Los ejemplos de ligandos adecuados incluyen, pero no se limitan a, vitaminas (por ejemplo, ácido fólico), proteínas (por ejemplo, transferrina y anticuerpos monoclonales), monosacáridos (por ejemplo, galactosa), péptidos y polisacáridos. En particular, los ligandos guiados pueden ser anticuerpos contra determinados receptores celulares de la superficie, como anti-VEGF, moléculas pequeñas como el ácido fólico y otras proteínas, como la holo-transferrina.

La elección del ligando, como apreciarán los expertos, puede variar dependiendo del tipo de aporte deseado. Como otro ejemplo, el ligando puede ser un agente de permeabilización de membrana o permeable a la membrana, como la proteína TAT del VIH-1. La proteína TAT es una activación transcripcional viral que se importa activamente al núcleo celular. Torchilin, VP et al, PNAS. 98, 8786 8791, (2001). Los ligandos guiados adecuados unidos a un polímero de BA comprenden normalmente un espaciador flexible tal como un óxido de (poli)etileno con un ácido borónico unido a su extremo distal (véase el Ejemplo 9).

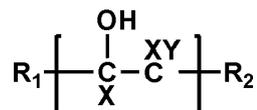
En diversas realizaciones, al menos uno de los compuestos comprendidos o unidos al polímero de polioliol y/o al polímero de BA (incluido un ligando guiado) puede consistir en un agente y en particular un fármaco, que ha de ser aportado a una diana, por ejemplo un individuo, en la que se debe ejercer la actividad química o biológica, por ejemplo la actividad terapéutica.

- La selección de un polímero de polioli y un polímero de BA adecuados para formar una nanopartícula descrita en la presente memoria se puede realizar en función del compuesto y la diana de interés. En particular, la selección de un polímero adecuado que contiene un polioli y un polímero de BA adecuado para formar una nanopartícula descrita en la presente memoria se puede realizar proporcionando polímeros de polioli y polímero de BA candidatos, y seleccionando un polímero de polioli y un polímero de BA capaces de formar una interacción de acoplamiento en el sentido de la divulgación, teniendo el polímero de BA y el polímero de polioli seleccionados una composición química tal que, en vista del compuesto de interés y el ligando guiado comprendidos en los polímeros de polioli y/o los polímeros de BA, o unidos a los mismos, el polímero de polioli es menos hidrófilo que el polímero de BA. La detección del polímero de BA en la superficie de la nanopartícula y la presentación relacionada al entorno externo a la nanopartícula se pueden llevar a cabo mediante la detección del potencial zeta, que puede demostrar la modificación de la superficie de la nanopartícula tal como se ilustra en el Ejemplo 12 (véase en particular la Figura 6). Algunos procedimientos adicionales para detectar la carga superficial de las partículas y la estabilidad de las partículas en soluciones salinas incluyen la detección de cambios en el tamaño de partícula, como los ejemplificados en el Ejemplo 12 (véase en particular la Figura 7) y procedimientos adicionales identificables por los expertos.
- En diversas realizaciones, los polímeros que contienen polioles comprenden una o más de al menos una de las siguientes unidades estructurales



en donde

A es un resto orgánico de la fórmula



(IV)

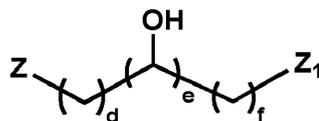
- en la que
- R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan independientemente entre cualquier grupo orgánico o basado en carbono con un peso molecular de aproximadamente 10 kDa o menos;
- X se selecciona independientemente entre un grupo alifático, que contiene uno o más de -H, -F, -C, -N u -O; e
- Y se selecciona independientemente entre -OH o un resto orgánico que porta un grupo hidroxilo (-OH), incluyendo, pero no limitado a, -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, -CF<sub>2</sub>OH, -CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>OH, y C(R<sub>1</sub>G<sub>1</sub>)(R<sub>2</sub>G<sub>2</sub>)(R<sub>3</sub>G<sub>3</sub>)OH, siendo R<sub>1</sub>G<sub>1</sub>, R<sub>1</sub>G<sub>2</sub> y R<sub>1</sub>G<sub>3</sub> independientemente funcionalidades de base orgánica,
- y
- B es un resto orgánico que enlaza uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> de un primer resto A con uno de los R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> de un segundo resto A.

El término "resto", tal como se utiliza en la presente memoria, indica un grupo de átomos que constituye una parte de una molécula o especie molecular más grande. En particular, un resto se refiere a un constituyente de una unidad estructural polimérica repetida. Los restos ejemplares incluyen especies de ácidos o bases, azúcares, carbohidratos, grupos alquilo, grupos arilo y cualquier otro constituyente molecular útil en la formación de una unidad estructural polimérica.

La expresión "resto orgánico", tal como se utiliza en la presente memoria, indica un resto que contiene un átomo de carbono. En particular, los grupos orgánicos incluyen compuestos naturales y sintéticos, y compuestos que incluyen heteroátomos. Los restos orgánicos naturales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, la mayoría de los azúcares, algunos alcaloides y terpenoides, carbohidratos, lípidos y ácidos grasos, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos y aminoácidos, vitaminas y grasas y aceites. Los grupos orgánicos sintéticos se refieren a compuestos que se preparan mediante reacción con otros compuestos.

En diversas realizaciones, uno o más compuestos de interés se pueden unir a (A), a (B) o a (A) y (B).

En diversas realizaciones, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> tienen independientemente la fórmula:



(V)

en donde

5 d es de 0 a 100,

e es de 0 a 100,

f es de 0 a 100,

Z es un enlace covalente que une un resto orgánico a otro y en particular a otro resto A o a un resto B tal como se define en la presente memoria, y

10 Z<sub>1</sub> se selecciona independientemente entre -NH<sub>2</sub>, -OH, -SH, y -COOH.

En diversas formas de realización, Z se puede seleccionar independientemente entre -NH-, -C(=O)NH-, -NH-C(=O), -SS-, -C(=O)O-, -NH(=NH)<sub>2</sub><sup>+</sup>- u -O-C(=O)-.

En diversas realizaciones en las que la unidad estructural A de un polímero que contiene un polioliol tiene la fórmula (IV), X puede ser C<sub>v</sub>H<sub>2v+1</sub>, donde v = 0-5, e Y puede ser -OH.

15 En algunas realizaciones, R1 y/o R2 tienen la fórmula (V), donde Z es -NH(=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)- y/o Z<sub>1</sub> es NH<sub>2</sub>.

De acuerdo con la presente invención, el polímero que contiene el polioliol se deriva del acoplamiento de un compuesto de la Fórmula A con un compuesto de la Fórmula B, siendo el compuesto de la fórmula A:



VI

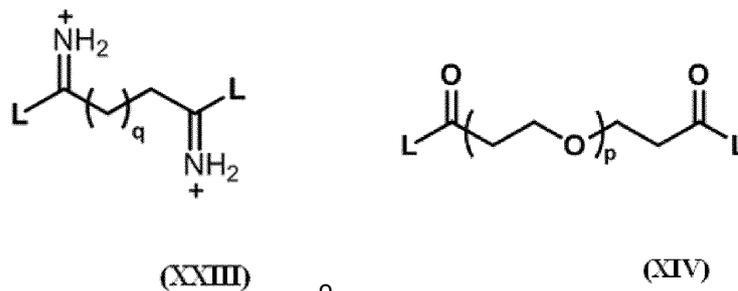


VII



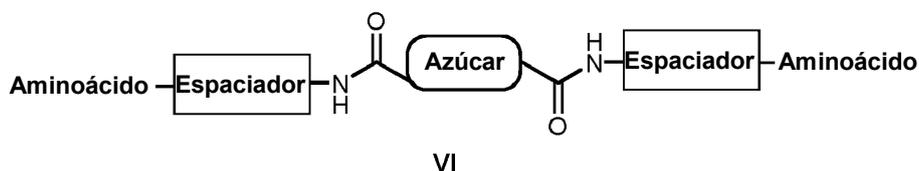
VIII

20 en donde el espaciador se selecciona independientemente entre cualquier grupo orgánico; el aminoácido se selecciona entre cualquier grupo orgánico que porte una amina libre y un grupo de ácido carboxílico libre; n es 1-20; y Z<sub>1</sub> se selecciona independientemente entre -NH<sub>2</sub>, -OH, -SH y -COOH; y el compuesto de la Fórmula B es:

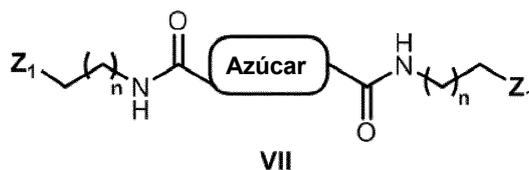


en donde q es un número de 1 a 20; p es un número de 20 a 200; y L es un grupo lábil.

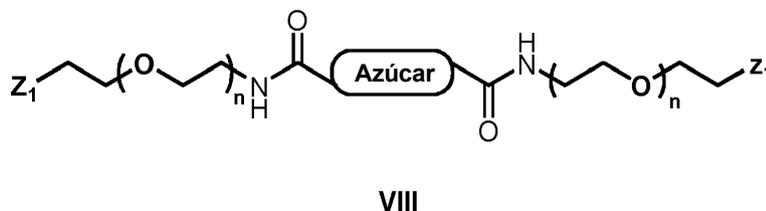
De acuerdo con la invención, en polímeros que contienen un poliol de la partícula descrita en la presente memoria (A) se selecciona independientemente entre las fórmulas



5



, y



;

en donde

10 el espaciador se selecciona independientemente entre cualquier resto orgánico, y en particular puede incluir grupos alquilo, fenilo o alcoxi que contienen opcionalmente un heteroátomo, tal como azufre, nitrógeno, oxígeno o flúor;

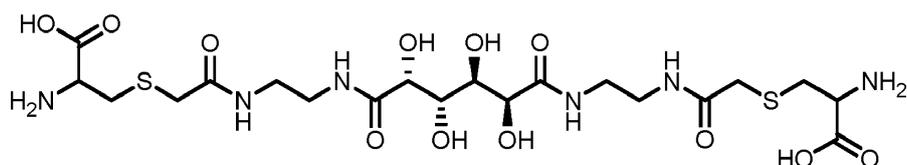
el aminoácido se selecciona entre cualquier grupo orgánico que porte una amina libre y un grupo de ácido carboxílico libre;

n es de 1 a 20; y

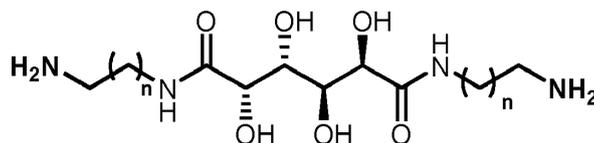
Z<sub>1</sub> se selecciona independientemente entre -NH<sub>2</sub>, -OH, -SH y -COOH.

15 En diversas realizaciones, Z<sub>1</sub> es NH<sub>2</sub>, y/o el azúcar puede ser cualquier monosacárido tal como glucosa, fructosa, manitol, sacarosa, galactosa, sorbitol, xilosa o galactosa.

En varias realizaciones, en polímeros que contienen un poliol de la partícula descrita en la presente memoria, una o más unidades estructurales (A) pueden tener independientemente la fórmula

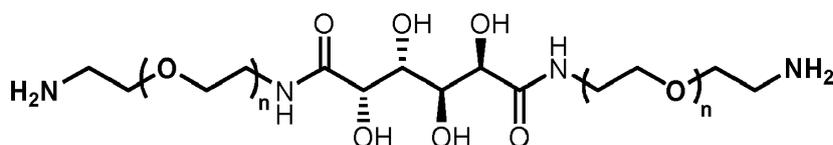


IX



X

y



XI

5 En diversas realizaciones, (B) puede estar formado por cualquier compuesto lineal, ramificado, simétrico o asimétrico que enlaza los dos restos (A) a través de grupos funcionales.

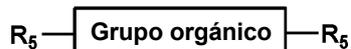
En diversas realizaciones, (B) puede estar formado por un compuesto en el que al menos dos grupos reticulables enlazan los dos restos (A).

En algunas realizaciones, (B) contiene un grupo orgánico neutro, catiónico o aniónico, cuya naturaleza y composición dependen de la naturaleza química del compuesto que haya de ser enlazado de forma covalente o no covalente.

10 Los restos catiónicos ejemplares de (B) para utilizarlos con carga aniónica incluyen, pero no se limitan a, grupos orgánicos que portan grupos de amidinas, amonios cuaternarios, grupos de amina primaria, grupos de amina secundaria, grupos de amina terciaria (protonada por debajo de sus pKa) e imidazolios.

Los restos aniónicos ejemplares contenidos en (B) para utilizarlos con carga catiónica incluyen, pero no se limitan a, grupos orgánicos que portan sulfonatos de fórmula, nitratos de fórmula, carboxilatos de fórmula y fosfonatos.

15 En particular, uno o más restos (B) catiónicos o aniónicos para utilizarlos con carga aniónica y cargas catiónicas respectivamente pueden tener independientemente una fórmula general de:

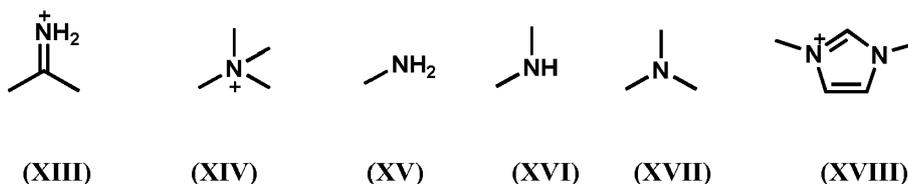


(XII)

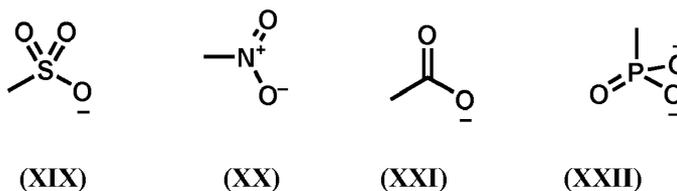
en donde  $R_5$  es un grupo electrófilo que puede estar enlazado de forma covalente con A cuando A contiene grupos nucleófilos. Los ejemplos de  $R_5$  en este caso incluyen, pero no se limitan a,

20  $-C(=O)OH$ ,  $-C(=O)Cl$ ,  $-C(=O)NHS$ ,  $-C(=NH_2^+)OMe$ ,  $-S(=O)OCl-$ ,  $-CH_2Br$ , ésteres alquílicos y aromáticos, alquinos terminales, tosilato y mesilato, entre otros. En el caso en el que el resto A contiene grupos terminales electrófilos,  $R_5$  portará grupos nucleófilos tales como  $-NH_2$  (aminas primarias),  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $N_3$  y aminas secundarias.

25 En particular, cuando el resto (B) es un resto catiónico (B) para uso con carga aniónica, el "grupo orgánico" es un resto orgánico que puede tener un esqueleto con una fórmula general que consiste en  $C_mH_{2m}$  con  $m \geq 1$  y otros heteroátomos, y ha de contener al menos uno de los siguientes grupos funcionales que incluyen amidinas de la fórmula (XIII), amonios cuaternarios de la fórmula (XIV), grupos de amina primaria de la fórmula (XV), grupos de amina secundaria de la fórmula (XVI), grupos de amina terciaria de la fórmula (XVII) (protonada por debajo de sus pKa) e imidazolios de la fórmula (XVIII)



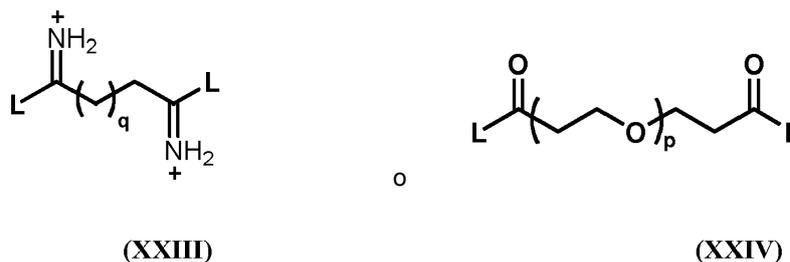
5 En algunas realizaciones, cuando el resto (B) es un resto aniónico (B) para utilizarlo con carga catiónica, el "grupo orgánico" puede tener un esqueleto con una fórmula general que consiste en  $C_mH_{2m}$  con  $m \geq 1$  y otros heteroátomos, y ha de contener al menos uno de los siguientes grupos funcionales que incluyen sulfonatos de la fórmula (XIX), nitratos de la fórmula (XX), carboxilatos de la fórmula (XXI) y fosfonatos de la fórmula (XXII)



En realizaciones en las que (B) está formado por carboxilatos (XXI), también se puede unir un compuesto que contiene grupos amino o hidroxilo primarios a través de la formación de un péptido o un enlace éster.

10 En realizaciones en las que (B) está formado por un grupo amino primario de la fórmula (XV) y/o un grupo amino secundario de la fórmula (XVI), también se puede unir un compuesto que contiene grupos de ácido carboxílico a través de la formación de un enlace peptídico.

De acuerdo con la presente invención, (B) se selecciona independientemente entre



en donde

15 q es de 1 a 20, y en particular puede ser 5;

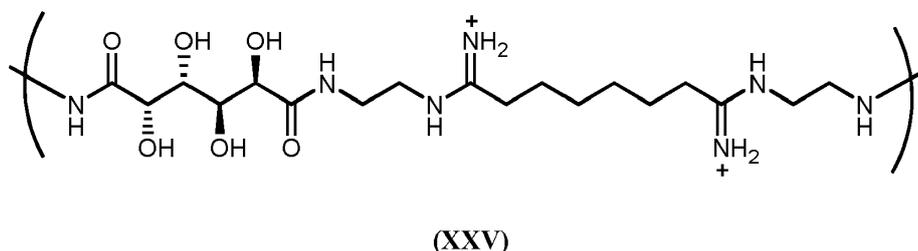
p es de 20 a 200; y

L es un grupo lábil.

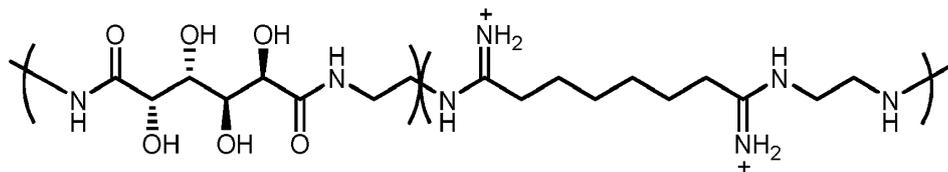
20 La expresión "grupo lábil", tal como se utiliza en la presente memoria indica un fragmento molecular que sale con un par de electrones en la escisión del enlace heterolítico. En particular, un grupo lábil puede consistir en aniones o moléculas neutras, y la capacidad de un grupo lábil para salir está en correlación con el  $pK_a$  del ácido conjugado, estando asociado un menor  $pK_a$  con una mejor capacidad de grupo lábil. Los grupos lábiles aniónicos ejemplares incluyen haluros tales como  $Cl^-$ ,  $Br^-$  e  $I^-$ , y ésteres de sulfonato, tales como *para*-toluenosulfonato o "tosilato" ( $TsO^-$ ). Algunos grupos lábiles de molécula neutra ejemplares son agua ( $H_2O$ ), amoníaco ( $NH_3$ ), y alcoholes ( $ROH$ ).

25 En particular, en diversas realizaciones, L puede ser un cloruro (Cl), metoxi (OMe), t butoxi (OtBU) o N hidrosuccinimida (NHS).

En algunas realizaciones, la unidad estructural de la fórmula (I) puede tener la fórmula

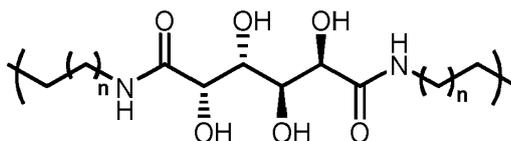


En algunas realizaciones, la unidad estructural de la fórmula (II) puede tener la fórmula



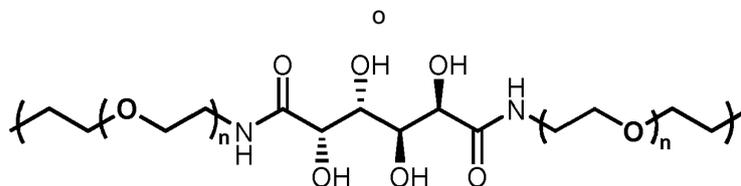
(XXVI)

En algunas realizaciones, la unidad estructural de la fórmula (III) puede tener la fórmula



(XXVII)

5

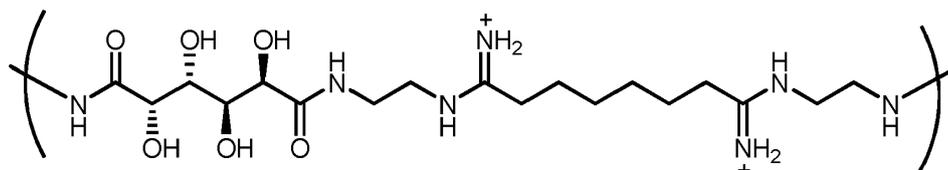


(XXVIII)

en donde

n es de 1 a 20 y en particular de 1 a 4.

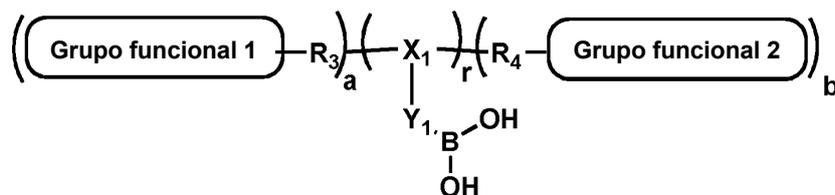
En algunas realizaciones, el polímero que contiene poliol puede tener la fórmula



(XXIX)

10

En algunas realizaciones, el polímero que contiene un ácido borónico contiene al menos un grupo de ácido borónico terminal y tiene la siguiente estructura:



(XXX)

en donde

15 R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se pueden seleccionar independientemente entre cualquier polímero orgánico hidrófilo, y en particular pueden ser independientemente cualquier óxido de (poli)etileno, y polímeros iónicos híbridos;

X<sub>1</sub> puede ser un resto orgánico que contiene uno o más de -CH, -N o -B;

$Y_1$  puede ser un grupo alquilo con una fórmula  $-C_mH_{2m}$  con  $m \geq 1$ , que posiblemente contiene olefinas o grupos alquínilo, o un grupo aromático tal como un fenilo, bifenilo, naftilo o antraceno;

$r$  es de 1 a 1.000;

$a$  es de 0 a 3; y

5  $b$  es de 0 a 3;

y en donde el grupo funcional 1 y el grupo funcional 2 son iguales o diferentes y son capaces de unirse a un ligando guiado, y en particular una proteína, anticuerpo o péptido, o es un grupo terminal tal como  $-OH$ ,  $-OCH_3$  o  $-(X_1)-(Y_1)-B(OH)_2$ .

En algunas realizaciones,  $R_3$  y  $R_4$  son  $(CH_2CH_2O)_t$ , donde  $t$  es de 2 a 2.000 y en particular de 100 a 300.

10 En algunas realizaciones  $X_1$  puede ser  $-NH-C(=O)-$ ,  $-S-S-$ ,  $-C(=O)-NH-$ ,  $-O-C(=O)-$  o  $-C(=O)-O-$  y/o  $Y_1$  puede ser un grupo fenilo.

En algunas realizaciones,  $r$  puede ser 1,  $a$  puede ser 0 y  $b$  puede ser 1.

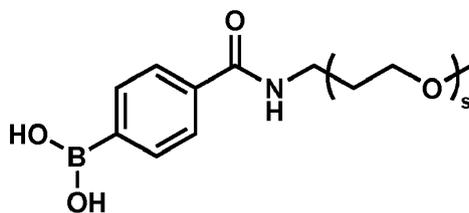
En algunas realizaciones, el grupo funcional 1 y el grupo funcional 2 son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre  $-B(OH)_2$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OH$ .

15 En particular, el grupo funcional 1 y/o 2 de la fórmula (XXXI) puede ser un grupo funcional capaz de unirse a una carga y en particular un ligando guiado tal como una proteína, anticuerpo o péptido, o puede ser un grupo terminal tal como  $-OH$ ,  $-OCH_3$  o  $-(X)-(Y)-B(OH)_2$ .

La expresión "grupo funcional", tal como se utiliza en la presente memoria, indica grupos específicos de átomos dentro de una estructura molecular o una parte de la misma, que son responsables de las reacciones químicas características de esa estructura o parte de la misma. Los grupos funcionales ejemplares incluyen hidrocarburos, grupos que contienen halógeno, grupos que contienen oxígeno, grupos que contienen nitrógeno y grupos que contienen fósforo y azufre, todos ellos identificables por los expertos. En particular, los grupos funcionales en el sentido de la presente divulgación incluyen un ácido carboxílico, amina, triarilfosfina, azida, acetileno, sulfonil azida, tioácido y aldehído. En particular, por ejemplo, un grupo funcional capaz de unirse a un grupo funcional correspondiente en un ligando guiado se puede seleccionar de modo que comprenda los siguientes compañeros de unión: grupo de ácido carboxílico y grupo amino, grupos azida y acetileno, grupo azida y triarilfosfina, sulfonil azida y tioácido, y aldehído y amina primaria. Los expertos pueden identificar grupos funcionales adicionales después de leer la presente divulgación. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "grupo funcional correspondiente" se refiere a un grupo funcional que puede reaccionar con otro grupo funcional. Por lo tanto, los grupos funcionales que pueden reaccionar entre sí se pueden designar como grupos funcionales correspondientes.

Un grupo terminal indica una unidad constitucional que constituye un extremo de una macromolécula o molécula oligomérica. Por ejemplo, el grupo terminal de un poliéster PET puede ser un grupo de alcohol o un grupo de ácido carboxílico. Los grupos terminales se pueden usar para determinar la masa molar. Los grupos terminales ejemplares comprenden  $-OH$ ,  $-COOH$ ,  $NH_2$ , y  $OCH_3$ .

35 En algunas realizaciones, el polímero que contiene ácido borónico puede tener la fórmula



(XXXI)

en donde  $s$  es de 20 a 300.

Los agentes y ligandos guiados ejemplares que se pueden unir a nanopartículas de la presente divulgación comprenden moléculas orgánicas o inorgánicas, incluyendo polinucleótidos, nucleótidos, polipéptidos aptámeros, proteínas, complejos macromoleculares de polisacáridos que incluyen, pero no se limitan a, aquellos que comprenden una mezcla de proteínas y polinucleótidos, sacáridos y/o polisacáridos, virus, moléculas con radioisótopos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

El término "polinucleótido", tal como se utiliza en la presente memoria, indica un polímero orgánico compuesto por dos

o más monómeros que incluyen nucleótidos, nucleósidos o análogos de los mismos. El término "nucleótido" se refiere a cualquiera de diversos compuestos que consisten en un azúcar de ribosa o desoxirribosa unido a una base de purina o pirimidina y a un grupo fosfato, y que es la unidad estructural básica de los ácidos nucleicos. El término "nucleósido" se refiere a un compuesto (como guanosina o adenosina) que consiste en una base de purina o pirimidina combinada con desoxirribosa o ribosa y que se encuentra especialmente en ácidos nucleicos. Las expresiones "análogo de nucleótido" o "análogo de nucleósido" se refieren respectivamente a un nucleótido o nucleósido en el que uno o más átomos individuales han sido reemplazados con un átomo diferente o con un grupo funcional diferente. En consecuencia, el término "polinucleótido" incluye ácidos nucleicos de cualquier longitud, y en particular ADN, ARN, análogos y fragmentos de los mismos. Un polinucleótido de tres o más nucleótidos también se conoce como "oligómero nucleotídico" u "oligonucleótido".

El término "aptámeros", tal como se utiliza en la presente memoria, indica moléculas de ácido oligonucleico o de péptido que se unen a una diana específica. En particular, los aptámeros de ácido nucleico pueden comprender, por ejemplo, especies de ácido nucleico que se han diseñado mediante rondas repetidas de *selección in vitro* o, de manera equivalente, SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) para unirse a varias dianas moleculares tales como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos, e incluso células, tejidos y organismos. Los aptámeros son útiles en aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas, ya que ofrecen propiedades de reconocimiento molecular que rivalizan con las de los anticuerpos. Los aptámeros peptídicos son péptidos que están diseñados para unirse específicamente e interferir en las interacciones proteína-proteína dentro de las células. En particular, los aptámeros peptídicos se pueden derivar, por ejemplo, de acuerdo con una estrategia de selección que se deriva del sistema del doble híbrido de levadura (Y2H). En particular, según esta estrategia, un bucle de aptámero peptídico variable unido a un dominio de unión al factor de transcripción se escruta contra la proteína diana unida a un dominio de activación del factor de transcripción. La unión *in vivo* del aptámero peptídico a su diana a través de esta estrategia de selección se detecta como expresión de un gen marcador de levadura en dirección corriente abajo.

El término "polipéptido", tal como se utiliza en la presente memoria, indica un polímero orgánico lineal, circular o ramificado compuesto por dos o más monómeros de aminoácidos y/o análogos de los mismos. El término "polipéptido" incluye polímeros de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas y péptidos de longitud completa, así como análogos y fragmentos de los mismos. Un polipéptido de tres o más aminoácidos también se denomina proteína oligomérica, péptido u oligopéptido. En particular, los términos "péptido" y "oligopéptido" indican normalmente un polipéptido con menos de 50 monómeros de aminoácidos. Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "aminoácido", "monómero de aminoácido" o "residuo de aminoácido" se refieren a cualquiera de los veinte aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales y aminoácidos artificiales, e incluyen tanto isómeros ópticos D como isómeros ópticos L. En particular, los aminoácidos no naturales incluyen estereoisómeros D de los aminoácidos naturales (que incluyen bloques de construcción de ligandos útiles, ya que no son susceptibles de degradación enzimática). La expresión "aminoácidos artificiales" indica moléculas que se pueden acoplar fácilmente entre sí usando una química de acoplamiento de aminoácidos estándar, pero con estructuras moleculares que no se parecen a los aminoácidos naturales. La expresión "análogo de aminoácido" se refiere a un aminoácido en el que uno o más átomos individuales han sido reemplazados, bien con un átomo diferente, isótopo, bien con un grupo funcional diferente, pero que por lo demás es idéntico al aminoácido original del que se deriva el análogo. Todos estos aminoácidos se pueden incorporar sintéticamente en un péptido o polipéptido utilizando químicas estándar de acoplamiento de aminoácidos. El término "polipéptido", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye polímeros que comprenden uno o más monómeros, o bloques de construcción distintos de un monómero de aminoácido. Los términos monómero, subunidad o bloques de construcción indican compuestos químicos que, bajo condiciones apropiadas, se pueden unir químicamente a otro monómero de la misma o diferente naturaleza química para formar un polímero. También está previsto que el término "polipéptido" comprenda un polímero en el que uno o más de los bloques de construcción están unidos de forma covalente a otro mediante un enlace químico distinto del enlace amídico o peptídico.

El término "proteína", tal como se utiliza en la presente memoria, indica un polipéptido con una estructura secundaria y terciaria particular que puede participar, de forma no exclusiva, en interacciones con otras biomoléculas, incluyendo otras proteínas, ADN, ARN, lípidos, metabolitos, hormonas, quimiocinas y moléculas pequeñas. Algunas proteínas ejemplares descritas en la presente memoria son anticuerpos.

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una proteína del tipo que es producido por células B activadas después de la estimulación por un antígeno y que se puede unir específicamente al antígeno promoviendo una respuesta inmune en sistemas biológicos. Los anticuerpos completos consisten normalmente en cuatro subunidades que incluyen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. El término anticuerpo incluye anticuerpos naturales y sintéticos, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos ejemplares incluyen IgA, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgM y similares. Los fragmentos ejemplares incluyen Fab Fv, Fab' F(ab')<sub>2</sub> y similares. Un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo que se une específicamente a otra biomolécula que se denomina "epítipo", y que, por lo tanto, se define como complementario a una única organización espacial y polar particular de ésta. En algunas formas, los anticuerpos monoclonales también pueden tener la misma estructura. Un anticuerpo policlonal se refiere a una mezcla de diferentes anticuerpos monoclonales. En algunas formas, los anticuerpos policlonales pueden consistir en una mezcla de anticuerpos monoclonales en los que al menos dos de los anticuerpos monoclonales se unen a un epítipo antigénico diferente. Los epítipos antigénicos diferentes pueden estar en la misma diana, en dianas diferentes o en una combinación. Los anticuerpos se pueden preparar mediante técnicas muy conocidas en este campo, tales como

la inmunización de un huésped y la recolección de sueros (policlonales), o la preparación de líneas celulares de hibridoma continuas y la recolección de la proteína segregada (monoclonal).

En diversas realizaciones, los polímeros de polioliol forman un complejo o enlace no covalente con uno o más compuestos de interés para ser aportados de acuerdo con la ilustración esquemática de las Figuras 1 y 2.

5 En diversas realizaciones, una estructura de nanopartículas comprende un agente y un polímero que contiene un polioliol, estando el agente unido a un polímero de polioliol mediante un enlace covalente. En los Ejemplos 16-21 se detalla un ejemplo de un polímero de polioliol conjugado con un agente. En estas realizaciones, los polímeros de polioliol conjugados con un agente (designados en la presente memoria como "conjugados de polímero de polioliol-agente") forman nanopartículas cuya estructura presenta sitios en su superficie para la interacción con moléculas de BA.

10 En varias de esas realizaciones, la nanopartícula comprende además polímeros de BA configurados para proporcionar a la nanopartícula una funcionalidad de estabilización estérica y/o de guiado. En particular, en dichas realizaciones, la adición de un polímero de BA permite minimizar la autoagregación e interacciones no deseadas con otras nanopartículas, proporcionando así una mayor estabilidad de sal y suero. Por ejemplo, la estabilización estérica se proporciona aquí mediante el polímero de BA que tiene PEG, tal como se ilustra en la nanopartícula ejemplar descrita en el Ejemplo 12.

15 En dichas realizaciones, la estructura de esta nanopartícula proporciona diversas ventajas sobre métodos de aporte de agentes del estado anterior de la técnica, tales como la capacidad de proporcionar una liberación controlada de uno o más agentes. Esta característica se puede proporcionar, por ejemplo, mediante el uso de un enlace éster biodegradable entre el agente y el polímero de polioliol. Los expertos en la técnica reconocerán otros posibles enlaces adecuados para este fin. En estas realizaciones, otra ventaja consiste en la capacidad de proporcionar un guiado específico del agente a través del resto de polímero de BA.

20 En varias realizaciones, los polímeros de BA pueden comprender un ácido borónico fluorado (Ejemplo 7) o un ácido borónico escindible fluorado (Ejemplo 8) que puede ser utilizado como un agente de formación de imágenes en IRM u otras técnicas similares. Un agente de imágenes de este tipo puede ser útil para rastrear la farmacocinética o farmacodinámica de un agente aportado por la nanopartícula.

25 En diversas realizaciones, una estructura de nanopartículas comprende un agente y un polímero de polioliol, consistiendo la nanopartícula en un liposoma modificado. En estas realizaciones, el liposoma modificado comprende lípidos conjugados con polímeros de polioliol a través de un enlace covalente de modo que la superficie del liposoma presenta polímeros de polioliol. En estas realizaciones, los liposomas modificados se forman de tal modo que los agentes que han de ser aportados están contenidos dentro de la nanopartícula de liposoma.

30 El término "liposoma", tal como se utiliza en la presente memoria, indica una estructura vesicular compuesta por lípidos. Los lípidos tienen normalmente un grupo de cola que comprende una cadena de hidrocarburo larga y un grupo de cabeza hidrófilo. Los lípidos se disponen formando una bicapa lipídica con un entorno acuoso interno adecuado para contener un agente que ha de ser administrado. Dichos liposomas presentan una superficie exterior que puede comprender ligandos o moléculas guiados adecuados para el reconocimiento específico por receptores de la superficie celular u otras dianas de interés.

35 El término "conjugado", tal como se utiliza en la presente memoria, indica que una molécula ha formado un enlace covalente con una segunda molécula e incluye enlaces donde los átomos se unen de forma covalente con enlaces alternos simples y múltiples (por ejemplo, dobles) (por ejemplo, C=C-C=C-C) e influyen entre sí para producir deslocalización de electrones.

40 En otras realizaciones de la presente divulgación, una estructura de nanopartículas comprende un agente y un polioliol, siendo la nanopartícula una micela modificada. En estas realizaciones, la micela modificada comprende polímeros de polioliol modificados para contener un bloque de polímero hidrófobo.

45 La expresión "bloque de polímero hidrófobo", tal como se utiliza en la presente divulgación, indica un segmento del polímero que por sí solo sería hidrófobo.

50 El término "micela", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un agregado de moléculas dispersas en un líquido. Una micela típica en solución acuosa forma un agregado con las regiones "de cabeza" hidrófilas en contacto con el disolvente circundante, secuestrando las regiones de cola simple hidrófobas en el centro de la micela. En la presente divulgación, la región de cabeza puede ser, por ejemplo, una región superficial del polímero de polioliol, mientras que la región de cola puede ser, por ejemplo, la región de bloque de polímero hidrófobo del polímero de polioliol.

55 En estas realizaciones, los polímeros de polioliol con un bloque de polímero hidrófobo, cuando se mezclan con un agente que ha de ser aportado, se disponen para formar una nanopartícula que consiste en una micela modificada con agentes que han de ser aportados contenidos dentro de la nanopartícula. Dichas realizaciones de nanopartículas presentan polímeros de polioliol en su superficie que son adecuados para interactuar con polímeros de BA que tienen o no una funcionalidad de guiado de acuerdo con realizaciones anteriores. En estas realizaciones, los polímeros de BA

que se pueden usar para este fin incluyen aquellos con A hidrófilo e B hidrófobo en la fórmula (I) o (II). Esta interacción proporciona las mismas ventajas o ventajas similares a las de otras realizaciones de nanopartículas arriba mencionadas.

5 En algunas realizaciones, las nanopartículas o componentes relacionados pueden estar comprendidos en una composición junto con un vehículo aceptable. El término "vehículo", tal como se utiliza en la presente memoria, indica cualquiera de los diversos medios que actúan generalmente como solventes, soportes, ligantes, excipientes o diluyentes para una nanopartícula comprendida en la composición como ingrediente activo.

En algunas realizaciones, cuando la composición se va a administrar a un individuo, la composición puede ser una composición farmacéutica y el vehículo aceptable puede ser un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En algunas realizaciones, una nanopartícula se puede incluir en composiciones farmacéuticas junto con un excipiente o diluyente. En particular, en algunas realizaciones se dan a conocer composiciones farmacéuticas que contienen nanopartículas en combinación con uno o más vehículos compatibles y farmacéuticamente aceptables, y en particular con diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 El término "excipiente", tal como se utiliza en la presente memoria, indica una sustancia inactiva que se usa como vehículo para los ingredientes activos de un medicamento. Los excipientes adecuados para las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria incluyen cualquier sustancia que mejore la capacidad del cuerpo de un individuo para absorber la nanopartícula. Los excipientes adecuados también incluyen cualquier sustancia que pueda ser utilizada para aumentar el tamaño de las formulaciones con nanopartículas para permitir una dosificación conveniente y precisa. Además de su uso en la cantidad de dosis única, los excipientes se pueden usar en el proceso de fabricación para ayudar en el manejo de las nanopartículas. Dependiendo de la vía de administración y de la forma de medicación, se pueden usar diferentes excipientes. Los excipientes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, antiadherentes, ligantes, revestimientos, desintegrantes, cargas, saborizantes (como edulcorantes) y colorantes, agentes deslizantes, lubricantes, conservantes, sorbentes.

20 El término "diluyente", tal como se utiliza en la presente memoria, indica un agente diluyente que se formula para diluir o transportar un ingrediente activo de una composición. Los diluyentes adecuados incluyen cualquier sustancia que pueda disminuir la viscosidad de una preparación medicinal.

En determinadas realizaciones se pueden formular composiciones, y en particular composiciones farmacéuticas, para administración sistémica, que incluye administración parenteral y más particularmente administración intravenosa, intradérmica e intramuscular.

30 Las composiciones ejemplares para administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, soluciones acuosas estériles, soluciones inyectables o suspensiones que incluyen nanopartículas. En algunas realizaciones, una composición para administración parenteral se puede preparar en el momento de su uso disolviendo una composición en polvo, previamente preparada en forma liofilizada, en un líquido acuoso biológicamente compatible (agua destilada, solución fisiológica u otra solución acuosa).

35 El término "liofilización" (también conocido como secado por congelación o criodesecación) indica un proceso de deshidratación que se usa normalmente para conservar un material perecedero o hacer que el material sea más conveniente para el transporte. La liofilización se lleva a cabo congelando el material y reduciendo después la presión circundante, y añadiendo suficiente calor para permitir que el agua congelada en el material se sublime directamente de la fase sólida a gas.

40 En aplicaciones farmacéuticas, la liofilización se utiliza a menudo para aumentar la vida útil de almacenamiento de los productos, tales como vacunas y otros productos inyectables. Al eliminar el agua del material y sellar el material en un frasco, el material se puede almacenar, transportar y reconstituir posteriormente con facilidad a su forma original para inyección.

45 En diversas realizaciones, las nanopartículas descritas en la presente memoria se aportan a una diana predeterminada. En algunas realizaciones, la diana es un sistema biológico *in vitro* y el método comprende la puesta en contacto de la diana con la nanopartícula descrita en la presente memoria.

50 En algunas realizaciones se proporciona un método para el aporte de un agente a un individuo, comprendiendo el método la formulación de una nanopartícula adecuada de acuerdo con diversas realizaciones descritas. Las nanopartículas también se pueden formular en una composición farmacéuticamente aceptable de acuerdo con diversas realizaciones descritas. El método comprende además el aporte de una nanopartícula a un individuo. Para aportar la nanopartícula a un individuo, la nanopartícula o las formulaciones de nanopartículas se pueden administrar por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Éstas se aportan en formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, las composiciones de nanopartículas se pueden administrar en forma de comprimidos o cápsulas, mediante inyección, inhalación, loción ocular, pomada, supositorio, infusión; tópicamente mediante loción o pomada; y rectalmente mediante supositorios.

55 El término "individuo", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye un solo organismo biológico, incluyendo,

pero sin limitarse a, plantas o animales, y en particular animales superiores y en particular vertebrados tales como mamíferos y en particular seres humanos.

5 Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", tal como se utilizan en la presente memoria, significan modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, generalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, administración intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal, inyección e infusión.

10 Las frases "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente", tal como se utilizan en la presente memoria, significan la administración de una nanopartícula o una composición de la misma de un modo que no sea directamente en el sistema nervioso central, de manera que entren en el sistema del individuo y, por lo tanto, estén sujetas al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo la administración subcutánea.

15 Los niveles de dosificación reales del ingrediente o agente activo en las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un individuo particular, composición y modo de administración, sin que sea tóxica para el individuo.

20 Este conjugado de polímero terapéutico se puede administrar a humanos y otros animales para terapia a través de cualquier vía de administración adecuada, incluyendo las vías oral, nasal, como por ejemplo un espray, rectal, intravaginal, parenteral, intracisternal y tópica, como en polvos, ungüentos o gotas, incluyendo las vías bucal y sublingual.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, el conjugado polimérico terapéutico, que se puede usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan en formas galénicas farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

25 En particular, en algunas realizaciones, el compuesto aportado es un fármaco para tratar o prevenir una afección en el individuo.

Los términos "fármaco" o "agente terapéutico" indican un agente activo que se puede usar en el tratamiento, la prevención o el diagnóstico de una afección en el individuo o se puede usar para mejorar de otro modo el bienestar físico o mental del individuo.

30 El término "afección", tal como se utiliza en la presente memoria, indica generalmente el estado físico del cuerpo de un individuo, en su totalidad o de una o más de sus partes, que no se ajusta a un estado físico del individuo, en su totalidad o de una o más de sus partes, que está asociado con un estado de bienestar físico, mental y posiblemente social completo. Las afecciones descritas en la presente memoria incluyen, entre otras, trastornos y enfermedades, indicando el término "trastorno" una afección del individuo vivo que está asociada a una anomalía funcional del cuerpo o de cualquiera de sus partes, e indicando el término "enfermedad" una afección del individuo vivo que perjudica el funcionamiento normal del cuerpo o de cualquiera de sus partes y se manifiesta normalmente por signos y síntomas distintivos. Las afecciones ejemplares incluyen, pero no se limitan a, lesiones, discapacidades, trastornos (incluyendo trastornos mentales y físicos), síndromes, infecciones, conductas desviadas del individuo y variaciones atípicas de la estructura y las funciones del cuerpo de un individuo o de partes del mismo.

40 El término "tratamiento", tal como se utiliza en la presente memoria, indica cualquier actividad que forme parte de una atención médica, o que se ocupe de una afección médica o quirúrgica.

45 El término "prevención", tal como se utiliza en la presente memoria, indica cualquier actividad que reduzca la carga de mortalidad o morbilidad de una afección en un individuo. Esto tiene lugar en los niveles de prevención primaria, secundaria y terciaria, en donde: a) la prevención primaria evita el desarrollo de una enfermedad; b) las actividades de prevención secundaria están dirigidas al tratamiento temprano de la enfermedad, lo que aumenta las oportunidades de intervenciones para prevenir la progresión de la enfermedad y la aparición de síntomas; y c) la prevención terciaria reduce el impacto negativo de una enfermedad ya establecida restaurando la función y reduciendo las complicaciones relacionadas con la enfermedad.

50 Los compuestos ejemplares que pueden ser aportados por las nanopartículas descritas en la presente memoria y que son adecuados como fármacos comprenden compuestos capaces de emitir radiaciones electromagnéticas (como isótopos <sup>10</sup>B) para ser utilizados en radioterapias (como la captura de neutrones de boro). Otros agentes terapéuticos adicionales comprenden cualquier agente terapéutico biológicamente activo lipófilo o hidrófilo, sintético o natural, incluyendo los conocidos en la técnica. The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 13 Edición, 2001, Merck and Co., Inc., Whitehouse Station, N.J. Los ejemplos de dichos agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, productos farmacéuticos de moléculas pequeñas, antibióticos, esteroides, polinucleótidos (por ejemplo, ADN genómico, ADNc, ARNm, ARNip, ARNhc, micro-ARN, oligonucleótidos antisentido, virus y polinucleótidos quiméricos), plásmidos, péptidos, fragmentos de péptidos, moléculas pequeñas (por ejemplo,

doxorubicina), agentes quelantes (por ejemplo, deferoxamina (DEFERAL), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)), productos naturales (por ejemplo, taxol, anfotericina), y otras macromoléculas biológicamente activas tales como, por ejemplo, proteínas y enzimas. Véase también la patente de EE. UU. n° 6,048,736, que enumera agentes activos (agentes terapéuticos) que se pueden usar como agentes terapéuticos con las nanopartículas descritas en la presente memoria. Los agentes terapéuticos de moléculas pequeñas no solo pueden ser el agente terapéutico dentro de la partícula compuesta, sino que, en una realización adicional, se pueden unir de forma covalente a un polímero en el compuesto. En diversas realizaciones, el enlace covalente es reversible (por ejemplo, a través de una forma de profármaco o enlace biodegradable, como un disulfuro) y proporciona otra forma de aportar el agente terapéutico. En diversas realizaciones, el agente terapéutico que puede ser aportado con las nanopartículas descritas en la presente memoria incluye agentes quimioterapéuticos tales como epotilonas, fármacos basados en camptotecina, taxol o un ácido nucleico tal como un plásmido, ARNip, ARNhc, micro-ARN, oligonucleótidos antisentido, aptámeros o su combinación, y fármacos adicionales identificables por los expertos después de leer la presente divulgación.

En algunas realizaciones, el compuesto aportado es un compuesto adecuado para obtener imágenes de una célula o tejido del individuo. Los compuestos ejemplares que se pueden aportar mediante las nanopartículas descritas en la presente memoria y que son adecuados para la obtención de imágenes comprenden compuestos que contienen isótopos, como los isótopos  $^{19}\text{F}$  para imágenes RM,  $^{18}\text{F}$  o  $^{64}\text{Cu}$  para imágenes PET, etc.

En particular, las nanopartículas descritas en la presente memoria se pueden configurar de modo que contengan polímeros de BA que contienen  $^{19}\text{F}$ . Por ejemplo, se pueden incorporar átomos de  $^{19}\text{F}$  en un compuesto de polímero de BA no escindible o escindible. Otras ubicaciones para los átomos de  $^{19}\text{F}$  son posibles en el componente de polímero de BA, el componente de polímero de polioliol o en el agente que ha de ser aportado. Estas y otras variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica.

En diversas realizaciones, las nanopartículas descritas en la presente memoria se pueden usar para aportar productos químicos utilizados en la industria agrícola. En otra realización de la invención, el agente aportado por la nanopartícula descrita en la presente memoria es un compuesto biológicamente activo que tiene utilidad microbicida y agrícola. Estos compuestos biológicamente activos incluyen los conocidos en la técnica. Por ejemplo, los compuestos biológicamente activos en la agricultura incluyen, pero no se limitan a, fertilizantes, fungicidas, herbicidas, insecticidas y mohicidas. Los microbicidas también se utilizan en el tratamiento del agua para tratar los suministros de agua municipales y los sistemas de agua industrial, como las aguas de refrigeración, los sistemas de agua blanca en la fabricación de papel. Los sistemas acuosos susceptibles de ataque o degradación microbiológicos también se encuentran en la industria del cuero, la industria textil, y la industria de revestimientos o pinturas. En las Patentes de EE. UU. n° 5,693,631, 6,034,081 y 6,060,466 se describen ejemplos de dichos microbicidas y sus usos, individualmente y en combinaciones. Las composiciones que contienen agentes activos tales como los arriba descritos se pueden utilizar de la misma manera que se conoce para el propio ingrediente activo. En particular, dado que dichos usos no son usos farmacológicos, el polímero del compuesto no tiene que satisfacer necesariamente el perfil de toxicidad requerido en los usos farmacéuticos.

En determinadas realizaciones, las nanopartículas que comprenden polímeros de polioliol y polímeros de BA también pueden estar comprendidas en un sistema adecuado para aportar cualquiera de los compuestos que se indican en la presente memoria y en particular agentes, usando una nanopartícula. En algunas realizaciones del sistema, las nanopartículas están provistas de componentes adecuados para preparar las nanopartículas para la administración a un individuo.

Los sistemas descritos en la presente memoria se pueden proporcionar en forma de *kits* de partes. Por ejemplo, los polímeros de polioliol y/o los polímeros de BA se pueden incluir como una molécula sola o en presencia de excipientes, vehículos o diluyentes adecuados.

En un *kit* de partes, los polímeros de polioliol, los polímeros de BA y/o los agentes que han de ser aportados están incluidos en el *kit* independientemente, posiblemente incluidos en una composición junto con vehículos portadores o agentes auxiliares adecuados. Por ejemplo, los polímeros de polioliol y/o los polímeros de BA pueden estar incluidos en una o más composiciones solas y/o estar incluidos en un vector adecuado. Además, un agente que ha de ser aportado puede estar incluido en una composición junto con un vehículo portador o agente auxiliar adecuado. Alternativamente, el agente puede ser aportado por el usuario final y puede no estar presente en el *kit* de partes. Además, los polímeros de polioliol, polímeros de BA y/o agentes pueden estar incluidos en diversas formas adecuadas para la incorporación apropiada en una nanopartícula.

También pueden estar incluidos componentes adicionales, que comprenden chips microfluídicos, estándares de referencia, tampones y componentes adicionales identificables por los expertos después de leer la presente divulgación.

En el *kit* de partes aquí descrito, los componentes del *kit* se pueden proporcionar, con instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, para realizar los métodos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el *kit* puede contener las composiciones en recipientes separados. En el *kit* también pueden estar incluidas instrucciones, por ejemplo, instrucciones escritas o de audio, en papel o soporte electrónico, como cintas o CD-ROM, para realizar el ensayo. El *kit* también puede contener, dependiendo del método particular utilizado, otros reactivos y materiales

envasados (tales como tampones de lavado y similares).

Los expertos en la técnica pueden identificar detalles adicionales relacionados con la identificación del agente de soporte o agente auxiliar adecuado de las composiciones, y en general con la fabricación y el envasado del *kit*, después de leer la presente divulgación.

- 5 En algunas realizaciones se puede preparar una nanopartícula preparando los componentes individuales de la nanopartícula y mezclando después los componentes en diversos órdenes para llegar a una estructura de nanopartícula compuesta deseada. La preparación y mezcla de componentes se lleva a cabo en soluciones adecuadas conocidas por los expertos en la técnica.

10 El término "mezclar", tal como se utiliza en la presente memoria, indica la adición de una solución que comprende una molécula de interés con otra solución que comprende otra molécula de interés. Por ejemplo, una solución acuosa de polímeros de poliol se puede mezclar con una solución acuosa de polímeros de BA en el contexto de la presente divulgación.

15 El término "solución", tal como se utiliza en la presente memoria, indica cualquier muestra en fase líquida que contenga moléculas de interés. Por ejemplo, una solución acuosa de polímeros de poliol puede comprender polímeros de poliol diluidos en agua o cualquier solución tamponada, en particular soluciones acuosas.

20 En algunas realizaciones se puede preparar una nanopartícula mezclando polímeros de poliol con un agente que ha de ser aportado (Figuras 1 y 2), formando una nanopartícula de polímero de poliol-agente. En otras realizaciones se puede preparar una nanopartícula mezclando adicionalmente polímeros de BA con la nanopartícula de polímero de poliol-agente. En otras realizaciones se prepara una nanopartícula mezclando polímeros de poliol con polímeros de BA, y mezclando después un agente que ha de ser aportado. En otras realizaciones más se prepara una nanopartícula mezclando simultáneamente polímeros de poliol, polímeros de BA y un agente que ha de ser aportado.

25 En algunas realizaciones se prepara una nanopartícula formando un conjugado de polímero de poliol-agente de acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación, preparando así una nanopartícula que comprende un conjugado de polímero de poliol-agente. En otras realizaciones se pueden preparar nanopartículas que comprenden conjugados de polímero de poliol-agente disolviendo las nanopartículas en una solución acuosa adecuada. En otras realizaciones más se pueden preparar nanopartículas que comprenden conjugados de polímero de poliol-agente mezclando conjugados de polímero de poliol-agente con polímeros de BA que proporcionan o no un ligando guiado.

30 En algunas realizaciones se puede preparar una nanopartícula mezclando polímeros de poliol con un bloque de polímero hidrófobo con un agente que ha de ser aportado, preparando así una micela modificada de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación. En otras realizaciones se puede preparar una nanopartícula mezclando adicionalmente la micela modificada con polímeros de BA. En otras realizaciones más se puede preparar una nanopartícula mezclando polímeros de poliol con polímeros de BA y mezclando después un agente que ha de ser aportado, con lo que se prepara una nanopartícula que consiste en una micela modificada.

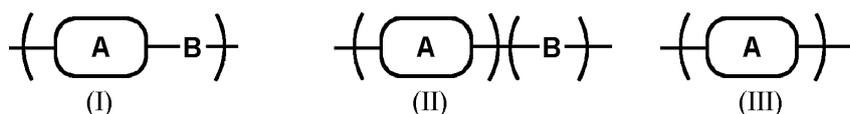
35 En algunas realizaciones de la presente divulgación se puede preparar una nanopartícula mezclando lípidos conjugados con polímeros de poliol con polímeros de BA y/o agentes que han de ser aportados, con lo que se prepara un liposoma modificado. En diversas realizaciones se puede preparar una nanopartícula mezclando lípidos conjugados con polímeros de poliol con polímeros de BA, y mezclando después agentes que han de ser aportados. En otras realizaciones se puede preparar una nanopartícula mezclando lípidos conjugados con polímeros de poliol con agentes que han de ser aportados. En otras realizaciones se puede preparar una nanopartícula mezclando lípidos conjugados con polímeros de poliol con agentes que han de ser aportados, y mezclando después polímeros de BA, con lo que se prepara una nanopartícula que consiste en un liposoma modificado.

40 La formación de nanopartículas de acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación se puede analizar con técnicas y procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en diversas realizaciones se utilizan ensayos de retardo en gel para controlar y medir la incorporación de un agente de ácido nucleico dentro de una nanopartícula (Ejemplo 10). En diversas realizaciones se puede elegir un tamaño de nanopartícula y/o un potencial zeta adecuados utilizando métodos conocidos (Ejemplo 11).

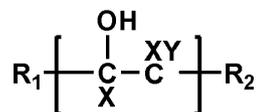
Los expertos en la técnica pueden identificar otros detalles relacionados con la identificación del agente portador o agente auxiliar adecuado de las composiciones, y en general la fabricación y el envasado del *kit*, después de leer la presente divulgación.

- 50 Nanopartículas que tienen un polímero con ácido nitrofenilborónico

En la presente memoria se describen nanopartículas que tienen un polímero que contiene un poliol que está conjugado con un polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico. El polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol de las nanopartículas guiadas descritas puede tener una o más de las siguientes unidades estructurales:



donde A es un resto orgánico de la fórmula

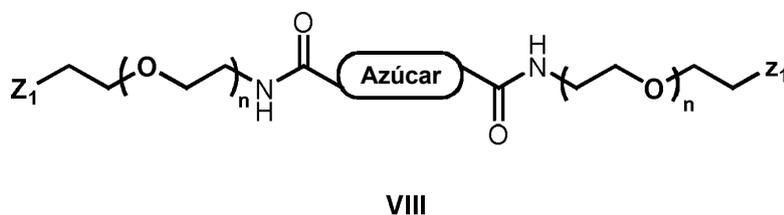
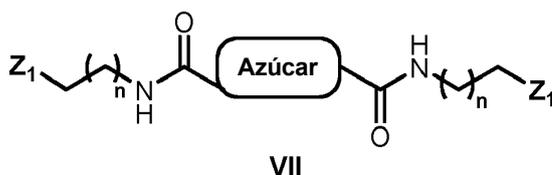
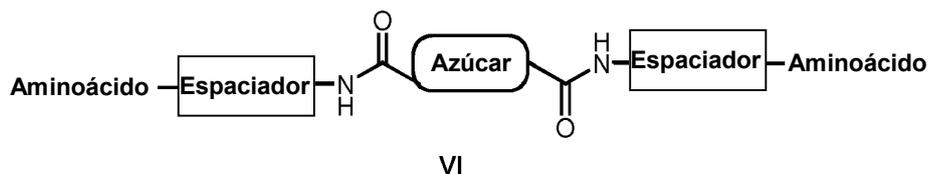


(IV)

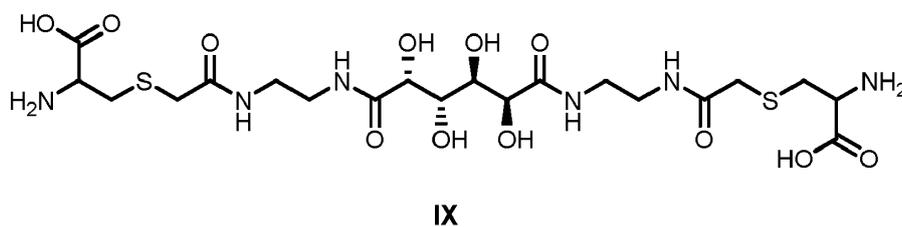
5 en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan independientemente entre cualquier grupo orgánico o basado en carbono con un peso molecular de aproximadamente 10 kDa o menos; X se selecciona independientemente entre un grupo alifático que contiene uno o más de -H, -F, -C, -N u -O; e Y se selecciona independientemente entre -OH o un resto orgánico que presenta un -OH, y B es un resto orgánico que une uno de los R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> de un primer resto A con uno de los R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> de un segundo resto A en el polímero. En algunas realizaciones, X puede ser C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>, donde n es cualquier número individual de 0-5 e Y es -OH.

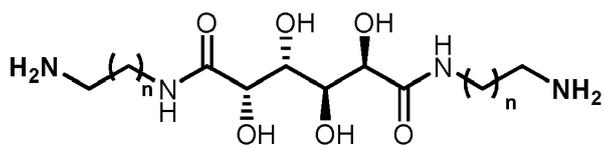
10 De acuerdo con la presente invención, el polímero que contiene el polioli se deriva del acoplamiento de un compuesto de la Fórmula A con un compuesto de la Fórmula B.

El compuesto de la Fórmula A puede ser uno cualquiera de:

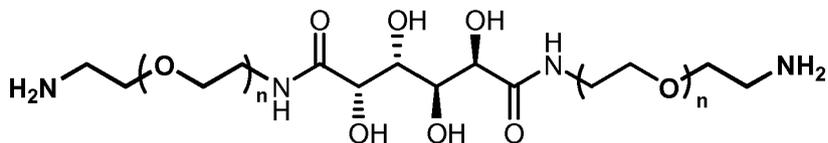


15



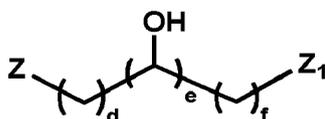


X



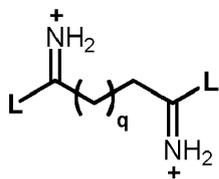
XI

5 donde el espaciador se selecciona independientemente entre cualquier grupo orgánico; el aminoácido se selecciona entre cualquier grupo orgánico que tenga una amina libre y un grupo de ácido carboxílico libre; n es cualquier número individual de 1 a 20; y Z<sub>1</sub> se selecciona independientemente entre -NH<sub>2</sub>, -OH, -SH, y -COOH; R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> pueden tener independientemente la fórmula:

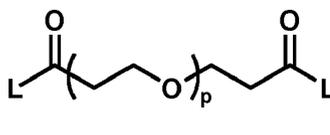


(V)

10 donde d es cualquier número individual de 0 a 100, e es cualquier número individual de 0 a 100, f es cualquier número individual de 0 a 100, Z es un enlace covalente que une un resto orgánico a otro, y Z<sub>1</sub> se selecciona independientemente entre -NH<sub>2</sub>, -OH, -SH, y -COOH; B es uno cualquiera de

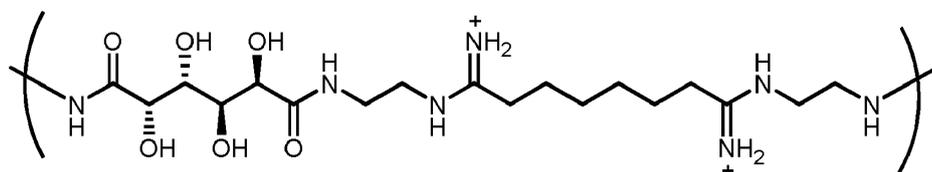


(XXIII)



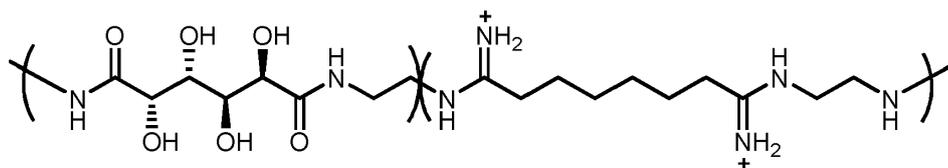
(XIV)

15 en donde q es cualquier número individual de 1-20; p es cualquier número individual de 20-200; y L es un grupo lábil, emparejándose estas subunidades B con cualquiera de las subunidades A arriba descritas. En realizaciones más particulares, el polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol de las nanopartículas guiadas mostrado en la unidad estructural de la fórmula (I) puede ser:



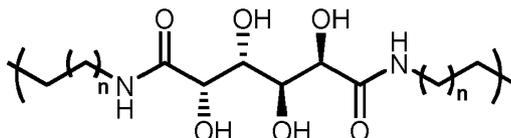
(XXV),

el polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol de las nanopartículas guiadas mostrado en la unidad estructural de la fórmula (II) puede ser:



(XXVI), y

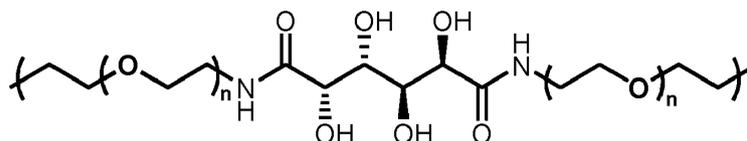
el polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol de las nanopartículas guiadas mostrado en la unidad estructural de la fórmula (III) puede ser:



(XXVII)

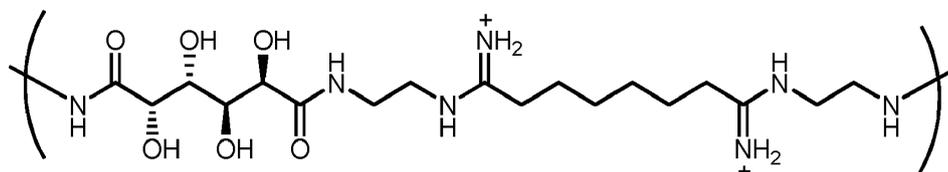
5

o



(XXVIII),

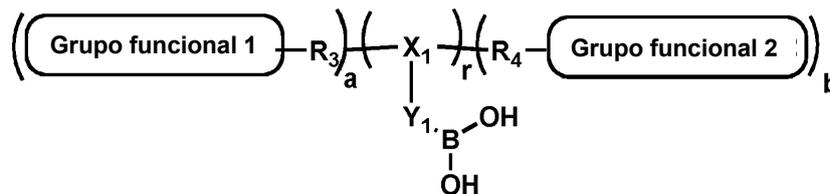
en donde n es cualquier número individual de 1-20. En algunas realizaciones de la nanopartícula guiada descrita, el polímero que contiene un poliol es:



(XXIX).

10 En resumen, una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (fórmula VI, VII u VIII) se puede combinar con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV) para formar el polímero que contiene un poliol de las nanopartículas descritas. En determinados aspectos descritos en la presente memoria, las nanopartículas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV).

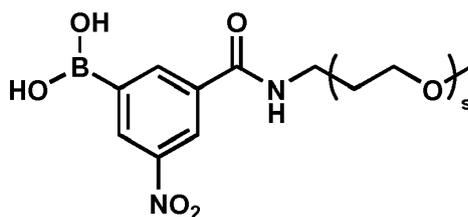
15 En algunas realizaciones, el polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico comprende un grupo de ácido nitrofenilborónico y tiene la fórmula general:



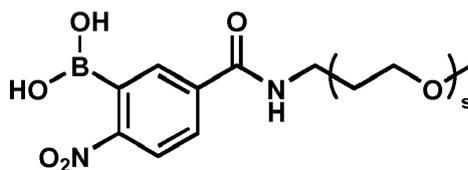
(XXX)

20 donde R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son independientemente un polímero orgánico hidrófilo, X<sub>1</sub> es un resto orgánico que contiene uno o más de -C-, -N-, o -B-, Y<sub>1</sub> es un grupo alquilo de la fórmula -C<sub>m</sub>H<sub>2m-</sub>, en la que m es ≥ 1 o un grupo aromático, r es cualquier número individual de 1-1.000, a es cualquier número individual de 0-3, y b es cualquier número individual de 0-3, y el grupo funcional 1 y el grupo funcional 2 pueden ser iguales o diferentes y se pueden seleccionar

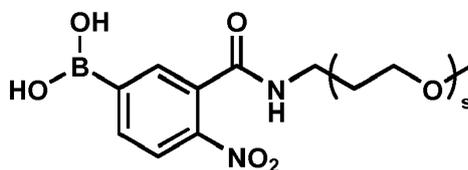
independientemente entre uno cualquiera de  $-B(OH)_2$ ,  $-OCH_3$ , u  $-OH$ . En algunas realizaciones, estas subpartes variables del polímero descrito que contiene un ácido nitrofenilborónico se pueden seleccionar entre lo siguiente:  $R_3$  y  $R_4$  pueden ser  $(CH_2CH_2O)_t$ , donde  $t$  es cualquier número individual de 2 a 2.000;  $X_1$  es uno cualquiera de  $-NH-C(=O)-$ ,  $-S-S-$ ,  $-C(=O)-NH-$ ,  $-O-C(=O)-$  o  $-C(=O)-O-$  e  $Y_1$  es un grupo nitrofenilo. En algunas realizaciones, estas subpartes variables del polímero descrito que contiene un ácido nitrofenilborónico se pueden seleccionar entre lo siguiente:  $R_3$  y  $R_4$  pueden ser  $(CH_2CH_2O)_t$ , donde  $t$  es cualquier número individual de 2 a 2.000;  $X_1$  es cualquiera de  $-NH-C(=O)-$ ,  $-S-S-$ ,  $-C(=O)-NH-$ ,  $-O-C(=O)-$  o  $-C(O)-O-$  e  $Y_1$  es un grupo nitrofenilo, y  $r$  puede tener un valor de 1,  $a$  puede tener un valor de 0 y  $b$  puede tener un valor de 1. En cada una de las realizaciones del polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico, el grupo nitro puede estar en la posición orto, meta o para, en relación con el grupo de ácido borónico, del anillo de fenilo. En otras realizaciones más, el polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico puede tener grupos adicionales presentes en el anillo de fenilo, tal como un grupo metilo. En una realización particular, la nanopartícula guiada descrita en la presente memoria puede incluir un polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico que tiene una de las siguientes fórmulas:



(XXXIII),



(XXXIV), o



(XXXV),

donde  $s$  es cualquier número individual del 20-300. Los polímeros de fórmulas XXXIII, XXXIV y XXXV se pueden modificar adicionalmente con el fin de cambiar la posición del PEG en el anillo de fenilo para que esté en la posición orto, meta o para con respecto al grupo de ácido borónico.

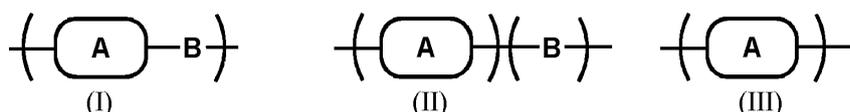
En resumen, una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (fórmula VI, VII u VIII) se puede combinar con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV) para formar el polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol de las nanopartículas descritas, el polímero resultante que contiene un poliol se puede acoplar después a un polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico. En algunas realizaciones, la conjugación entre el polímero descrito que contiene un poliol y el polímero descrito que contiene un ácido nitrofenilborónico estará mediada por al menos un grupo hidroxilo del grupo de ácido borónico. En determinados aspectos descritos en la presente memoria, las nanopartículas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que se puede acoplar después a un polímero que contiene un ácido borónico que tiene la fórmula XXX. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, las nanopartículas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que se puede acoplar después a un polímero que contiene un ácido borónico correspondiente a una cualquiera de las fórmulas XXXIII, XXXIV o XXXV.

Las nanopartículas descritas en la presente memoria pueden incluir además un compuesto. En algunas realizaciones, el compuesto puede consistir en uno o más agentes terapéuticos, tales como un agente quimioterapéutico de moléculas pequeñas o un polinucleótido. En algunas realizaciones, el polinucleótido puede ser uno o más de ADN, ARN o ARN interferente (como ARNhc, ARNip o micro-ARN). En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico

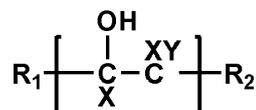
de moléculas pequeñas puede ser uno o más de camptotecina, una epotilona o un taxano. Las nanopartículas descritas en la presente memoria también pueden incluir una combinación de uno o más polinucleótidos con uno o más agentes quimioterapéuticos de moléculas pequeñas. A este respecto, uno cualquiera de los polímeros de la subparte A (fórmula VI, VII, u VIII) se puede combinar con uno cualquiera de los polímeros de la subparte B (fórmula XXIII o XIV) para formar el polímero que contiene un segmento de nanopartículas de polioliol de las nanopartículas descritas, el polímero resultante que contiene un polioliol se puede acoplar a un polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico y el polímero de la subparte A, la subparte B o el polímero que tiene ácido nitrofenilborónico se pueden formar con uno o más agentes terapéuticos, como un agente quimioterapéutico de moléculas pequeñas o un polinucleótido. En algunas realizaciones, el polímero de la subparte A (fórmula VI, VII u VIII) se puede combinar con uno cualquiera de los polímeros de la subparte B (fórmula XXIII o XIV) para formar el polímero que contiene un segmento de nanopartículas de polioliol de las nanopartículas descritas, el polímero resultante que contiene un polioliol se puede acoplar después a un polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico y el polímero de la subparte A, la subparte B, o el polímero que tiene ácido nitrofenilborónico se pueden formar con uno o más de ADN, ARN o ARN interferente (como ARNhc, ARNip o micro-ARN). En algunas realizaciones, el polímero de la subparte A (fórmula VI, VII, u VIII) se puede combinar con cualquiera de los polímeros de la subparte B (fórmula XXIII o XIV) para formar el polímero que contiene un segmento de nanopartículas de polioliol de las nanopartículas descritas, el polímero resultante que contiene un polioliol se puede acoplar después a un polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico y el polímero de la subparte A, la subparte B, o el polímero que tiene ácido nitrofenilborónico se puede formar con uno o más agentes quimioterapéuticos. En algunas realizaciones, el polímero de la subparte A (fórmula VI, VII, u VIII) se puede combinar con uno cualquiera de los polímeros de la subparte B (fórmula XXIII o XIV) para formar el polímero que contiene un segmento de nanopartículas de polioliol de las nanopartículas descritas, el polímero resultante que contiene un polioliol se puede acoplar después a un polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico y el polímero de la subparte A, la subparte B, o el polímero que tiene ácido nitrofenilborónico se pueden formar con uno o más de ADN, ARN o ARN interferente (como ARNhc, ARNip o micro-ARN). En algunas realizaciones, la conjugación entre el polímero descrito que contiene un polioliol y el polímero descrito que contiene un ácido nitrofenilborónico estará mediada por al menos un grupo hidroxilo del grupo de ácido nitrofenilborónico. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, las nanopartículas guiadas que incorporan un agente terapéutico o un polinucleótido pueden tener un polímero que contiene un polioliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X, u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que se puede acoplar después a un polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico correspondiente a una cualquiera de las fórmulas XXXIII, XXXIV o XXXV.

#### Nanopartículas guiadas

En la presente memoria se describen nanopartículas guiadas que tienen un polímero que contiene un polioliol que está conjugado con cualquiera de 5, 4, 3, 2 o 1 ligandos guiados. El polímero que contiene un segmento de nanopartículas de polioliol de las nanopartículas guiadas descritas puede tener una o más de las siguientes unidades estructurales:



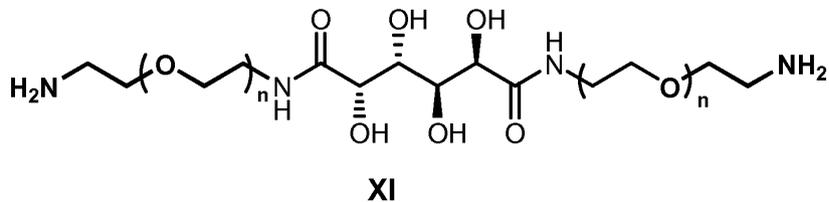
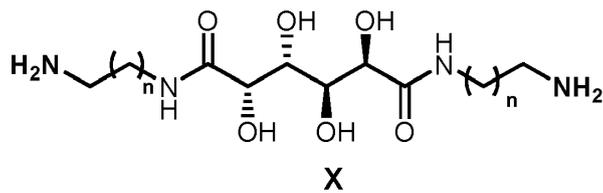
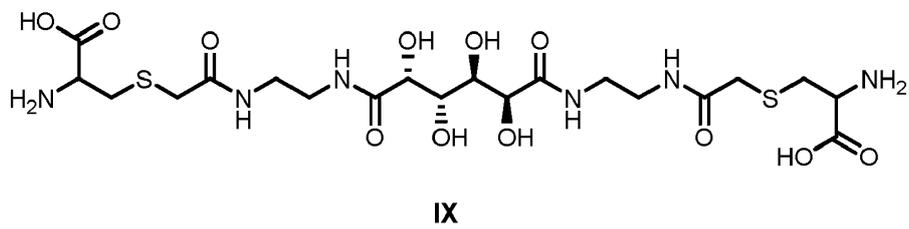
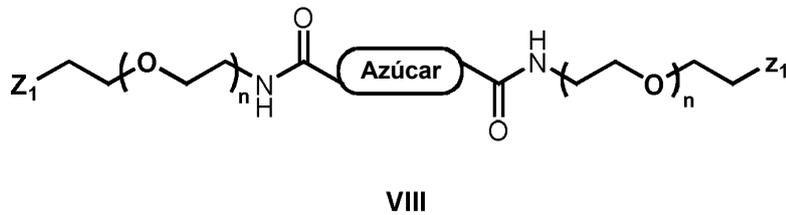
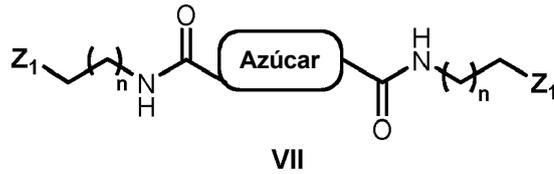
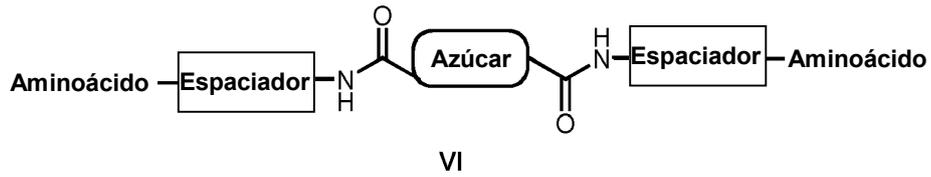
donde A es un resto orgánico de fórmula



(IV)

en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan independientemente entre cualquier grupo orgánico o basado en carbono con un peso molecular de aproximadamente 10 kDa o menos; X se selecciona independientemente entre un grupo alifático que contiene uno o más de -H, -F, -C, -N u -O; e Y se selecciona independientemente entre -OH o un resto orgánico que presenta un -OH, y B es un resto orgánico que une uno de los R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> de un primer resto A con uno de los R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> de un segundo resto A en el polímero. En algunas realizaciones, X puede ser C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>, donde n es cualquier número individual de 0-5 e Y es -OH.

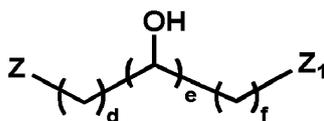
De acuerdo con la presente invención, el polímero que contiene el polioliol se deriva del acoplamiento de un compuesto de la Fórmula A con un compuesto de la Fórmula B. El compuesto de la Fórmula A puede ser uno cualquiera de:



donde el espaciador se selecciona independientemente entre cualquier grupo orgánico; el aminoácido se selecciona entre cualquier grupo orgánico que tenga una amina libre y un grupo de ácido carboxílico libre; n es cualquier número individual de 1 a 20; y Z<sub>1</sub> se selecciona independientemente entre -NH<sub>2</sub>, -OH, -SH, y -COOH; R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> pueden tener independientemente la fórmula:

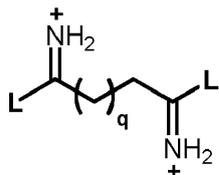
5

10

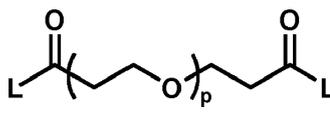


(V)

donde d es cualquier número individual de 0 a 100, e es cualquier número individual de 0 a 100, f es cualquier número individual de 0 a 100, Z es un enlace covalente que une un resto orgánico a otro, y Z<sub>1</sub> se selecciona independientemente entre -NH<sub>2</sub>, -OH, -SH, y -COOH; B es uno cualquiera de



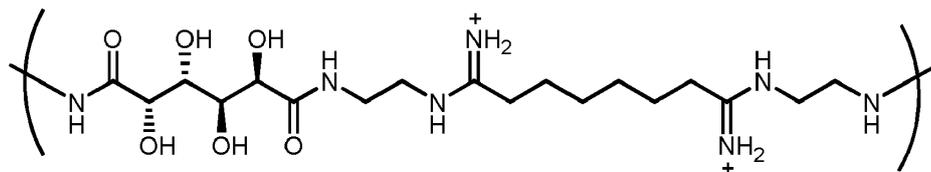
(XXIII)



(XIV)

5

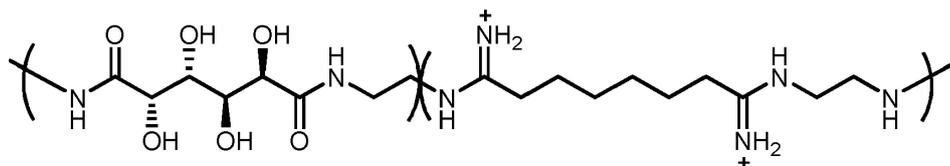
en donde q es cualquier número individual de 1-20; p es cualquier número individual de 20-200; y L es un grupo lábil, emparejándose estas subunidades B con cualquiera de las subunidades A arriba descritas. En realizaciones más particulares, el polímero que contiene un segmento de nanopartículas de polirol de las nanopartículas guiadas mostrado en la unidad estructural de la fórmula (I) puede ser:



(XXV),

10

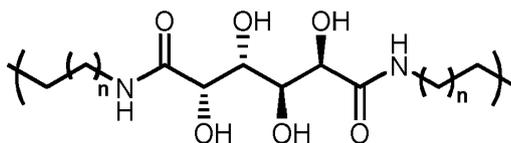
el polímero que contiene un segmento de nanopartículas de polirol de las nanopartículas guiadas mostrado en la unidad estructural de la fórmula (II) puede ser:



(XXVI), y

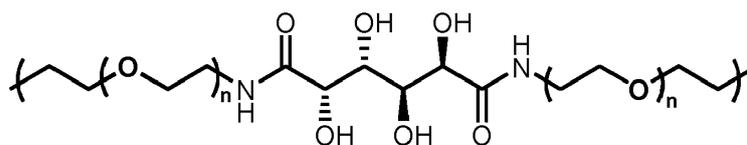
15

el polímero que contiene un segmento de nanopartículas de polirol de las nanopartículas guiadas mostrado en la unidad estructural de la fórmula (III) puede ser:



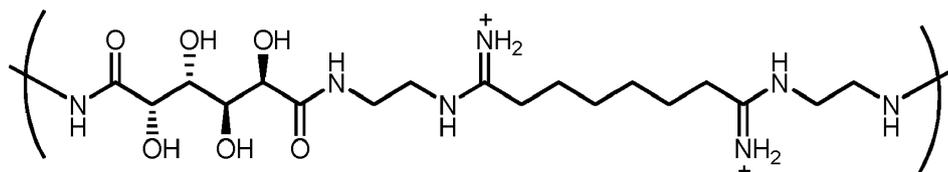
(XXVII)

o



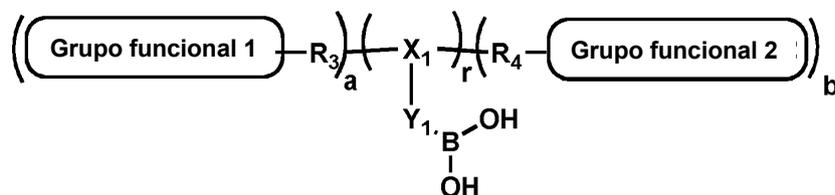
(XXVIII),

en donde n es cualquier número individual de 1-20. En algunas realizaciones de la nanopartícula guiada descrita, el polímero que contiene un poliol es:



(XXIX).

- 5 En resumen, una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (fórmula VI, VII u VIII) se puede combinar con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV) para formar el polímero que contiene un poliol de las nanopartículas guiadas descritas. En determinados aspectos descritos en la presente memoria, las nanopartículas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV).
- 10 Las nanopartículas guiadas descritas también pueden tener un polímero que contiene un ácido borónico, acoplado al polímero que contiene un poliol con un enlace covalente reversible. De acuerdo con la presente invención, el ácido borónico es un ácido nitrofenilborónico y el polímero que contiene el ácido nitrofenilborónico se conjuga con el polímero que contiene un poliol con un enlace éster de borato reversible. En algunas realizaciones, la nanopartícula se configurará para presentar el polímero que contiene un ácido borónico a un entorno externo a la nanopartícula. En
- 15 otras realizaciones adicionales, el polímero que contiene el ácido borónico se conjuga con un ligando guiado en su extremo terminal opuesto a la nanopartícula. En algunas realizaciones, el polímero que contiene un ácido borónico comprende al menos un grupo de ácido borónico terminal y tiene la fórmula general:



(XXX)

- 20 donde R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son independientemente un polímero orgánico hidrófilo, X<sub>1</sub> es un resto orgánico que contiene uno o más de -C-, -N-, o -B-, Y<sub>1</sub> es un grupo alquilo de la fórmula -C<sub>m</sub>H<sub>2m-</sub>, en la que m es ≥ 1 o un grupo aromático, r es cualquier número individual de 1-1.000, a es cualquier número individual de 0-3, y b es cualquier número individual de 0-3, y el grupo funcional 1 y el grupo funcional 2 pueden ser iguales o diferentes y se pueden seleccionar independientemente entre uno cualquiera de -B(OH)<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>, u -OH. En algunas realizaciones, estas subpartes variables del polímero descrito que contiene un ácido borónico se pueden seleccionar entre lo siguiente: R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>
- 25 pueden ser (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>t</sub>, donde t es cualquier número individual de 2 a 2.000; X<sub>1</sub> es uno cualquiera de -NH-C(=O)-, -S-S-, -C(=O)-NH-, -O-C(=O)- o -C(=O)-O- e Y<sub>1</sub> es un grupo fenilo. En algunas realizaciones, estas subpartes variables del polímero descrito que contiene un ácido borónico se pueden seleccionar entre lo siguiente: R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> pueden ser (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>t</sub>, donde t es cualquier número individual de 2 a 2.000; X<sub>1</sub> es cualquiera de -NH-C(=O)-, -S-S-, -C(=O)-NH-, -O-C(=O)- o -C(O)-O- e Y<sub>1</sub> es un grupo fenilo, y r puede tener un valor de 1, a puede tener un valor de 0 y b puede
- 30 tener un valor de 1. En una realización particular, la nanopartícula guiada descrita en la presente memoria puede incluir un polímero que contiene un ácido borónico que tiene la siguiente fórmula:

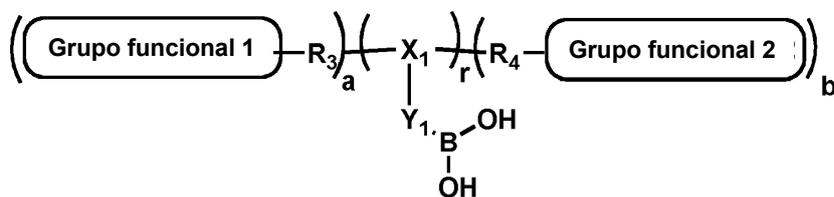


(XXXI)

donde s es cualquier número individual del 20-300.

En algunas realizaciones, el polímero que contiene un ácido borónico tiene un ácido nitrofenilborónico. En algunas realizaciones, el polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico comprende un grupo de ácido nitrofenilborónico y tiene la fórmula general:

5



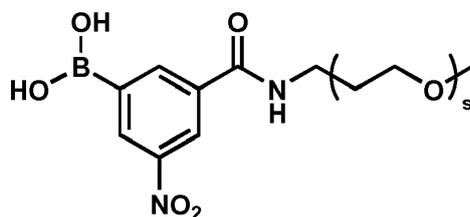
(XXX)

donde R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son independientemente un polímero orgánico hidrófilo, X<sub>1</sub> es un resto orgánico que contiene uno o más de -C-, -N-, o -B-, Y<sub>1</sub> es un grupo alquilo de la fórmula -C<sub>m</sub>H<sub>2m-</sub>, en la que m es ≥ 1 o un grupo aromático, r es cualquier número individual de 1-1.000, a es cualquier número individual de 0-3, y b es cualquier número individual de 0-3, y el grupo funcional 1 y el grupo funcional 2 pueden ser iguales o diferentes y se pueden seleccionar independientemente entre uno cualquiera de -B(OH)<sub>2</sub>-, -OCH<sub>3</sub>-, u -OH-. En algunas realizaciones, estas subpartes variables del polímero descrito que contiene un ácido borónico se pueden seleccionar entre lo siguiente: R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> pueden ser (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>t</sub>, donde t es cualquier número individual de 2 a 2.000; X<sub>1</sub> es uno cualquiera de -NH-C(=O)-, -S-S-, -C(=O)-NH-, -O-C(=O)- o -C(=O)-O- e Y<sub>1</sub> es un grupo nitrofenilo. En algunas realizaciones, estas subpartes variables del polímero descrito que contiene un ácido nitrofenilborónico se pueden seleccionar entre lo siguiente: R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> pueden ser (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>t</sub>, donde t es cualquier número individual de 2 a 2.000; X<sub>1</sub> es cualquiera de -NH-C(=O)-, -S-S-, -C(=O)-NH-, -O-C(=O)- o -C(O)-O- e Y<sub>1</sub> es un grupo nitrofenilo, y r puede tener un valor de 1, a puede tener un valor de 0 y b puede tener un valor de 1. En cada una de las realizaciones del polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico, el grupo nitro puede estar en la posición orto, meta o para, en relación con el grupo de ácido borónico, del anillo de fenilo. En otras realizaciones más, el polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico puede tener grupos adicionales presentes en el anillo de fenilo, tal como un grupo metilo. En una realización particular, la nanopartícula guiada descrita en la presente memoria puede incluir un polímero que contiene un ácido borónico que tiene una de las siguientes fórmulas:

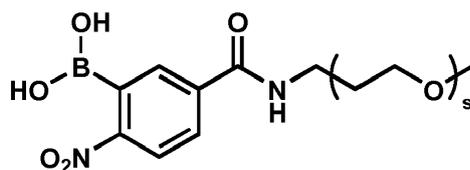
10

15

20

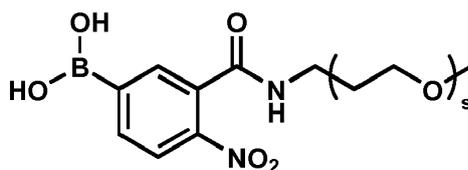


(XXXIII),



(XXXIV), o

25



(XXXV),

donde  $s$  es cualquier número individual del 20-300. Los polímeros de fórmulas XXXIII, XXXIV y XXXV se pueden modificar adicionalmente con el fin de cambiar la posición del PEG en el anillo de fenilo para que esté en la posición orto, meta o para con respecto al grupo de ácido borónico.

5 En resumen, una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (fórmula VI, VII u VIII) se puede combinar con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV) para formar el polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol de las nanopartículas descritas, el polímero resultante que contiene un poliol se puede acoplar después a un polímero que contiene un ácido borónico, consistiendo el polímero que contiene un ácido borónico en un ácido fenilborónico o un ácido nitrofenilborónico. De acuerdo con la presente invención, el polímero que contiene un ácido borónico es un ácido nitrofenilborónico. En algunas realizaciones, la conjugación entre el polímero descrito que contiene un poliol y el polímero descrito que contiene un ácido borónico estará mediada por al menos un grupo hidroxilo del grupo de ácido borónico. En determinados aspectos descritos en la presente memoria, las nanopartículas guiadas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que se puede acoplar después a un polímero que contiene un ácido borónico que tiene la fórmula XXX. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, las nanopartículas guiadas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que se puede acoplar después a un polímero que contiene un ácido borónico correspondiente a una cualquiera de las fórmulas XXXI, XXXIII, XXXIV o XXXV.

En algunos aspectos descritos en la presente memoria, las nanopartículas formadas a partir del polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol descrito en la presente memoria o de la combinación de un polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol y un polímero que contiene un ácido borónico se conjugan con un ligando guiado para formar una nanopartícula guiada que tiene una relación entre el ligando guiado y la nanopartícula de 3:1. En algunos aspectos descritos en la presente memoria, las nanopartículas formadas a partir del polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol descrito en la presente memoria, o de la combinación de un polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol y un polímero que contiene un ácido borónico, se conjugan con un ligando guiado para formar una nanopartícula guiada que tiene una relación entre el ligando guiado y la nanopartícula de 1:1. En algunos aspectos descritos en la presente memoria, las nanopartículas formadas a partir del polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol descrito en la presente memoria, o de la combinación de un polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol y un polímero que contiene un ácido borónico, se conjugan con un único ligando guiado para formar una nanopartícula guiada. En algunos aspectos, el ligando guiado descrito se conjuga con el polímero que contiene un ácido borónico en el extremo terminal opuesto al ácido borónico. El ligando guiado conjugado con la nanopartícula guiada descrita puede ser uno cualquiera de una proteína, un fragmento de proteína, un péptido de aminoácido o un aptámero de aminoácidos o de polinucleótidos, u otras moléculas de alta afinidad que se sabe que se unen a una diana de interés. En algunas realizaciones, un ligando guiado que consiste en una proteína, o fragmento de proteína, puede ser uno cualquiera de un anticuerpo, un receptor celular, un ligando para un receptor celular, tal como transferrina, o una proteína o proteína quimérica que tiene una parte de la misma. Cuando el ligando guiado consiste en un anticuerpo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, murino, de conejo, de primate no humano, de canino o de roedor, o un quimérico compuesto por dos cualesquiera de estos anticuerpos. Además, el anticuerpo se puede humanizar de modo que solo los segmentos de CDR o una pequeña porción de la región variable que comprende un segmento de CDR no sean humanos y el resto del anticuerpo sea humano. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden ser de cualquier isotipo, como IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, IgY u otro tipo de isotipo que se entiende que es producido por un mamífero. En algunas realizaciones, el ligando guiado puede incluir solamente el péptido de aminoácido de un anticuerpo, un receptor celular, un ligando para un receptor celular que es responsable de la unión a su diana.

En algunos aspectos, una nanopartícula formada a partir de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (fórmula VI, VII u VIII) combinada con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV) para formar el polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol de las nanopartículas guiadas descritas, además se acopla a cualquiera de 5, 4, 3, 2 o 1 polímeros que contienen un ácido borónico, como un ácido fenilborónico o un ácido nitrofenilborónico que está conjugado con un ligando guiado. De acuerdo con la presente invención, el polímero que contiene un ácido borónico es un ácido nitrofenilborónico.

En algunos aspectos, una nanopartícula formada a partir de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (fórmula VI, VII u VIII) combinada con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV) para formar el

polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol de las nanopartículas guiadas descritas, además se acopla a un polímero individual que contiene un ácido borónico, como un ácido fenilborónico o un ácido nitrofenilborónico que está conjugado con un ligando guiado. De acuerdo con la presente invención, el polímero que contiene un ácido borónico es un ácido nitrofenilborónico.

5 En determinados aspectos descritos en la presente memoria, las nanopartículas guiadas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que puede estar acoplado a cualquiera de 5, 4, 3, 2 o 1 polímeros que contienen un ácido borónico que tiene la fórmula XXX y que está acoplado a un ligando guiado en su extremo terminal opuesto al ácido borónico.

10 En determinados aspectos descritos en la presente memoria, las nanopartículas guiadas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que puede estar acoplado a un polímero individual que contiene un ácido borónico que tiene la fórmula XXX y que está acoplado a un ligando guiado en su extremo terminal opuesto al ácido borónico.

15 En algunos aspectos, una nanopartícula formada a partir de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (fórmula VI, VII u VIII) combinada con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV) para formar el polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol de las nanopartículas guiadas descritas, además se acopla a cualquiera de 5, 4, 3, 2 o 1 polímeros que contienen un ácido borónico, como un ácido fenilborónico o un ácido nitrofenilborónico que está conjugado con un ligando guiado, conjugándose la nanopartícula guiada resultante  
20 solamente con un único ligando guiado. De acuerdo con la presente invención, el polímero que contiene un ácido borónico es un ácido nitrofenilborónico.

En algunos aspectos, una nanopartícula formada a partir de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (fórmula VI, VII u VIII) combinada con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV) para formar el polímero que contiene un segmento de nanopartículas de poliol de las nanopartículas guiadas descritas, además se  
25 acopla a un polímero individual que contiene un ácido borónico, como un ácido fenilborónico o un ácido nitrofenilborónico que está conjugado con un ligando guiado, conjugándose la nanopartícula guiada resultante solamente con un único ligando guiado. De acuerdo con la presente invención, el polímero que contiene un ácido borónico es un ácido nitrofenilborónico.

En determinados aspectos descritos en la presente memoria, las nanopartículas guiadas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que puede estar acoplado a cualquiera de 5, 4, 3, 2 o 1 polímeros que contienen un ácido borónico que tiene la fórmula XXX y que está acoplado a un ligando guiado en su extremo terminal opuesto al ácido borónico, conjugándose la nanopartícula guiada resultante solamente  
30 con un único ligando guiado.

35 En determinados aspectos descritos en la presente memoria, las nanopartículas guiadas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que se puede acoplar a un polímero individual que contiene un ácido borónico que tiene la fórmula XXX y que se acopla a un ligando guiado en su extremo terminal opuesto al ácido borónico, conjugándose la nanopartícula guiada resultante solamente con un único ligando  
40 guiado.

En algunas realizaciones, las nanopartículas guiadas descritas en la presente memoria se conjugan con cualquier ligando guiado. En algunas realizaciones, las nanopartículas guiadas descritas en la presente memoria se conjugan con un único ligando guiado. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, las nanopartículas guiadas  
45 pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que se puede acoplar después a cualquiera de 5, 4, 3, 2 o 1 polímeros que contienen un ácido borónico correspondiente a una cualquiera de las fórmulas XXXI, XXXIII, XXXIV o XXXV, que además se conjuga con un ligando guiado seleccionado entre uno o más de una proteína, un fragmento de proteína, un péptido de aminoácido o un aptámero.

En algunas realizaciones, las nanopartículas guiadas descritas en la presente memoria se conjugan con un único ligando guiado. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, las nanopartículas guiadas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que se puede acoplar después a un polímero que contiene un ácido borónico correspondiente a una cualquiera de las fórmulas XXXI, XXXIII, XXXIV o XXXV, que además se conjuga con un único ligando guiado seleccionado entre una proteína, un fragmento de  
50 proteína, un péptido de aminoácido o un aptámero.  
55

En algunas realizaciones, las nanopartículas guiadas descritas en la presente memoria se conjugan con un único ligando guiado. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, las nanopartículas guiadas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte

A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que se puede acoplar después a cualquiera de 5, 4, 3, 2 o 1 polímeros que contienen un ácido borónico correspondiente a una cualquiera de las fórmulas XXXI, XXXIII, XXXIV o XXXV, que además se conjuga con un anticuerpo, receptor celular, ligando para un receptor celular, o una proteína o proteína quimérica que tiene una parte de la misma.

5 En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, las nanopartículas guiadas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que se puede acoplar después a un polímero que contiene un ácido borónico correspondiente a una cualquiera de las fórmulas XXXI, XXXIII, XXXIV o XXXV, que además se conjuga con un único anticuerpo, receptor celular, ligando para un receptor celular o una proteína o proteína quimérica que tiene una parte de la misma.

10 En algunas realizaciones, las nanopartículas guiadas descritas en la presente memoria se conjugan con un único ligando guiado. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, las nanopartículas guiadas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que se puede acoplar después a un polímero que contiene un ácido borónico correspondiente a una cualquiera de las fórmulas XXXI, XXXIII, XXXIV o XXXV, que además se conjuga con un único ligando guiado seleccionado entre una proteína, un fragmento de proteína, un péptido de aminoácido o un aptámero, conjugándose la nanopartícula guiada resultante solamente con un único ligando guiado.

15 En algunas realizaciones, las nanopartículas guiadas descritas en la presente memoria se conjugan con un único ligando guiado. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, las nanopartículas guiadas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que se puede acoplar después a cualquiera de 5, 4, 3, 2 o 1 polímeros que contienen un ácido borónico correspondiente a una cualquiera de las fórmulas XXXI, XXXIII, XXXIV o XXXV, que además se conjuga con un anticuerpo, receptor celular, ligando para un receptor celular, o una proteína o proteína quimérica que tiene una parte de la misma, conjugándose la nanopartícula guiada resultante solamente con un único ligando guiado.

20 En algunas realizaciones, las nanopartículas guiadas descritas en la presente memoria se conjugan con un único ligando guiado. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, las nanopartículas guiadas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que se puede acoplar después a cualquiera de 5, 4, 3, 2 o 1 polímeros que contienen un ácido borónico correspondiente a una cualquiera de las fórmulas XXXI, XXXIII, XXXIV o XXXV, que además se conjuga con un anticuerpo, receptor celular, ligando para un receptor celular o una proteína o proteína quimérica que tiene una parte de la misma, conjugándose la nanopartícula guiada resultante solamente con un único ligando guiado.

25 En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, las nanopartículas guiadas pueden tener un polímero que contiene un poliol formado a partir de la combinación de una cualquiera de las fórmulas de la subparte A (IX, X u XI) con una cualquiera de las fórmulas de la subparte B (fórmula XXIII o XIV), que se puede acoplar después a un polímero que contiene un ácido borónico correspondiente a una cualquiera de las fórmulas XXXI, XXXIII, XXXIV o XXXV, que además se conjuga con un único anticuerpo, receptor celular, ligando para un receptor celular o una proteína o proteína quimérica que tiene una parte de la misma, conjugándose la nanopartícula guiada resultante solamente con un único ligando guiado.

30 Las nanopartículas guiadas descritas en la presente memoria pueden incluir además un compuesto. En algunas realizaciones, el compuesto puede consistir en uno o más agentes terapéuticos, tales como un agente quimioterapéutico de moléculas pequeñas o un polinucleótido. En algunas realizaciones, el polinucleótido puede ser uno o más de ADN, ARN o ARN interferente (como ARN<sub>hc</sub>, ARN<sub>ip</sub> o micro-ARN). En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico de moléculas pequeñas puede ser uno o más de camptotecina, una epotilona o un taxano. Las nanopartículas guiadas descritas en la presente memoria también pueden incluir una combinación de uno o más polinucleótidos con uno o más agentes quimioterapéuticos de moléculas pequeñas.

35 Habiendo analizado los diversos tipos de nanopartículas y nanopartículas guiadas que se pueden producir utilizando los componentes descritos en la presente memoria, se pueden producir las siguientes realizaciones particulares. En una realización, la nanopartícula guiada descrita tiene un polímero que contiene ácido múcico, un agente terapéutico seleccionado entre camptotecina, una epotilona, un taxano, o una secuencia de ARN interferente, un polímero que contiene un ácido fenilborónico, que tiene la fórmula XXXI, XXXIII, XXXIV o XXXV, que está acoplado al polímero de ácido múcico con un enlace covalente reversible, y la nanopartícula guiada está configurada para presentar el polímero que contiene el ácido fenilborónico a un entorno externo a la nanopartícula, en donde el polímero que contiene el ácido fenilborónico está conjugado con un ligando guiado en su extremo terminal opuesto a la nanopartícula, comprendiendo la nanopartícula guiada un único ligando guiado.

40 En una realización, la nanopartícula guiada descrita tiene un polímero que contiene ácido múcico, un agente terapéutico seleccionado entre camptotecina, una epotilona, un taxano, o una secuencia de ARN interferente, un polímero que contiene un ácido fenilborónico, que tiene la fórmula XXXI, XXXIII, XXXIV o XXXV, que está acoplado al polímero de ácido múcico con un enlace covalente reversible, y la nanopartícula guiada está configurada para presentar el polímero que contiene el ácido fenilborónico a un entorno externo a la nanopartícula, en donde el polímero que contiene el ácido fenilborónico está conjugado con un anticuerpo en su extremo terminal opuesto a la nanopartícula, comprendiendo la nanopartícula guiada un único anticuerpo.

45 En una realización, la nanopartícula guiada descrita tiene un polímero que contiene ácido múcico, un agente terapéutico seleccionado entre camptotecina, una epotilona, un taxano, o una secuencia de ARN interferente, un polímero que contiene un ácido fenilborónico, que tiene la fórmula XXXI, XXXIII, XXXIV o XXXV, que está acoplado al

polímero de ácido múcico con un enlace covalente reversible, y la nanopartícula guiada está configurada para presentar el polímero que contiene el ácido fenilborónico a un entorno externo a la nanopartícula, en donde el polímero que contiene el ácido fenilborónico está conjugado con uno cualquiera de un anticuerpo humano, mívrido, de conejo, de primate no humano, de canino o de roedor, o un anticuerpo quimérico compuesto por dos cualesquiera de estos anticuerpos, en donde el anticuerpo es uno cualquiera de un isotipo de IgG, IgD, IgM, IgE, IgA o IgY, en su extremo terminal opuesto a la nanopartícula, comprendiendo la nanopartícula guiada un único anticuerpo.

En una realización, la nanopartícula guiada descrita tiene un polímero que contiene ácido múcico, un agente terapéutico seleccionado entre camptotecina, una epotilona, un taxano, o una secuencia de ARN interferente, un polímero que contiene un ácido fenilborónico, que tiene la fórmula XXXI, XXXIII, XXXIV o XXXV, que está acoplado al polímero de ácido múcico con un enlace covalente reversible, y la nanopartícula guiada está configurada para presentar el polímero que contiene el ácido fenilborónico a un entorno externo a la nanopartícula, en donde el polímero que contiene el ácido fenilborónico está conjugado con un receptor celular en su extremo terminal opuesto a la nanopartícula, comprendiendo la nanopartícula guiada un único receptor celular.

En una realización, la nanopartícula guiada descrita tiene un polímero que contiene ácido múcico, un agente terapéutico seleccionado entre camptotecina, una epotilona, un taxano, o una secuencia de ARN interferente, un polímero que contiene un ácido fenilborónico, que tiene la fórmula XXXI, XXXIII, XXXIV o XXXV, que está acoplado al polímero de ácido múcico con un enlace covalente reversible, y la nanopartícula guiada está configurada para presentar el polímero que contiene el ácido fenilborónico a un entorno externo a la nanopartícula, en donde el polímero que contiene el ácido fenilborónico se conjuga con un ligando receptor en su extremo terminal opuesto a la nanopartícula, comprendiendo la nanopartícula guiada un solo ligando receptor.

### Ejemplos

El sistema de métodos descrito en la presente memoria se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos. Los expertos en la técnica apreciarán la aplicabilidad de las características descritas en detalle para los métodos de detección de ácido nucleico y detección de otras dianas, tales como proteínas, antígenos, células eucariotas o procaríotas, y similares.

Todos los reactivos químicos se obtuvieron de proveedores comerciales y se utilizaron tal como se recibieron sin purificación adicional. Las muestras de polímero se analizaron en un Viscotek GPC System equipado con una matriz de detección triple TDA 302 que consiste en un detector de índice de refracción (IR) diferencial, un viscosímetro diferencial y un detector de dispersión de luz de ángulo bajo. Como eluyente se utilizó una solución de ácido acético al 7,5% con un caudal de 1 ml/min.

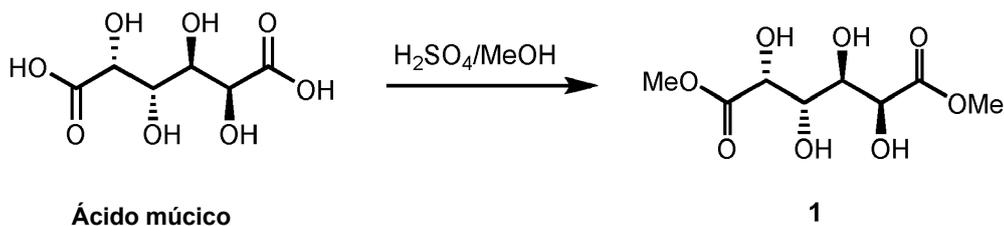
El pGL3, un plásmido que contiene el gen de luciferasa de luciérnaga se extrajo y se purificó a partir de bacterias que expresan pGL3. El siGL3 se adquirió de Integrated DNA Technologies (secuencia proporcionada más abajo). El siCON1 (secuencia proporcionada más abajo) se adquirió de Dharmacon. Se usaron células HeLa para determinar la eficacia del aporte de ADNp o ARNip mediante el polímero catiónico de diamina de ácido múcico-DMS.

Tabla 1: Secuencias de ARNip

Plásmido	Secuencias	SEQ ID N°
siGL3	GUGCCAGAGUCCUUCGAUAdTdT (sentido)	SEQ ID N° 1
	UAUCGAAGGACUCUGGCACdTdT (antisentido)	SEQ ID N° 2
siCON1	UAGCGACUAAACACAUCAAUU (sentido)	SEQ ID N° 3
	UUGAUGUGUUUAGUCGCUAUU (antisentido)	SEQ ID N° 4

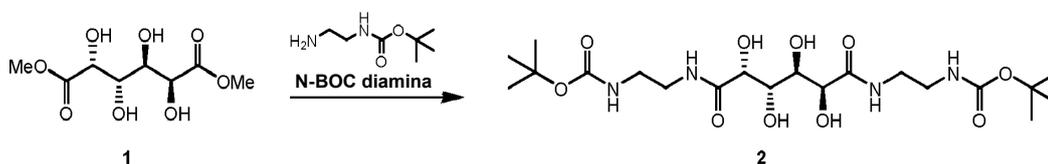
#### Ejemplo 1: Síntesis de éter dimetilíco de ácido múcico, (1)

En un matraz de fondo redondo de 500 ml que contenía 120 ml de metanol y 0,4 ml de ácido sulfúrico concentrado se añadieron 5 g (22,8 mmol) de ácido múcico (Aldrich). Esta mezcla se dejó bajo reflujo a 85 °C a lo largo de la noche bajo agitación constante. A continuación, la mezcla se filtró, se lavó con metanol y después se recristalizó a partir de una mezcla de 80 ml de metanol y 0,5 ml de trietilamina. Después de secar bajo vacío a lo largo de la noche, se obtuvieron 8,0 g (33,6 mmol, 71%) de éter dimetilíco de ácido múcico. <sup>1</sup>H RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 4,88-4,91 (d, 2H), 4,78-4,81 (m, 2H), 4,28-4,31 (d, 2H), 3,77-3,78 (d, 2H), 3,63 (s, 6H). ESI/MS (m/z): 261,0 [M+Na]<sup>+</sup>



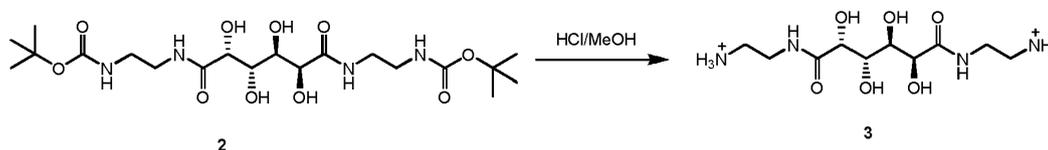
## Ejemplo 2: Síntesis de diamina de ácido místico protegida con N-BOC, (2)

Una mezcla de 8 g (33,6 mmol) de éster dimetílico de ácido místico (1; Ejemplo 1), 12,4 ml (88,6 mmol) de trietilamina y 160 ml de metanol se calentó bajo reflujo a 85 °C en un matraz de fondo redondo de 500 ml bajo agitación constante durante 0,5 h antes de la adición de 14,2 g (88,6 mmol) de N-BOC diamina (Fluka) disuelta en metanol (32 ml). Luego, esta suspensión de reacción se llevó de nuevo a reflujo. Después de calentar bajo reflujo a lo largo de la noche, la mezcla se filtró, se lavó con metanol, se recristalizó a partir de metanol y luego se secó bajo vacío para producir 9,4 g (19 mmol, 57%) de diamina de ácido místico protegida con N-BOC. <sup>1</sup>H RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 7,66 (m, 2H), 6,79 (m, 2H), 5,13-5,15 (d, 2H), 4,35-4,38 (d, 2H), 4,08-4,11 (m, 2H), 3,78-3,80 (d, 2H), 2,95-3,15 (m, 8H), 1,38 (s, 18). ESI/MS (m/z): 517,1 [M+Na]<sup>+</sup>



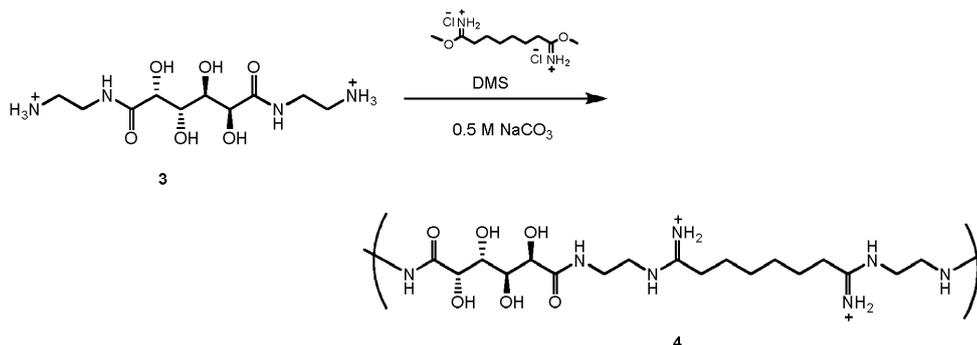
## Ejemplo 3: Síntesis de diamina de ácido místico, (3)

Se transfirieron 8 g (16,2 mmol) de la diamina de ácido místico protegida con N-BOC (2; Ejemplo 2) a un matraz de fondo redondo de 500 ml que contenía HCl 3 M en metanol (160 ml) y se dejó bajo reflujo a lo largo de la noche a 85 °C bajo agitación constante. Después, el precipitado se filtró, se lavó con metanol y se secó bajo vacío a lo largo de la noche para obtener 5,7 g (15,6 mmol, 96%) de diamina de ácido místico. <sup>1</sup>H RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 7,97 (m, 8H), 5,35-5,38 (m, 2H), 4,18-4,20 (m, 2H), 3,82 (m, 2H), 3,35-3,42 (m, 8H), 2,82-2,90 (m, 4H). ESI/MS (m/z): 294,3 [M]<sup>+</sup>, 317,1 [M+Na]<sup>+</sup>, 333,0 [M+K]<sup>+</sup>



## Ejemplo 4: Copolímero de diamina de ácido místico-DMS (MAP), (4)

Un tubo de Eppendorff de 1,5 ml se cargó con una solución de 85,5 mg (0,233 mmol) de la sal bis(clorhidrato) del Ejemplo 3 (3) en 0,8 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M. Después se añadió dimetilsuberimidato•2HCl (DMS, Pierce Chemical Co., 63,6 mg, 0,233 mmol) y la solución se agitó con formación de vórtice y se centrifugó para disolver los componentes. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 h. La mezcla se diluyó luego a 8 ml con agua y el pH se llevó a 4 con la adición de HCl 1 N. Esta solución se dializó después con una membrana de diálisis de 3500 MWCO (tubo de diálisis plisado Pierce) en ddH<sub>2</sub>O durante 24 h. La solución dializada se liofilizó a sequedad para obtener 49 mg de un polvo esponjoso blanco. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, dDMSO) δ 9,15 (bs), 7,92 (bs), 5,43 (bs), 4,58 (bs), 4,17 (bs), 3,82 (bs), 3,37 (bs), 3,28 (bs), 2,82 (bs), 2,41 (bs), 1,61 (bs), 1,28 (bs), <sup>13</sup>C RMN (126 MHz, dDMSO) δ 174,88 (s, 1H), 168,38 (s, 1H), 71,45 (s, 4H), 71,22 (s, 3H), 42,34 (s, 2H), 36,96 (s, 3H), 32,74 (s, 3H), 28,09 (s, 4H), 26,90 (s, 4H). Mw [GPC] = 2520, Mw/Mn = 1,15.

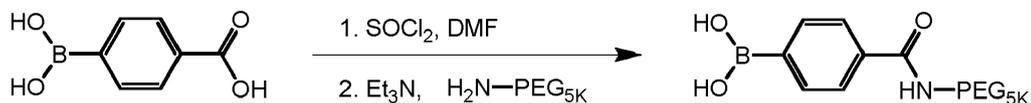


El polímero 4 es un ejemplo de un polímero que contiene un polirol de tipo A-B catiónico (la estructura repetitiva es ABABAB...).

Ejemplo 5: Ácido borónico-amida-PEG<sub>5000</sub>, (5)

5 Cuando un polímero del Ejemplo 4 se ensambla con ácidos nucleicos, por ejemplo, ARNip, se formarán nanopartículas. Estas nanopartículas deberán tener estabilización estérica para ser utilizadas en mamíferos y, opcionalmente, podrían incluir agentes guiados. Para realizar estas dos funciones, las nanopartículas se pueden decorar con PEG para la estabilización estérica y ligandos PEG-guiados. Para ello se preparan compuestos de PEG que contienen ácidos borónicos. Por ejemplo, un PEG que contiene ácido borónico se puede sintetizar de acuerdo con el siguiente ejemplo.

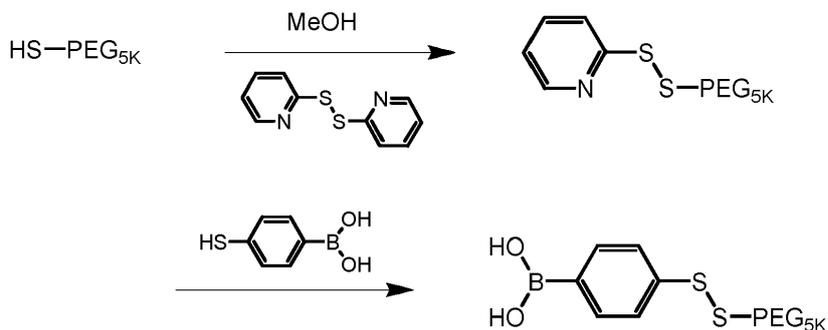
10 332 mg de ácido 4-carboxifenilborónico (2 mmol) se disolvieron en 8 ml de SOCl<sub>2</sub>. A esto se le añadieron unas pocas gotas de DMF y la mezcla se sometió a reflujo bajo argón durante 2 h. El exceso de SOCl<sub>2</sub> se retiró bajo presión reducida y el sólido resultante se disolvió en 10 ml de diclorometano anhidro. A esta solución se le añadieron 500 mg de PEG<sub>5000</sub>-NH<sub>2</sub> (2 mmol) y 418 µl de trietilamina (60 mmol) disueltos en 5 ml de diclorometano a 0 °C bajo argón. La mezcla resultante se calentó a temperatura ambiente y la agitación continuó a lo largo de la noche. El disolvente de diclorometano se retiró bajo presión reducida y el líquido resultante se precipitó con 20 ml de éter dietílico. El precipitado se filtró, se secó y se volvió a disolver en ddH<sub>2</sub>O. La solución acuosa se filtró con un filtro de 0,45 µm y se dializó con una membrana de diálisis 3500 MWCO (tubo de diálisis plisado Pierce) en ddH<sub>2</sub>O durante 24 h. La solución dializada se liofilizó a sequedad. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, dDMSO) δ 7,92 - 7,77 (m), 4,44 (d), 4,37 (t), 3,49 (m), 2,97 (s).



20 Ejemplo 6: Ácido borónico-disulfuro-PEG<sub>5000</sub>, (6)

Una versión escindible (bajo condiciones reductoras) del compuesto de PEG del Ejemplo 5 también se puede sintetizar de la siguiente manera.

25 En un frasco de vidrio equipado con una barra de agitación se introdujeron 250 mg de PEG<sub>5000</sub>-SH (0,05 mmol, LaySanBio Inc.). A esto se le añadieron 110 mg de aldritol-2 (0,5 mmol, Aldrich) disueltos en 4 ml de metanol. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, tras lo cual se añadieron 77 mg de ácido mercaptofenilborónico (0,5 mmol, Aldrich) en 1 ml de metanol. La solución resultante se agitó durante otras 2 h a temperatura ambiente. El metanol se retiró bajo vacío y el residuo se disolvió de nuevo en 2 ml de diclorometano. A la solución de diclorometano se le añadieron 18 ml de éter dietílico y la mezcla se dejó reposar durante 1 h. El precipitado resultante se recogió mediante centrifugación, se lavó varias veces con éter dietílico y se secó. El sólido seco se disolvió de nuevo en agua, se filtró con un filtro de 0,45 µm y se dializó con una membrana de diálisis 3500 MWCO (tubo de diálisis plisado Pierce) en ddH<sub>2</sub>O durante 15 h. La solución dializada se liofilizó a sequedad. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, dDMSO) δ 8,12 - 8,00 (m), 7,83 - 7,72 (m), 7,72 - 7,61 (m), 7,61 - 7,43 (m), 3,72 (d, J = 5,4), 3,68 - 3,15 (m), 3,01 - 2,83 (m).

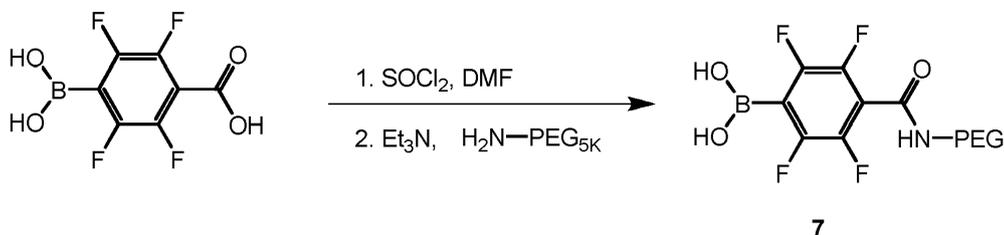


Ejemplo 7: Síntesis de ácido (2,3,5,6)-tetrafluorofenil borónico-PEG<sub>5000</sub>, (7)

35 Una versión fluorada del compuesto de PEG que contiene ácidos borónicos del Ejemplo 5 se puede sintetizar y usar como un agente de formación de imágenes con la nanopartícula terapéutica. Los átomos de flúor para la formación de imágenes se pueden incorporar como se describe e ilustra a continuación.

Un ácido (2,3,5,6)-fluorocarboxifenilborónico se disuelve en SOCl<sub>2</sub> en exceso (~ 100 eq.) y se añaden unas gotas de DMF. La mezcla se somete a reflujo bajo argón durante 2 h. El exceso de SOCl<sub>2</sub> se retira bajo presión reducida y el

- residuo resultante se disuelve en diclorometano anhidro. A esta solución se le añaden PEG<sub>5000</sub>-NH<sub>2</sub> (1 eq.) y trietilamina (30 eq.) disueltos en diclorometano a 0 °C bajo argón. La mezcla resultante se calienta a temperatura ambiente y la agitación continúa a lo largo de la noche. El disolvente de diclorometano se retira bajo presión reducida y el líquido resultante se precipita con éter dietílico. El precipitado se filtra, se seca y se disuelve de nuevo en ddH<sub>2</sub>O. Después, la solución acuosa se filtra con un filtro de 0,45 µm y se dializa con una membrana de diálisis 3500 MWCO (tubo de diálisis plisado Pierce) en ddH<sub>2</sub>O durante 24 h. La solución dializada se liofiliza a sequedad.

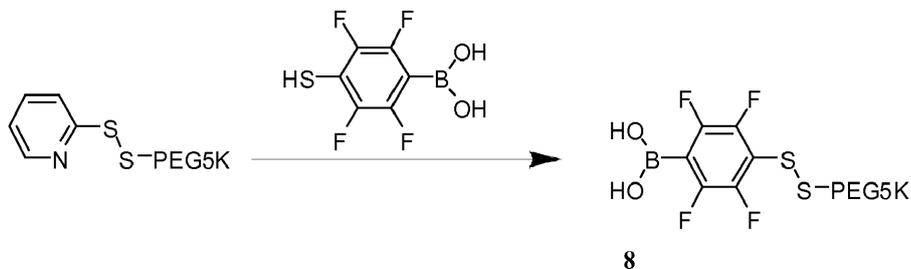


- El compuesto que contiene flúor es útil para proporcionar <sup>19</sup>F en la nanopartícula. El <sup>19</sup>F se puede detectar mediante espectroscopía de resonancia magnética utilizando una IRM de paciente estándar. La adición del <sup>19</sup>F permite obtener imágenes de las nanopartículas (se puede hacer solo para obtener imágenes o con la adición de un agente terapéutico puede permitir la obtención de imágenes y la terapia).

#### Ejemplo 8: Síntesis de ácido (2,3,5,6)-tetrafluorofenil borónico-disulfuro-PEG<sub>5000</sub>, (8)

- Una versión fluorada del compuesto de PEG escindible que contiene ácidos borónicos del Ejemplo 5 se puede sintetizar y utilizar como un agente de formación de imágenes con la nanopartícula terapéutica. Los átomos de flúor para la formación de imágenes se pueden incorporar como se describe e ilustra a continuación.

- En un frasco de vidrio equipado con una barra de agitación se introducen 250 mg de PEG<sub>5000</sub>-SH (0,05 mmol, LaySanBio Inc.). A esto se le añaden 110 mg de aldritol-2 (0,5 mmol, Aldrich) disueltos en 4 ml de metanol. La solución se agita a temperatura ambiente durante 2 h, tras lo cual se añaden 77 mg de ácido (2,3,5,6)-fluoro-4-mercaptofenilborónico (0,5 mmol) en 1 ml de metanol. La solución resultante se agita durante otras 2 h a temperatura ambiente. El metanol se retira bajo vacío y el residuo se disuelve de nuevo en 2 ml de diclorometano. Luego se añaden 18 ml de éter dietílico a la solución de diclorometano y la mezcla se deja reposar durante 1 h. El precipitado resultante se recoge por centrifugación, se lava varias veces con éter dietílico y se seca. El sólido seco se disuelve de nuevo en agua, se filtra con un filtro de 0,45 µm y se dializa con una membrana de diálisis 3500 MWCO (tubo de diálisis plisado Pierce) en ddH<sub>2</sub>O durante 15 h. La solución dializada se liofiliza a sequedad.



- #### Ejemplo 9: Síntesis de ácido borónico-PEG<sub>5000</sub>-transferrina, (9)

- Un agente guiado se podría disponer en el otro extremo del PEG con respecto al ácido borónico en los compuestos de los Ejemplos 5-8, por ejemplo de acuerdo con una estrategia ilustrada esquemáticamente en la Figura 12 con referencia a la unión de transferrina.

- Por lo tanto, los componentes de un sistema que contiene ácidos nucleicos como agente terapéutico podrían ser (el ligando guiado podría ser una proteína como la transferrina (Figura 12), un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un péptido como RGD o LHRH, una molécula pequeña como folato o galactosa, etc.). Un agente guiado PEGilado con ácido borónico se puede sintetizar de la siguiente manera.

- En particular, para sintetizar el ácido borónico PEG<sub>5000</sub>-transferrina de acuerdo con la estrategia ilustrada esquemáticamente en la Figura 12 se llevó a cabo el siguiente procedimiento. Se añadió una solución de 10 mg (0,13 µmol) de holo-transferrina humana (rica en hierro) (Sigma Aldrich) en 1 ml de tampón PBS 0,1 M (pH 7,2) a 3,2 mg de OPSS-PEG<sub>5000</sub>-SVA (5 eq. 0,64 µmol, LaysanBio Inc.). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La Transferrina PEGilada se purificó a partir de OPSS-PEG<sub>5000</sub>-SVA sin reaccionar usando un Ultracel 50.000 MWCO (Amicon Ultra-4, Millipore) y a partir de transferrina sin reaccionar usando una columna de filtración en gel G3000SWx1 (Tosoh Biosep) (confirmada por HPLC y análisis MALDI-TOF). Después se incubaron 100 µg del OPSS-PEG<sub>5000</sub> transferrina PEGilada en 100 µl a temperatura ambiente con 20 µl de ácido 4-mercaptofenilborónico (1 µg/µl, 20 µg, 100 eq.) durante 1 h. Después de la incubación, la solución se dializó dos veces con un dispositivo YM-30.000

NMWI (Millipore) para retirar el 4-mercaptofenilborónico en exceso y el producto secundario de piridil-2-tiona.

Ejemplo 10: Formulación de partículas de MAP-ácido nucleico - ensayo de retardo de gel

5 Como se muestra en el diagrama de la Figura 1, 1 µg de ADN plasmídico o ARNip en agua libre de DNasa y RNasa (0,1 µg/µl, 10 µl) se mezcló con 10 µl de MAP en diversas concentraciones en agua libre de DNasa y RNasa para obtener relaciones de carga (carga "+" en el polímero con respecto a carga "-" en ácido nucleico) de 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 y 5. Las mezclas resultantes se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. 10 µl de las soluciones de 20 µl se cargaron en un gel de agarosa al 1% con 3,5 µl de tampón de carga y el gel se sometió a electroforesis a 80 V durante 45 minutos, tal como se muestra en las Figuras 3 y 4. El ácido nucleico que no está contenido dentro de la nanopartícula migrará sobre el gel. Estos resultados proporcionan una guía de las relaciones de carga necesarias para la contención de ácidos nucleicos dentro de las nanopartículas.

Ejemplo 11: Tamaño de partícula y potencial zeta de partículas de MAP-ácido nucleico

15 1 µg de ADN plasmídico en agua libre de DNasa y RNasa (0,1 µg/µl, 10 µl) se mezcló con 10 µl de MAP en diversas concentraciones en agua libre de DNasa y RNasa para obtener relaciones de carga de 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, y 5. Las mezclas resultantes se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de 20 µl se diluyó después con agua libre de DNasa y RNasa a 70 µl para las mediciones del tamaño de partícula. Esta solución de 70 µl se diluyó después a 1.400 µl con KCl 1 mM para las mediciones del potencial zeta. Las mediciones del tamaño de partícula y del potencial zeta se realizaron en un instrumento de dispersión dinámica de luz (DLS) ZetaPals (Brookhaven Instruments). Los resultados se muestran en la Figura 5.

Ejemplo 12: Estabilización del tamaño de partícula mediante PEGilación con ácido borónico PEG<sub>5k</sub>

20 Como se muestra en el diagrama de la Figura 2, 2 µg de ADN plasmídico en agua libre de DNasa y RNasa (0,45 µg/µl, 4,4 µl) se diluyeron a 80 µl en agua libre de DNasa y RNasa. Esta solución plasmídica se mezcló con 4,89 µg de MAP (0,5 µg/µl, 9,8 µl), también diluidos a 80 µl en agua libre de DNasa y RNasa para obtener una relación de carga 3 +/- y una concentración final de plásmido de 0,0125 µg/µl. La mezcla resultante se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A esta solución se le añadieron 480 µg de ácido borónico PEG<sub>5k</sub>, (compuesto 6; Ejemplo 6), (20 µg/µl, 24 µl). Esta mezcla se incubó después durante 30 minutos, se dializó dos veces en agua libre de DNasa y RNasa con una membrana de 0,5 ml 100.000 MWCO (BIOMAX, Millipore Corporation) y se reconstituyó en 160 µl de agua libre de DNasa y RNasa. La mitad de la solución se diluyó con 1,4 ml de KCl 1 mM para las mediciones del potencial zeta (Figura 6). Se ha de señalar que el potencial zeta de las nanopartículas que contienen BA muestra un potencial zeta más bajo que las nanopartículas que no lo contienen. Estos resultados apoyan la conclusión de que las nanopartículas que contienen BA tienen el BA situado en el exterior de las nanopartículas. La otra mitad se utilizó para medir el tamaño de partícula. El tamaño de partícula se midió cada minuto durante 5 minutos, tras lo cual se añadieron 10,2 µl de 10X PBS de tal modo que la solución final de 90,2 µl estaba en 1X PBS. Después, el tamaño de partícula se midió de nuevo cada minuto durante otros 10 minutos, tal como se muestra en la Figura 7. Las nanopartículas que contienen BA separadas de componentes que no están en forma de partículas (por filtración) son estables en PBS mientras que las partículas sin el BA no lo son. Estos datos apoyan la conclusión de que las nanopartículas que contienen BA tienen el BA situado en su exterior ya que están estabilizadas contra la agregación en PBS.

Ejemplo 13: Transfección de partículas de MAP/ADNp en células HeLa

40 Unas células HeLa se sembraron en placas de 24 pocillos a razón de 20.000 células/pocillo 48 h antes de la transfección, y se cultivaron en medio complementado con FBS al 10%. Las partículas de MAP se formularon de modo que contuvieran 1 µg de pGL3 en 200 µl de Opti-MEM I en diversas relaciones de carga de polímero con respecto a ADNp (véase el Ejemplo 9). Se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se añadió la formulación de partículas. Las células se incubaron posteriormente a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 h antes de la adición de 800 µl de medio de cultivo complementado con FBS al 10%. Después de 48 h de incubación se analizó la viabilidad celular de una fracción de las células utilizando un ensayo MTS. Las células restantes se sometieron a lisis en 100 µl de 1X reactivo de lisis de cultivo celular de luciferasa. La actividad de la luciferasa se determinó mediante la adición de 100 µl de reactivo de ensayo de luciferasa a 10 µl de lisado celular y la bioluminiscencia se cuantificó utilizando un luminómetro Monolight. La actividad de la luciferasa se describe posteriormente como unidades de luz relativas (RLU) por 10.000 células. Los resultados se muestran en la Figura 8 y la Figura 9.

Ejemplo 14: Co-transfección de partículas de MAP/ADNp y/o ARNip en células HeLa

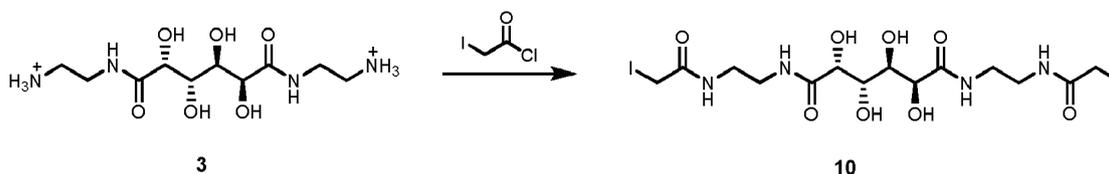
50 Unas células HeLa se sembraron en placas de 24 pocillos a razón de 20.000 células/pocillo 48 h antes de la transfección y se cultivaron en medio complementado con FBS al 10%. Las partículas de MAP se formularon de modo que contuvieran 1 µg de pGL3 y 50 nM de siGL3 en 200 µl de Opti-MEM I en una relación de carga de 5 +/- . Las partículas que contenían solo pGL3 o pGL3 y siCON se usaron como controles. Se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se añadió la formulación de partículas. Las células se incubaron posteriormente a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 h antes de la adición de 800 µl de medio de cultivo complementado con FBS al 10%. Después de 48 h de incubación, las células se analizaron para determinar la actividad de luciferasa y la viabilidad celular tal como se describe en el Ejemplo 12. Los resultados se muestran en la Figura 10. Dado que las RLU se reducen en las transfecciones con el siGL3 (secuencia correcta), tanto el siGL3 como el pGL3 deben ser aportados conjuntamente.

## Ejemplo 15: Transfección de MAP/siGL3 en células HeLa-LUC

Unas células HeLa-LUC (que contienen el gen que codifica la proteína luciferasa de luciérnaga) se sembraron en placas de 24 pocillos a razón de 20.000 células/pocillo 48 h antes de la transfección y se cultivaron en medio complementado con FBS al 10%. Las partículas de MAP se formularon de modo que contuvieran siGL3 50 y 100 nM en 200  $\mu$ l de Opti-MEM I con una relación de carga de 5 +/- . Se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se añadió la formulación de partículas. Las células se incubaron posteriormente a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 h antes de la adición de 800  $\mu$ l de medio de cultivo complementado con FBS al 10%. Después de 48 h de incubación, las células se analizaron para determinar la actividad de luciferasa y la viabilidad celular tal como se describe en el Ejemplo 12. Los resultados se muestran en la Figura 11. Dado que las RLU disminuyen con una concentración creciente de siGL3, estos datos sugieren que se puede producir la inhibición de un gen endógeno.

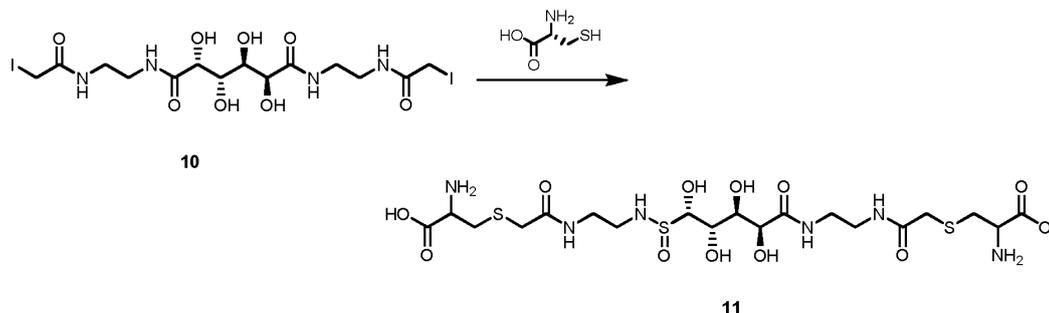
## Ejemplo 16: Síntesis de diioduro de ácido múcico, (10)

1 g (2,7 mmol) de diamina de ácido múcico (Ejemplo 3) se mezcló con 3,8 ml (27,4 mmol) de trietilamina y 50 ml de DMF anhidra antes de la adición gota a gota de 1,2 ml (13,7 mmol) de cloruro de yodoacetilo en un matraz de fondo redondo de 250 ml. Esta mezcla se dejó reaccionar a lo largo de la noche con agitación constante a temperatura ambiente. El disolvente se retiró posteriormente mediante una bomba de vacío, el producto se filtró, se lavó con metanol y se secó bajo vacío para producir 0,8 g (1,3 mmol, 46%) de diioduro de ácido múcico. <sup>1</sup>H RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO)  $\delta$  8,20 (s, 2H), 7,77 (s, 2H), 4,11 (m, 2H), 4,03 (m, 2H), 3,79 (m, 2H), 3,11-3,17 (m, 2H), 1,78 (d, 2H). ESI/MS (m/z): 652,8 [M+Na]<sup>+</sup>



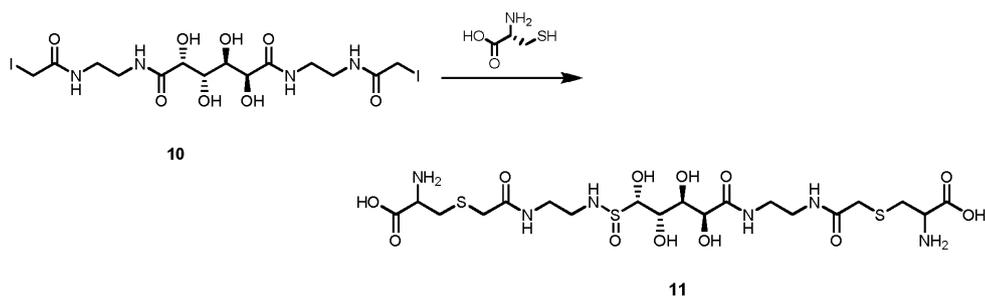
## Ejemplo 17: Síntesis de la dicisteína de ácido múcico, (11)

A 7 ml de carbonato de sodio desgasificado 0,1 M se les añadieron 17 mg de L-cisteína y 0,4 g de diioduro de ácido múcico. La suspensión resultante se llevó a reflujo a 150 °C durante 5 h hasta que la solución se volvió transparente. Esta mezcla se enfrió después a temperatura ambiente y se ajustó a pH 3 a través de HCl 1 N. Luego se empleó una adición lenta de acetona para la precipitación del producto. Después de la filtración, lavado con acetona y secado al vacío, se obtuvieron 60 mg de producto bruto.



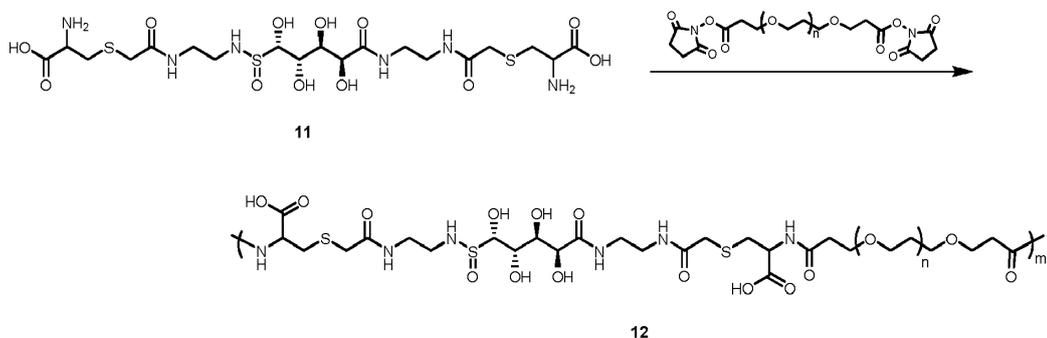
## Ejemplo 17: Síntesis de dicisteína de ácido múcico, (11)

A 20 ml de tampón de fosfato de sodio desgasificado 0,1 M con pH 7,5 en un matraz de fondo redondo de 50 ml se les añadieron 0,38 g de L-cisteína (3,2 mmol) y 0,40 g (0,6 mmol) de diioduro de ácido múcico. La suspensión resultante se dejó a reflujo a 75 °C a lo largo de la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se liofilizó. Posteriormente se añadieron 80 ml de DMF a este polvo liofilizado de color marrón claro y se llevó a cabo la separación mediante filtración del reactivo en exceso insoluble y las sales de fosfato del producto soluble. La DMF se retiró bajo presión reducida y el producto se secó al vacío para obtener 12 mg (0,02 mmol, 3%) de dicisteína de ácido múcico.



Ejemplo 18: Síntesis de polímeros, (poli(ácido múxico-DiCys-PEG)) (12)

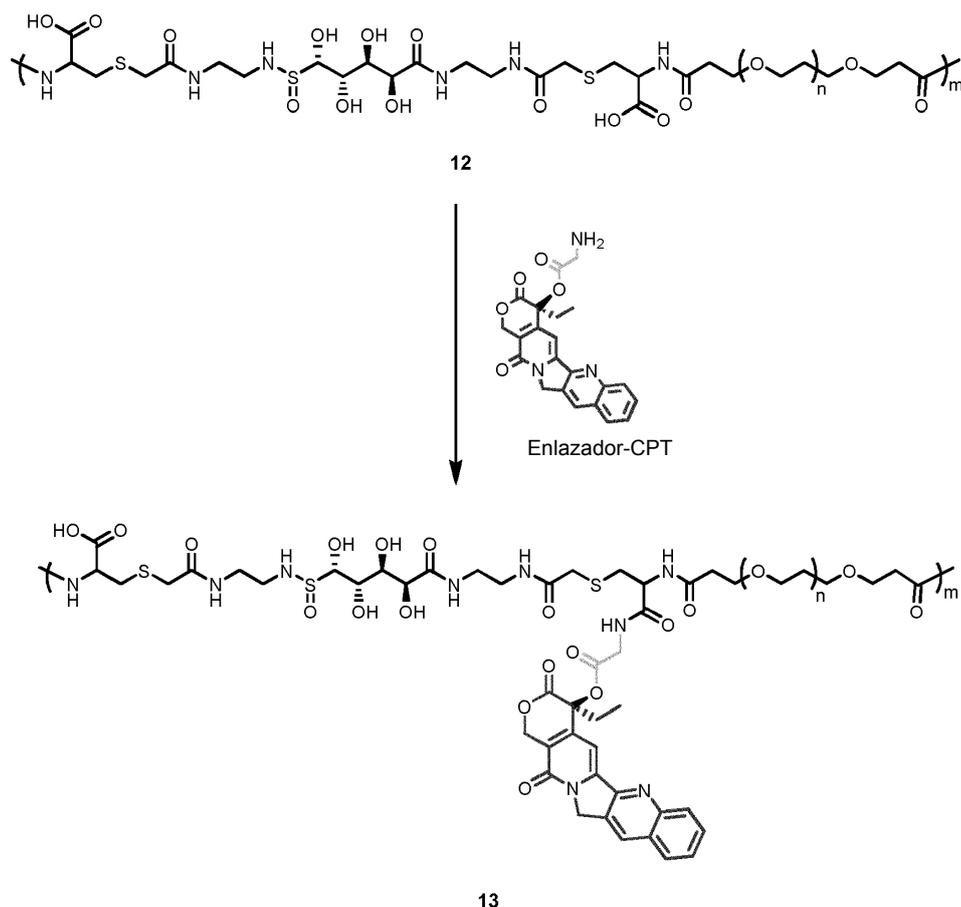
- 12 mg (21,7  $\mu\text{mol}$ ) de dicisteína de ácido múxico y 74 mg (21,7  $\mu\text{mol}$ ) de PEG-DiSPA 3400 se secaron bajo vacío antes de la adición de 0,6 ml de DMSO anhidro bajo argón en un matraz de fondo redondo de 2 cuellos de 10 ml. Después de 10 minutos de agitación, se transfirieron 9  $\mu\text{l}$  (65,1  $\mu\text{mol}$ ) de DIEA anhidra al recipiente de reacción bajo argón. Esta mezcla se agitó bajo argón a lo largo de la noche. La solución que contenía el polímero se dializó después utilizando un dispositivo centrífugo de membrana de 10 kDa y se liofilizó para producir 47 mg (58%) de poli(ácido múxico-DiCys-PEG).



- 10 Este polímero que contiene polioles es un polímero AB aniónico.

Ejemplo 19: Unión covalente del fármaco (camptotecina, CPT) con polímero de ácido múxico, (13)

- En un frasco de vidrio se disolvieron 10 mg (2,7  $\mu\text{mol}$  de unidades de repetición) de poli(ácido múxico-DiCys-PEG) en 1,5 ml de DMSO anhidro. Después de agitar durante 10 minutos, se añadieron a la mezcla de reacción 1,1  $\mu\text{l}$  de DIEA (6,3  $\mu\text{mol}$ ), 3,3 mg (6,3  $\mu\text{mol}$ ) de TFA-Gly-CPT, 1,6 mg (8,1  $\mu\text{mol}$ ) de EDC y 0,7 mg (5,9  $\mu\text{mol}$ ) de NHS. Después de agitar durante 8 horas, se añadieron 1,5 ml de etanol y los disolventes se retiraron bajo presión reducida. El precipitado se disolvió en agua y los materiales insolubles se retiraron por filtración a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ . Después, la solución de polímero se dializó contra agua a través de una membrana de 10 kDa y posteriormente se liofilizó para obtener el conjugado de poli(ácido múxico-DiCys-PEG) -CPT.



Ejemplo 20: Formulación de nanopartículas con polímero de CPT-ácido mónico (13) en agua, (20)

Los diámetros efectivos de poli(ácido mónico-DiCys-PEG) y poli(ácido mónico-DiCys-PEG)-CPT conjugados se midieron formulando los polímeros en agua bidestilada (0,1-10 mg/ml) y se evaluaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) utilizando un instrumento ZetaPALS (Brookhaven Instrument Co). Posteriormente se registraron y promediaron 3 operaciones sucesivas de 1 minuto cada una. Los potenciales zeta de los dos compuestos se midieron en una solución de KCl 1,1 mM utilizando un instrumento ZetaPALS (Brookhaven Instrument Co). Después se realizaron 10 operaciones automatizadas sucesivas en residuos diana de 0,012 y se promediaron los resultados (Figura 14). En particular se midieron dos distribuciones para el conjugado de poli(ácido mónico-DiCys-PEG)-CPT, cuya distribución predominante era de 57 nm (60% de la población total de partículas). También se midió una segunda distribución menor a 233 nm.

Ejemplo 21: Formulación de nanopartículas PEGiladas con ácido borónico con polímero de CPT-ácido mónico (13) y ácido borónico-disulfuro-PEG<sub>5000</sub> (6) en agua

La nanopartícula de poli(ácido mónico-DiCys-PEG)-CPT PEGilada con ácido borónico se formula disolviendo el polímero en agua bidestilada en una concentración de 0,1 mg/ml seguido de la adición del polímero 6 (BA-PEG) también en agua, de tal modo que la relación de PBA-PEG con respecto a los dioles en el azúcar de ácido mónico en el conjugado poli(ácido mónico-DiCys-PEG)-CPT es 1:1. La mezcla se incubó durante 30 minutos, tras lo cual se miden el diámetro efectivo y el potencial zeta utilizando un instrumento ZetaPALS (Brookhaven Instrument Co).

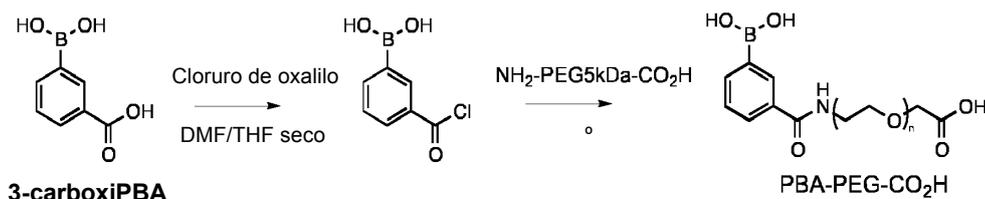
Ejemplo 22: Nanopartículas guiadas para el aporte de ADNp en ratones

El plásmido pApoE-HCRLuc contiene el gen para expresar la luciferasa y está bajo el control de un promotor específico del hígado. El polímero (MAP) 4 (0,73 mg), el polímero 6 (73 mg) y el polímero 9 (0,073 mg) se combinaron en 5 ml de agua y después se añadieron 1,2 ml de agua que contenía el plásmido pApoE-HCRLuc (con lo que se obtiene una relación de carga de polímero 4 con respecto al plásmido de +3). Las partículas se dispusieron en D5W (5% de glucosa en agua) mediante filtración sucesiva por centrifugación con adiciones posteriores de D5W (a partir de la formulación inicial que estaba en agua). A unos ratones desnudos se les implantaron células de cáncer de hígado Hepa-1-6 y los tumores se dejaron crecer hasta un tamaño de aproximadamente 200 mm<sup>3</sup>. Se realizaron inyecciones de las nanopartículas guiadas por vía intravenosa en la vena caudal en una cantidad igual a 5 mg de plásmido/kg de ratón. Se tomaron imágenes de los ratones 24 horas después de las inyecciones. Los ratones no mostraron signos de toxicidad y se detectó expresión de luciferasa en la región del tumor y no en la región del hígado.

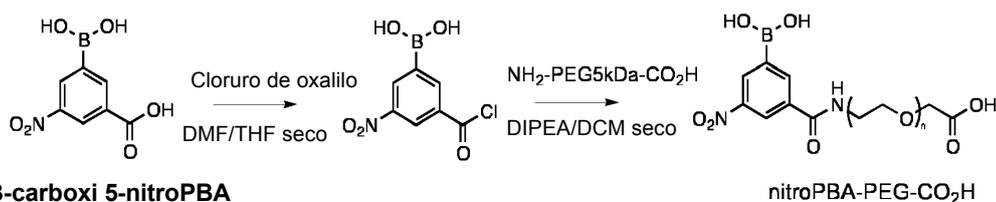
## Ejemplo 23: Síntesis de PBA-PEG y nitroPBA-PEG y determinación de pKa

Para preparar una nanopartícula estabilizada y guiada se usó la propiedad de unión covalente y reversible entre ácidos borónicos y MAP (que contiene diol). El pKa del ácido fenilborónico (PBA) es alto en 8,8. Para disminuir el pKa se emplearon PBA con grupos de extracción de electrones en el anillo de fenilo con el fin de aumentar la acidez del átomo de boro. Un 3-carboxiPBA y un 3-carboxi 5-nitroPBA comercialmente disponibles se convirtieron en cloruros de acilo usando cloruro de oxalilo. Estas especies de cloruro de acilo se sometieron después a reacción con NH<sub>2</sub>-PEG para formar PBA-PEG y nitroPBA-PEG, respectivamente. Para que se desarrollaran las reacciones de síntesis fue necesaria la adición de bases DMF y DIPEA. Sin embargo, la presencia de estas bases dio lugar a formaciones de aductos tetraédricos con PBA ácido. Para retirar estos aductos se llevó a cabo un tratamiento en HCl 0,5 N con equilibrio posterior a pH neutro mediante diálisis contra agua.

Para la síntesis de PBA-PEG, a 200 mg (1,21 mM) de ácido 3-carboxifenilborónico disueltos en 5 ml de tetrahidrofurano anhidro se les añadieron 18,7 µl (0,24 mM) de dimetilformamida anhidra bajo argón. Este recipiente de reacción se transfirió a un baño de hielo y se añadieron lentamente bajo argón 195 µl (2,89 mM) de cloruro de oxalilo. Se dejó que la reacción se desarrollara bajo ventilación y agitación constante durante 2 h a temperatura ambiente. El disolvente y el reactivo en exceso se retiraron bajo vacío. En 15 ml de diclorometano anhidro se disolvieron bajo argón 37 mg (0,2 mM) del compuesto de cloruro de acilo seco resultante. Después se añadieron 500 mg (0,1 mM) de NH<sub>2</sub>-PEG5kDa-CO<sub>2</sub>H y 52 µl (0,3 mM) de DIPEA seco bajo argón. Después de la reacción a lo largo de la noche con agitación constante, el disolvente se retiró bajo vacío y el producto seco se reconstituyó en HCl 0,5 N. Esta solución se pasó a través de un filtro de 0,2 µm (Acrodisc®) y se dializó contra agua con un dispositivo de filtro de membrana MWCO de 3 kDa (Amicon™) hasta que se alcanzó un pH constante. El sobrenadante se filtró después con un filtro de 0,2 µm (Acrodisc®) y se liofilizó para producir 377 mg (73%) de PBA-PEG-CO<sub>2</sub>H. 1H RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 12,52 (s, 1H), 8,39 (t, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,14 (s, 2H), 7,88 (d, 1H), 7,82 (d, 1H), 7,39 (t, 1H), 3,99 (s, 2H), 3,35-3,62 (pico PEG). MALDI-TOF (m/z): 5.600 g/mol (NH<sub>2</sub>-PEG5kDa-CO<sub>2</sub>H, 5.400 g/mol).



La síntesis de nitroPBA-PEG-CO<sub>2</sub>H se llevó a cabo del mismo modo que para PBA-PEG-CO<sub>2</sub>H, excepto que el material de partida fue ácido 3-carboxi 5-nitrofenilborónico. La reacción produjo 393 mg (76%) de nitroPBA-PEG-CO<sub>2</sub>H. 1H RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 12,52 (s, 1H), 8,89 (t, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,68 (s, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,61 (s, 2H), 3,99 (s, 2H), 3,35-3,62 (pico PEG). MALDI-TOF (m/z): 5.600 g/mol (NH<sub>2</sub>-PEG5kDa-CO<sub>2</sub>H, 5.400 g/mol).



Los pKa de los compuestos de PBA sintetizados se averiguaron midiendo el cambio en la absorbancia de PBA al convertirse de conformación trigonal (en pH bajo) a tetraédrica (en pH alto). A una solución de PBA 10<sup>-3</sup> M en PBS 0,1 M, pH 7,4 se tituló NaOH 1 N. Se registró el pH y se retiraron muestras correspondientes para las mediciones de absorbancia a 268 nm.

Tabla 2. pKa y constantes de unión de los compuestos de PBA

Compuesto	pKa	Constante de unión con MAP (M <sup>-1</sup> )
PBA	8,8	20
PBA-PEG-CO <sub>2</sub> H	8,3	520
nitroPBA-PEG-CO <sub>2</sub> H	6,8	1420

35

## Ejemplo 24: Conjugación de anticuerpos con nitroPBA-PEG

Después de la producción de nitroPBA-PEG, el compuesto resultante se conjugó con un anticuerpo. Para la conjugación, 36 mg (6,4  $\mu\text{M}$ ) de nitroPBA-PEG-CO<sub>2</sub>H, 12,3 mg (64  $\mu\text{M}$ ) de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y 11,1 mg (96  $\mu\text{M}$ ) de NHS se disolvieron en 2,4 ml de tampón MES 0,1 M, pH 6,0. Esta mezcla se sometió a reacción durante 15 minutos en un agitador rotatorio a temperatura ambiente. Los reactantes en exceso se dializaron con un dispositivo de filtro de membrana de límite de peso molecular de 3 kDa (Amicon™). Este compuesto de PEG de ácido carboxílico activado se añadió a 20 mg (0,14 mM) de anticuerpo IgG1 humano (Herceptin®) en PBS 0,1 M, pH 7,2. La reacción se llevó a cabo en un agitador rotatorio a temperatura ambiente durante 2 h y después se dializó 4 veces utilizando un dispositivo de filtro de membrana de límite de peso molecular de 50 kDa (Amicon™) contra 1x PBS con pH 7,4. El análisis del conjugado mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) mostró una conjugación media de 1 a 2 compuestos de nitroPBA-PEG por anticuerpo.

## Ejemplo 26: Formación y caracterización de nanopartículas de MAP guiadas

Se examinó el efecto de PBA-PEG y nitroPBA-PEG en la formación y la estabilidad de nanopartículas. Una solución de PBA-PEG se añadió a una solución de MAP con una relación de carga 3 +/- (carga positiva de MAP para cada carga negativa de ARNip) en tampón de fosfato con pH 7,4. Esta mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos para la complejación de PBA-PEG con el MAP que contiene diol. Esto se añadió después a un volumen igual de ARNip en agua y se mezcló mediante pipeteo. Después de 10 minutos se realizaron pruebas y caracterizaciones. Las formulaciones de partículas estabilizadas con nitroPBA-PEG y en diferentes relaciones de carga se realizaron de la misma manera. La conjugación de PBA-PEG formó partículas de MAP/ARNip con un tamaño de 150-300 nm. El MAP-4 (que indica 4 unidades de metileno entre el centro de carga (amidina) y el sitio de unión (poliol)) produjo nanopartículas más pequeñas que cuando se usó MAP-2. Sin embargo, tras la adición de sal, todas las partículas se agregaron, lo que indica que el PBA-PEG no era capaz de proporcionar suficiente estabilidad a las nanopartículas. Cuando se usó nitroPBA-PEG, las partículas en todas las relaciones de carga analizadas, 1 y 3 (+/-), mostraron nanopartículas estabilizadas. La diferencia en la estabilidad de partículas conferida por PBA-PEG y nitroPBA-PEG indica la importancia de modificar los compuestos de ácido borónico PEGilados para que tengan una unión más fuerte con los polioles.

En el caso del ARNip condensado con MAP-4 sin la presencia del agente estabilizante PEG se observó un tamaño de partícula de 640 nm con un alto potencial zeta de +32 mV. Cuando se añadió nitroPBA-PEG para estabilizar la partícula, el diámetro se redujo a 130 nm con una carga superficial negativa de -4 mV. Esta carga negativa es el resultado de la unión entre el ácido borónico y los dioles. Cuando se introdujo un 0,25% en moles de nitroPBA-PEG conjugado con IgG (Herceptin®), de forma interesante el tamaño de partícula se redujo aún más a 82 nm, mientras que el potencial zeta se mantuvo similar.

Se evaluó la estabilidad de sal para nanopartículas de MAP-4/ARNip con diversos grupos de PEG unidos. El tamaño de partícula se registró durante 5 operaciones en 1 minuto utilizando un analizador de potencial zeta (instrumento DLS ZetaPALS, Brookhaven Instruments, Holtsville, NY). La medición se detuvo para permitir la adición de una solución de 10x PBS a la formulación de partículas, de modo que las formulaciones de partículas resultantes contuvieran 1x PBS. Las mediciones se reiniciaron posteriormente y se registraron 10 operaciones sucesivas de 1 minuto cada una para estudiar el efecto de la adición de sal sobre la estabilidad de las partículas. Como se muestra en la Figura 16, sin la presencia de un agente estabilizante PEG, las partículas se agregan. Cuando había presencia de nitroPBA-PEG, las partículas se mantenían estables en condiciones de sal.

## Ejemplo 27: Formación y caracterización de nanopartículas de MAP-CPT guiadas

Para preparar una nanopartícula de MAP-CPT guiada se usó la propiedad de unión covalente y reversible entre ácidos borónicos y MAP (que contiene diol). La constante de unión entre PBA y MAP es baja en aproximadamente 20 M<sup>-1</sup>. Para aumentar la constante de unión se emplearon PBA con grupos de extracción de electrones en el anillo de fenilo con el fin de aumentar la acidez del átomo de boro y, por lo tanto, elevar la constante de unión con MAP. Un 3-carboxiPBA y un 3-carboxi 5-nitroPBA comercialmente disponibles se convirtieron en cloruros de acilo usando cloruro de oxalilo. Estas especies de cloruro de acilo se sometieron después a reacción con NH<sub>2</sub>-PEG-CO<sub>2</sub>H para formar PBA-PEG-CO<sub>2</sub>H y nitroPBA-PEG-CO<sub>2</sub>H, respectivamente. Para que se desarrollaran las reacciones de síntesis fue necesaria la adición de bases DMF y DIPEA. Sin embargo, la presencia de estas bases dio lugar a formaciones de aductos tetraédricos con PBA ácido. Para retirar estos aductos se llevó a cabo un tratamiento en HCl 0,5 N con equilibrado posterior a pH neutro mediante diálisis contra agua.

Los valores de pKa de los PBA modificados se determinaron mediante cambios de absorbancia debidos al cambio conformacional del PBA de la forma trigonal a tetraédrica a medida que aumentaba el pH (Tabla 2). El PBA con grupos de extracción de electrones dio como resultado pKa más bajos, teniendo el nitroPBA-PEG-CO<sub>2</sub>H el pKa más bajo, de 6,8. Por lo tanto, con pH fisiológico, la mayor parte del PBA estaba presente en la forma tetraédrica aniónica reactiva. Se encontraron constantes de unión entre PBA y MAP mediante unión competitiva con Alizarin Red S en PBS 0,1 M, pH 7,4. Debido al bajo valor de pKa y la alta constante de unión con MAP observada para nitroPBA-PEG-CO<sub>2</sub>H, éste se eligió como el enlazador entre IgG (Herceptin®) y nanopartículas de MAP-CPT.

La reacción de conjugación entre IgG (Herceptin®) y nitroPBA-PEG-CO<sub>2</sub>H tuvo lugar a través de acoplamiento de EDC (arriba descrito). Se unió un promedio de 1 a 2 PEG por cada anticuerpo de IgG (Herceptin®).

Tabla 3. Caracterización de MAP, conjugado de MAP-CPT, nanopartículas de MAP-CPT y nanopartículas de MAP-CPT guiadas

		Cortas	Medianas	Largas
MAP	Base añadida (equivalente) <sup>a</sup>	1,1	1,6	2
	MW <sup>b</sup> (kDa)	20	65	102
	Polidispersidad <sup>c</sup>	1,22	1,36	1,13
	# unidades de repetición (n)	5-7	15-21	25-30
Conjugado de MAP-CPT	MW <sup>b</sup> (kDa)	22	75	114
	% en peso de CPT conjugada	9,8	12,7	10,1
Nanopartícula de MAP-CPT	# conjugados/partícula	2-3	2-3	2-3
	# CPT/partícula	~14	~60	~72
	Tamaño de partícula (nm)	~30	~30	~30
	Potencial zeta (mV)	-1,3+/-0,6	-0,5+/-0,5	-0,8+/-0,5
Nanopartícula de MAP-CPT guiada	# Herceptin/partícula		1	
	Tamaño se partícula		~40	
	Potencial zeta (mV)		-0,4+/-0,6	

5

<sup>a</sup>Cantidad equivalente de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) añadida por grupo amino en di(Asp-amina) de ácido mónico. <sup>b</sup>MW, peso molecular determinado como (Mw + Mn)/2; Mw, peso molecular medio ponderado; Mn, peso molecular medio numérico. <sup>c</sup>Polidispersidad determinada como Mw/Mn.

10 En el caso de las nanopartículas de MAP-CPT guiadas se observó un tamaño medio de aproximadamente 40 nm por DLS y crio-EM (Tabla 3). Este aumento de aproximadamente 10 nm de la nanopartícula no guiada sugiere la unión de IgG (Herceptin®) a la nanopartícula (la cantidad fue de aproximadamente un anticuerpo de Herceptin® por nanopartícula). De hecho, a partir de las imágenes crio-EM, las nanopartículas guiadas no eran esféricas, sino que parecían tener protuberancias que indicaban la unión de anticuerpos. La carga superficial de las nanopartículas de MAP-CPT guiadas era ligeramente más alta que la de las nanopartículas de MAP-CPT debido a la presencia de un  
15 Herceptin cargado positivamente con pH 7,4 (pI de Herceptin®, 9,2).

Ejemplo 28: Estudios de absorción en células

20 Para examinar la absorción en células de nanopartículas de MAP-CPT guiadas con Herceptin® frente a las nanopartículas no guiadas se utilizó una línea celular de cáncer de mama humano con sobreexpresión HER2 (BT-474). Como control negativo se utilizó una línea celular de cáncer de mama HER2 negativo (MCF-7). Para estos estudios se sembraron placas de 24 pocillos con BT-474 (en medio RPMI-1640 complementado con un 10% de suero bovino fetal) o con MCF-7 (en medio Eagle Modificado por Dulbecco complementado con un 10% de suero bovino fetal) (Cellgro, Manassas, Va.) a razón de 20.000 células por pocillo, y se mantuvieron a 37 °C en un horno humidificado con un 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 40 h, los medios se reemplazaron con 0,3 ml de medios frescos que contenían MAP-CPT mediano (40 µg CPT/ml), MAP-CPT mediano con Herceptin® libre a 10 mg/ml, MAP-CPT guiado (40 µg CPT/ml)  
25 en densidades de orientación variables o MAP-CPT guiado con Herceptin® libre a 10 mg/ml. La transfección se realizó durante 30 minutos a 37 °C. Después, las formulaciones se retiraron y las células se lavaron dos veces con PBS frío. Se añadieron 200 µl de tampón RIPA por pocillo para el desprendimiento de células y la lisis. Las células lisadas se incubaron luego a 4 °C durante 15 minutos y se centrifugaron a 14.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Una parte del sobrenadante se utilizó para la cuantificación de proteínas mediante un ensayo de BCA. A otra parte se le añadió una  
30 cantidad igual de NaOH 0,1 N, se incubó a temperatura ambiente a lo largo de la noche y se midió la fluorescencia a 370/440 nm utilizando concentraciones conocidas de MAP-CPT como estándar.

Se observó que un Herceptin®-PEG-nitroPBA por nanopartícula era suficiente para lograr una absorción aproximadamente un 70% mayor en la línea celular BT-474 en comparación con la nanopartícula no guiada (Figura 17A). La absorción del MAP-CPT guiado en células BT-474 mostraba inhibición en presencia de Herceptin® libre

(Figura 17B). En cambio, la absorción de nanopartículas de MAP-CPT en MCF-7 no mostraba dependencia del guiado o de la presencia de Herceptin® libre (Figura 2B). Estos datos indican que existe una absorción mediada por receptor en las células BT-474 por las nanopartículas de MAP-CPT guiadas mediante el acoplamiento del receptor de HER2. La absorción celular tanto de las nanopartículas de MAP-CPT guiadas como de las no guiadas también se produjo a través de endocitosis en fase fluida no específica.

#### Ejemplo 29: Estudios de liberación *in vitro*

Se realizaron experimentos para evaluar la liberación de CPT a partir de nanopartículas de MAP-CPT cortas, medianas y largas y nanopartículas de MAP-CPT guiadas. Estos estudios se realizaron utilizando 0,32 mg de CPT/ml en 1x PBS con pH 6,5, 7 o 7,4; plasma de ratones BALB/c, plasma humano y 1x PBS con pH 7,4 que contenía 3 mg/ml de lipoproteínas de baja densidad (LDL), o 100 unidades/ml de butirilcolinesterasa (BCHE) o una combinación de LDL y BCHE.

Los medios pipeteados en placas de 96 pocillos se incubaron a 37 °C en un horno humidificado durante 2 h para el equilibrado. Las formulaciones se mezclaron en el medio pertinente y se dispusieron de nuevo en el horno. Se tomaron muestras en momentos predeterminados y se congelaron inmediatamente a -80 °C hasta el momento del análisis. Para la liberación en plasma de ratones BALB/c y en plasma humano, la incubación se llevó a cabo en un horno humidificado a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub> para mantener el sistema tampón de ácido carbónico/bicarbonato, el sistema tampón de mayor pH en el plasma a niveles de pH fisiológicos.

La cantidad de CPT no conjugada se determinó mezclando primero 10 µl de muestra con 10 µl de HCl 0,1 N e incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se añadieron 80 µl de metanol y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 3 h para la precipitación de proteínas. Esta mezcla se centrifugó a 14.000 g durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante se filtró con un filtro de 0,45 µm (Millex-LH) y se diluyó 20 veces con metanol, y 10 µl de la solución resultante se inyectaron en HPLC. El área de pico de la CPT eluida (a los 7,8 minutos) se comparó con la del control. Para medir la cantidad total de CPT, 10 µl de muestra se mezclaron con 6,5 µl de NaOH 0,1 N. Esta solución se incubó a temperatura ambiente durante 1 h para que la CPT se liberara del polímero original. Después se añadieron 10 µl de HCl 0,1 N para convertir la forma de CPT de carboxilato en la forma de lactona. Posteriormente se añadieron 73,5 µl de metanol y la mezcla se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se centrifugó y se procesó como se indica más arriba. La concentración de CPT unida al polímero se determinó a partir de la diferencia entre las concentraciones de CPT total y de CPT no conjugada.

La liberación de CPT de las nanopartículas de MAP-CPT cortas, medianas y largas, y de las nanopartículas de MAP-CPT guiadas, mostraba en todos los casos una cinética de primer orden. Las semividas de liberación de CPT de las nanopartículas de MAP-CPT cortas, medianas y largas eran muy similares en todas las condiciones probadas, mientras que se observaron semividas más largas en el caso del MAP-CPT guiado (Tabla 4). Se observó una fuerte dependencia de la tasa de liberación con el pH. A medida que el pH aumentaba de 6,5 a 7,4, las semividas de liberación se redujeron de 338 h a 58 h en el caso de las nanopartículas de MAP-CPT cortas, medianas y largas. Estos datos indican que la hidrólisis desempeña un papel importante en la liberación de CPT. En plasma de ratones BALB/c se observó una semivida de liberación de 59 h, mientras que se obtuvo una semivida significativamente menor, de 38 h, en plasma humano en el caso de las nanopartículas de MAP-CPT cortas, medianas y largas. Se sabe que el plasma de ratones contiene más actividad de esterasa que el plasma humano, mientras que el plasma humano contiene más "grasa" que el plasma de ratón. Por lo tanto, para comprender las diferencias en las tasas de liberación entre el plasma humano y el de ratones, las contribuciones de la esterasa y la grasa a las tasas de liberación de CPT se analizaron individualmente. La butirilcolinesterasa (BCHE) está presente tanto en plasma de ratones como en plasma humano y se usó para analizar la contribución de la esterasa a la velocidad de liberación. Para analizar la contribución de la "grasa" a la tasa de liberación se eligió lipoproteína de baja densidad (LDL). Estos componentes se constituyeron en PBS (pH 7,4). Se comprobó que la presencia de BCHE no afectaba a la tasa de liberación (semivida de 61 h en comparación con 58 h en PBS, pH 7,4, en el caso de las nanopartículas de MAP-CPT cortas, medianas y largas). Sin embargo, la adición de LDL aumentó radicalmente las tasas de liberación. Este efecto se debe probablemente a la alteración de las nanopartículas por interacciones hidrófobas de competencia. Por lo tanto, la alteración de las nanopartículas por la presencia de "grasa" y la posterior escisión de CPT por hidrólisis parecen ser otro mecanismo principal de la liberación de CPT a partir de nanopartículas de MAP-CPT. La liberación *in vitro* de las nanopartículas de MAP-CPT guiadas con Herceptin® muestra semividas más largas que las versiones no guiadas. Es posible que la presencia de Herceptin® con un pl de 9,2 aumentara la estabilidad de las nanopartículas cargadas negativamente mediante interacciones electrostáticas y que, por lo tanto, protegiera las nanopartículas frente a algunas de las interacciones hidrófobas de competencia.

Tabla 4. Semividas de liberación *in vitro* ( $t_{1/2}$ ) de CPT a partir de nanopartículas de MAP-CPT cortas, medianas y largas y a partir de nanopartículas de MAP-CPT guiadas en diversos medios

PBS	$t_{1/2}$ (h)	pH 6,5	pH 7	pH 7,4
	MAP-CPT cortas, medianas y largas	338	178	58
	MAP-CPT guiadas	396	204	78
Plasma	$t_{1/2}$ (h)	Ratones	Humano	
	MAP-CPT cortas, medianas y largas	59	38	
	MAP-CPT guiadas	63	46	
PBS pH 7,4	$t_{1/2}$ (h)	LDL <sup>a</sup>	BCHE <sup>b</sup>	LDL + BCHE <sup>c</sup>
	MAP-CPT cortas, medianas y largas	45	61	44
	MAP-CPT guiadas	62	76	62

5 Abreviaturas: PBS, solución salina tamponada con fosfato; LDL, lipoproteína de baja densidad; BCHE, butirilcolinesterasa. <sup>a</sup>PBS, pH 7,4, que contiene 3 mg/ml de LDL. <sup>b</sup>PBS, pH 7,4, que contiene 100 unidades/ml de BCHE. <sup>c</sup>PBS, pH 7,4, que contiene 3 mg/ml de LDL y 100 unidades/ml de BCHE.

#### Ejemplo 30: Ensayos de citotoxicidad

10 Se evaluaron las citotoxicidades *in vitro* de MAP mediano, nitroPBA-PEG, CPT, nanopartículas de MAP-CPT medianas, nanopartículas de MAP-CPT guiadas y Herceptin® en dos líneas celulares de cáncer de mama HER2+ (BT-474, SKBR-3) y dos líneas celulares de cáncer de mama HER2- (MCF-7, MDA-MB-231) (Tabla 5). Para estos estudios, las células se mantuvieron a 37 °C en un horno humidificado con un 5% de CO<sub>2</sub>. Las líneas celulares BT-474, MCF-7, SKBR-3 y MDA-MB-231 se incubaron en medio RPMI-1640, medio Eagle Modificado por Dulbecco, medio modificado 5A de McCoy y medio Eagle Modificado por Dulbecco, respectivamente (todos complementados con un 10% de suero bovino fetal). En placas de 96 pocillos se dispusieron 3.000 células por pocillo. Después de 24 horas, los medios se retiraron y se reemplazaron con medios frescos que contenían diferentes concentraciones de MAP mediano, nitroPBA-PEG, CPT, nanopartículas de MAP-CPT medianas, nanopartículas de MAP-CPT guiadas o Herceptin®. Después de 72 h de incubación, las formulaciones se reemplazaron con medios frescos y se añadieron 20 µl de ensayo de proliferación celular CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega) a cada pocillo. Esta mezcla se incubó durante 2 horas en un horno humidificado a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub> antes de las mediciones de absorbancia a 490 nm. Como controles se utilizaron pocillos que contenían células no tratadas.

25 El medio MAP y el nitroPBA-PEG dieron valores de IC<sub>50</sub> por encima de 500 µM y 1000 µM (concentraciones más altas analizadas), respectivamente, lo que indica una toxicidad mínima. Las concentraciones IC<sub>50</sub> de CPT, nanopartículas de MAP-CPT medianas y nanopartículas de MAP-CPT guiadas se basaron en el contenido de la CPT. Se observa que la CPT se fue liberando gradualmente a partir de nanopartículas de MAP-CPT medianas y nanopartículas de MAP-CPT guiadas (véase Estudios de liberación *in vitro*). Además, la absorción de nanopartículas por las células da como resultado tiempos de liberación prolongados debido a la naturaleza ácida de los endosomas. Estos factores contribuyen a los valores de IC<sub>50</sub> más altos observados para las nanopartículas de MAP-CPT medianas y las nanopartículas de MAP-CPT guiadas en comparación con la CPT (Tabla 5). En las líneas celulares HER2+, las nanopartículas de MAP-CPT guiadas produjeron valores IC<sub>50</sub> más bajos en comparación con MAP-CPT solo, mientras que en las líneas celulares HER2-, el guiado no afectó a la IC<sub>50</sub>. BT-474 fue la línea celular más resistente a CPT, y en consecuencia a las nanopartículas de MAP-CPT medianas. La adición de Herceptin en concentraciones de 0,001-0,5 µM a células BT-474 o SKBR-3 dio como resultado una viabilidad celular constante de aproximadamente un 60% en comparación con un control sin tratamiento. La falta de un valor de IC<sub>50</sub> real en este intervalo de concentraciones para estas líneas celulares se ha observado anteriormente (Phillips, et al., Cancer Res. 68, 9280-9290 (2008)). No se observaron efectos en las líneas celulares HER2- en concentraciones de Herceptin de hasta 0,5 µM.

Tabla 5: Valores IC<sub>50</sub> de MAP mediano, nitroPBA-PEG, CPT, nanopartículas de MAP-CPT medianas, nanopartículas de MAP-CPT guiadas y Herceptin para una gama de líneas celulares de cáncer de mama

		MCF-7	MDA-MB-231	SKBR-3	BT-474
Expresión de HER2		-	-	+	+
IC <sub>50</sub> (µM)	MAP mediano	> 500	> 500	> 500	> 500
	nitroPBA-PEG	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000
	CPT	0,3	0,1	0,03	4
	MAP-CPT mediano	0,5	0,6	0,2	40
	MAP-CPT guiado	0,5	0,6	0,1	6
	Herceptin	ningún efecto	ningún efecto	ningún valor <sup>a</sup>	ningún valor <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ningún valor, no se obtuvo valor de IC<sub>50</sub> en el intervalo de concentraciones de 0,001-0,5 µM.

#### 5 Ejemplo 31: Estudios farmacocinéticos

Se realizaron estudios farmacocinéticos en plasma de nanopartículas de MAP-CPT cortas, medianas y largas y de nanopartículas de MAP-CPT guiadas en inyecciones de 10 mg/kg (base de CPT) en ratones BALB/c hembra (Figura 18). Para estos estudios se administraron nanopartículas formuladas en NaCl al 0,9% en peso (nanopartículas no guiadas) o PBS (nanopartículas de MAP-CPT guiadas) mediante inyección de bolo en la vena caudal en ratones BALB/c hembra de 12 - 16 semanas de edad. En momentos predeterminados se extrajo sangre a través de un sangrado de vena safena con tubos de extracción de sangre (Microvette CB 300 EDTA, Sarstedt). Las muestras se centrifugaron inmediatamente a 10.000 g, 4 °C durante 15 minutos y el sobrenadante se retiró y se almacenó a -80 °C hasta el momento del análisis. Los análisis para CPT no conjugada y unida a polímero se llevaron a cabo como se indica a continuación. La cantidad de CPT no conjugada se determinó mezclando primero 10 µl de muestra con 10 µl de HCl 0,1 N e incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se agregaron 80 µl de metanol y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 3 h para la precipitación de proteínas. Esta mezcla se centrifugó a 14.000 g durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante se filtró con un filtro de 0,45 µm (Millex-LH), se diluyó 20 veces con metanol y 10 µl de la solución resultante se inyectaron en HPLC. El área de pico de la CPT eluida (a los 7,8 minutos) se comparó con la del control. Para medir la cantidad total de CPT, 10 µl de muestra se mezclaron con 6,5 µl de NaOH 0,1 N. Esta solución se incubó a temperatura ambiente durante 1 h para que la CPT se liberara del polímero original. Después se añadieron 10 µl de HCl 0,1 N para convertir la forma de CPT de carboxilato en la forma de lactona. Posteriormente se añadieron 73,5 µl de metanol y la mezcla se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se centrifugó y se procesó como se indica más arriba. La concentración de CPT unida al polímero se determinó a partir de la diferencia entre las concentraciones de CPT total y de CPT no conjugada. Para el análisis de datos farmacocinéticos se utilizó el *software* de modelado no compartimental PK Solutions 2.0 de Summit Research Services (Montrose, Colorado). Todos los animales fueron tratados de acuerdo con las National Institute of Health Guidelines for Animal Care (Pautas del Instituto Nacional de Salud para el Cuidado de Animales) y aprobados por el California Institute of Technology Institutional Animal Care and Use Committee (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Instituto de Tecnología de California).

En todas las nanopartículas, la CPT unida a polímero mostró un perfil bifásico con una fase de redistribución ( $\alpha$ ) rápida y una fase de eliminación ( $\beta$ ) larga (Figura 18A). La fase de eliminación para nanopartículas de MAP-CPT medianas y largas se prolongó particularmente con semividas de 16,6 y 17,6 h, respectivamente, y dio valores altos de área bajo la curva (AUC) de 2.298 y 3.636 µg\*h/ml, respectivamente. Adicionalmente, mostraron volúmenes de distribución y tasas de eliminación bajas. Veinticuatro horas después de la inyección, un 11,3% de la dosis inyectada de las nanopartículas de MAP-CPT medianas y un 20,5% de la dosis inyectada de las nanopartículas de MAP-CPT largas todavía circulaban en el plasma como CPT unida al polímero. En cambio, los ratones a los que se les había inyectado CPT sola a razón de 10 mg/kg mostraron una eliminación rápida, con un AUC de solo 1,6 µg\*h/ml y un 0,01% de la dosis inyectada permanecía en circulación después de 8 h. El guiado de nanopartículas de MAP-CPT medianas afectó al perfil farmacocinético aumentando la fase de redistribución y prolongando la fase de eliminación a 21,2 h con un alto valor de AUC de 2.766 µg\*h/ml. Con todas las nanopartículas, las cantidades de CPT no unida en plasma fueron bajas en todos los momentos (Figura 18B).

#### Ejemplo 32: Determinación de la dosis máxima tolerable (DMT) en ratones desnudos

Los valores de DMT se determinaron en ratones desnudos NCr hembra y se definieron como la dosis más alta que resultó en menos de un 15% de pérdida de peso corporal y sin muertes relacionadas con el tratamiento. En estos

experimentos, unos ratones desnudos NCr hembra de 12 semanas de edad se dividieron aleatoriamente en trece grupos que incluían cinco ratones cada uno. El día 0 y el día 7 se administraron mediante inyección intravenosa en la vena caudal formulaciones de nanopartículas de MAP medianas o de nitroPBA-PEG a razón de 200 mg/kg, nanopartículas de MAP-CPT cortas a razón de 10, 15 o 20 mg/kg (base de CPT), nanopartículas de MAP-CPT medianas a razón de 8, 10 o 15 mg/kg (base de CPT), nanopartículas de MAP-CPT largas a razón de 5, 8 o 10 mg/kg (base de CPT) y nanopartículas de MAP-CPT guiadas a razón de 8 o 10 mg/kg (base de CPT). Todas las inyecciones se formularon en solución salina al 0,9% p/v, excepto para MAP-CPT guiado que se formuló en PBS, pH 7,4. El peso y la salud de los ratones se registraron y monitorizaron diariamente durante 2 semanas después del inicio del tratamiento. La DMT se definió como la dosis más alta que resultó en menos del 15% de pérdida de peso corporal y sin muertes relacionadas con el tratamiento. Los animales fueron sacrificados mediante asfixia con CO<sub>2</sub> cuando se sobrepasaron los criterios para la DMT o al final del estudio.

Los ratones tratados con MAP mediano, nitroPBA-PEG, MAP-CPT corto, mediano y largo y MAP-CPT guiado se pesaron y se controlaron en cuanto a la salud después de dos dosis semanales el día 0 y el día 7 (Tabla 6). El peso y la salud de los ratones no resultaron afectados por el tratamiento con altas dosis de MAP mediano o nitroPBA-PEG, lo que indica una toxicidad mínima para estos componentes poliméricos. En los grupos que incluían CPT, la pérdida máxima de peso apareció de 3 a 5 días después de cada tratamiento. La mayoría de los grupos recuperaron el peso perdido. Si la pérdida de peso corporal continuaba y excedía un promedio de un 15%, se concluía el estudio. Algunos ratones en grupos tratados con MAP-CPT mediano a razón de 15 mg/kg y con MAP-CPT largo a razón de 10 mg/kg mostraron diarrea y parecían débiles. Todos los demás ratones parecían sanos. Se comprobó que los valores de DMT eran 20, 10, 8 y 8 mg/kg (sobre base de CPT) para MAP-CPT corto, mediano, largo y MAP-CPT guiado, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Respuesta al tratamiento para el estudio de dosis máxima tolerable (DMT)

	Dosis (mg/kg) <sup>a</sup>	% máx. de pérdida de peso (día) <sup>b</sup>	Muerte
MAP mediano	200	-1,1 (11)	0
nitroPBA-PEG	200	-0,5 (2)	0
MAP-CPT corto	10	-4,5 (2)	0
MAP-CPT corto	15	-6,1 (10)	0
MAP-CPT corto	20	-10,2 (12)	0
MAP-CPT mediano	8	-6,8 (10)	0
MAP-CPT mediano	10	-14,9 (12)	0
MAP-CPT mediano	15	-18,4 (4)	sacrificados <sup>c</sup>
MAP-CPT largo	5	-4,8 (4)	0
MAP-CPT largo	8	-9,2 (12)	0
MAP-CPT largo	10	-16,5 (10)	sacrificados <sup>c</sup>
MAP-CPT guiado	8	-5,2 (4)	0
MAP-CPT guiado	10	-15,2 (9)	sacrificados <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Todos los grupos que contienen MAP-CPT se basan en mg de CPT/kg. <sup>b</sup>Porcentaje máximo de pérdida de peso corporal. <sup>c</sup>Animales sacrificados debido a una pérdida de peso corporal superior a un 15%.

Ejemplo 33: Biodistribución en ratones desnudos

Para evaluar la biodistribución, las nanopartículas guiadas en ratones desnudos NCr de 7 semanas de edad fueron trasplantadas por vía subcutánea con gránulos de 17β-estradiol. Después de 2 días se inyectaron por vía subcutánea en el flanco delantero derecho células de carcinoma BT-474 suspendidas en medio RPMI-1640 a razón de 10 millones de células/animal. El tratamiento comenzó un día después de que los tumores alcanzaran un tamaño medio de 260 mm<sup>3</sup>. Los animales se asignaron al azar a dos grupos de seis ratones por grupo y se trataron mediante inyecciones intravenosas en la vena caudal con nanopartículas de MAP-CPT a razón de 5 mg CPT/kg (en PBS, pH 7,4) o con nanopartículas de MAP-CPT guiadas a razón de 5 mg CPT/kg y 29 mg de Herceptin®/kg (en PBS, pH 7,4). Después de 4 h y 24 h se extrajo sangre de tres animales de cada grupo a través de un sangrado de vena safena. Después, los animales fueron sacrificados mediante asfixia por CO<sub>2</sub> y perfundidos con PBS. Después se recogieron el tumor, el

pulmón, el corazón, el bazo, el riñón y el hígado y se dividieron en dos partes del mismo tamaño. Una pieza se incrustó en Tissue-Tek® OCT (Sakura) y la otra se recogió en tubos Eppendorf, y ambas se congelaron inmediatamente a -80 °C hasta el momento del procesamiento.

5 Los órganos se pesaron y 100 mg de cada uno se dispusieron en tubos homogenizadores Lysing Matrix A que  
 10 contenían una esfera cerámica de 6,5 mm (1/4 de pulgada) añadida (MP Biomedicals, Solon, Ohio). Se añadió 1 ml  
 de tampón de lisis RIPA (Thermo Scientific) y los tejidos se homogeneizaron utilizando un homogeneizador FastPrep®-  
 24 (MP Biomedicals, Solon, Ohio) a 6 m/s durante 30 s. Esto se repitió 3 veces con 1 minuto de enfriamiento en hielo  
 entre cada ronda. Las muestras se centrifugaron después a 14.000 g durante 15 min a 4 °C. La cantidad de CPT no  
 15 conjugada se determinó mezclando primero 10 µl del sobrenadante con 10 µl de HCl 0,1 N e incubando a temperatura  
 ambiente durante 30 min. Luego se añadieron 80 µl de metanol y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante  
 3 h para la precipitación de proteínas. Esta mezcla se centrifugó a 14.000 g durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante  
 se filtró con un filtro de 0,45 µm (Millex-LH) y 10 µl de la solución resultante se inyectaron en HPLC. El área de pico  
 de la CPT eluida (a los 7,8 minutos) se comparó con la del control. Para medir la cantidad total de CPT, 10 µl de  
 muestra se mezclaron con 6,5 µl de NaOH 0,1 N. Esta solución se incubó a temperatura ambiente durante 1 h para  
 20 que la CPT se liberara del polímero original. Después se añadieron 10 µl de HCl 0,1 N para convertir la forma de CPT  
 de carboxilato en la forma de lactona. Posteriormente se añadieron 73,5 µl de metanol y la mezcla se incubó durante  
 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se centrifugó y se procesó como se indica más arriba.

El porcentaje medio de dosis inyectada (ID) de la CPT total por gramo de tumor, corazón, hígado, bazo, riñón y pulmón  
 se muestra en la Figura 19A. Cuatro horas después de la dosificación, se presentaron un 5,3 y un 5,2% de ID de CPT  
 20 total por gramo de tumor en ratones tratados con nanopartículas de MAP-CPT y nanopartículas de MAP-CPT guiadas,  
 respectivamente. Veinticuatro horas después del tratamiento, en el caso de los ratones tratados con nanopartículas  
 de MAP-CPT permanecía un 2,6% de ID de la CPT total por gramo de tumor, mientras que en el caso de los ratones  
 que recibieron nanopartículas de MAP-CPT guiadas se encontró un 3,2% de ID de CPT total por gramo de tumor.  
 25 Estos datos muestran que las nanopartículas guiadas esencialmente con el mismo tamaño y carga de superficie que  
 una versión no guiada no aumentan la localización del tumor con respecto a la de una versión no guiada, y son  
 coherentes con las observaciones notificadas por otros. Los animales tratados con nanopartículas de MAP-CPT y  
 nanopartículas de MAP-CPT guiadas dieron como resultado una distribución similar de CPT en corazón, hígado, riñón  
 y pulmón. Sin embargo había una cantidad comparativamente significativa de la acumulación total de CPT en el bazo  
 en el caso del MAP-CPT guiado frente al no guiado a las 24 h. Este efecto se ha observado previamente en caso de  
 30 anticuerpos humanizados en ratones.

La Figura 19B muestra el porcentaje medio de CPT no conjugada en cada órgano para tumor, corazón, hígado, bazo,  
 riñón y pulmón. El porcentaje de CPT no conjugada en corazón, hígado, bazo, riñón y pulmón fue bajo tanto a las 4 h  
 como a las 24 h, lo que indica una rápida eliminación de CPT libre de estos órganos. En el tumor a las 24 h había  
 35 porcentajes significativamente más altos de CPT no conjugada tanto en el caso de las nanopartículas de MAP-CPT  
 como de las nanopartículas de MAP-CPT guiadas en comparación con los porcentajes a las 4 h. La retención de CPT  
 libre dentro de los tumores sugiere la acumulación celular de CPT. Las nanopartículas guiadas muestran un porcentaje  
 ligeramente mayor de CPT no conjugada en tumores de ratones con respecto a las nanopartículas no guiadas tanto a  
 las 4 como a las 24 h.

La concentración total de CPT en plasma y el porcentaje de CPT total que no está conjugada en plasma fueron  
 40 similares tanto en el caso de las nanopartículas de MAP-CPT como de las nanopartículas de MAP-CPT guiadas (Figura  
 19C). Después de 4 h quedaban en el plasma 17 y 20 µg/ml de CPT total en el caso de las nanopartículas de MAP-  
 CPT y de las nanopartículas de MAP-CPT guiadas, respectivamente. Después de 24 h, las cantidades de CPT total  
 que quedaban en el plasma fueron las mismas tanto en el caso de las nanopartículas de MAP-CPT como de las  
 nanopartículas de MAP-CPT guiadas a 12 µg/ml. El porcentaje de CPT total que no estaba conjugada en plasma fue  
 45 inferior al 3% en todas las condiciones, lo que indica una liberación pequeña y una eliminación rápida de CPT no  
 conjugada del plasma (Figura 19D).

#### Ejemplo 33: Tratamiento de tumores con nanopartículas guiadas

Unos ratones desnudos NCr con tumores BT-474 fueron tratados con MAP-CPT (5 mg CPT/kg) o con MAP-CPT  
 guiado (5 mg CPT/kg, 29 mg Herceptin/kg). Después de 4 y 24 h, los ratones fueron sacrificados y los tumores se  
 50 extrajeron y se seccionaron utilizando un criostato hasta un grosor de 20-30 µm. Las secciones del tumor se colocaron  
 en portaobjetos Superfrost Plus (Fisher Scientific, Hampton, NH) y se almacenaron a -80 °C hasta el momento del  
 procesamiento. Los portaobjetos se descongelaron y las secciones de tejido se fijaron directamente sobre el  
 portaobjetos durante 15 minutos con una solución de formalina al 10%. Después, los portaobjetos se lavaron tres  
 veces con PBS durante 5 min cada una, y se bloquearon durante 1 h en un tampón de bloqueo de suero de cabra al  
 55 5%. La CPT es naturalmente fluorescente con emisión a 440 nm. Para identificar la ubicación del MAP, el PEG dentro  
 del MAP se tiñó con un anticuerpo primario anti-PEG de rata que reconoce las unidades de PEG internas a 14 µg/ml  
 y se incubó a 4 °C a lo largo de la noche. Después se llevaron a cabo tres lavados con PBS y 1 h de incubación con  
 2 µg/ml de anticuerpo secundario de IgM anti-rata Alexa Fluor® 488. A continuación, los portaobjetos se lavaron tres  
 veces con PBS y se incubaron durante 1 h con 2 µg/ml de anticuerpo secundario de IgG anti-humano de cabra Alexa  
 60 Fluor® 633 para visualizar el Herceptin®. Los portaobjetos se lavaron tres veces más con PBS, se montaron con un  
 reactivo Prolong Gold Antifade y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de la obtención de imágenes. Las imágenes

se adquirieron con un microscopio Zeiss LSM 510 Meta Confocal (Carl Zeiss, Alemania) utilizando un objetivo de aceite 63x Plan-Neofluar. Para detectar la CPT se utilizó excitación de 2 fotones a 720 nm (filtro de emisión BP 390-465 nm). Para detectar el PEG y el Herceptin se utilizó excitación a 488 nm (filtro de emisión LP 530) y a 633 nm (filtro de emisión BP 645-700 nm), respectivamente. Todos los ajustes de láser y ganancia se establecieron al comienzo de la obtención de imágenes y no se modificaron. El análisis de las imágenes se realizó en el explorador de imágenes Zeiss 1sm.

La Figura 20A muestra la sección del tumor de ratones tratados con nanopartículas de MAP-CPT después de 4 h. La señal de CPT era dispersa. Las señales para CPT y MAP parecieron colocalizar en la imagen fusionada. Veinticuatro horas después de la inyección había una acumulación de señal de CPT en forma de manchas puntuadas (Figura 20B). La imagen fusionada sugiere la colocalización de CPT y MAP. En el caso de los ratones tratados con nanopartículas de MAP-CPT guiadas, se observaron manchas que indican la acumulación de CPT después de 4 y 24 h de tratamiento (Figuras 20C y 20D). En las imágenes fusionadas había colocalización de señales de CPT y MAP. La presencia de Herceptin en nanopartículas de MAP-CPT guiadas está indicada por las fuertes señales azules en el canal de Herceptin en comparación con las señales de fondo débiles en la versión no guiada.

Ejemplo 33: Estudio de la eficacia antitumoral en ratones desnudos

El BT-474 es uno de los cánceres de mama más resistentes a los fármacos anticancerosos, incluyendo la camptotecina. Para promover el crecimiento tumoral en ratones desnudos, dos días antes de la implantación de células tumorales BT-474 se implantaron gránulos de  $17\beta$ -estradiol en ratones desnudos NCr de 7 semanas de edad. En el día 0 (cinco días después de la implantación), los tamaños medios de los tumores de cada grupo eran de 250 mm<sup>3</sup>. Los tratamientos comenzaron el día 1. Los animales se dividieron aleatoriamente en nueve grupos con seis a ocho ratones por grupo y se trataron con nanopartículas de MAP-CPT a razón de 1 mg u 8 mg/kg (base de CPT, en PBS, pH 7,4), CPT a razón de 8 mg/kg (disuelto en 20% de DMSO, 20% de PEG 400, 30% de etanol y 30% de ácido fosfórico 10 mM con pH 3,5 mM), Irinotecán a razón de 80 mg/kg (en solución de dextrosa al 5% p/v, D5W), Herceptin® a razón de 2,9 o 5,9 mg/kg (en PBS, pH 7,4), nanopartículas de MAP-CPT guiadas a razón de 0,5 mg CPT/kg y 2,9 mg de Herceptin®/kg o 1 mg de CPT/kg y 5,9 mg de Herceptin®/kg (en PBS, pH 7,4), o solución salina. Todos los tratamientos estaban recién preparados y se administraron mediante inyección intravenosa en la vena caudal. Las inyecciones se estandarizaron a 150  $\mu$ l por 20 g de peso corporal de ratones. Los tratamientos que contenían Herceptin® se administraron una vez por semana durante 2 semanas; todos los demás grupos se administraron una vez por semana durante 3 semanas. Los tamaños de los tumores se registraron tres veces a la semana utilizando medidas de calibre (largo x ancho<sup>2</sup>/2) y la salud de los animales se controló continuamente. Los animales fueron sacrificados cuando el volumen del tumor superó los 1.000 mm<sup>3</sup>. Seis semanas después del inicio del tratamiento, los animales fueron sacrificados mediante asfixia con CO<sub>2</sub>. Los resultados de este estudio se presentan en la Figura 21 y en la Tabla 7.

Los tumores en el grupo control, al que se le había administrado solución salina, crecieron rápidamente (Figura 21). Después de 28 días, cinco de cada ocho ratones tenían tumores que superaban el límite de tamaño de 1.000 mm<sup>3</sup>. Todos los animales en este grupo fueron sacrificados en ese momento.

El grupo tratado con CPT (8 mg/kg) no produjo ninguna inhibición tumoral en comparación con el grupo de control ( $P > 0,05$ ). Se registraron una y tres muertes relacionadas con el tratamiento los días 9 y 16, respectivamente, así como cuatro sacrificios debido a la superación del límite de tamaño del tumor el día 28. Ninguno de los animales sobrevivió hasta el final del estudio.

Los ratones tratados con Irinotecán a razón de 80 mg/kg mostraron una inhibición tumoral no significativa en comparación con el grupo control ( $P > 0,05$ ). El día 11 se produjo una muerte relacionada con el tratamiento. Los tumores alcanzaron un tamaño medio de 575 mm<sup>3</sup> al final del estudio.

Los animales que recibieron nanopartículas de MAP-CPT a razón de 8 mg de CPT/kg mostraron una inhibición tumoral altamente significativa en comparación con la del grupo de control ( $P < 0,01$ ). Al final del estudio, el tamaño medio del tumor se había reducido a 63 mm<sup>3</sup> y en tres de los ocho ratones tratados el tamaño de los tumores había vuelto a cero. Aunque no se produjeron muertes en un estudio de DMT con ratones desnudos NCr no portadores de tumores tratados con MAP-CPT a razón de 8 mg de CPT/kg, en dicho estudio se produjo una muerte el día 21 debido a la pérdida de peso. Esto se puede deber a la carga tumoral adicional en este estudio y/o porque los ratones utilizados en este estudio tenían 7 semanas de edad, mientras que en los estudios de DMT se usaron ratones de 12 semanas de edad.

Los animales tratados con Herceptin® a razón de 5,9 mg/kg mostraron una inhibición del tumor altamente significativa en comparación con el grupo de control ( $P < 0,01$ ). El día 11 de tratamiento, los tumores de siete de los ocho animales tratados habían vuelto a cero. Sin embargo, al final del estudio, dos de los tumores regresivos recidivaron, lo que dio como resultado un total de cinco animales con tumores en volumen cero y un volumen tumoral medio del grupo de 60 mm<sup>3</sup> (Figura 22). Los ratones tratados con nanopartículas de MAP-CPT a razón de 1 mg de CPT/kg se terminaron temprano debido a que no se observaron efectos antitumorales. Sin embargo, cuando se añadió Herceptin® a razón de 5,9 mg/kg como agente de guiado a través de un enlazador nitroPBA-BA en las nanopartículas de MAP-CPT con una dosis baja de CPT de 1 mg/kg (nanopartículas de MAP-CPT guiadas a razón de 5,9 mg de Herceptin®/kg y 1 mg

de CPT/kg), todos los tumores habían vuelto a cero el día 9 de tratamiento y se mantuvieron en cero al final del estudio (Figura 22). El día 37 se produjo una muerte no relacionada con el tratamiento. Este resultado es altamente significativo en comparación con el grupo de control ( $P < 0,01$ ). La combinación de resultados observada para estos tres grupos indica que la eficacia de las nanopartículas de MAP-CPT se mejora mediante la adición del agente de guiado Herceptin® además de la actividad intrínseca del Herceptin®.

Los animales tratados con Herceptin® a razón de 2,9 mg/kg dieron como resultado dos animales con tumores que habían vuelto a cero al final del estudio. Sin embargo, el tamaño medio del tumor aumentó desde el inicio del estudio hasta 278 mm<sup>3</sup>. Este resultado es significativo en comparación con el grupo de control ( $0,01 \leq P \leq 0,05$ ). Cuando los animales fueron tratados con nanopartículas de MAP-CPT guiadas que contenían 0,5 mg de CPT/kg y 2,9 mg de Herceptin®/kg, dos tumores volvieron a cero. El tamaño medio del tumor se había reducido a 141 mm<sup>3</sup> al final del estudio. Este resultado es altamente significativo en comparación con el grupo control ( $P < 0,01$ ). Estos resultados sugieren además los beneficios del guiado en la inhibición de tumores.

Cinco semanas después de la implantación de los gránulos de 17β-estradiol, se observó que varios ratones, independientemente de los grupos de tratamiento, tenían vejiga distendida e hinchazón abdominal. Probablemente, esto se debió al uso de gránulos de 17β-estradiol, que causa hidronefrosis y retención de orina en ratones desnudos atímicos. Seis semanas después del tratamiento, las condiciones empeoraron y se observó que más ratones desarrollaban vejigas distendidas e hinchazón abdominal, por lo que los animales fueron sacrificados y se terminó el experimento.

Tabla 7. Estudio de eficacia antitumoral en ratones desnudos NCr con tumores de xenoinjerto BT-474

	N <sub>inicio</sub> /N <sub>fin</sub> <sup>a</sup>	N <sub>TRD</sub> /N <sub>NTRD</sub> /N <sub>sacrif.</sub> <sup>b</sup>	Volumen de tumor medio (mm <sup>3</sup> )	Volumen de tumor mediano (mm <sup>3</sup> )	N <sub>reg. a cero</sub> <sup>c</sup>	P vs. solución salina <sup>d</sup>
MAP-CPT (8 mg/kg)	8/7	1/0/0	63	68	3	0,002
Irinotecán (80 mg/kg)	8/7	1/0/0	575	479	0	0,242
CPT (8 mg/kg)	8/0	4/0/4	808	417	0	0,781
Herceptin (5,9 mg/kg)	8/9	0/0/0	60	0	5	0,003
MAP-CPT guiado (1 mg CPT/kg, 5,9 mg Herceptin)	8/7	0/1/0	0	0	7	0,001
Herceptin (2,9 mg/kg)	6/6	0/0/0	278	245	2	0,026
MAP-CPT guiado (0,5 mg CPT/kg, 2,9 mg Herceptin)	6/6	0/0/0	141	187	2	0,005
Solución salina	8/0	0/0/8	911	1087	0	-

<sup>a</sup>N<sub>inicio</sub> es el número de animales al comienzo del estudio, N<sub>fin</sub> es el número de animales que sobreviven al final del estudio. <sup>b</sup>N<sub>TRD</sub> es el número de muertes relacionadas con el tratamiento, N<sub>NTRD</sub> es el número de muertes no relacionadas con el tratamiento, N<sub>sacrif.</sub> es el número de animales sacrificados debido a la superación del límite de tamaño del tumor de 1.000 mm<sup>3</sup>. <sup>c</sup>N<sub>reg. a cero</sub> es el número de animales con tumores que habían vuelto a cero al final del estudio.

Los ejemplos arriba expuestos se proporcionan para dar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar las realizaciones de las partículas, composiciones, sistemas y métodos de la divulgación, y no pretenden limitar el alcance de la invención, que está definido en las reivindicaciones adjuntas.

Se ha de entender que las descripciones no se limitan a composiciones o sistemas biológicos particulares, que evidentemente pueden variar. También se ha de entender que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares, y no pretende ser limitativa. Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contenido indique claramente lo contrario. El término "pluralidad" incluye dos o más referentes a menos que el contenido indique claramente lo contrario. A no ser que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado entendido comúnmente por los expertos en la técnica a la que se refiere la divulgación.

**Listado de secuencias**

<110> DAVIS, MARK E. HAN, HAN

5 <120> NANOPARTÍCULAS ESTABILIZADAS CON COMPOSICIONES DE ÁCIDO NITROFENILBORÓNICO

<130> CTEK-0116

10 <140> PCT/US2013/028681  
<141> 01-03-2013

<160> 4

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <220>  
<223> Descripción de molécula de ADN/ARN combinados: oligonucleótido sintético

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> (20) .. (21)  
<223> desoxitimidina

30 <400> 1  
gugccagagu ccuucgauat t 21

35 <210> 2  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

45 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (20)..(21)  
<223> desoxitimidina

50 <400> 2  
uaucaagga cucuggcact t 21

<210> 3  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 3  
uagcgacuaa acacaucaau u 21

65 <210> 4  
<211> 21

<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
5 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 4  
uugauguguu uagucgcuau u

21

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula que comprende un polímero que contiene un poliol y un polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico,

5 en donde el polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico está conjugado con el polímero que contiene un poliol a través de un enlace éster de borato reversible, y

en donde el polímero que contiene el poliol se deriva del acoplamiento de un compuesto de la Fórmula A con un compuesto de la Fórmula B;

en donde

el compuesto de la Fórmula A es:



VI

10



VII



VIII

en donde

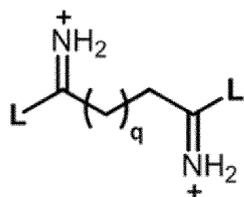
el espaciador se selecciona independientemente entre cualquier grupo orgánico;

15 el aminoácido se selecciona entre cualquier grupo orgánico que porte una amina libre y un grupo de ácido carboxílico libre;

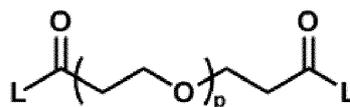
n es 1-20; y

Z<sub>1</sub> se selecciona independientemente entre -NH<sub>2</sub>, -OH, -SH, y -COOH; y

el compuesto de la Fórmula B es:



(XXIII)



(XIV)

20

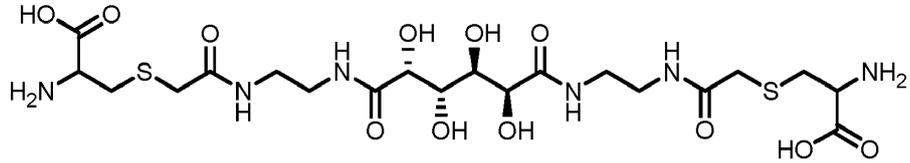
en donde

q es un número de 1 a 20;

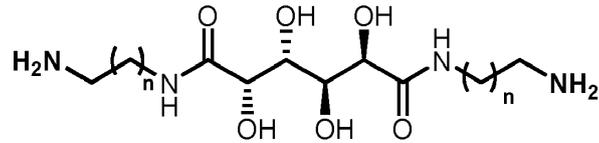
p es un número de 20 a 200; y

L es un grupo lábil.

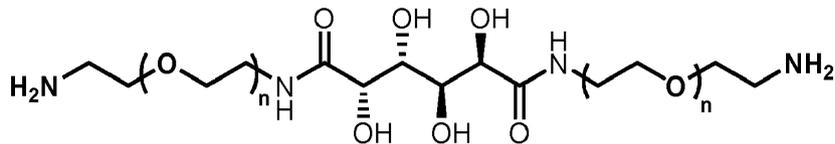
2. La nanopartícula según la reivindicación 1, en donde A es:



IX



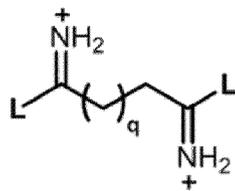
X



XI

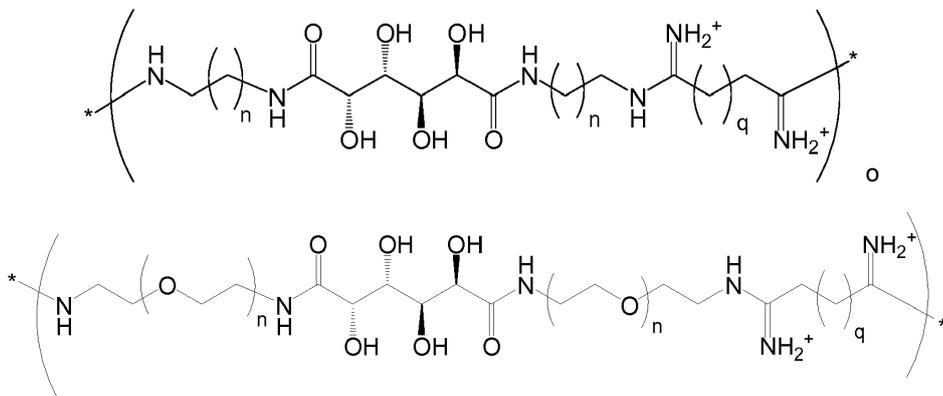
en donde n es un número de 1 a 20.

3. La nanopartícula según la reivindicación 2, en donde el compuesto de la fórmula B es:

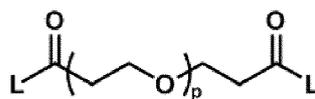


(XXIII)

4. La nanopartícula según la reivindicación 3, en donde el polímero que contiene el polioliol comprende unidades de la fórmula:

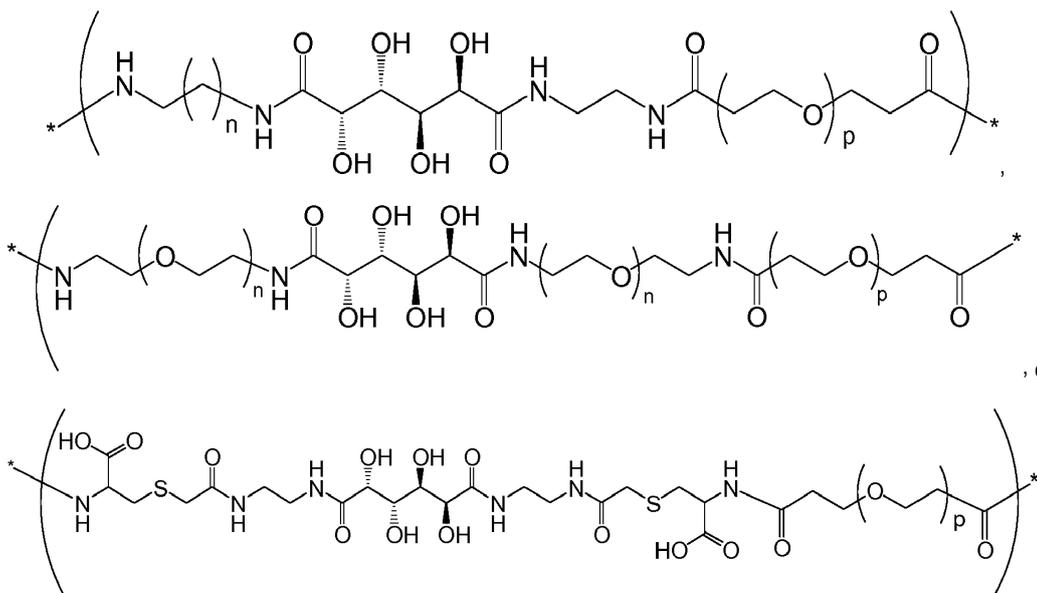


5. La nanopartícula según la reivindicación 2, en donde el compuesto de la fórmula B es:



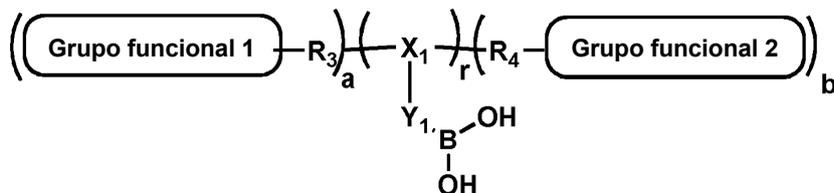
(XIV)

6. La nanopartícula según la reivindicación 5, en donde el polímero que contiene el polirol comprende unidades de la fórmula:



5

7. La nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico comprende al menos un grupo de ácido nitrofenilborónico terminal y tiene la fórmula general



(XXX)

10 en donde

$R_3$  y  $R_4$  son independientemente  $(CH_2CH_2O)_t$ , donde  $t$  es de 2 a 2.000;

$X_1$  es  $-NH-C(=O)-$ ,  $-S-S-$ ,  $-C(=O)-NH-$ ,  $-O-C(=O)-$  o  $-C(=O)-O-$ ;

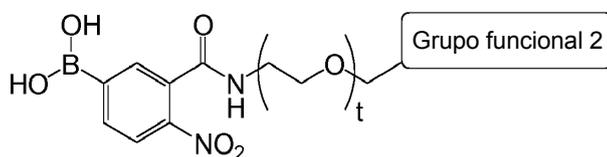
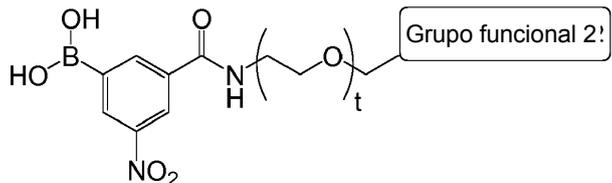
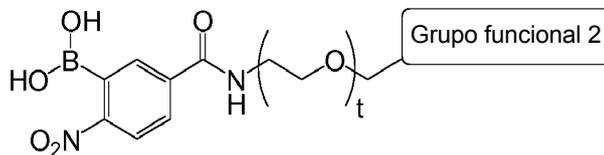
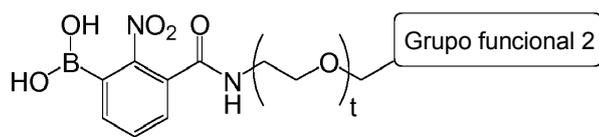
$Y_1$  es un grupo nitrofenilo;

$r = 1$ ;  $a = 0$ ; y  $b = 1$ ; y

15 en donde el grupo funcional 2 comprende un grupo  $-B(OH)_2$ ,  $-OCH_3$ ,  $-COOH$ ,  $-NH_2$ , u  $-OH$ .

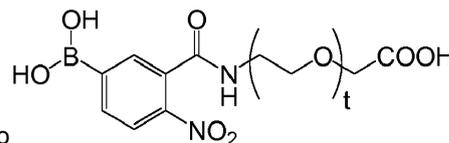
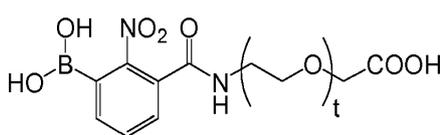
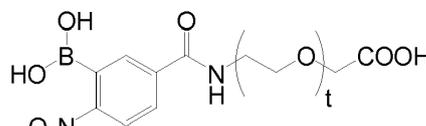
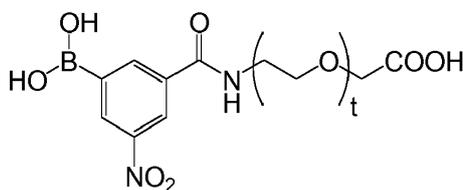
8. La nanopartícula según la reivindicación 7, en donde el grupo funcional 2 comprende un grupo  $-B(OH)_2$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OH$ , o  $-COOH$ .

9. La nanopartícula según la reivindicación 7, en donde el polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico es:



5 en donde t es un número de 2 a 2.000.

10. La nanopartícula según la reivindicación 7, en donde el polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico es:



en donde t es un número de 2 a 2.000.

10 11. La nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende un agente terapéutico.

12. La nanopartícula según la reivindicación 11, en donde el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico de moléculas pequeñas o un polinucleótido.

13. La nanopartícula de la reivindicación 12, en donde el polinucleótido es ARN interferente.

15 14. La nanopartícula según la reivindicación 12, en donde el agente quimioterapéutico de moléculas pequeñas es camptotecina, una epotilona, un taxano o una combinación de los mismos.

15. La nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que además comprende cualquiera de 5, 4, 3, 2, o 1 ligandos guiados.

20 16. La nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la nanopartícula está conjugada solamente con un único ligando guiado.

17. La nanopartícula según la reivindicación 15 o 16, en donde el ligando guiado es una proteína, un aptámero, una molécula pequeña, un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo.

18. La nanopartícula según la reivindicación 16, en donde el ligando guiado es un único anticuerpo.

19. La nanopartícula según la reivindicación 18, en donde el único anticuerpo está conjugado con una parte terminal del polímero que contiene un ácido nitrofenilborónico.
20. La nanopartícula según la reivindicación 15 o 16, en donde el ligando guiado se selecciona entre transferrina, una proteína, un aptámero, una molécula pequeña, un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, y la nanopartícula comprende además un agente terapéutico seleccionado entre camptotecina, una epotilona, un taxano o un polinucleótido, o cualquier combinación de los mismos.
21. Una composición que comprende una nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 y un vehículo y/o excipiente adecuado.
22. La composición según la reivindicación 21, en donde la composición es una composición farmacéutica y el vehículo y/o excipiente adecuado es un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

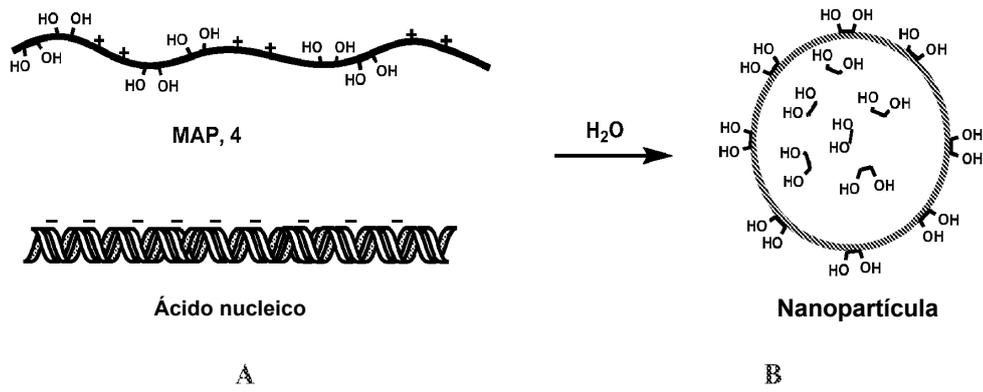


FIG. 1

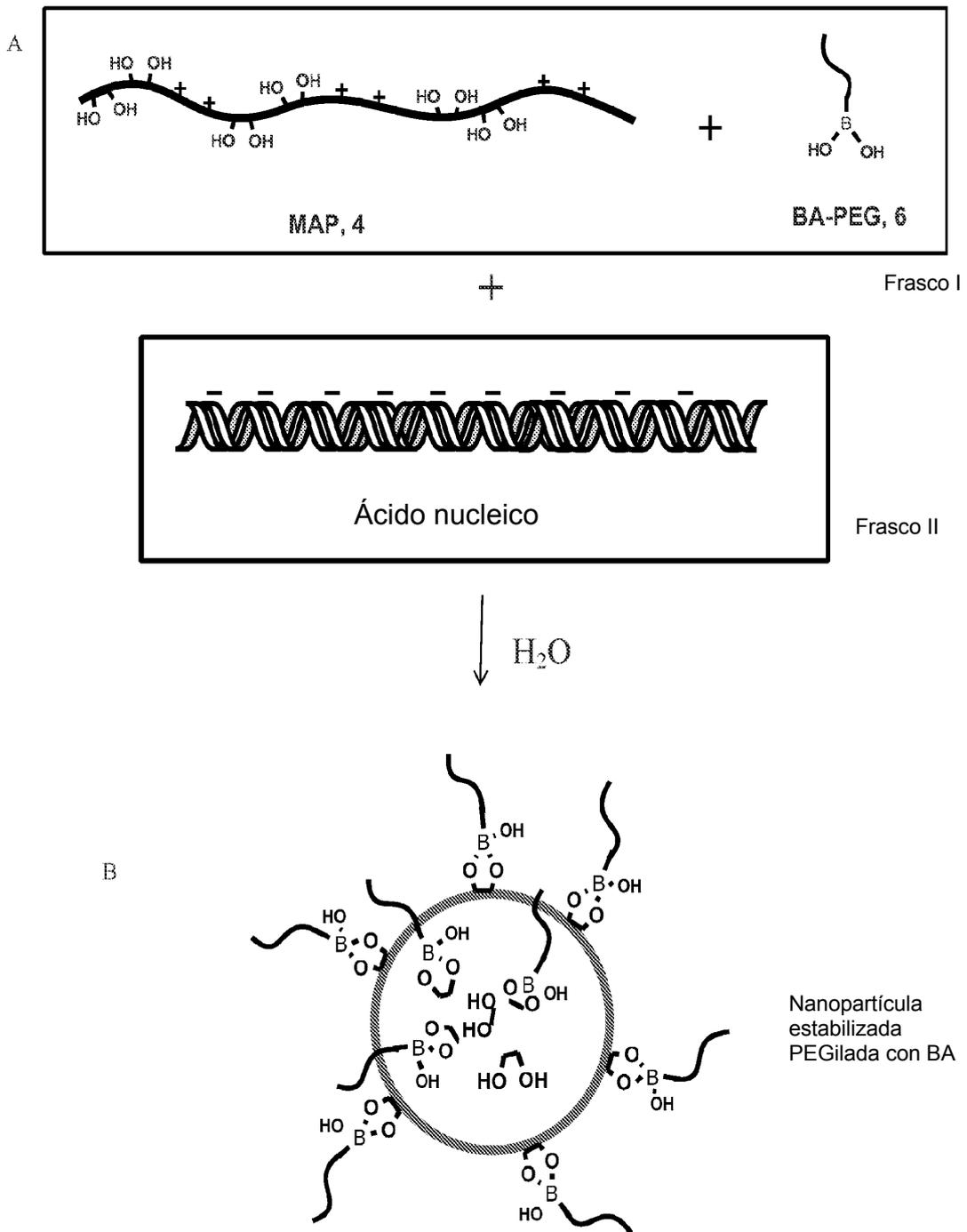
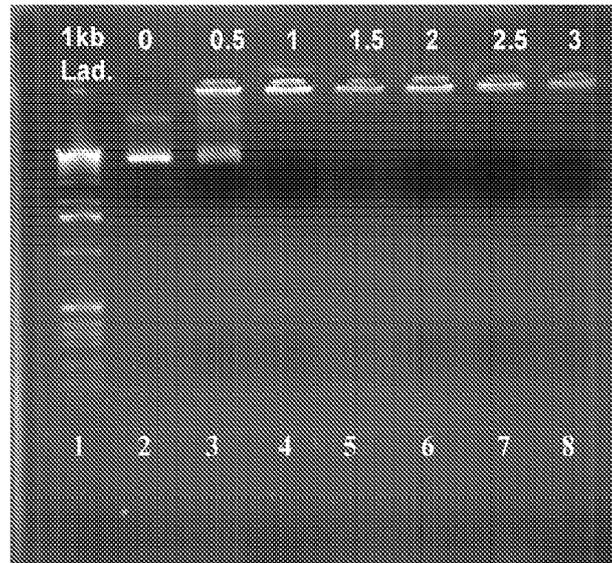


FIG. 2

Relación de carga +/-



**FIG. 3**

Relación de carga +/-

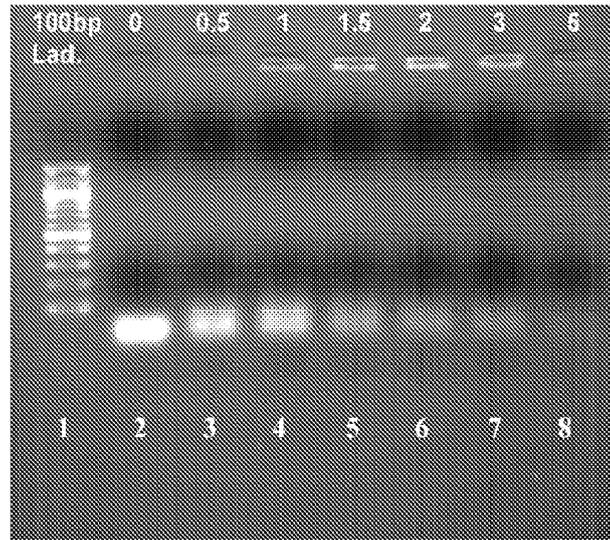
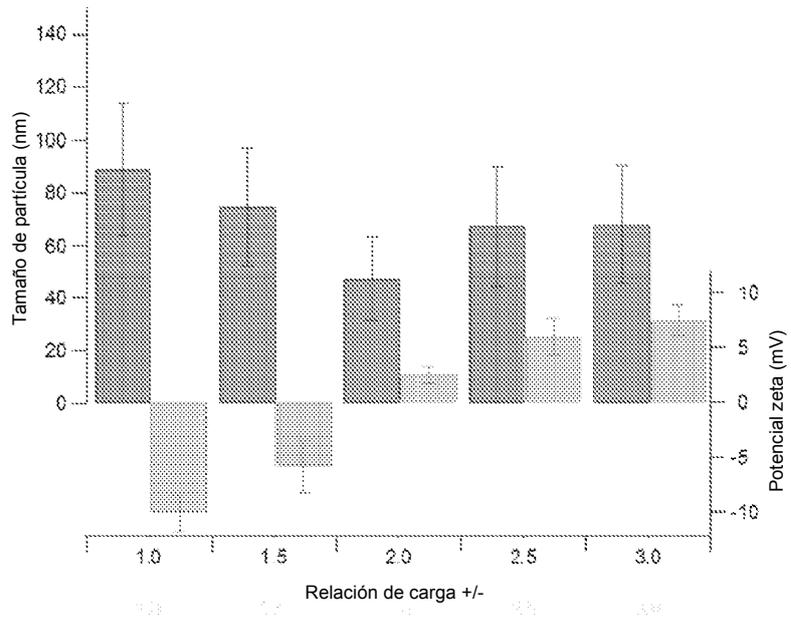
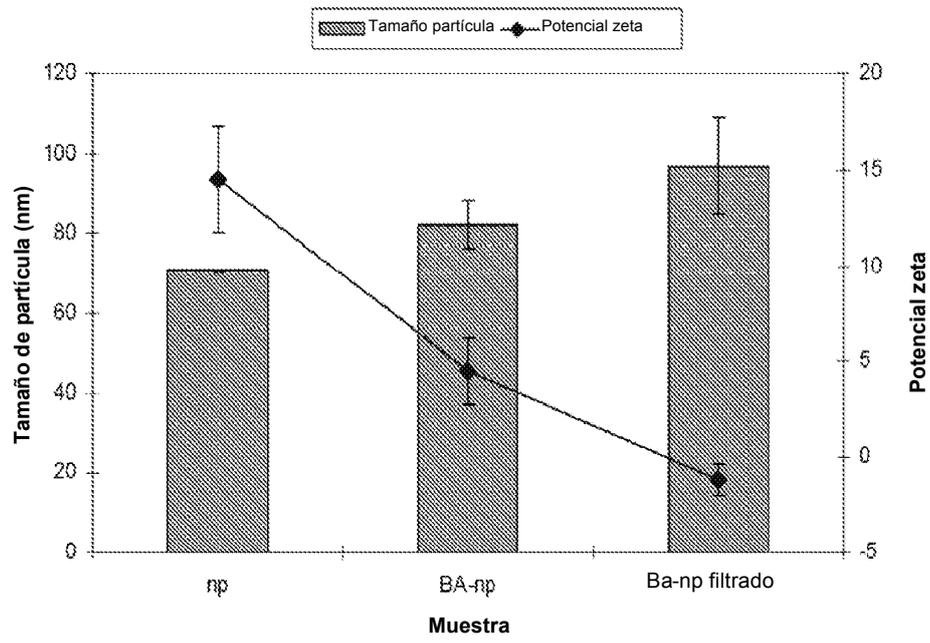


FIG. 4



**FIG. 5**



**FIG. 6**

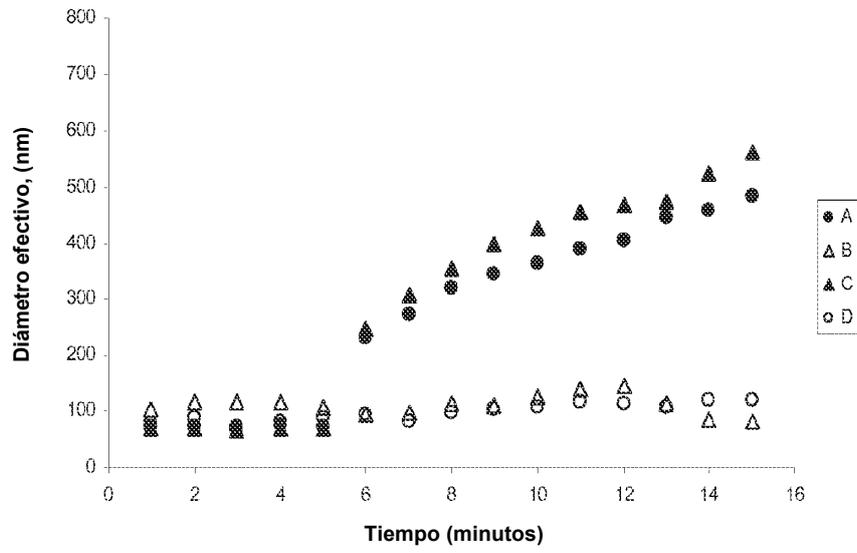
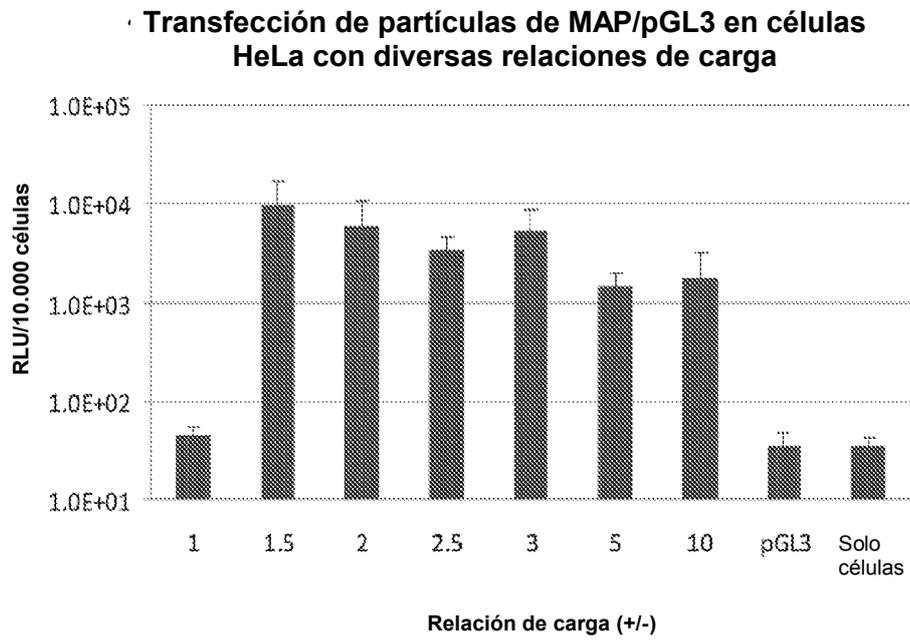
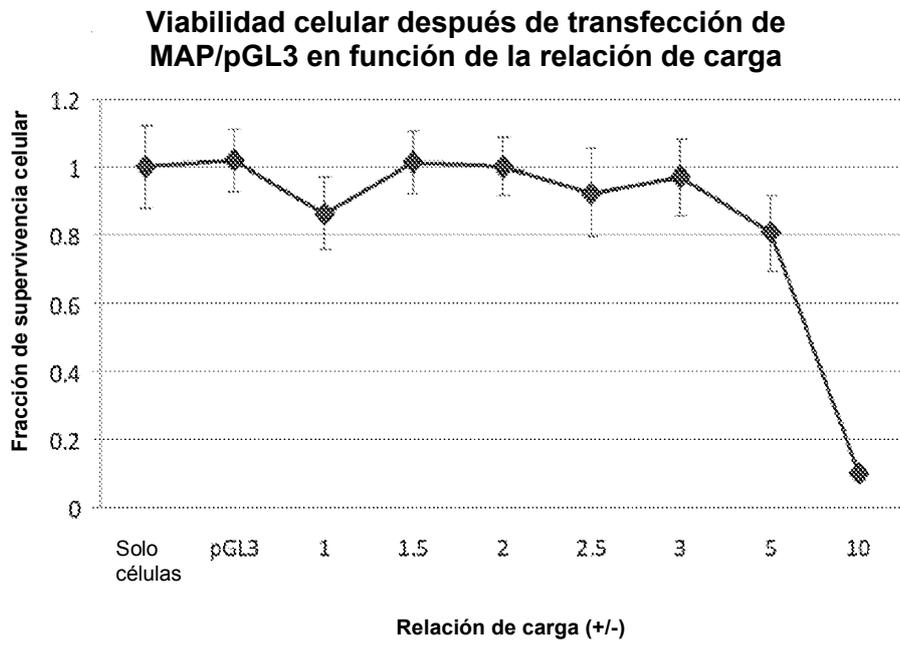


FIG. 7

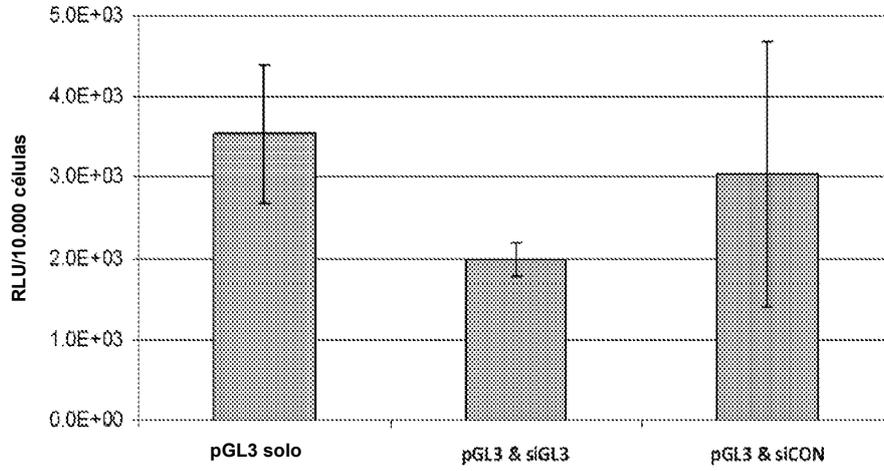


**FIG. 8**



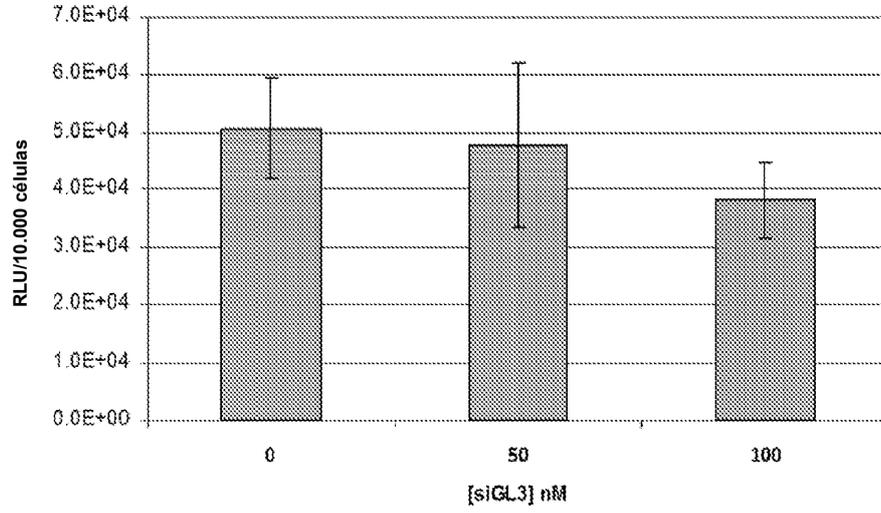
**FIG. 9**

Cotransfección de partículas que contienen pGL3 y siGL3 en una relación de carga de 5 en células HeLa, como controles sirven partículas que contienen pGL3 o pGL3 y siCON

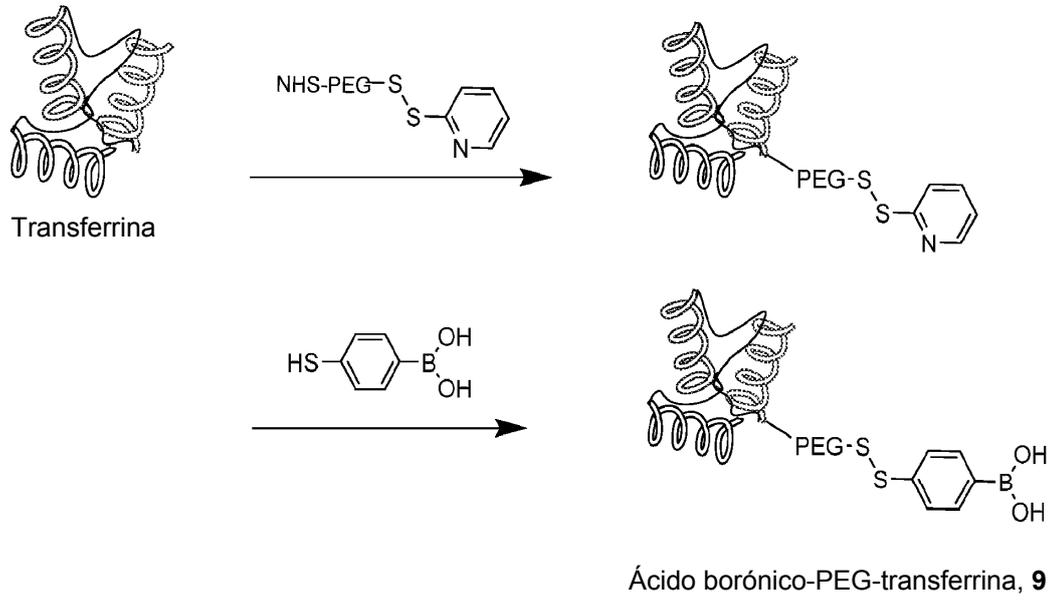


**FIG. 10**

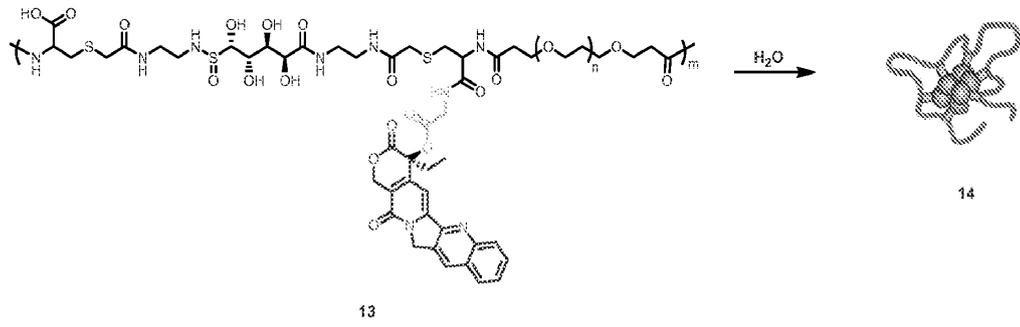
Efecto del aporte de MAP/siGL3 en una relación de carga de 5 en células HeLa-LUC con diversas concentraciones de siGL3



**FIG. 11**



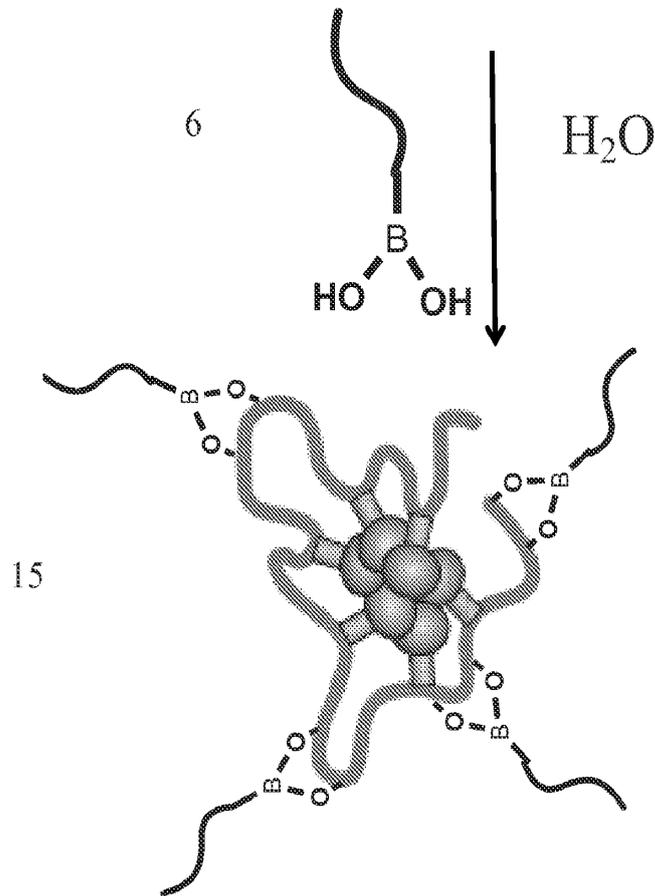
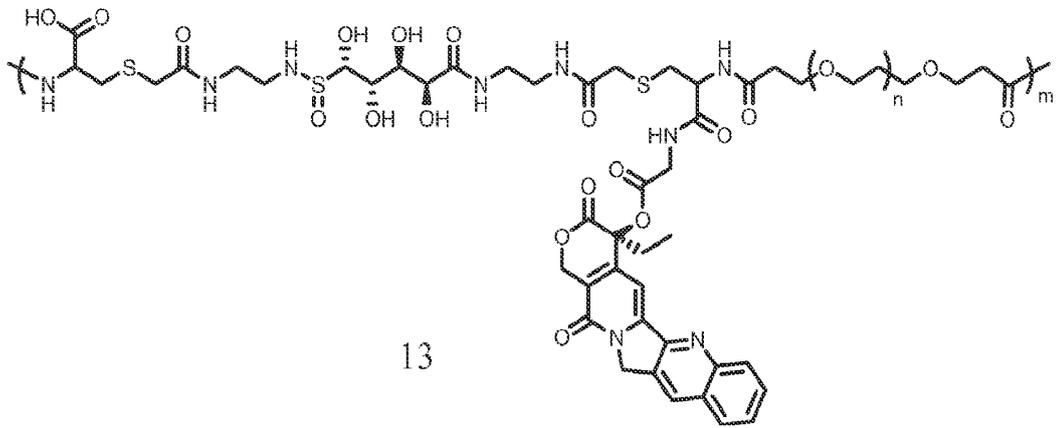
**FIG. 12**



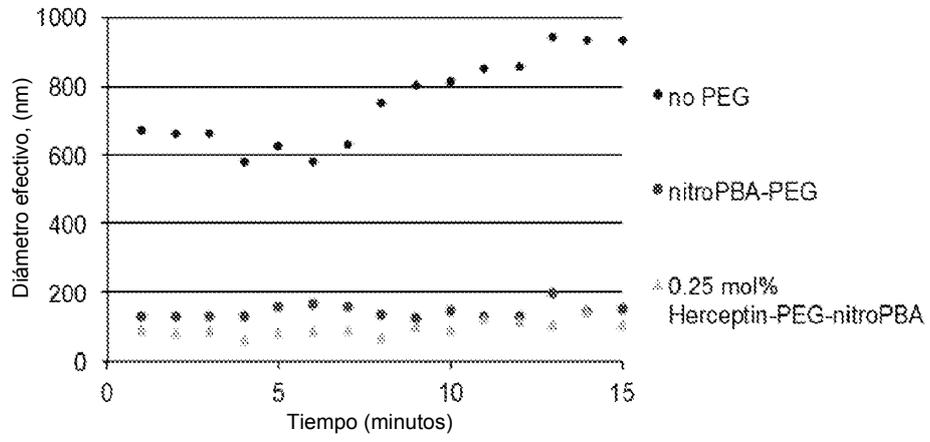
**FIG. 13**

<b>Polímero</b>	<b>Diámetro efectivo (nm)</b>	<b>Potencial zeta (mV)</b>
poli(ácido múcico-DiCys-PEG)	4,8	-5
poli(ácido múcico-DiCys-PEG)-CPT	57	-8

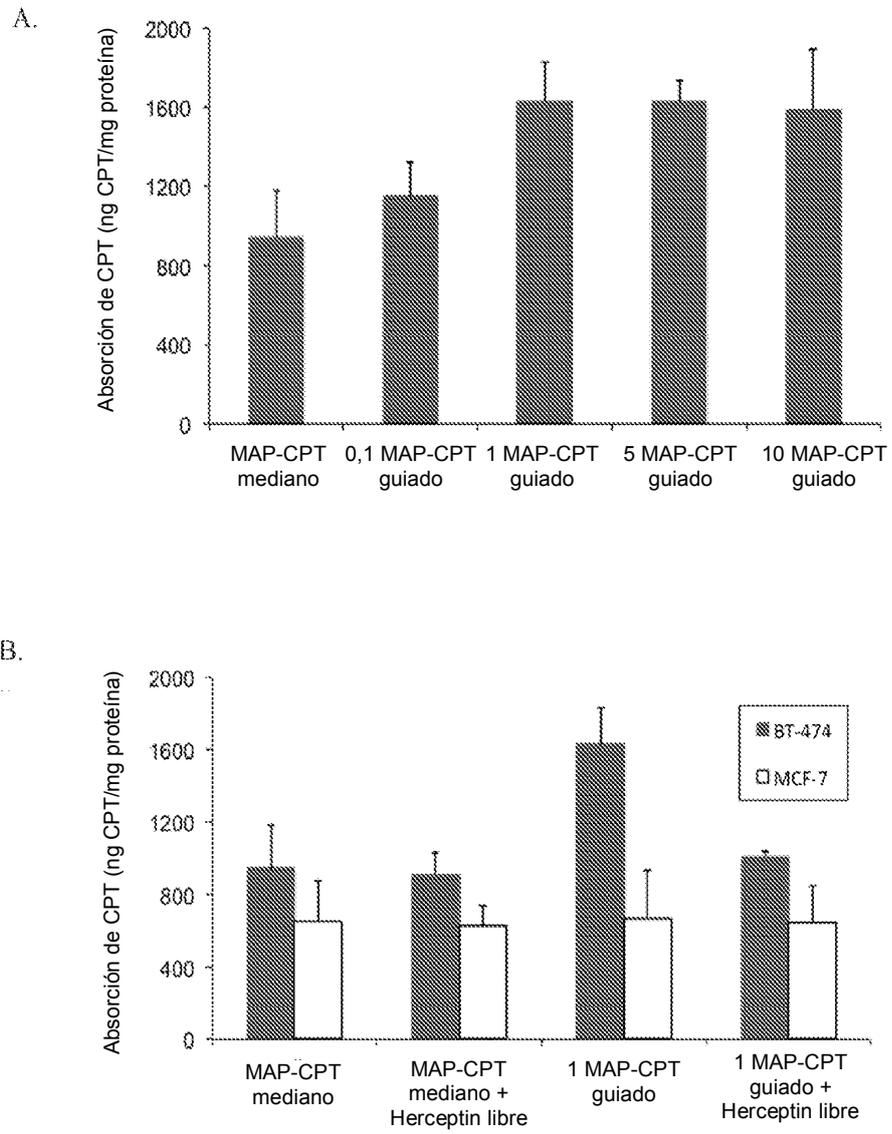
**FIG. 14**



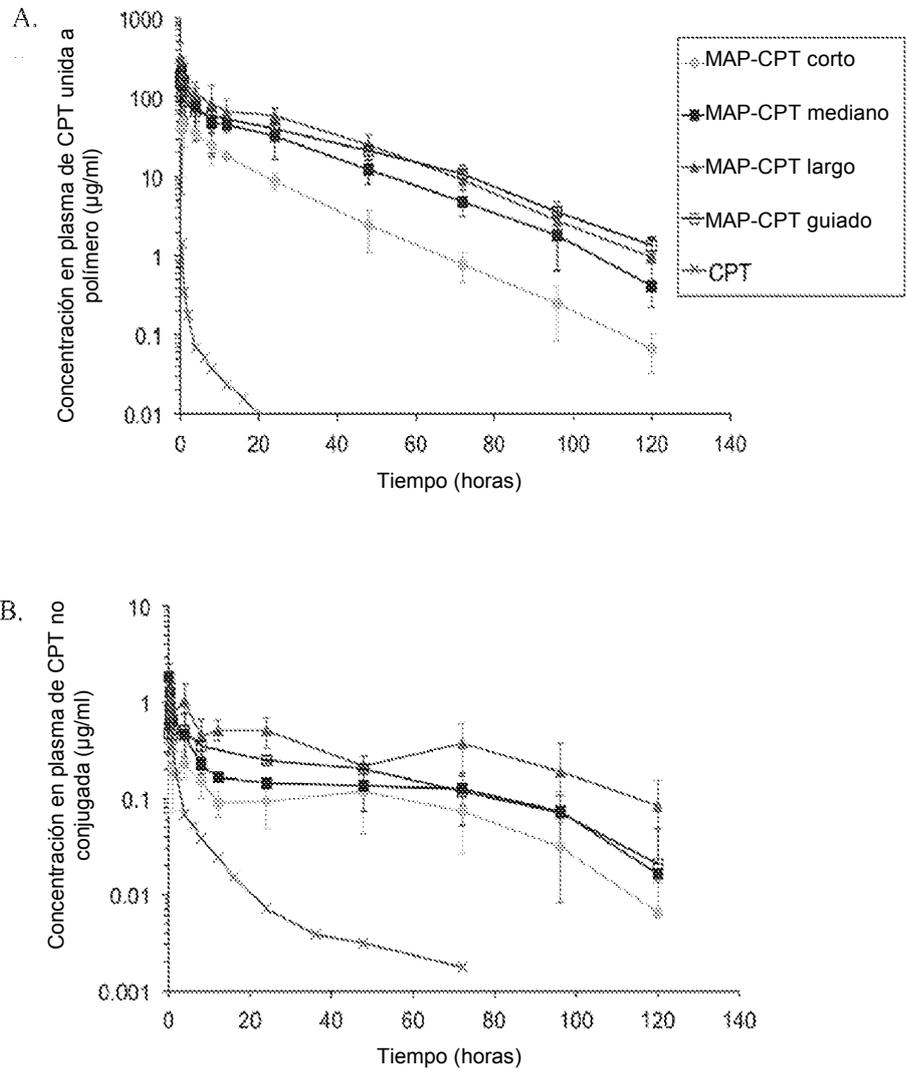
**FIG. 15**



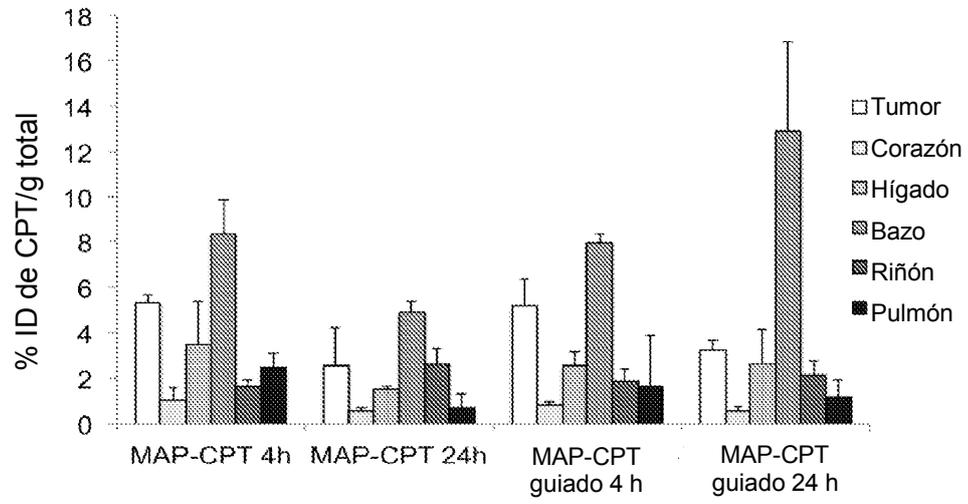
**FIG. 16**



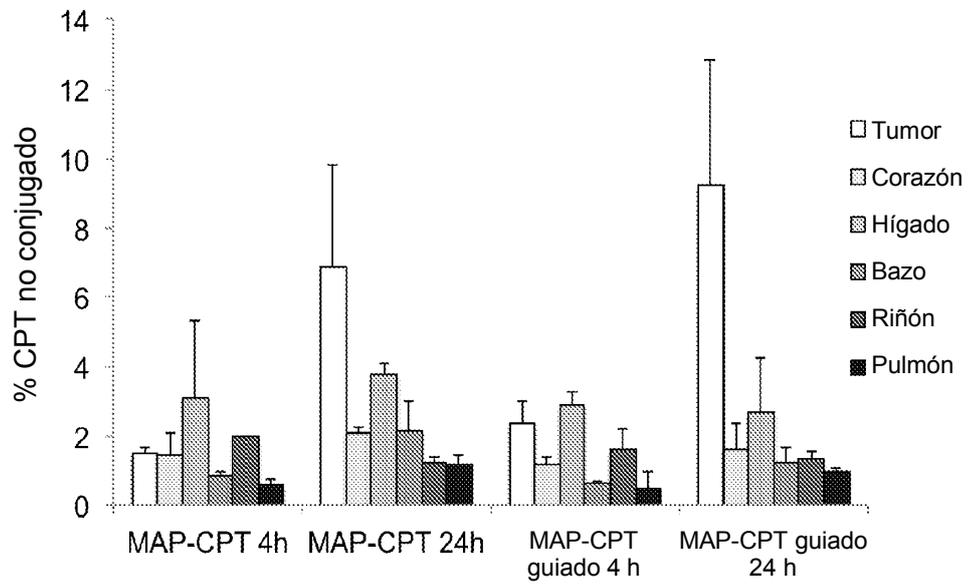
**FIG. 17**



**FIG. 18**



**FIG. 19A**



**FIG. 19B**

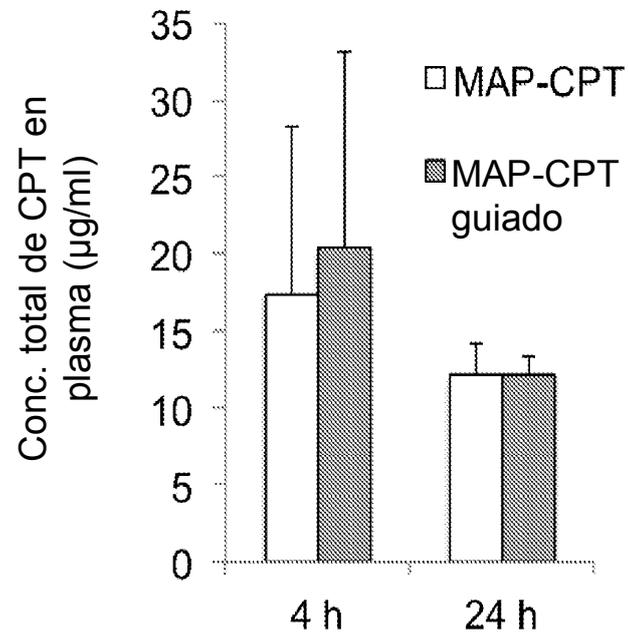
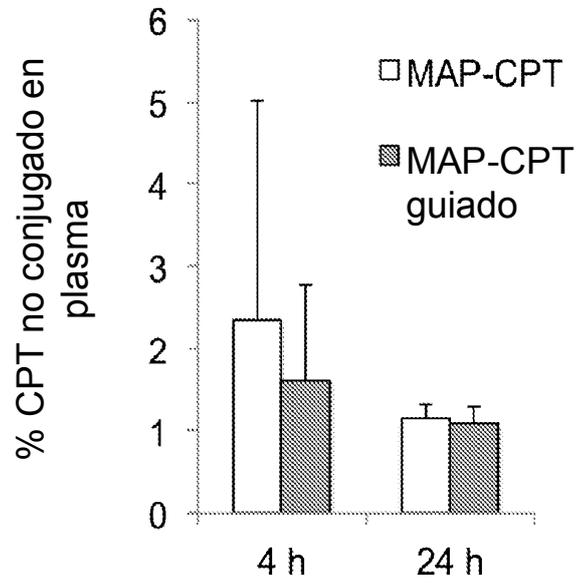
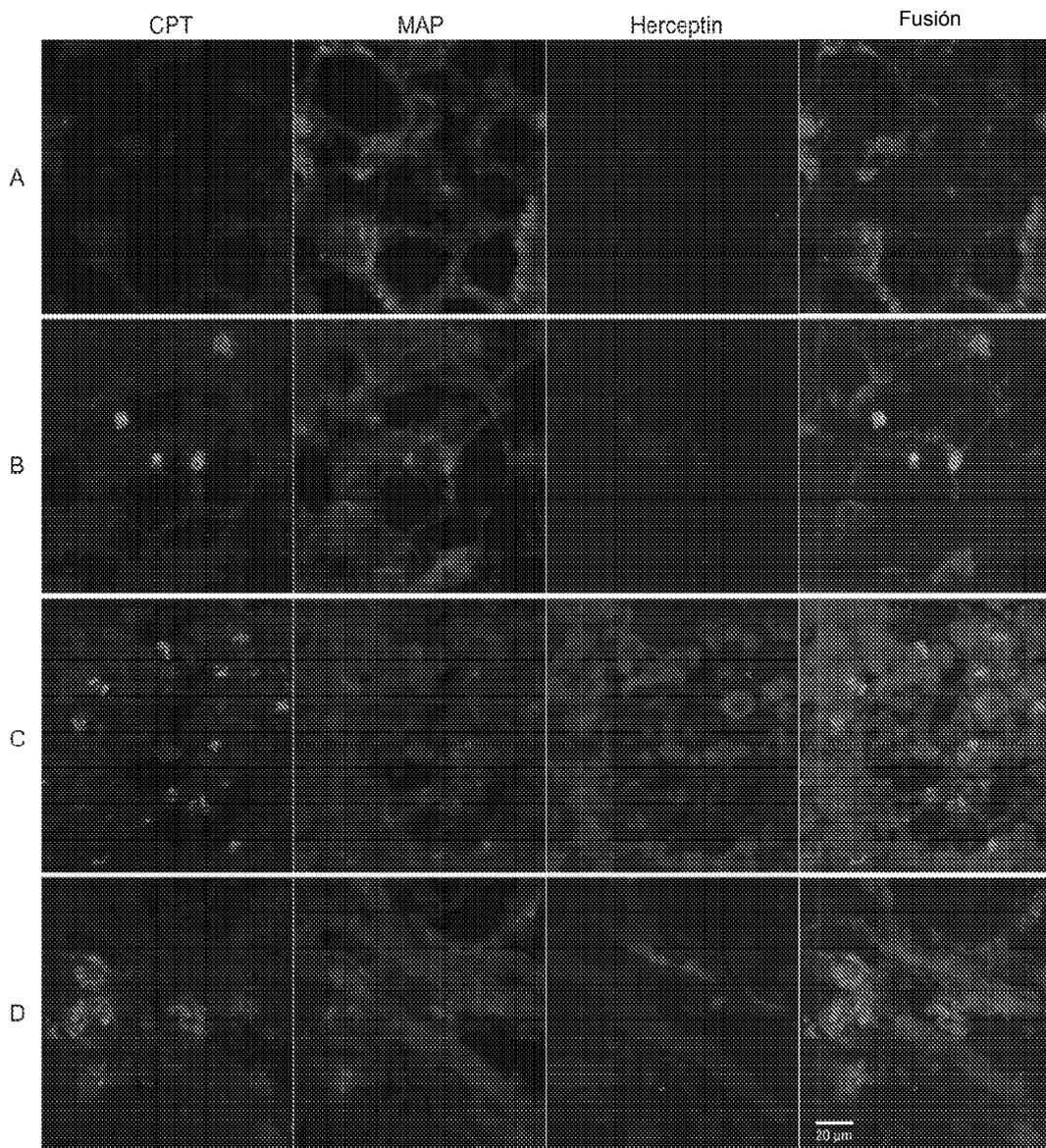


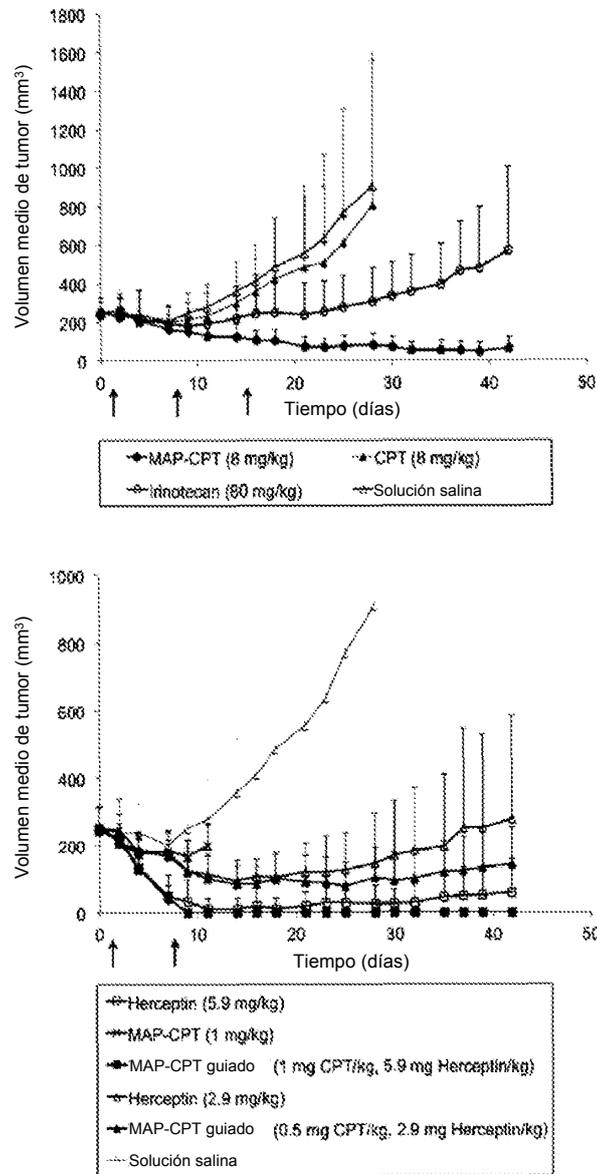
FIG. 19C



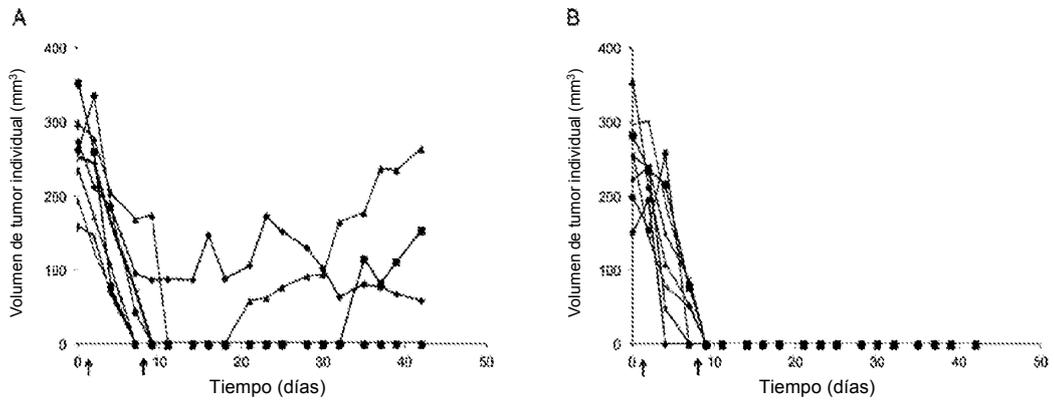
**FIG. 19D**



**FIG. 20**



**FIG. 21**



**FIG. 22**