

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 208**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)
A61K 9/51	(2006.01)
A61K 33/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 37/00	(2006.01)
A61P 3/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2013 PCT/US2013/027431**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13126776**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2013 E 13708044 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2817024**

54 Título: **Nanoestructuras para tratar cánceres**

30 Prioridad:

22.02.2012 US 201261601706 P

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

28.02.2020

73 Titular/es:

**NORTHWESTERN UNIVERSITY (100.0%)
633 Clark Street
Evanston, IL 60208, US**

72 Inventor/es:

**THAXTON, C., SHAD;
DAMIANO, MARINA, G.;
ZHANG, HENG;
MCMAHON, KAYLIN, M.;
YANG, SHUO;
GORDON, LEO, I. y
SINGH, AMARESHWAR, T.K.**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 745 208 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

Nanoestructuras para tratar cánceres

5 Campo de invención

La presente invención se refiere en general a nanoestructuras y a composiciones para tratar cánceres y otras afecciones.

10 Antecedentes

Actualmente se usan nanoestructuras, incluyendo nanoestructuras de liposomas, en aplicaciones tales como administración de fármacos, inserción de genes y pruebas diagnósticas. Se ha usado una variedad de métodos para fabricar tales nanoestructuras; por ejemplo, se han formado nanoestructuras de liposomas mediante técnicas que incluyen síntesis de lipoproteína/conjugado y sonicar mezclas de componentes de liposoma anfipáticos. Sin embargo, algunos de tales métodos conducen a menudo a estructuras que tienen tamaños relativamente grandes, distribuciones de gran tamaño y/o estabilidad a corto plazo. Por consiguiente, existe la necesidad de nanoestructuras que tengan tamaños más pequeños, distribuciones de tamaño controladas y/o estabilidad a largo plazo, y métodos para elaborar tales nanoestructuras, mientras que se es capaz de controlar la funcionalidad y la capacidad de adaptación de las nanoestructuras. El uso de tales nanoestructuras para tratar afecciones tales como cáncer también sería beneficioso.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere en general a nanoestructuras y a composiciones para tratar cánceres. En algunos casos, la nanoestructura puede usarse para tratar cánceres controlando el metabolismo del colesterol en células. Las nanoestructuras y composiciones pueden usarse, por ejemplo, para controlar la entrada y salida de colesterol en células cancerosas. Las nanoestructuras son imitadores de HDL natural tal como se describe en más detalle a continuación. El objeto de esta solicitud implica, en algunos casos, productos interrelacionados, soluciones alternativas a un problema particular, y/o una pluralidad de diferentes usos de estructuras y composiciones, tal como se describirá en más detalle a continuación.

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas, mientras que las realizaciones que se no encuentran en estas reivindicaciones son sólo con fines de referencia.

En un conjunto de realizaciones, se proporciona una serie de métodos.

En un conjunto de realizaciones, se proporciona un método para destruir células cancerosas que tienen receptor eliminador de clase B tipo I (SR-B1). El método implica poner en contacto las células cancerosas que tienen SR-B1 con una nanoestructura sintética en una cantidad eficaz para destruir las células cancerosas.

En un conjunto de realizaciones, se proporciona un método para destruir células de linfoma de células B. El método implica poner en contacto las células de linfoma de células B con una nanoestructura sintética en una cantidad eficaz para destruir las células de linfoma de células B.

En un conjunto de realizaciones, se proporciona un método para tratar linfoma no Hodgkin en un sujeto. El método implica administrar al sujeto una nanoestructura sintética en una cantidad eficaz para tratar el linfoma no Hodgkin.

En un conjunto de realizaciones, se proporciona un método para tratar cáncer en un sujeto. El método implica administrar al sujeto una composición que controla la entrada y salida de colesterol en células cancerosas del sujeto para tratar el cáncer.

En un conjunto de realizaciones, se proporciona un método de diagnóstico, prevención, tratamiento o gestión de una enfermedad o afección corporal. El método implica administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una estructura sintética que comprende un núcleo de nanoestructura y una cubierta que rodea y está unida al núcleo de nanoestructura, permitiendo que la nanoestructura sintética se una con un receptor de la superficie celular que se une a una lipoproteína natural, y bloquear o reducir la cantidad de unión entre el receptor de la superficie celular y la lipoproteína natural.

En algunas realizaciones, la lipoproteína natural es HDL, IDL, LDL o VLDL. El método puede implicar, por ejemplo, aumentar o reducir la entrada o salida de colesterol en una célula que comprende el receptor de la superficie celular.

En un conjunto de realizaciones, se proporciona un método para diagnosticar, prevenir, tratar o gestionar una enfermedad o afección corporal asociada con niveles de lípidos anómalos. El método puede implicar administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una estructura sintética que comprende un núcleo de nanoestructura y una cubierta que rodea y está unida al núcleo de nanoestructura, y alterar

el flujo de colesterol celular en el sujeto usando la estructura sintética.

5 En un conjunto de realizaciones, un método implica administrar a una matriz biológica una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una estructura sintética que comprende un núcleo de nanoestructura y una cubierta que rodea y está unida al núcleo de nanoestructura, y permitir que la nanoestructura sintética secuestre o intercambie lípidos o proteínas con otras lipoproteínas naturales en la matriz biológica. La nanoestructura sintética puede ser un imitador de la lipoproteína natural. En algunas realizaciones, el método implica unir la nanoestructura sintética a un receptor de la superficie celular que puede unirse con una lipoproteína natural.

10 En uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente, el método puede implicar unir la estructura, o un componente de la estructura, a uno o más receptores de la superficie celular que regulan el transporte de colesterol. El receptor de la superficie celular puede ser, por ejemplo, SR-B1, ABCA1 y/o ABCG1.

15 En uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente, la enfermedad o afección corporal asociada con niveles de lípidos anómalos puede implicar inflamación o regulación del sistema inmunitario.

20 En uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente, la composición puede comprender una pluralidad de nanoestructuras sintéticas. En algunas realizaciones, el cáncer es linfoma no Hodgkin. En algunos casos, el cáncer está caracterizado por células de linfoma de células B, o en el que las células cancerosas son células de linfoma de células B. En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia. En otras realizaciones, el cáncer es melanoma. En determinadas realizaciones, el cáncer está caracterizado por células que tienen SR-B1. En algunas realizaciones, el cáncer está caracterizado por células que tienen ABCA1 y/o ABCG1, o en el que las células cancerosas tienen ABCA1 y/o ABCG1.

25 En uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente, un método puede implicar controlar el crecimiento de las células cancerosas. En algunas realizaciones, un método implica destruir las células cancerosas. En algunos casos, la destrucción tiene lugar por apoptosis. En algunas realizaciones, un método implica controlar el metabolismo del colesterol en las células cancerosas. Controlar el metabolismo del colesterol puede implicar, por ejemplo, aumentar la salida de colesterol de las células cancerosas y/o reducir la entrada de colesterol en las células cancerosas. En algunos casos, un método implica modular la unión de SR-B1. En algunos casos, un método implica inhibir sustancialmente SR-B1.

35 En uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente, un método puede implicar usar la nanoestructura sintética para secuestrar colesterol en las células cancerosas. La nanoestructura sintética puede usarse para secuestrar al menos 5, al menos 10, al menos 20, o al menos 50 de moléculas de colesterol en las células cancerosas. El colesterol puede, por ejemplo, ser colesterol esterificado o colesterol libre.

40 En uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente, la nanoestructura sintética puede ser un bioimitador de lipoproteína de alta densidad esférica y madura, por ejemplo, con respecto al tamaño, la forma y/o la química de superficie. La nanoestructura sintética puede adaptarse para secuestrar colesterol. En algunas realizaciones, la nanoestructura sintética comprende un núcleo de nanoestructura y una cubierta. En algunos casos, un núcleo de nanoestructura incluye un material inorgánico, tal como un metal (por ejemplo, oro).

45 En uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente, el núcleo de nanoestructura sintética puede tener la mayor dimensión de sección transversal de menos de o igual a aproximadamente 50 nm, o menos de o igual a aproximadamente 35 nm, o menos de o igual a aproximadamente 30 nm.

50 En uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente, la nanoestructura sintética puede comprender una cubierta que comprende una capa lipídica que rodea y está unida a un núcleo de nanoestructura. En algunos casos, la capa lipídica es una bicapa lipídica. En algunas realizaciones, al menos una porción de la bicapa lipídica está unida de manera covalente al núcleo. En otras realizaciones, al menos una porción de la bicapa lipídica se adsorbe físicamente al núcleo. En algunos casos, la bicapa lipídica comprende un fosfolípido. Por ejemplo, la bicapa lipídica puede comprender 50-200 fosfolípidos. En algunos casos, la cubierta comprende una estructura de lipoproteína. En algunas realizaciones, la cubierta comprende una apolipoproteína. La apolipoproteína puede ser, por ejemplo, apolipoproteína A-I, apolipoproteína A-II o apolipoproteína E. En algunas realizaciones, la nanoestructura sintética incluye 1-6 apolipoproteínas. En determinadas realizaciones, la nanoestructura sintética comprende una cubierta que tiene una superficie interna y una superficie externa, y una proteína está asociada con al menos la superficie externa de la cubierta.

60 Otras ventajas y características nuevas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de diversas realizaciones no limitativas de la invención cuando se consideran junto con las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

65 Se describirán realizaciones no limitativas de la presente divulgación a modo de ejemplo con referencia a las figuras

adjuntas, que son esquemáticas y no se pretenden dibujar a escala. En las figuras, cada componente idéntico o casi idéntico ilustrado se representa normalmente por un solo número. Con fines de claridad, no todos los componentes están marcados en cada figura, ni se muestran todos los componentes de cada realización de la invención donde la ilustración no es necesaria para permitir que los expertos en la técnica entiendan la invención. En las figuras:

- 5 la figura 1A muestra un ejemplo de una nanoestructura que puede usarse para tratar una enfermedad o afección descrita en el presente documento según un conjunto de realizaciones;
- 10 la figura 1B muestra un método de fabricación de nanoestructuras según un conjunto de realizaciones;
- 15 la figura 2A muestra la expresión de SR-B1 relativa mediante obtención del perfil de expresión génica en muestras de paciente con linfoma en comparación con células B indiferenciadas y de memoria obtenidas de donantes sanos según un conjunto de realizaciones;
- 20 la figura 2B es una imagen de una inmunotransferencia de tipo Western que muestra la expresión de receptores específicos de lipoproteínas de alta densidad (HDL), ABCA1, ABCG1 y SR-B1 en líneas de células de linfoma según un conjunto de realizaciones;
- 25 la figura 2C muestra una inmunotransferencia de tipo Western que demuestra la expresión de SR-B1 en linfoma y linfocitos normales (HL normal). Los números representan la razón de expresión de receptor SR-B1 con respecto a GAPDH. Todas las razones se normalizaron a la misma razón medida para la expresión de SR-B1 en células HepG2 según un conjunto de realizaciones;
- 30 la figura 2D muestra la expresión del receptor SR-B1 de HDL en todas las líneas de células cancerosas cultivadas excepto para Jurkat según un conjunto de realizaciones;
- 35 la figura 2E muestra la expresión de SR-B1 en hepatocitos y macrófagos diferenciados de células CD14+ humanas. Se incluyeron células HepG2 y Jurkat como controles positivos y negativos para SR-B1, respectivamente, según un conjunto de realizaciones;
- 40 las figuras 3A y 3B muestran el efecto de hHDL y HDL-NP sobre el ensayo de MTS de células de linfoma (72 h) para determinar el efecto de (A) hHDL y (B) HDL-NP según un conjunto de realizaciones. Las medidas de valores de absorbancia en el control (células no tratadas) se establecieron al 100% para todos los ensayos de MTS;
- 45 las figuras 3C y 3D muestran el efecto de hHDL y HDL-NP sobre células primarias según un conjunto de realizaciones. Los ensayos de MTS muestran que las hHDL y HDL-NP no reducen significativamente la viabilidad de (A) hepatocitos primarios o (B) macrófagos primarios a 24 y 48 h tras el tratamiento. A las 72 h tras el tratamiento, hHDL aumenta significativamente la viabilidad de tanto hepatocitos como macrófagos en comparación con el control;
- 50 la figura 4 muestra los efectos de componentes libres de nanoestructuras sintéticas descritas en el presente documento (por ejemplo, HDL-NP) sobre células de linfoma según un conjunto de realizaciones;
- 55 la figura 5A muestra los resultados de un ensayo de incorporación de ³H timidina para medir la proliferación celular en presencia de Ac-LDL y HDL-NP en líneas de células de linfoma según un conjunto de realizaciones;
- la figura 5B muestra que la apoptosis (72 h) de células de linfoma tratadas con HDL-NP depende de la dosis según un conjunto de realizaciones;
- la figura 5C muestra un ensayo colorimétrico para determinar la actividad caspasa 3 activada según un conjunto de realizaciones;
- la figura 5D-5F muestran inmunotransferencias de tipo Western para PARP y caspasa-3 según un conjunto de realizaciones: inmunotransferencia de tipo Western de 28 h para (figura 5D) escisión inducida por HDL-NP de PARP, (figura 5E) niveles de caspasa 3 en células Ramos, y (figura 5F) inmunotransferencia de tipo Western de 24 h para escisión inducida por HDL-NP de PARP en células SUDHL-4;
- 60 la figura 6A muestra apoptosis en hepatocitos primarios y macrófagos después de tratamiento con hHDL 10 nM y HDL-NP según un conjunto de realizaciones;
- 65 la figura 6B muestra apoptosis en linfocitos humanos normales tratados con HDL-NP (linfa normal) y células SUDHL-4 expresadas como aumento en veces en comparación con el control (48 h) según un conjunto de realizaciones. (Recuadro) Apoptosis en linfocitos humanos normales a los 2 ó 5 d después del tratamiento con HDL-NP;
- la figura 7A muestra la captación de HDL-NP en células de linfoma mediante datos de ICP-EM que miden el contenido en Au según un conjunto de realizaciones;

- la figura 7B muestra la captación de HDL-NP en células de linfoma mediante experimento de competición basado en IPC-EM entre HDL-NP y hHDL según un conjunto de realizaciones;
- 5 la figura 7C muestra micrografías electrónicas de transmisión de HDL-NP en células SUDHL-4 después del tratamiento con HDL-NP (24 h) según un conjunto de realizaciones;
- la figura 8A muestra los resultados del ensayo de MTS del rescate con Ac-LDL (microgramos por mililitro) en líneas de células de linfoma SR-B1⁻ y SR-B1⁺ según un conjunto de realizaciones;
- 10 la figura 8B muestra apoptosis en líneas de células de linfoma después del rescate con Ac-LDL;
- las figuras 8C y 8D muestran apoptosis en células SUDHL-4 y células Ramos tratadas, respectivamente, según un conjunto de realizaciones;
- 15 las figuras 8E y 8F muestran histogramas de citometría de flujo de anexina V/PI representativos de apoptosis en Ramos y SUDHL-4, respectivamente, según un conjunto de realizaciones;
- la figura 9A muestra el porcentaje de salida de colesterol de células de linfoma a HDL-NP en comparación con hHDL según un conjunto de realizaciones;
- 20 la figura 9B muestra la salida de colesterol de macrófagos y hepatocitos humanos a hHDL y HDL-NP según un conjunto de realizaciones;
- la figura 9C muestra la entrada de colesterol a células de linfoma mediante HDL-NP y hHDL según un conjunto de realizaciones;
- 25 la figura 9D muestra entrada de colesterol a macrófagos y hepatocitos humanos de hHDL y HDL-NP según un conjunto de realizaciones;
- 30 la figura 9E muestra la salida de colesterol de células SUDHL-4 a hHDL y HDL-NP solas y después del tratamiento con BLT-1 10 μ M según un conjunto de realizaciones;
- la figura 9F muestra la entrada de colesterol de hHDL y HDL-NP a células SUDHL-4 solas y después del tratamiento con BLT-1 10 μ M según un conjunto de realizaciones;
- 35 las figuras 10A y 10B muestran el efecto de HDL-NP sobre el volumen tumoral y los niveles de expresión de SR-B1 en un modelo de xenoinjerto para tumores de células Ramos y Jurkat, respectivamente, según un conjunto de realizaciones;
- 40 la figura 11A muestra la expresión de niveles de SR-B1 en tumores de células Ramos y Jurkat de cuatro ratones representativos recogidos el día 11 según un conjunto de realizaciones;
- las figuras 11B-11E muestran la tinción con H&E de muestras tumorales según un conjunto de realizaciones. (Figura 11B) muestra de tumor de células Jurkat rodeado por tejido adiposo; (figura 11C) imagen de mayor amplificación (5x) también revela la contaminación de adipocitos dentro del tumor de células Jurkat; (figura 11D y 11E) amplificación 10x, la contaminación de adipocitos es más prevalente en (figura 11D) tumor de células Jurkat que en (figura 11E) tumor de células Ramos;
- 45 la figura 12A muestra los efectos de nanoestructuras sintéticas descritas en el presente documento (por ejemplo, HDL-NP) sobre células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) según un conjunto de realizaciones;
- 50 la figura 12B muestra los efectos de nanoestructuras sintéticas descritas en el presente documento (por ejemplo, HDL-NP) sobre células HepG2 (células cancerosas de hígado humano) según un conjunto de realizaciones;
- 55 la figura 12C muestra los efectos de nanoestructuras sintéticas descritas en el presente documento (por ejemplo, HDL-NP) sobre células PC3 (células cancerosas de próstata humana) según un conjunto de realizaciones;
- 60 la figura 12D muestra los efectos de nanoestructuras sintéticas descritas en el presente documento (por ejemplo, HDL-NP) sobre células LnCaP (células cancerosas de próstata humana) según un conjunto de realizaciones;
- la figura 12E muestra los efectos de nanoestructuras sintéticas descritas en el presente documento (por ejemplo, HDL-NP) sobre células HMLE-GFP (células epiteliales de mama humana) según un conjunto de realizaciones;
- 65 la figura 12F muestra los efectos de nanoestructuras sintéticas descritas en el presente documento (por ejemplo, HDL-NP) sobre células HMLE-Twist (células epiteliales de mama humana) según un conjunto de realizaciones;

la figura 12G muestra los efectos de nanoestructuras sintéticas descritas en el presente documento (por ejemplo, HDL-NP) sobre células MDA-MB-231 (células cancerosas de mama humana) según un conjunto de realizaciones;

5 la figura 12H muestra los efectos de nanoestructuras sintéticas descritas en el presente documento (por ejemplo, HDL-NP) sobre células C8161 (células de melanoma humano) según un conjunto de realizaciones;

la figura 12I muestra los efectos de nanoestructuras sintéticas descritas en el presente documento (por ejemplo, HDL-NP) sobre A375 células (células de melanoma humano) según un conjunto de realizaciones;

10 la figura 12J muestra los efectos de nanoestructuras sintéticas descritas en el presente documento (por ejemplo, HDL-NP) sobre células Ramos (células de linfoma de células B humano) según un conjunto de realizaciones; y

15 la figura 13 es un espectro de UV-vis de una nanoestructura sintética (HDL-NP) según un conjunto de realizaciones.

Descripción detallada

20 Se proporcionan nanoestructuras, composiciones y métodos para tratar cánceres y otras afecciones. En algunos casos, las nanoestructuras y/o composiciones pueden usarse para tratar cánceres u otras enfermedades o afecciones, al menos en parte, controlando el metabolismo del colesterol en las células. Las nanoestructuras y composiciones pueden usarse, por ejemplo, para controlar la entrada y/o salida de colesterol en las células. En algunos casos, las nanoestructuras o composiciones pueden usarse para destruir las células. Los ejemplos de células cancerosas que pueden verse afectadas por las nanoestructuras y composiciones descritas en el presente documento incluyen aquellas que tienen un receptor eliminador de clase B tipo I (SR-B1), células de linfoma de células B, células de linfoma no Hodgkin, células de melanoma y/u otras. En algunas realizaciones, las nanoestructuras pueden ser imitadores de la lipoproteína natural de alta densidad (HDL).

30 Se describen en el presente documento enfoques terapéuticos nuevos para seleccionar como diana células cancerosas (por ejemplo, células que tienen el receptor SRBI, células de linfoma, células de linfoma no Hodgkin, células de melanoma y/u otras) usando una nanoestructura sintética y/o composiciones de la misma. En algunas realizaciones, la nanoestructura sintética puede ser un bioimitador de HDL esférica y madura, por ejemplo, en cuanto al tamaño, la forma, la química de superficie y/o la función de las estructuras. El control de tales características puede lograrse, al menos en parte, usando un molde sintético para la formación de las nanoestructuras. Por ejemplo, pueden formarse nanopartículas sintéticas de lipoproteínas de alta densidad (HDL-NP) usando una nanopartícula de oro (Au-NP) (u otra entidad o material adecuado) como molde sintético al que pueden añadirse otros componentes (por ejemplo, lípidos, proteínas, etc.).

40 En algunas realizaciones, las nanoestructuras sintéticas pueden tener un tamaño, forma y/o química de superficie sustancialmente similares a las de HDL natural, pero pueden diferir en al menos una característica de la de HDL natural. La al menos una característica puede ser, por ejemplo, la presencia o ausencia de uno o más componentes en la nanoestructura, el posicionamiento de uno o más componentes en o sobre la nanoestructura, los materiales usados para formar la nanoestructura, la constitución de la cubierta de la nanoestructura, la constitución del núcleo de la nanoestructura, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las nanoestructuras pueden elaborarse sustancialmente libres de colesterol (por ejemplo, en el núcleo, y/o antes de la administración de las nanoestructuras a un sujeto o muestra) dado que la Au-NP u otra entidad adecuada ocupa el estado real en el núcleo. Esta configuración difiere de la de HDL naturales, que tienen un núcleo formado de ésteres colesterílicos y triglicéridos. Además, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden tener determinadas características y/o funciones similares a las de HDL natural (por ejemplo, constante de unión a colesterol) pero pueden tener otras características y/o funciones que difieren de las de HDL natural (por ejemplo, capacidad de proporcionar colesterol a células). Las diferencias entre las nanoestructuras descritas en el presente documento y HDL naturales pueden contribuir a la eficacia de las nanoestructuras en el tratamiento de células, enfermedades y afecciones descritas en el presente documento, tal como se describe en más detalle a continuación.

55 El colesterol en las membranas celulares parece ser importante para la supervivencia y la proliferación de células malignas. Como terapia, y en contraste directo con HDL natural, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden inducir apoptosis dependiente del tiempo y de la dosis en células cancerosas tales como las que tienen un receptor eliminador de clase B tipo I (SR-B1), células de linfoma de células B, células de linfoma no Hodgkin, células de melanoma y/u otras. Por ejemplo, los datos demuestran que la eficacia terapéutica de las nanoestructuras puede derivarse seleccionando como diana el receptor de alta afinidad para HDL, SR-B1 y/o por la capacidad de la nanoestructura para manipular el flujo de colesterol celular. En conjunto, la unión del receptor de nanoestructura seleccionada como diana, que puede lograrse a través de la química de superficie de las nanoestructuras, y/o la manipulación del flujo de colesterol celular, que puede lograrse a través de características de la nanoestructura, tales como ocupación del núcleo, pueden cooperar de manera única para ofrecer una eficacia terapéutica potencial significativa como alternativa a la quimioterapia para cánceres como el linfoma de células B, el linfoma no Hodgkin, el melanoma u otros. De manera más general, las estructuras y métodos descritos en el presente documento pueden ser aplicables a través de un continuo de células que son sensibles al flujo de

colesterol como medio de supervivencia, y también en células en las que la acumulación de colesterol es patológica.

Por consiguiente, en un conjunto de realizaciones, se proporcionan métodos para tratar cáncer en un sujeto. En una realización, un método puede implicar administrar al sujeto una composición que controla la entrada y salida de colesterol en células cancerosas del sujeto para tratar el cáncer. En algunos casos, el cáncer es identificado por células que requieren el mantenimiento de colesterol para sobrevivir. En una realización, se proporciona un método para tratar cáncer, en el que el cáncer se define mediante células cancerosas que expresan SR-B1. En una realización, se proporciona un método para destruir células cancerosas que tienen SR-B1. El método puede implicar poner en contacto las células cancerosas que tienen SR-B1 con una nanoestructura sintética en una cantidad eficaz para destruir las células cancerosas. En otras realizaciones, se proporciona un método para reducir la proliferación o viabilidad de las células cancerosas. El cáncer puede definirse, en algunas realizaciones, por determinadas células cancerosas que expresan SR-B1. Los ejemplos no limitativos de tales células incluyen células Ramos, células SUDHL4, células LY3, células de melanoma (por ejemplo, líneas celulares A375 y/o C8161) y células de linfoma de células B.

En determinadas realizaciones, las células cancerosas que van a tratarse expresan los receptores ABCA1 y/o ABCG1. En una realización, se proporciona un método para destruir células de linfoma de células B. El método puede implicar poner en contacto las células de linfoma de células B con una nanoestructura sintética en una cantidad eficaz para destruir las células de linfoma de células B. En una realización, se proporciona un método para tratar linfoma no Hodgkin en un sujeto. El método puede implicar administrar al sujeto una nanoestructura sintética en una cantidad eficaz para tratar el linfoma no Hodgkin. En otras realizaciones, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden usarse para tratar leucemia, linfoma y/o melanoma. En determinadas realizaciones, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden usarse para tratar enfermedades o afecciones que implican el proceso de acumulación de colesterol patológica, especialmente enfermedades o afecciones identificadas por células que tienen receptores en los que la expresión celular de los receptores están acoplados de manera natural por HDL y/o las nanoestructuras descritas en el presente documento. Otros cánceres o afecciones también pueden beneficiarse de los aspectos de la invención.

De manera sorprendente, las nanoestructuras descritas en el presente documento, que pueden diseñarse para imitar el tamaño, forma, composición química de la superficie y/o propiedades de unión a colesterol de HDL esférica madura y natural, mostraron que destruían células cancerosas que expresan SR-B1, incluyendo células de linfoma de células B y/o células de pacientes que tienen linfoma no Hodgkin. Aunque se pensaba que las nanoestructuras podían usarse para secuestrar colesterol en células (similar a la función de HDL natural), fue inesperado que las nanoestructuras destruyeran las células, por ejemplo, por apoptosis, especialmente cuando las nanoestructuras no incorporaban ningún fármaco o agente quimioterápico para tratar específicamente las células cancerosas. Esto es especialmente el caso dado que HDL natural (cuya nanoestructura puede diseñarse para imitar) no tiene efecto de destrucción en líneas celulares que expresan SR-B1, y que HDL natural conduce en realidad a un aumento en la proliferación de células que expresan este receptor. Fue inesperado que las nanoestructuras descritas en el presente documento tuvieran un efecto tan drástico y contrario de no sólo controlar el crecimiento de células cancerosas reduciendo la proliferación de células que expresan SR-B1 (incluyendo células de linfoma de células B y/o células de pacientes que tienen linfoma no Hodgkin), sino también destruyendo las células. También fue inesperado que la muerte celular se lograra por apoptosis, ya que ha varios mecanismos posibles para la muerte celular, incluyendo autofagia y necrosis/lisis celular.

Hay aproximadamente 70.000 casos nuevos de linfoma no Hodgkin (LNH) cada año, y el 90% son linfomas de células B. Estos provocan una estimación de 19.320 muertes al año. El tratamiento actual, aunque más eficaz ahora que en el pasado, incluye quimioterapia, radiación, inhibidores de moléculas pequeñas de rutas de señalización e inmunoterapia; sin embargo, se desarrolla resistencia y da como resultado progresión de la enfermedad y muerte. Por tanto, se necesitan estrategias de tratamiento nuevas y más eficaces. La evidencia reciente reunida en linfoblastos y mieloblastos de pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia mieloide aguda (LMA) demuestra una captación potenciada de colesterol a través de portadores de lipoproteínas de alta densidad, lo que puede dar como resultado una proliferación celular aumentada. Además, la esterificación potenciada del colesterol dentro de las líneas celulares de leucemia y linfoma se correlaciona con una proliferación celular aumentada y se demostró que la inhibición de moléculas pequeñas de la formación de éster de colesterol inhibe el crecimiento celular. En conjunto, estos datos sugieren que el colesterol y sus metabolitos son importantes para la supervivencia y la proliferación de LNH de células B.

Las lipoproteínas de alta densidad son nanopartículas naturales dinámicas que son importantes debido a la correlación inversa que existe entre niveles de HDL en circulación y el desarrollo de enfermedad cardiovascular. Uno de los mecanismos ateroprotectores más importantes de las HDL se cree que es el transporte de colesterol inverso (RCT). El RCT es un proceso complejo de salida de colesterol de macrófagos cargados de lípidos encontrado en el desarrollo de ateromas en partículas de HDL, transporte de colesterol en la circulación periférica, y suministro de colesterol al hígado para la excreción en las heces. Durante el proceso de RCT, la captación de colesterol madura química y estructuralmente las HDL maduras desde formas discoidales nacientes iniciales hasta formas esféricas más maduras. La esterificación de colesterol unido a la superficie de HDL mediante la acción de la enzima lecitina colesterol acil transferasa (LCAT) conduce ésteres colesterílicos formados al núcleo de HDL y mantiene un gradiente

para la captación de colesterol libre en la superficie de partículas de HDL en maduración. A nivel celular, las partículas de HDL acoplan receptores sobre la superficie de macrófagos para eliminar el colesterol libre. Los transportadores del casete de unión a ATP, A1 y G1 (ABCA1 y ABCG1) median la salida de colesterol de células a HDL esféricas y nacientes. ABCA1 emite principalmente colesterol a HDL nacientes, y las HDL esféricas más maduras seleccionan como diana ABCG1 para la salida de colesterol. SR-B1 es un receptor de HDL de alta afinidad que media el transporte celular de colesterol mediante HDL esféricas y maduras. SR-B1 es único en que puede acoplar especies de HDL maduras en la membrana celular y mediar la salida de colesterol, pero también es responsable de captar partículas de HDL y mediar el proceso de entrada de colesterol celular. La entrada de colesterol celular se entiende mejor en el contexto de hepatocitos ya que captan HDL esféricas y maduras por medio de SR-B1 como última etapa en RCT.

Recientemente, se desarrollaron nanoestructuras que incluyen un constructo de nanopartículas biomiméticas con el tamaño, la forma, la composición química superficial y las propiedades de unión a colesterol de HDL esférica madura y natural, tal como se describe en la publicación de patente internacional n.º WO/2009/131704, presentada el 24 de abril de 2009 y titulada, "Nanostructures Suitable for Sequestering Cholesterol and Other Molecules" y el documento WO2011/091065 A2. Las HDL biomiméticas pueden sintetizarse usando, por ejemplo, nanopartícula de oro de 5 nm de diámetro (AuNP) como molde restrictivo del tamaño y la forma para ensamblar los componentes químicos de superficie de HDL naturales, incluyendo fosfolípidos y la apolipoproteína que define HDL A-I (APOA-I). Aunque la publicación de patente internacional n.º WO/2009/131704 describe el uso de nanoestructuras para tratar cánceres generalmente, se pensó que las nanoestructuras podían usarse para tratar cáncer incluyendo fármacos contra el cáncer u otros componentes que se sabe que son eficaces para destruir células cancerosas. En otras palabras, se pensó que las nanoestructuras se usarían como portadores de fármacos para tratar cáncer. Fue inesperado que las nanoestructuras, tales como las descritas en el presente documento, pudieran usarse solas sin la incorporación de ningún fármaco, para tratar cáncer y destruir células cancerosas.

También fue inesperado que las nanoestructuras descritas en el presente documento pudieran usarse para controlar el metabolismo del colesterol en células limitando salida y/o entrada de colesterol. Tal como se describe en el presente documento, en algunas realizaciones, las nanoestructuras pueden usarse para aumentar la salida de colesterol fuera de células cancerosas. Por ejemplo, las nanoestructuras, que pueden incluir una cubierta lipófila y opcionalmente Apo-A1, pueden usarse para secuestrar colesterol de la célula de modo que hay una salida de colesterol fuera de la célula. En algunos casos, la salida de colesterol fuera de la célula como resultado de las nanoestructuras es mayor que (o al menos igual a) la posible salida con HDL natural. Además, en algunas realizaciones, las nanoestructuras pueden usarse para reducir la entrada de colesterol en las células cancerosas. Sin desear limitarse a la teoría, se cree que las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden usarse para evitar que HDL natural se una a las células cancerosas. Por ejemplo, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden competir directamente con HDL natural por la unión con ligandos/receptores de la superficie celular similares. Tal como se indica en el presente documento, sin embargo, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden reducir la proliferación y/o destruir células cancerosas, mientras que HDL natural puede no tener un efecto de este tipo.

Se usa natural HDL para proporcionar colesterol a células cancerosas, por ejemplo, a través de SR-B1. Esto es posible en HDL natural debido a la presencia de colesterol esterificado en el núcleo de las partículas. Puesto que, en algunas realizaciones, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden incluir un núcleo que no incluye colesterol esterificado (por ejemplo, un núcleo sólido que está formado por, por ejemplo, un material sintético), la fuente de colesterol que va a administrarse a las células cancerosas puede retirarse. Muchos tipos de cánceres dependen de la captación de HDL para el suministro de colesterol para, presuntamente, mantener la integridad de la membrana celular y para la proliferación celular. Puesto que las células pueden requerir suficientes cantidades de colesterol para sobrevivir, el tratamiento de células con las nanoestructuras descritas en el presente documento puede destruir las células, al menos en parte, disminuyendo la cantidad de entrada de colesterol en las células. Por consiguiente, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden usarse para alterar el metabolismo del colesterol en células cancerosas, por ejemplo, de modo que la integridad de la membrana celular ya no puede mantenerse para la proliferación celular.

Poco se conoce sobre las rutas moleculares del metabolismo del colesterol en células cancerosas tales como células de linfoma, incluyendo la presencia de receptores moleculares para HDL. Un aspecto de la invención implica el descubrimiento de que ABCA1 y ABCG1 se expresan a niveles relativamente bajos y constantes, mientras que SR-B1 se expresa altamente en múltiples líneas celulares de linfoma de células B, y el uso de las nanoestructuras sintéticas descritas en el presente documento para unirse a uno o más de estos receptores.

En un aspecto, se proporcionan métodos para tratar células de linfoma usando nanoestructuras sintéticas. Las células de linfoma pueden ser, por ejemplo, células de linfoma no Hodgkin y/o células de linfoma de células B. En algunas realizaciones, las células de linfoma pueden ser células de linfoma de Burkitt. Por ejemplo, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden inhibir una infección de virus de Epstein Barr (EBV) de linfoma de Burkitt. En algunas realizaciones, el linfoma se caracteriza por células que expresan SR-B1. En determinadas realizaciones, el linfoma se caracteriza por células que expresan ABCA1 y/o ABCG1. En determinadas realizaciones, el linfoma se caracteriza por células que tienen expresión aumentada de SR-B1, ABCA1 y/o ABCG1.

Pueden usarse receptores SR-B1, ABCA1 y/o ABCG1 para unirse a las nanoestructuras sintéticas descritas en el presente documento.

5 En determinadas realizaciones, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden alterar la fluidez de la membrana (por ejemplo, de una balsa lipídica de la membrana celular). Las nanoestructuras pueden incluir en las rutas moleculares posteriores ancladas en las balsas lipídicas.

10 En determinadas realizaciones, las nanoestructuras descritas pueden reducir el volumen, tamaño o crecimiento tumoral (por ejemplo, en al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, o al menos el 90%) en comparación con la ausencia de tratamiento usando las nanoestructuras descritas en el presente documento.

15 En general, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden tener diferentes mecanismos para tratar cáncer y/o destruir células cancerosas, incluyendo dos o más mecanismos diferentes que pueden producirse simultáneamente, y debe apreciarse que aunque se han proporcionado diferentes teorías para estos mecanismos, la invención no está limitada en este respecto. En algunas realizaciones, las nanoestructuras pueden controlar el crecimiento de células cancerosas y/o destruir las células cancerosas. En algunos casos, las células cancerosas pueden ser destruidas por apoptosis o por otros mecanismos. En determinadas realizaciones, las nanoestructuras pueden controlar el metabolismo del colesterol en las células (por ejemplo, salida de colesterol y/o entrada de colesterol). En algunos casos, las nanoestructuras pueden modular la unión de SR-B1 en células. Por ejemplo, en algunas realizaciones las nanoestructuras pueden inhibir sustancialmente SR-B1 (por ejemplo, de modo que no está disponible para la unión con HDL natural). Una combinación de uno o más de tales mecanismos es posible. Debe apreciarse que otros mecanismos también son posibles.

25 En determinadas realizaciones, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden unirse con y/o competir por la unión con las mismas o ligandos/receptores de la superficie celular similares a lipoproteínas naturales. Aunque las lipoproteínas naturales tales como HDL (por ejemplo, hHDL) se describen predominantemente en el presente documento, otras lipoproteínas naturales con las que las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden unirse y/o con las que pueden competir, tales como lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de baja densidad acetilada (Ac-LDL), lipoproteína de densidad intermedia (IDL) y lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), también son posibles. En algunas realizaciones, las nanoestructuras descritas en el presente documento imitan las lipoproteínas naturales tales como LDL o VLDL. Es decir, el tamaño, la química de superficie y otras características de las nanoestructuras pueden diseñarse para ser similares al tamaño, la química de superficie y otras características de la lipoproteína natural.

35 Un método de diagnóstico, prevención, tratamiento o gestión de una enfermedad o afección corporal puede implicar, por ejemplo, administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una estructura sintética descrita en el presente documento que comprende un núcleo de nanoestructura y una cubierta que rodea y está unida al núcleo de nanoestructura, y permitir que la nanoestructura sintética se una con un ligando/receptor de la superficie celular que se une a una lipoproteína natural (por ejemplo, HDL, IDL, LDL o VLDL), y bloquear o reducir la cantidad de unión entre el ligando/receptor de la superficie celular y la lipoproteína natural (por ejemplo, en comparación a cuando la etapa de unión de la nanoestructura sintética no se realiza). El ligando/receptor de la superficie celular puede incluir, por ejemplo, SR-B1, ABCA1 y/o ABCG1. En algunas realizaciones, un método de este tipo puede conducir a alteración de flujo de colesterol celular (por ejemplo, aumentar o disminuir la entrada o salida de colesterol en una célula que comprende el receptor de la superficie celular). En determinadas realizaciones, la nanoestructura sintética puede secuestrar o intercambiar lípidos o proteínas (por ejemplo, una apolipoproteína) en una matriz biológica (por ejemplo, suero, sangre, plasma) con otras lipoproteínas naturales.

50 En determinadas realizaciones, un método implica administrar a una matriz biológica (por ejemplo, sangre, suero, plasma) una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una estructura sintética que comprende un núcleo de nanoestructura y una cubierta que rodea y está unida al núcleo de nanoestructura, y permitir que la nanoestructura sintética secuestre o intercambie lípidos o proteínas con otras lipoproteínas naturales en la matriz biológica. La nanoestructura sintética puede ser un imitador de la lipoproteína natural. En algunas realizaciones, el método implica unir la nanoestructura sintética a un receptor de la superficie celular que puede unirse con una lipoproteína natural. El ligando/receptor de la superficie celular puede incluir, por ejemplo, SR-B1, ABCA1 y/o ABCG1.

60 En un aspecto de la presente divulgación, se proporcionan artículos, composiciones, kits y métodos que se refieren a nanoestructuras, incluyendo aquellas que pueden usarse para tratar cánceres u otras enfermedades o afecciones. Determinadas realizaciones descritas en el presente documento incluyen estructuras que tienen una disposición de tipo cubierta de núcleo; por ejemplo, un núcleo de nanopartícula puede estar rodeado por una cubierta que incluye un material, tal como una bicapa lipídica, que puede interactuar con colesterol y/u otros lípidos. En algunas realizaciones, las estructuras, cuando se introducen en un sujeto, pueden usarse para destruir células cancerosas. En algunos casos, las nanoestructuras pueden usarse para controlar el metabolismo del colesterol en células tales como células cancerosas.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, un núcleo (por ejemplo, una nanopartícula de oro) puede usarse como armazón para moldear y dirigir la síntesis de estructuras de tamaño, forma y química de superficie bien definidas que son susceptibles a una amplia variedad de química de superficie adicional y capacidad de adaptación. Por ejemplo, puede llevarse a cabo una síntesis de lipoproteínas de tamaño específico de abajo a arriba usando un núcleo de nanoestructura para soportar una cubierta que incluye una bicapa lipídica y/u otros componentes adecuados. En algunas realizaciones, el núcleo de nanoestructura puede actuar para limitar y moldear el tamaño de estructuras formadas y/o puede usarse para controlar la entrada de colesterol en células. La cubierta puede usarse para secuestrar colesterol y/o controlar la salida de colesterol fuera de las células.

Determinados artículos y métodos descritos en el presente documento implican el uso de armazones de nanoestructura para la síntesis controlable de estructuras con un alto grado de reproducibilidad y con el potencial de escalación masiva. Las estructuras resultantes pueden ser estables en una variedad de disolventes, pueden tener altos tiempos de circulación *in vivo*, y pueden ser relativamente económicas de fabricar. Además, como los lípidos pueden modificarse fácilmente con sustancias químicas de unión comercialmente disponibles, las estructuras descritas en el presente documento son susceptibles a funcionalización adicional con posibles agentes farmacológicos y/o agentes de direccionamiento/reconocimiento tales como anticuerpos, moléculas pequeñas y proteínas. Se describen ventajas adicionales en más detalle a continuación.

Los ejemplos de nanoestructuras que pueden usarse en los métodos se describen en el presente documento ahora.

La realización ilustrativa de la figura 1A incluye una estructura 10 (por ejemplo, una estructura sintética o nanoestructura sintética) que tiene un núcleo 16 y una cubierta 20 que rodea al núcleo. En realizaciones en las que el núcleo es una nanoestructura, el núcleo incluye una superficie 24 a la que pueden unirse opcionalmente uno o más componentes. Por ejemplo, en algunos casos, el núcleo 16 es una nanoestructura rodeada por la cubierta 20, que incluye una superficie 28 interna y una superficie 32 externa. La cubierta puede estar formada, al menos en parte, por uno o más componentes 34, tal como una pluralidad de lípidos, que pueden asociarse opcionalmente entre sí y/o con la superficie 24 del núcleo. Por ejemplo, los componentes 34 pueden asociarse con el núcleo uniéndose de manera covalente al núcleo, adsorberse físicamente, adsorberse químicamente, o unirse al núcleo a través de interacciones iónicas, interacciones hidrófobas y/o hidrófilas, interacciones electrostáticas, interacciones de van der Waals, o combinaciones de las mismas. En una realización particular, el núcleo incluye una nanoestructura de oro y la cubierta se une al núcleo a través de un enlace oro-tiol.

Opcionalmente, los componentes 34 pueden reticularse entre sí. La reticulación de componentes de una cubierta puede, por ejemplo, permitir el control de transporte de especies a la cubierta, o entre un área exterior a la cubierta y un área interior de la cubierta. Por ejemplo, cantidades relativamente altas de reticulación pueden permitir que determinadas moléculas pequeñas, pero no grandes, pasen a o través de la cubierta, mientras que una reticulación relativamente baja o ninguna puede permitir que moléculas más grandes pasen a o través de la cubierta. Además, los componentes que forman la cubierta pueden estar en forma de una monocapa o una multicapa, lo que también puede facilitar o impedir el transporte o secuestro de moléculas. En una realización a modo de ejemplo, la cubierta 20 incluye una bicapa lipídica que está dispuesta para secuestrar colesterol y/o controlar la salida de colesterol fuera de las células, tal como se describe en el presente documento.

Debe entenderse que una cubierta que rodea un núcleo no necesariamente rodea completamente el núcleo, aunque tales realizaciones pueden ser posibles. Por ejemplo, la cubierta puede rodear al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 99% del área superficial de un núcleo. En algunos casos, la cubierta rodea sustancialmente un núcleo. En otros casos, la cubierta rodea completamente un núcleo. Los componentes de la cubierta pueden distribuirse uniformemente a través de una superficie del núcleo en algunos casos, y de manera no uniforme en otros casos. Por ejemplo, la cubierta puede incluir porciones (por ejemplo, agujeros) que no incluyen ningún material en algunos casos. Si se desea, la cubierta puede diseñarse para permitir la penetración y/o el transporte de determinadas moléculas y componentes dentro o fuera de la cubierta, pero puede evitar la penetración y/o el transporte de otras moléculas y componentes dentro o fuera de la cubierta. La capacidad de determinadas moléculas de penetrar y/o transportarse en y/o a través de una cubierta puede depender, por ejemplo, de la densidad de empaquetamiento de los componentes que forman la cubierta y las propiedades químicas y físicas de los componentes que forman la cubierta. Tal como se describe en el presente documento, la cubierta también puede incluir una capa de material, o múltiples capas de materiales en algunas realizaciones.

La estructura 10 (por ejemplo, una estructura sintética o nanoestructura sintética) también puede incluir uno o más componentes 36 tales como proteínas, ácidos nucleicos y agentes bioactivos que pueden impartir opcionalmente especificidad a la estructura. Pueden asociarse uno o más componentes 36 con el núcleo, la cubierta, o ambos; por ejemplo, pueden asociarse con la superficie 24 del núcleo, superficie 28 interna de la cubierta, superficie 32 exterior de la cubierta y/o incrustarse en la cubierta. Por ejemplo, uno o más componentes 36 pueden asociarse con el núcleo, la cubierta, o ambos a través de enlaces covalentes, adsorción física, adsorción química, o unirse a través de interacciones iónicas, interacciones hidrófobas y/o hidrófilas, interacciones electrostáticas, interacciones de van der Waals, o combinaciones de las mismas. En una realización particular, la cubierta 20 está en forma de una estructura o ensamblaje de lipoproteínas que incluye tanto proteínas como lípidos que se unen de manera covalente

o no covalente entre sí. Por ejemplo, la cubierta puede estar en forma de un ensamblaje de apolipoproteínas que sirve como cofactor enzimático, ligando de receptor y/o portador de transferencia de lípidos que regula la captación de lípidos. Tal como se describe en el presente documento, los componentes de estructura 10 pueden escogerse de modo que la superficie de la estructura imita la composición de superficie general de HDL, LDL u otras estructuras.

5 Debe entenderse que componentes y configuraciones distintos de los descritos en el presente documento pueden ser adecuados para determinadas estructuras y composiciones, y que no todos los componentes mostrados en la figura 1A están presentes necesariamente en algunas realizaciones.

10 La estructura 10 puede estar fabricada por cualquier método adecuado. Por ejemplo, en algunas realizaciones y tal como se muestra a modo ilustrativo en la figura 1B, la síntesis de una estructura (por ejemplo, una HDL-NP) puede iniciarse añadiendo apolipoproteína A-I a una disolución de coloidal AuNP (5 nm de diámetro). A continuación, pueden añadirse uno, dos o más tipos de fosfolípidos a la mezcla. Uno de los fosfolípidos puede incluir, por ejemplo, un grupo de cabeza disulfuro que se une con alta afinidad a la superficie del núcleo de la nanopartícula (por ejemplo, oro). También pueden usarse otras químicas de superficie. Un segundo fosfolípido puede ser uno que se asocia de manera natural con HDL y puede formar la capa externa de estrato de fosfolípido. Se describen métodos de fabricación y otros detalles en la patente estadounidense n.º 8.323.686, presentada el 24 de abril de 2009 y expedida el 4 de diciembre de 2012.

20 En algunos casos, el núcleo 16 es hueco y, por tanto, no incluye un núcleo de nanoestructura. Por tanto, en algunas de estas y otras realizaciones, la estructura 10 incluye una cubierta que puede permitir opcionalmente que pasen componentes (por ejemplo, agentes bioactivos, colesterol) hasta y desde el núcleo 16 y un entorno 40 fuera de la cubierta. En contraste con determinadas estructuras huecas existentes (por ejemplo, liposomas) que tienen normalmente la mayor dimensión de sección transversal de más de aproximadamente 100 nm debido al impedimento estérico de los componentes que forman la cubierta, las estructuras 10 que tienen un núcleo hueco (por ejemplo, un núcleo parcial o totalmente hueco) puede ser muy pequeñas, por ejemplo, teniendo la mayor dimensión de sección transversal de menos de aproximadamente 100 nm, o incluso menos de aproximadamente 50 nm. Por ejemplo, los liposomas que incluyen una bicapa lipídica que comprende fosfolípidos son difíciles de fabricar, teniendo un tamaño de menos de 100 nm puesto que los fosfolípidos se vuelven limitados estéricamente, haciendo por tanto difícil o imposible formar estructuras huecas de bicapa con pequeños radios de curvatura. Usando los métodos descritos en el presente documento, sin embargo, pueden formarse tales y otras estructuras que tienen pequeños radios de curvatura, tal como se proporciona en el presente documento.

35 En un conjunto de realizaciones, la estructura 10, ya incluya un núcleo de nanoestructura o un núcleo hueco, se construye y dispone para secuestrar, transportar o intercambiar determinadas moléculas a y/o de un sujeto o una muestra biológica. Por ejemplo, la estructura 10, cuando se introduce en un sujeto, puede interactuar con uno o más componentes en el sujeto tales como células, tejidos, órganos, partículas, fluidos (por ejemplo, sangre), y porciones de los mismos. La interacción puede tener lugar, al menos en parte, a través de la cubierta de estructura 10, y puede implicar, por ejemplo, el intercambio de materiales (por ejemplo, proteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, nutrientes) del uno o más componentes del sujeto a la estructura 10, y/o de la estructura 10 al uno o más componentes del sujeto. En algunas de tales realizaciones, la cubierta de estructura 10 puede diseñarse para incluir componentes con propiedades que permiten una interacción favorable (por ejemplo, unión, adsorción, transporte) con el uno o más materiales del sujeto. Por ejemplo, la cubierta puede incluir componentes que tienen una determinada hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga superficial, grupo funcional, especificidad para la unión y/o densidad para facilitar interacciones particulares, tal como se describe en más detalle a continuación. En determinadas realizaciones, uno o más materiales de un sujeto están secuestrados por la estructura 10, y la estructura 10 facilita la excreción, la degradación y/o el transporte del material. La excreción, degradación y/o transporte del material puede conducir a determinados efectos beneficiosos y/o terapéuticos. Como tales, las estructuras descritas en el presente documento pueden usarse para el diagnóstico, la prevención, el tratamiento o la gestión de determinadas enfermedades o afecciones corporales.

50 En determinadas realizaciones en las que el núcleo 16 no es hueco, el núcleo puede comprender o estar formado por un material que es tóxico para las células. En algunas realizaciones, el material tóxico puede liberarse del núcleo. En otras realizaciones, el material tóxico no se libera del núcleo. Por ejemplo, el contacto entre un componente de una célula y el material tóxico puede afectar a la proliferación de la célula.

60 En algunas realizaciones, la estructura 10, ya incluya un núcleo de nanoestructura o un núcleo hueco, se adapta para controlar el metabolismo del colesterol y células. Por ejemplo, el núcleo de nanoestructura o núcleo hueco puede usarse para limitar la cantidad de entrada de colesterol en las células. Esto puede realizarse, por ejemplo, formando nanoestructuras que no incluyen ningún colesterol, o suficientes cantidades de colesterol, en el núcleo para suministro en una célula. Para las células que requieren colesterol para la supervivencia (por ejemplo, para mantener la integridad de la membrana y/u otras funciones), limitar la cantidad de entrada de colesterol en las células puede destruir las células. Por tanto, tales nanoestructuras pueden usarse para el tratamiento de enfermedades o afecciones que implican o requieren reducir la proliferación o destrucción de células. En algunas realizaciones, las estructuras que pueden usarse para el tratamiento de enfermedades o afecciones que implican reducir la proliferación y/o inducir la destrucción de células pueden incluir proteínas (por ejemplo, una

apolipoproteína) sobre la superficie o incrustarse dentro de la cubierta de la estructura. En otras realizaciones, sin embargo, no es necesario que tales proteínas estén presentes en o dentro de la cubierta con el fin de que la estructura se use para el tratamiento de enfermedades o afecciones que implican reducir la proliferación y/o inducir la destrucción de células.

5 En un conjunto particular de realizaciones, la estructura 10, ya incluya un núcleo de nanoestructura o un núcleo hueco, se construye y dispone para secuestrar colesterol (y/u otros lípidos). Sin desear limitarse a la teoría, se cree que la estructura 10 secuestra colesterol a través de interacciones hidrófobas con una capa hidrófoba (por ejemplo, una bicapa lipídica) de la estructura. Por ejemplo, en algunos casos, el colesterol puede unirse a una superficie de la estructura (por ejemplo, a la superficie externa de la cubierta) a través de interacciones hidrófobas. En otros casos, el colesterol puede transportarse desde una superficie externa de la cubierta hasta una superficie interna de la cubierta y/o hasta el núcleo de la estructura. El colesterol también puede incrustarse en la cubierta, por ejemplo, entre dos capas de la cubierta. Opcionalmente, la estructura 10 puede incluir una o más apolipoproteínas (por ejemplo, apolipoproteína-A1), proteínas o péptidos, lo que puede facilitar el secuestro de colesterol. La estructura 10 también puede secuestrar colesterol retirando colesterol y fosfolípidos de una célula, o de otras especies de lipoproteínas en circulación. El colesterol secuestrado por la estructura 10 puede esterificarse enzimáticamente (por ejemplo, mediante lecitina:acil CoA transferasa (LCAT)) para formar un éster colesterílico que puede migrar hacia el centro de la estructura. En el caso de realizaciones de núcleo hueco, el éster colesterílico puede acumularse en la estructura hueca. En algunas realizaciones, estas y otras estructuras pueden usarse para controlar la salida de colesterol fuera de células.

Tal como se describe en el presente documento, las nanoestructuras pueden usarse para controlar el metabolismo del colesterol en las células. Por ejemplo, en algunos casos, las nanoestructuras pueden usarse para controlar uno o más de entrada de colesterol y salida de colesterol en células (por ejemplo, células cancerosas tales como las que tienen SR-B1, células de linfoma de células B, células de linfoma no Hodgkin, células de melanoma y/u otras). En algunas realizaciones, las nanoestructuras pueden usarse para aumentar la salida de colesterol fuera de las células, por ejemplo, en relación con partículas de HDL natural de tamaño, forma y/o química de superficie similares. La salida de colesterol puede aumentar en, por ejemplo, al menos el 1%, al menos el 3%, al menos el 5%, al menos el 7%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 60%, al menos el 80%, o al menos el 100% en algunas realizaciones. Otros intervalos también son posibles. En otros casos, las nanoestructuras pueden usarse para reducir la salida de colesterol fuera de las células. En otras realizaciones, las nanoestructuras pueden usarse para reducir la entrada de colesterol en las células, por ejemplo, en relación con partículas de HDL natural de tamaño, forma y/o química de superficie similares. La entrada de colesterol puede reducirse en, por ejemplo, al menos el 1%, al menos el 3%, al menos el 5%, al menos el 7%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 60%, al menos el 80%, o al menos el 100% en algunas realizaciones. Otros intervalos también son posibles. En otros casos, las nanoestructuras pueden usarse para aumentar la entrada de colesterol en las células. En algunas realizaciones, las nanoestructuras pueden usarse para controlar la salida y/o entrada de colesterol en cantidades suficientes para provocar que las células detengan significativamente la proliferación y/o para destruir las células.

40 En otras realizaciones, sin embargo, las nanoestructuras descritas en el presente documento no se construyen ni se disponen para secuestrar colesterol.

45 En determinadas realizaciones, las estructuras pueden experimentar endocitosis por una célula (por ejemplo, una célula cancerosa), ubicándose de ese modo dentro de la célula. En otras realizaciones, las estructuras permanecen fuera de una célula. También son posibles estructuras que están tanto dentro como fuera de la célula.

En algunas realizaciones, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden secuestrar colesterol de altas concentraciones de colesterol y transferirlo al hígado directa o indirectamente. Por ejemplo, el colesterol puede secuestrarse de áreas de altas concentraciones de colesterol mediante salida directa de colesterol en o sobre las estructuras descritas en el presente documento. En algunas de tales realizaciones, el colesterol que es secuestrado por las estructuras se transporta directamente al hígado mediante las estructuras. En otras realizaciones, otras especies de lipoproteínas en circulación (por ejemplo, LDL) pueden participar en el intercambio de colesterol. Por ejemplo, en algunos casos, se transfiere colesterol libre o colesterol esterificado desde otras lipoproteínas hasta las estructuras descritas en el presente documento. En otros casos, una vez el colesterol libre o colesterol esterificado es secuestrado por las estructuras descritas en el presente documento, el colesterol puede transferirse desde las estructuras hasta otras especies de lipoproteínas, que pueden en última instancia acabar en el hígado. Por tanto, en tales realizaciones, las estructuras descritas en el presente documento pueden alterar o aumentar el transporte de colesterol inverso indirectamente. Además, en el caso en el que el colesterol libre o colesterol esterificado se secuestra desde las estructuras descritas en el presente documento hasta otras especies de lipoproteínas, las estructuras pueden secuestrar adicionalmente colesterol de, por ejemplo, áreas de alto contenido en colesterol, lipoproteínas en circulación, u otros sitios fisiológicos de alta concentración de colesterol. Debe entenderse, sin embargo, que las estructuras descritas en el presente documento pueden retirar colesterol y/u otras moléculas mediante otras rutas, tales como a través de la orina, y la invención no está limitada en este respecto.

65 La cantidad de una molécula (por ejemplo, colesterol u otros lípidos) secuestrada por una estructura y/o una

composición descrita en el presente documento puede depender, por ejemplo, del tamaño de la estructura, la biología y la química de superficie de la partícula, así como del método de administración. Por ejemplo, si las estructuras circulan indefinidamente desde la periferia hacia el hígado y salen de nuevo, cada estructura necesita secuestrar relativamente pocas moléculas de colesterol para que la composición sea eficaz, ya que las estructuras se reciclan. Por otro lado, si se usa una composición, por ejemplo, como colesterol o resina de unión a sales biliares por vía oral, cada estructura puede secuestrar un mayor número de colesterol para aumentar la captación de colesterol. Además, si las estructuras son de un tamaño tal que se excretan rápidamente (por ejemplo, a través del hígado o la orina) después de secuestrar el colesterol, puede implementarse una alta captación de colesterol por estructura y/o infusión continua. Como tal, una estructura única descrita en el presente documento, que puede incorporarse en una composición farmacéutica u otra formulación, puede ser capaz de secuestrar cualquier número adecuado de un tipo particular de molécula (por ejemplo, lípidos tales como colesterol; esteroides tales como estrógeno, progesterona y testosterona; sales biliares, etc.) durante el uso, por ejemplo, al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 500, al menos 1.000, al menos 2.000, al menos 5.000 o al menos 10.000 moléculas, que pueden depender del tamaño (por ejemplo, área de superficie y/o volumen) de la estructura, la aplicación particular y el método de administración. En algunos casos, tales números de moléculas pueden unirse a la estructura en un caso particular.

En algunos casos, una estructura única tiene una constante de unión para colesterol, K_d , de, por ejemplo, menos de o igual a aproximadamente 100 μM , menos de o igual a aproximadamente 10 μM , menos de o igual a aproximadamente 1 μM , menos de o igual a aproximadamente 0,1 mM, menos de o igual a aproximadamente 10 nM, menos de o igual a aproximadamente 7 nM, menos de o igual a aproximadamente 5 nM, menos de o igual a aproximadamente 2 nM, menos de o igual a aproximadamente 1 nM, menos de o igual a aproximadamente 0,1 nM, menos de o igual a aproximadamente 10 pM, menos de o igual a aproximadamente 1 pM, menos de o igual a aproximadamente 0,1 pM, menos de o igual a aproximadamente 10 fM, o menos de o igual a aproximadamente 1 fM. A continuación se proporcionan en más detalle métodos para determinar la cantidad de colesterol secuestrada y constantes de unión.

En determinadas realizaciones, las moléculas que son secuestradas por las estructuras descritas en el presente documento provocan que la estructura crezca en tamaño (por ejemplo, área transversal, área de superficie y/o volumen), por ejemplo, dependiendo del número de moléculas secuestradas. Las moléculas pueden asociarse con una superficie de una estructura, incrustarse en una cubierta de una estructura, transportarse a un núcleo de la estructura, o combinaciones de los mismos, tal como se describe en el presente documento. Como tal, el tamaño de una estructura (por ejemplo, área transversal, área de superficie y/o volumen) puede aumentar en al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 50%, al menos el 70% o al menos el 100%, de un tiempo anterior al secuestro en comparación con un tiempo después de/durante el secuestro en algunas realizaciones.

Debe entenderse, sin embargo, que aunque muchas de las realizaciones en el presente documento se describen en el contexto de secuestrar colesterol u otros lípidos, la invención no está limitada como tal y las estructuras, composiciones, kits y métodos descritos en el presente documento pueden usarse para secuestrar otras moléculas y/o para prevenir, tratar o gestionar otras enfermedades o afecciones corporales.

El núcleo 16, ya sea un núcleo de nanoestructura o un núcleo hueco, puede tener cualquier forma y/o tamaño adecuado. Por ejemplo, el núcleo puede ser sustancialmente esférico, no esférico, ovalado, en forma de varilla, piramidal, similar a un cubo, en forma de disco, similar a un alambre o de forma irregular. El núcleo (por ejemplo, un núcleo de nanoestructura o un núcleo hueco) puede tener la dimensión de sección transversal más grande (o, a veces, la dimensión de sección transversal más pequeña) de, por ejemplo, menos de o igual a aproximadamente 500 nm, menos de o igual a aproximadamente 250 nm, menos de o igual a aproximadamente 100 nm, menos de o igual a aproximadamente 75 nm, menos de o igual a aproximadamente 50 nm, menos de o igual a aproximadamente 40 nm, menos de o igual a aproximadamente 35 nm, menos de o igual a aproximadamente 30 nm, menos de o igual a aproximadamente 25 nm, menos de o igual a aproximadamente 20 nm, menos de o igual a aproximadamente 15 nm, o menos de o igual a aproximadamente 5 nm. En algunos casos, el núcleo tiene una relación de aspecto mayor de aproximadamente 1:1, mayor de 3:1 o mayor de 5:1. Tal como se usa en el presente documento, "relación de aspecto" se refiere a la relación de una longitud con respecto a un ancho, donde la longitud y el ancho se miden perpendicularmente entre sí, y la longitud se refiere a la dimensión más larga medida linealmente.

En realizaciones en las que el núcleo 16 incluye un núcleo de nanoestructura, el núcleo de nanoestructura puede formarse de cualquier material adecuado. En algunas realizaciones, el núcleo está formado por un material sintético (por ejemplo, un material que no se produce de manera natural, o que está presente de manera natural en el cuerpo). En una realización, un núcleo de nanoestructura comprende o está formado por un material inorgánico. El material inorgánico puede incluir, por ejemplo, un metal (por ejemplo, Ag, Au, Pt, Fe, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, y otros metales de transición), un semiconductor (por ejemplo, silicio, compuestos y aleaciones de silicio, seleniuro de cadmio, sulfuro de cadmio, arseniuro de indio y fosfuro de indio) o un aislante (por ejemplo, cerámicas tales como óxido de silicio). El material inorgánico puede estar presente en el núcleo en cualquier cantidad adecuada, por ejemplo, al menos el 1% en peso, el 5% en peso, el 10% en peso, el 25% en peso, el 50% en peso, el 75% en peso, el 90% en peso o el 99% en peso. En una realización, el núcleo está formado por el 100% en peso de material

inorgánico. El núcleo de nanoestructura puede, en algunos casos, estar en forma de un punto cuántico, un nanotubo de carbono, un nanoalambre de carbono o una nanovarilla de carbono. En algunos casos, el núcleo de nanoestructura comprende, o está formado por, un material que no es de origen biológico. En algunas realizaciones, una nanoestructura incluye o puede estar formada por uno o más materiales orgánicos tales como un polímero sintético y/o un polímero natural. Los ejemplos de polímeros sintéticos incluyen polímeros no degradables tales como polimetacrilato y polímeros degradables tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico y copolímeros de los mismos. Los ejemplos de polímeros naturales incluyen ácido hialurónico, quitosano y colágeno.

La estructura 10, que puede incluir una cubierta 20 que rodea el núcleo 16, también puede tener cualquier forma y/o tamaño adecuado. Por ejemplo, una estructura puede tener una forma que es sustancialmente esférica, ovalada, en forma de varilla, piramidal, similar a un cubo, en forma de disco o en forma irregular. La mayor dimensión de sección transversal (o, a veces, la menor dimensión de sección transversal) de una estructura puede ser, por ejemplo, de menos de o igual a aproximadamente 500 nm, menos de o igual a aproximadamente 250 nm, menos de o igual a aproximadamente 100 nm, menos de o igual a aproximadamente 75 nm, menos de o igual a aproximadamente 50 nm, menos de o igual a aproximadamente 40 nm, menos de o igual a aproximadamente 35 nm, menos de o igual a aproximadamente 30 nm, menos de o igual a aproximadamente 25 nm, menos de o igual a aproximadamente 20 nm, menos de o igual a aproximadamente 15 nm, o menos de o igual a aproximadamente 5 nm. La estructura también puede tener una relación de aspecto sustancialmente similar a la relación de aspecto del núcleo.

Además, una cubierta de una estructura puede tener cualquier grosor adecuado. Por ejemplo, el grosor de una cubierta puede ser de al menos 10 ángstrom, al menos 0,1 nm, al menos 1 nm, al menos 2 nm, al menos 5 nm, al menos 7 nm, al menos 10 nm, al menos 15 nm, al menos 20 nm, al menos 30 nm, al menos 50 nm, al menos 100 nm, o al menos 200 nm (por ejemplo, desde la superficie interna hasta la superficie externa de la cubierta). En algunos casos, el grosor de una cubierta es de menos de 200 nm, menos de 100 nm, menos de 50 nm, menos de 30 nm, menos de 20 nm, menos de 15 nm, menos de 10 nm, menos de 7 nm, menos de 5 nm, menos de 3 nm, menos de 2 nm, o menos de 1 nm (por ejemplo, desde la superficie interna hasta la superficie externa de la cubierta). Tales grosores pueden determinarse antes de o después del secuestro de moléculas tal como se describe en el presente documento.

Los expertos habituales en la técnica están familiarizados con técnicas para determinar tamaños de estructuras y partículas. Los ejemplos de técnicas adecuadas incluyen dispersión dinámica de luz (DDL) (por ejemplo, usando un instrumento Zetasizer de Malvern), microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido, recuento de electrorresistencia y difracción láser. Otras técnicas adecuadas son conocidas para los expertos en la técnica. Aunque se conocen muchos métodos para determinar tamaños de nanoestructuras, los tamaños descritos en el presente documento (por ejemplo, grosores, dimensiones de sección transversal más grandes o más pequeñas) se refieren a los medidos por dispersión dinámica de luz.

La cubierta de una estructura descrita en el presente documento puede comprender cualquier material adecuado, tal como un material hidrófobo, un material hidrófilo y/o un material anfífilo. Aunque la cubierta puede incluir uno o más materiales inorgánicos tales como los enumerados anteriormente para el núcleo de nanoestructura, en muchas realizaciones la cubierta incluye un material orgánico tal como un lípido o determinados polímeros. Los componentes de la cubierta pueden escogerse, en algunas realizaciones, para facilitar el secuestro de colesterol u otras moléculas. Por ejemplo, el colesterol (u otras moléculas secuestradas) pueden unirse a o de otro modo asociarse con una superficie de la cubierta, o la cubierta puede incluir componentes que permiten que el colesterol se internalice mediante la estructura. El colesterol (u otras moléculas secuestradas) también puede incrustarse en una cubierta, dentro de una capa o entre dos capas formando la cubierta.

Los componentes de una cubierta pueden cargarse, por ejemplo, para impartir una carga sobre la superficie de la estructura, o no cargarse. En algunas realizaciones, la superficie de la cubierta puede tener un potencial zeta de más de o igual a aproximadamente -75 mV, de más de o igual a aproximadamente -60 mV, de más de o igual a aproximadamente -50 mV, de más de o igual a aproximadamente -40 mV, de más de o igual a aproximadamente -30 mV, de más de o igual a aproximadamente -20 mV, de más de o igual a aproximadamente -10 mV, de más de o igual a aproximadamente 0 mV, de más de o igual a aproximadamente 10 mV, de más de o igual a aproximadamente 20 mV, de más de o igual a aproximadamente 30 mV, de más de o igual a aproximadamente 40 mV, de más de o igual a aproximadamente 50 mV, de más de o igual a aproximadamente 60 mV, o de más de o igual a aproximadamente 75 mV. La superficie de la cubierta puede tener un potencial zeta de menos de o igual a aproximadamente 75 mV, menos de o igual a aproximadamente 60 mV, menos de o igual a aproximadamente 50 mV, menos de o igual a aproximadamente 40 mV, menos de o igual a aproximadamente 30 mV, menos de o igual a aproximadamente 20 mV, menos de o igual a aproximadamente 10 mV, menos de o igual a aproximadamente 0 mV, menos de o igual a aproximadamente -10 mV, menos de o igual a aproximadamente -20 mV, menos de o igual a aproximadamente -30 mV, menos de o igual a aproximadamente -40 mV, menos de o igual a aproximadamente -50 mV, menos de o igual a aproximadamente -60 mV, o menos de o igual a aproximadamente -75 mV. Otros intervalos también son posibles. También son posibles combinaciones de los intervalos a los que se hace referencia anteriormente (por ejemplo, más de o igual a aproximadamente -60 mV y menos de o igual a aproximadamente -20 mV). Tal como se describe en el presente documento, la carga de superficie de la cubierta puede adaptarse variando la química de superficie y los componentes de la cubierta.

En un conjunto de realizaciones, una estructura descrita en el presente documento o una porción de la misma, tal como una cubierta de una estructura, incluye uno o más lípidos naturales o sintéticos o análogos de lípidos (es decir, moléculas lipófilas). Uno o más lípidos y/o análogos de lípidos pueden formar una capa única o una capa múltiple (por ejemplo, una bicapa) de una estructura. En algunos casos en los que las capas múltiples se forman, los lípidos naturales o sintéticos o análogos de lípidos se encajan (por ejemplo, entre diferentes capas). Los ejemplos no limitativos de lípidos naturales o sintéticos o análogos de lípidos incluyen aceites grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos y policétidos (derivados de la condensación de subunidades de cetoacilo), y lípidos de esteroides y lípidos de prenoles (derivados de la condensación de subunidades de isopreno).

En un conjunto particular de realizaciones, una estructura descrita en el presente documento incluye uno o más fosfolípidos. El uno o más fosfolípidos pueden incluir, por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, lecitina, β , γ -dipalmitoil- α -lecitina, esfingomielina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, cloruro de N-(2,3-di(9-(Z)-octadeceniloxy))-prop-1-il-N,N,N-trimetilamonio, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, cefalina, cardiopina, cerebrósidos, dicetilfosfato, dioleoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilglicerol, dioleoilfosfatidilglicerol, palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina, di-estearoil-fosfatidilcolina, estearoil-palmitoil-fosfatidilcolina, di-palmitoil-fosfatidiletanolamina, di-estearoil-fosfatidiletanolamina, di-miristoil-fosfatidilserina, di-oleil-fosfatidilcolina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfotioetanol, y combinaciones de los mismos. En algunos casos, una cubierta (por ejemplo, una bicapa) de una estructura incluye 50-200 lípidos naturales o sintéticos o análogos de lípidos (por ejemplo, fosfolípidos). Por ejemplo, la cubierta puede incluir menos de aproximadamente 500, menos de aproximadamente 400, menos de aproximadamente 300, menos de aproximadamente 200, o menos de aproximadamente 100 lípidos naturales o sintéticos o análogos de lípidos (por ejemplo, fosfolípidos), por ejemplo, según el tamaño de la estructura.

También pueden usarse lípidos que no contienen fósforo tales como estearilamina, docecilamina, palmitato de acetilo y amidas de ácido graso. En otras realizaciones, pueden usarse otros lípidos tales como grasas, aceites, ceras, colesterol, esteroides, vitaminas solubles en grasa (por ejemplo, vitaminas A, D, E y K), glicéridos (por ejemplo, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos) para formar porciones de una estructura descrita en el presente documento.

Una porción de una estructura descrita en el presente documento tal como una cubierta o una superficie de una nanoestructura puede incluir opcionalmente uno o más grupos alquilo, por ejemplo, una especie que contiene alcano, alqueno o alquino, que imparte opcionalmente hidrofobicidad a la estructura. Un grupo "alquilo" se refiere a un grupo alifático saturado, que incluye un grupo alquilo de cadena lineal, grupo alquilo de cadena ramificada, grupo cicloalquilo (alíclico), grupo cicloalquilo sustituido con alquilo y grupo alquilo sustituido con cicloalquilo. El grupo alquilo puede tener diversos números de carbono, por ejemplo, entre C_2 y C_{40} , y en algunas realizaciones puede ser de más de C_5 , C_{10} , C_{15} , C_{20} , C_{25} , C_{30} o C_{35} . En algunas realizaciones, un alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada puede tener 30 o menos átomos de carbono en su estructura principal, y, en algunos casos, 20 o menos. En algunas realizaciones, un alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada puede tener 12 o menos átomos de carbono en su estructura principal (por ejemplo, C_1 - C_{12} para cadena lineal, C_3 - C_{12} para cadena ramificada), 6 o menos, o 4 o menos. Asimismo, los cicloalquilos pueden tener desde 3-10 átomos de carbono en su estructura de anillo, o 5, 6 ó 7 carbonos en la estructura de anillo. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, ciclobutilo, hexilo, ciclohexilo, y similares.

El grupo alquilo puede incluir cualquier grupo terminal adecuado, por ejemplo, un grupo tiol, un grupo amino (por ejemplo, una amina no sustituida o sustituida), un grupo amida, un grupo imina, un grupo carboxilo o un grupo sulfato, que puede, por ejemplo, permitir la unión de un ligando a un núcleo de nanoestructura directamente o por medio de un grupo de unión. Por ejemplo, cuando se usan metales inertes para formar un núcleo de nanoestructura, las especies de alquilo pueden incluir un grupo tiol para formar un enlace metal-tiol. En algunos casos, las especies de alquilo incluyen al menos un segundo grupo terminal. Por ejemplo, las especies pueden unirse a un resto hidrófilo tal como polietilenglicol. En otras realizaciones, el segundo grupo terminal puede ser un grupo reactivo que puede unirse de manera covalente a otro grupo funcional. En algunos casos, el segundo grupo terminal puede participar en una interacción ligando/receptor (por ejemplo, biotina/estreptavidina).

En algunas realizaciones, la cubierta incluye un polímero. Por ejemplo, puede usarse un polímero anfífilo. El polímero puede ser un copolímero de dibloque, copolímero de tribloque, etc., por ejemplo, cuando un bloque es un polímero hidrófobo y otro bloque es un polímero hidrófilo. Por ejemplo, el polímero puede ser un copolímero de un ácido α -hidroxilo (por ejemplo, ácido láctico) y polietilenglicol. En algunos casos, una cubierta incluye un polímero hidrófobo, tal como polímeros que pueden incluir determinados acrílicos, amidas e imidas, carbonatos, dienos, ésteres, éteres, fluorocarbonos, olefinas, estirenos, acetales de vinilo, cloruros de vinilideno y vinilo, ésteres vinílicos, vinil éteres y cetonas, y polímeros de vinilpiridina y vinilpirrolidona. En otros casos, una cubierta incluye un polímero hidrófilo, tal como polímeros que incluyen determinados acrílicos, aminas, éteres, estirenos, ácidos vinílicos y alcoholes vinílicos. El polímero puede estar cargado o no cargado. Tal como se indica en el presente documento, los componentes particulares de la cubierta pueden escogerse para impartir determinada funcionalidad a las estructuras.

5 Cuando una cubierta incluye un material anfífilo, el material puede disponerse de cualquier manera adecuada con respecto al núcleo de nanoestructura y/o entre sí. Por ejemplo, el material anfífilo puede incluir un grupo hidrófilo que señala hacia el núcleo y un grupo hidrófobo que se extiende lejos del núcleo, o, el material anfífilo puede incluir un grupo hidrófobo que señala hacia el núcleo y un grupo hidrófilo que se extiende lejos del núcleo. También pueden formarse bicapas de cada configuración.

10 Las estructuras descritas en el presente documento también pueden incluir una o más proteínas, polipéptidos y/o péptidos (por ejemplo, péptidos sintéticos, péptidos anfífilos). En un conjunto de realizaciones, las estructuras incluyen proteínas, polipéptidos y/o péptidos que pueden aumentar la velocidad de transferencia de colesterol o la capacidad de portar colesterol de las estructuras. Las una o más proteínas o péptidos pueden asociarse con el núcleo (por ejemplo, una superficie del núcleo o incrustarse en el núcleo), la cubierta (por ejemplo, una superficie interna y/o externa de la cubierta y/o incrustarse en la cubierta), o ambos. Las asociaciones pueden incluir interacciones covalentes o no covalentes (por ejemplo, interacciones hidrófobas y/o hidrófilas, interacciones electrostáticas, interacciones de van der Waals).

15 Un ejemplo de una proteína adecuada que puede asociarse con una estructura descrita en el presente documento es una apolipoproteína, tal como apolipoproteína A (por ejemplo, apo A-I, apo A-II, apo A-IV y apo A-V), apolipoproteína B (por ejemplo, apo B48 y apo B100), apolipoproteína C (por ejemplo, apo C-I, apo C-II, apo C-III y apo C-IV), y apolipoproteínas D, E, y H. Específicamente, apo A₁, apo A₂, y apo E promueven la transferencia de colesterol y ésteres colesterílicos al hígado para el metabolismo y puede ser útil incluirlos en estructuras descritas en el presente documento. Adicional o alternativamente, una estructura descrita en el presente documento puede incluir uno o más análogos peptídicos de una apolipoproteína, tal como uno descrito anteriormente. Una estructura puede incluir cualquier número adecuado de, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 10, apolipoproteínas o análogos de las mismas. En determinadas realizaciones, una estructura incluye 1-6 apolipoproteínas, similar a una partícula de HDL que se produce de manera natural. Por supuesto, también pueden incluirse otras proteínas (por ejemplo, no apolipoproteínas) en estructuras descritas en el presente documento.

20 Opcionalmente, también pueden asociarse una o más enzimas con una estructura descrita en el presente documento. Por ejemplo, la lecitina-colesterol aciltransferasa es una enzima que convierte colesterol libre en éster colesterílico (una forma más hidrófoba de colesterol). En lipoproteínas que se producen de manera natural (por ejemplo, HDL y LDL), el éster colesterílico se secuestra en el núcleo de la lipoproteína, y provoca que la lipoproteína cambie desde una forma de disco hasta una forma esférica. Por tanto, las estructuras descritas en el presente documento pueden incluir lecitina-colesterol aciltransferasa para imitar las estructuras de HDL y LDL. También pueden incluirse otras enzimas tales como proteína de transferencia de éster colesterílico (CETP) que transfiere colesterol esterificado de especies de HDL a LDL.

30 En algunas realizaciones, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden tener un efecto terapéutico en ausencia de cualquier agente bioactivo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las nanoestructuras o composiciones de las mismas usadas para tratar cáncer no incluyen ningún fármaco contra el cáncer (por ejemplo, agentes quimioterápicos), y pueden todavía ser eficaces para tratar células cancerosas (por ejemplo, destruir células cancerosas). Debe apreciarse, sin embargo, que las nanoestructuras y composiciones descritas en el presente documento no están limitadas como tal, y que en otros casos, uno o más agentes bioactivos pueden asociarse con una nanoestructura o una composición descrita en el presente documento. Si están presentes, el uno o más agentes bioactivos pueden liberarse opcionalmente de la estructura o composición (por ejemplo, liberación a largo plazo o a corto plazo). Los agentes bioactivos incluyen moléculas que afectan un sistema biológico e incluyen, por ejemplo proteínas, ácidos nucleicos, agentes terapéuticos, vitaminas y sus derivados, fracciones virales, lipopolisacáridos, fracciones bacterianas y hormonas. Otros agentes de interés pueden incluir agentes quimioterápicos, que se usan en el tratamiento y la gestión de pacientes con cáncer. Tales moléculas se caracterizan generalmente como agentes antiproliferativos, agentes citotóxicos y agentes inmunosupresores e incluyen moléculas tales como taxol, doxorubicina, daunorrubicina, alcaloides de la vinca, actinomicina y etopósido.

35 Otros ejemplos de agentes bioactivos incluyen fármacos cardiovasculares, fármacos respiratorios, fármacos simpatomiméticos, fármacos colinomiméticos, fármacos adrenérgicos o bloqueantes de neuronas adrenérgicas, analgésicos/antipiréticos, anestésicos, antiasmáticos, antibióticos, antidepresivos, antidiabéticos, antifúngicos, antihipertensivos, antiinflamatorios (por ejemplo, glucocorticoides tales como prednisona), especies de ácido nucleico (por ejemplo, especies antisentido y de ARNip contra mediadores inflamatorios), antineoplásicos, agentes ansiolíticos, agentes inmunosupresores, agentes inmunomoduladores, agentes antimigraña, sedantes/hipnóticos, agentes antianginales, antipsicóticos, agentes antimaníacos, antiarrítmicos, agentes antiartiríticos, agentes antigota, anticoagulantes, agentes trombolíticos, agentes antifibrinolíticos, agentes hemorreológicos, agentes antiplaquetarios, anticonvulsivos, antiparkinsonianos, antihistamínicos/antiprurito, agentes útiles para la regulación de calcio, antibacterianos, antivirales, antimicrobianos, antiinfecciosos, broncodilatadores, agentes hipoglucémicos, agentes hipolipidémicos, agentes útiles para la estimulación de eritropoyesis, agentes antiúlceras/antirreflujo, antináuseas/antieméticos y vitaminas solubles en aceite, agentes de colesterol (por ejemplo, estatinas tales como Lipitor, Zocor, que pueden reducir los niveles de colesterol), o combinaciones de los mismos.

65 En algunas realizaciones, se asocian uno o más ácidos nucleicos con una estructura descrita en el presente

documento. Un ácido nucleico incluye cualquier ácido desoxirribonucleico bicatenario o monocatenario (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) de longitud variable. Los ácidos nucleicos incluyen cadenas sentido y antisentido. Los análogos de ácido nucleico tales como análogos de fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos también se consideran ácidos nucleicos y pueden usarse. Los ácidos nucleicos también incluyen cromosomas y fragmentos cromosómicos.

5 Uno o más residuos de azúcar pueden asociarse opcionalmente con estructuras descritas en el presente documento.

10 En algunas realizaciones, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden dirigirse a sitios específicos (por ejemplo, células y/o tejidos específicos tales como células y/o tejidos cancerosos) en ausencia de uno o más ligandos o receptores específicos para un sitio o sitios diana particulares. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las nanoestructuras o composiciones de las mismas usadas para tratar cáncer no incluyen ningún receptor específico sobre la nanoestructura en sí, y todavía pueden ser eficaces para dirigirse a y/o tratar células cancerosas (por ejemplo, reduciendo la proliferación de y/o destruyendo células cancerosas). Las nanoestructuras pueden dirigirse específicamente a un sitio particular (por ejemplo, células cancerosas) debido a la construcción de la nanoestructura en sí, por ejemplo, el hecho de que la nanoestructura imita HDL natural en tamaño, forma y/o química de superficie. Debe apreciarse, sin embargo, que las nanoestructuras y composiciones descritas en el presente documento no están limitadas como tales, y que en otros casos, las nanoestructuras pueden incluir uno o más ligandos o receptores específicos para un sitio o sitios diana particulares. Por ejemplo, una estructura descrita en el presente documento puede incluir un ligando para un receptor (o un receptor para un ligando) que se expresa sobre la superficie de un sitio que va a seleccionarse como diana. Los ejemplos de componentes de superficie específicos incluyen anticuerpos (incluyendo derivados y fragmentos de anticuerpo), marcadores de superficie celular específicos, moléculas pequeñas (por ejemplo, folato) y aptámeros, es decir, un ácido nucleico capaz de unirse específicamente a una molécula diana específica, tal como un resto biológico (por ejemplo, aptámeros de ARN y aptámeros de ADN). Además, un componente de proteína de las estructuras descritas en el presente documento podría modificarse y usarse como molécula de direccionamiento, por ejemplo Apo E o Apo A₁. Las estructuras también pueden incluir determinados grupos (por ejemplo, grupos asialo) para seleccionar como diana moléculas específicas pequeñas.

30 En otras realizaciones, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden dirigirse a sitios específicos (por ejemplo, células y/o tejidos específicos tales como células y/o tejidos cancerosos) debido a la presencia de uno o más ligandos o receptores (por ejemplo, una apolipoproteína, tal como Apo-A1) específicos para un sitio o sitios diana particulares y debido a la construcción de la propia nanoestructura, por ejemplo, el hecho de que la nanoestructura imita HDL natural en tamaño, forma y/o química de superficie. En algunas de tales realizaciones, una nanoestructura equivalente que no incluye uno o más ligandos o receptores específicos para un sitio o sitios diana particulares puede ser algo eficaz para tratar células cancerosas (por ejemplo, puede reducir la proliferación de y/o destruir células cancerosas en un primer grado). Cuando el ligando de direccionamiento se añade a la nanoestructura, entonces la nanoestructura puede ser más eficaz para tratar células cancerosas, por ejemplo, puede reducir la proliferación de y/o destruir células cancerosas en un segundo grado mayor que el primer grado. En algunas realizaciones, el segundo grado puede ser de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 60%, o al menos el 80% mayor que el primer grado.

45 En otras realizaciones, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden incluir únicamente un solo tipo de ligando o receptor (por ejemplo, una apolipoproteína, tal como Apo-A1) que es específico para un sitio o sitios diana particulares y no ningún otro tipo de ligando o receptor específico para un sitio o sitios diana particulares a los que la nanoestructura va a administrarse y seleccionarse como diana.

50 En algunas realizaciones, las nanoestructuras descritas en el presente documento no seleccionan como diana células cancerosas específicamente, sino que también pueden dirigirse a células no cancerosas hasta cierto punto. En algunas realizaciones, las nanoestructuras pueden usarse para destruir células cancerosas, o disminuir de otro modo la proliferación de células cancerosas, sin tener efectos perjudiciales sustanciales hacia células no cancerosas (por ejemplo, linfocitos humanos normales/periféricos y/o células del endotelio o hígado que seleccionan como diana de manera natural HDL y median el flujo de colesterol). En algunas realizaciones, las nanoestructuras descritas en el presente documento no tienen efectos perjudiciales sustanciales hacia células que no expresan SR-B1. En otras realizaciones, las nanoestructuras descritas en el presente documento no tienen efectos perjudiciales sustanciales hacia células que expresan SR-B1 pero no son cancerosas (por ejemplo, células del endotelio o hígado que seleccionan como diana de manera natural HDL y median el flujo de colesterol).

60 En un conjunto de realizaciones, las estructuras, composiciones y métodos descritos en el presente documento se usan para diagnosticar, prevenir, tratar o gestionar enfermedades o afecciones corporales asociadas con niveles de lípidos anómalos. Por ejemplo, la lipoproteína de alta densidad es una nanoestructura sérica dinámica protectora contra el desarrollo de aterosclerosis y resultante en enfermedades tales como cardiopatía y accidente cerebrovascular. Al administrar determinadas composiciones y métodos descritos en el presente documento, tales como aquellos que incluyen estructuras que imitan HDL que se produce de manera natural, pueden aumentarse los niveles de HDL séricos en circulación (por ejemplo, bajos niveles de HDL). Esto puede proporcionar un enfoque

terapéutico prometedor para, por ejemplo, prevenir y potencialmente revertir la aterosclerosis alterando o aumentando el transporte inverso de colesterol. En otras realizaciones, las estructuras descritas en el presente documento pueden usarse para competir directamente con HDL para ligandos de superficie celular similares a HDL.

- 5 En aún otras realizaciones, composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden usarse para disminuir los niveles de LDL (por ejemplo, disminuir altos niveles de LDL) o aumentar temporalmente los niveles de LDL, por ejemplo, usando una estructura que imita LDL que se produce de manera natural. Además, en determinadas realizaciones, el diagnóstico, la prevención, el tratamiento o la gestión de enfermedades o afecciones corporales asociadas con niveles de lípidos anómalos puede implicar usar las estructuras, composiciones y métodos descritos en el presente documento para alterar o aumentar el transporte de colesterol inverso (por ejemplo, directa o indirectamente) a modo de alterar el flujo de colesterol a través y fuera del cuerpo.

15 Otras enfermedades o afecciones corporales asociadas con niveles de lípidos anómalos que podrían beneficiarse de las estructuras y/o composiciones descritas en el presente documento incluyen, por ejemplo, aterosclerosis, flebosclerosis o cualquier afección venosa en la que se forman depósitos de placas que contienen colesterol u otro material dentro de la íntima o media interior de las venas, síndromes coronarios agudos, angina incluyendo, angina estable, angina inestable, inflamación, septicemia, inflamación vascular, inflamación dérmica, insuficiencia cardíaca congestiva, cardiopatía coronaria (CC), arritmias ventriculares, enfermedad vascular periférica, infarto de miocardio, comienzo de infarto de miocardio mortal, infarto de miocardio no mortal, isquemia, isquemia cardiovascular, ataques isquémicos transitorios, isquemia no relacionada con enfermedad cardiovascular, lesión por isquemia-reperusión, necesidad reducida de revascularización, trastornos de la coagulación, trombocitopenia, trombosis venosa profunda, pancreatitis, esteatohepatitis no alcohólica, neuropatía diabética, retinopatía, neuropatía diabética dolorosa, claudicación, psoriasis, isquemia de las extremidades crítica, impotencia, dislipidemia, hiperlipidemia, hiperlipoproteinemia, hipoalfalipoproteinemia, hipertrigliceridemia, cualquier afección estenótica que conduce a patología isquémica, obesidad, diabetes incluyendo tanto de tipo I como de tipo II, ictiosis, accidente cardiovascular, placas vulnerables, ulceración de las extremidades inferiores, isquemia coronaria grave, linfomas, cataratas, disfunción endotelial, xantomas, disfunción orgánica terminal, enfermedad vascular, enfermedad vascular que es el resultado del tabaquismo y la diabetes, enfermedad de las arterias carótida y coronaria, placas de regresión y encogimiento establecidas, placas inestables, íntima vascular que es débil, íntima vascular inestable, lesión endotelial, daño endotelial como resultado de procedimientos quirúrgicos, morbilidad asociada con enfermedad vascular, ulceraciones en la luz arterial, restenosis como resultado de angioplastia con balón, enfermedades del almacenamiento de proteínas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad priónica), enfermedades de hemostasis (por ejemplo, trombosis, trombofilia, coagulación intravascular diseminada, trombocitopenia, trombocitopenia inducida por heparina, púrpura trombocitopénica trombótica), enfermedades reumáticas (por ejemplo, esclerosis múltiple, lupus eritomatoso sistémico, síndrome de Sjogren, polimiositis/dermatomiositis, escleroderma), enfermedades neurológicas (por ejemplo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer), y subindicaciones de los mismos.

40 Las estructuras, composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden diagnosticar, prevenir, tratar o gestionar enfermedades o afecciones corporales asociadas con niveles de lípidos anómalos, por ejemplo, reducir los niveles de triglicéridos, aumentar o reducir el nivel de otros lípidos, aumentar la estabilidad de las placas o disminuir la probabilidad de rotura de placas, aumentar o reducir la vasodilatación, tratar o prevenir la inflamación, tratar o prevenir enfermedades inflamatorias o una respuesta inflamatoria, reforzar o estabilizar el músculo liso y la íntima vascular, estimular la salida de colesterol extracelular para el transporte al hígado, modular las respuestas inmunitarias, movilizar colesterol de placas ateroscleróticas, y modificar cualquier membrana, célula, tejido, órgano y estructura y/o región extracelular en los que serían ventajosas modificaciones de composición y/o funcionales. En determinadas realizaciones, las estructuras descritas en el presente documento para diagnosticar, prevenir, tratar o gestionar enfermedades o afecciones corporales asociadas con niveles de lípidos anómalos pueden usarse para competir directamente con lipoproteínas naturales para ligandos de superficie celular similares (por ejemplo, SR-B1, HBP/vigilina).

55 En algunas realizaciones, las estructuras descritas en el presente documento pueden usarse para diagnosticar, prevenir, tratar o gestionar una enfermedad o afección corporal alterando (por ejemplo, aumentando o disminuyendo) el flujo de colesterol celular (por ejemplo, salida y entrada). Un método para diagnosticar, prevenir, tratar o gestionar una enfermedad o afección corporal asociada con niveles de lípidos anómalos puede implicar, por ejemplo, administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una estructura sintética descrita en el presente documento que comprende un núcleo de nanoestructura y una cubierta que rodea y está unida al núcleo de nanoestructura, y alterar flujo de colesterol celular en el sujeto usando la estructura sintética. Tal como se describe en el presente documento, alterar el flujo de colesterol celular puede implicar la unión de la estructura, o un componente de la estructura, a uno o más receptores de la superficie celular que regulan el transporte de colesterol (por ejemplo, SR-B1, ABCA1 y/o ABCG1). La enfermedad o afección corporal asociada con niveles de lípidos anómalos puede incluir aquellos enumerados anteriormente, tales como inflamación, regulación del sistema inmunitario, etc.

65 Debe entenderse que los componentes descritos en el presente documento, tales como los lípidos, fosfolípidos, grupos alquilo, polímeros, proteínas, polipéptidos, péptidos, enzimas, agentes bioactivos, ácidos nucleicos y

especies de direccionamiento descritos anteriormente (que pueden ser opcionales), pueden asociarse con una estructura de cualquier manera adecuada y con cualquier porción adecuada de la estructura, por ejemplo, el núcleo, la cubierta, o ambos. Por ejemplo, uno o más de tales componentes pueden asociarse con una superficie de un núcleo, un interior de un núcleo, una superficie interna de una cubierta, una superficie externa de una cubierta, y/o incrustarse en una cubierta. Además, tales componentes pueden usarse, en algunas realizaciones, para facilitar el secuestro, intercambio y/o transporte de materiales (por ejemplo, proteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, nutrientes) de uno o más componentes de un sujeto (por ejemplo, células, tejidos, órganos, partículas, fluidos (por ejemplo, sangre), y porciones de los mismos) a una estructura descrita en el presente documento, y/o de la estructura al uno o más componentes del sujeto. En algunos casos, los componentes tienen propiedades químicas y/o físicas que permiten una interacción favorable (por ejemplo, unión, adsorción, transporte) con el uno o más materiales del sujeto.

Además, los componentes descritos en el presente documento, tales como los lípidos, fosfolípidos, grupos alquilo, polímeros, proteínas, polipéptidos, péptidos, enzimas, agentes bioactivos, ácidos nucleicos y especies de direccionamiento descritos anteriormente, pueden asociarse con una estructura descrita en el presente documento antes de la administración a un sujeto o muestra biológica y/o después de la administración a un sujeto o muestra biológica. Por ejemplo, en algunos casos una estructura descrita en el presente documento incluye un núcleo y una cubierta que se administra *in vivo* o *in vitro*, y la estructura tiene un mayor efecto terapéutico después de secuestrar uno o más componentes (por ejemplo, una apolipoproteína) de un sujeto o muestra biológica. Es decir, la estructura puede usar componentes naturales del sujeto o muestra biológica para aumentar la eficacia de la estructura después de que se haya administrado.

Puede usarse una variedad de métodos para fabricar las nanoestructuras descritas en el presente documento. Los ejemplos de métodos se proporcionan en publicación de patente internacional n.º WO/2009/131704, presentada el 24 de abril de 2009 y titulada, "Nanostructures Suitable for Sequestering Cholesterol and Other Molecules".

En algunas realizaciones, debido a que las estructuras descritas en el presente documento pueden formarse mediante el uso de nanoestructuras que sirven como molde (por ejemplo, un núcleo), y debido a que pueden proporcionarse determinadas nanoestructuras (por ejemplo, elaborarse o adquirirse) que tienen una uniformidad relativamente alta en tamaño, forma y masa, las estructuras descritas en el presente documento también pueden tener una uniformidad relativamente alta en tamaño, forma y masa. Es decir, puede formarse una mezcla de estructuras relativamente uniformes cuando la pluralidad de estructuras tiene una distribución de dimensiones de sección transversal tales que no más de aproximadamente el 20%, el 15%, el 10% o el 5% de las estructuras tienen una dimensión de sección transversal mayor de aproximadamente el 20%, el 15%, el 10% o el 5% de la dimensión de sección transversal promedio. Las estructuras que tienen uniformidad relativamente alta son útiles en determinadas composiciones descritas en el presente documento.

Además, las dispersiones de estructuras descritas en el presente documento son útiles en determinadas composiciones y métodos descritos en el presente documento.

En algunos casos, las estructuras pueden incluir o usarse como agentes de contraste. Por ejemplo, el núcleo de nanoestructura de la estructura puede comprender un material adecuado para su uso como agente de contraste (por ejemplo, oro, óxido de hierro, un punto cuántico, radionúclido, etc.). En otras realizaciones, la cubierta puede incluir un agente de contraste. Por ejemplo, una nanopartícula u otro agente de contraste adecuado puede incrustarse dentro de la bicapa lipídica de la cubierta, o asociarse con una superficie interna o externa de la cubierta. Los agentes de contraste pueden usarse para potenciar diversos métodos de obtención de imágenes conocidos por los expertos en la técnica tales como IRM, rayos X, PET, CT, etc.

En otras realizaciones, se introduce una composición en un sujeto o una muestra biológica, y las estructuras de la composición y/o el sujeto o muestra biológica se exponen a condiciones de ensayo que pueden determinar una enfermedad o afección del sujeto o muestra biológica. Al menos una porción de las estructuras puede extraerse del sujeto o muestra biológica y puede realizarse un ensayo con las estructuras extraídas. Las estructuras pueden someterse a ensayo para determinar la cantidad y/o el tipo de moléculas unidas a o de otro modo secuestradas por las estructuras. Por ejemplo, en un conjunto de realizaciones, se realiza un ensayo de competición, por ejemplo, cuando se añade colesterol marcado y se monitoriza el desplazamiento de colesterol. Cuanta más captación medida de colesterol marcado, menos colesterol no marcado unido libre está presente. Esto puede realizarse, por ejemplo, después de que una composición que comprende las estructuras descritas en el presente documento se administre a un sujeto o una muestra biológica, y las estructuras se extraen posteriormente del sujeto o muestra biológica. Este método puede usarse, por ejemplo, cuando las estructuras van a usarse como agente de diagnóstico para ver cuánto colesterol (no marcado) ha secuestrado en un sujeto o muestra biológica.

También pueden usarse otros métodos para determinar la cantidad de colesterol secuestrada por las estructuras descritas en el presente documento. En algunos casos, puede usarse colesterol marcado (por ejemplo, colesterol marcado de manera fluorescente tal como NBD-colesterol o colesterol radiactivo). Puede añadirse colesterol marcado a las estructuras o bien *in vitro* o bien *in vivo*. Al añadir estructuras sin colesterol marcado y medir el aumento de fluorescencia tras la unión, puede modularse la constante de unión de colesterol marcado a la

estructura. Además, para retirar el colesterol de la estructura, puede disolverse la partícula (por ejemplo, KCN) y luego medirse la fluorescencia resultante en disolución. Comparar con la curva de calibración puede permitir la determinación del número de moléculas de colesterol por partícula. También pueden usarse otros métodos tales como extracción orgánica y espectrometría de masas cuantitativa para calcular la cantidad de colesterol secuestrada por una o más estructuras descritas en el presente documento.

Tal como se describe en el presente documento, las estructuras de la invención pueden usarse en “composiciones farmacéuticas” o composiciones “farmacéuticamente aceptables”, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más de las estructuras descritas en el presente documento, formuladas junto con uno o más portadores, aditivos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden ser útiles para tratar cáncer u otras afecciones. En algunos casos, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse para destruir células cancerosas. Los ejemplos de cánceres y células cancerosas incluyen aquellos que tienen receptor eliminador de clase B tipo I (SR-B1), células de linfoma de células B, células de linfoma no Hodgkin, células de melanoma y/u otras. Debe entenderse que puede usarse cualquier estructura adecuada descrita en el presente documento en tales composiciones farmacéuticas, incluyendo las descritas en relación con las figuras. En algunos casos, las estructuras en una composición farmacéutica tienen un núcleo de nanoestructura que comprende un material inorgánico y una cubierta que rodea y está unida sustancialmente al núcleo de nanoestructura. En algunas realizaciones, las estructuras pueden adaptarse para controlar el metabolismo del colesterol en las células de interés, tal como entrada de colesterol en las células y salida fuera de las células.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse especialmente para administración en forma sólida o líquida, incluyendo aquellas adaptadas para lo siguiente: administración oral, por ejemplo, grandes cantidades de medicamentos líquidos (disoluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, por ejemplo, aquellos dirigidos para absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como , por ejemplo, suspensión o disolución estéril, o formulación de liberación sostenida; aplicación tópica, por ejemplo, como crema, pomada o parche de liberación controlada o aerosol aplicado a la piel, los pulmones o la cavidad oral; por vía intravaginal o por vía intrarrectal, por ejemplo, como óvulo vaginal, crema o espuma; por vía sublingual; por vía ocular; por vía transdérmica; o por vía nasal, por vía pulmonar y a otras superficies mucosas.

La expresión “farmacéuticamente aceptable” se emplea en el presente documento para referirse a aquellas estructuras, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico lógico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, compatible con una razón beneficio/riesgo razonable.

La expresión “portador farmacéuticamente aceptable” tal como se usa en el presente documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente o disolvente que encapsula material, implicado en portar o transportar el compuesto objeto desde un órgano o parte del cuerpo hasta otro órgano o parte del cuerpo. Cada portador debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación y no perjudiciales para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semillas de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes de tamponamiento, tales como hidróxido de magnesio y hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; disolución de Ringer; alcohol etílico; disoluciones de pH tamponado; poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y otras sustancias no tóxicas compatibles empleadas en formulaciones farmacéuticas.

También pueden estar presentes en las composiciones agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, saborizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y agentes quelantes de metal, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Las estructuras descritas en el presente documento pueden administrarse por vía oral, administrarse por vía parenteral, administrarse por vía subcutánea y/o administrarse por vía intravenosa. En determinadas realizaciones, una estructura o preparación farmacéutica se administra por vía oral. En otras realizaciones, la estructura o preparación farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las vías de administración alternativas incluyen

administraciones sublinguales, intramusculares y transdérmicas.

5 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen aquellas adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido por los expertos en la técnica de farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosificación variará según el huésped que esté tratándose, y el modo particular de administración. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosificación será generalmente la cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico. Generalmente, esta cantidad oscilará desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 99% de principio activo, desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 70%, o desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 30%.

15 Las composiciones de la invención adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base con sabor, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como disolución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como enjuagues bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de una estructura descrita en el presente documento como principio activo. Una estructura de la invención también puede administrarse como bolo, electuario o pasta.

25 En formas sólidas de dosificación de la invención para administración oral (cápsulas, comprimidos, pastillas, grageas, polvos, gránulos y similares), el principio activo se mezcla con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de lo siguiente: cargas o expansores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; humectantes, tales como glicerol; agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos, y carbonato de sodio; agentes de retardo de disolución, tales como parafina; aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol y tensioactivos no iónicos; absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, y mezclas de los mismos; y agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes de tamponamiento. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.

40 Un comprimido puede elaborarse mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes accesorios. Pueden prepararse comprimidos usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato de almidón de sodio o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), tensioactivo o agente dispersante. Pueden elaborarse comprimidos moldeados en una máquina adecuada en la que una mezcla de la estructura en polvo se hidrata con un diluyente líquido inerte.

45 Los comprimidos, y otras formas sólidas de dosificación de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden prepararse o marcarse con muescas opcionalmente con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. También pueden formularse para proporcionar liberación lenta o controlada del principio activo en la misma usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices de polímero, liposomas y/o microesferas. Pueden formularse para liberación rápida, por ejemplo, liofilizarse. Pueden esterilizarse mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro retenedor de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición que libera el/los principio(s) activo(s) sólo, o en una determinada porción del tubo gastrointestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones incrustantes que pueden usarse incluyen ceras y sustancias poliméricas. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

60 Las formas líquidas de dosificación para administración oral de las estructuras descritas en el presente documento incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, dispersiones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de las estructuras de la invención, las formas líquidas de dosificación pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semillas de algodón, cacahuete, maíz, germen de trigo, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol

tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos.

Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Pueden presentarse formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento (por ejemplo, para administración rectal o vaginal) como supositorio, que pueden prepararse mezclando uno o más compuestos de la invención con uno o más excipientes o portadores no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorio o un salicilato, y que son sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a la temperatura corporal y, por tanto, se fundirán en el cuerpo y liberarán las estructuras.

Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de una estructura descrita en el presente documento incluyen polvos, aerosoles, pomadas, pastas, espumas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches y medicamentos inhalatorios. El compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propelente que se requiera.

Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de las estructuras de la invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.

Los polvos y aerosoles pueden contener, además de las estructuras descritas en el presente documento, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden contener adicionalmente propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja adicional de proporcionar administración controlada de una estructura descrita en el presente documento al cuerpo. Disolver o dispersar la estructura en el medio apropiado puede hacer tales formas de dosificación. Los potenciadores de la absorción también pueden usarse para aumentar el flujo de la estructura a través de la piel. O bien proporcionar una membrana de control de la velocidad o bien dispersar la estructura en una matriz polimérica o gel puede controlar la velocidad de dicho flujo.

Las formulaciones oftálmicas, pomadas para ojos, polvos, disoluciones y similares, también se contemplan dentro del alcance de esta invención.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento adecuadas para administración parenteral comprenden una o más estructuras de la invención en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en disoluciones o dispersiones inyectables estériles antes del uso, que pueden contener azúcares, alcoholes, antioxidantes, tampones, bacteriostatos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados, que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos sobre las estructuras de la invención puede facilitarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los sistemas de administración adecuados para su uso con las estructuras y composiciones descritas en el presente documento incluyen sistemas de administración con liberación prolongada, liberación retardada, liberación sostenida o liberación controlada, tal como se describe en el presente documento. Tales sistemas pueden evitar administraciones repetidas de las estructuras en muchos casos, aumentando la conveniencia para el sujeto y el

médico. Muchos tipos de sistemas de administración de liberación están disponibles y se conocen por los expertos en la técnica. Incluyen, por ejemplo, sistemas basados en polímeros tales como ácido poliláctico y/o poliglicólico, polianhídridos y policaprolactona; sistemas no poliméricos basados en lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono, di y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera; comprimidos usando aglutinantes y excipientes convencionales; o implantes parcialmente fusionados. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, sistemas erosivos en los que la composición está contenida en una forma dentro de una matriz, o sistemas de difusión en los que un componente activo controla la velocidad de liberación. Las composiciones pueden ser, por ejemplo, microesferas, hidrogeles, depósitos poliméricos, matrices de colesterol o sistemas poliméricos. En algunas realizaciones, el sistema puede permitir la liberación sostenida o controlada del compuesto activo, por ejemplo, mediante el control de la velocidad de difusión o erosión/degradación de la formulación. Además, puede usarse un sistema de administración de hardware basado en bomba en algunas realizaciones. Las estructuras y composiciones descritas en el presente documento también pueden combinarse con (por ejemplo, estar contenidas en) dispositivos de administración tales como jeringas, almohadillas, parches, tubos, películas, dispositivos basados en MEMS y dispositivos implantables.

El uso de un implante de liberación a largo plazo puede ser particularmente adecuado en algunos casos. "Liberación a largo plazo", tal como se usa en el presente documento, significa que el implante está construido y dispuesto para administrar niveles terapéuticos de la composición durante al menos aproximadamente 30 o aproximadamente 45 días, durante al menos aproximadamente 60 o aproximadamente 90 días, o incluso más tiempo en algunos casos. Los implantes de liberación a largo plazo se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente.

Las formas de depósito inyectables pueden prepararse formando matrices microencapsuladas de las estructuras descritas en el presente documento en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la razón de estructura con respecto a polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación de la estructura. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos).

Cuando las estructuras descritas en el presente documento se administran como productos farmacéuticos, a humanos y animales, pueden administrarse *per se* o como composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 99,5%, de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 90%, o similares, de estructuras en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

La administración puede ser localizada (por ejemplo, en una región particular, sistema fisiológico, tejido, órgano o tipo de célula) o sistémica, dependiendo de la afección que va a tratarse. Por ejemplo, la composición puede administrarse mediante inyección parental, implante, por vía oral, por vía vaginal, por vía rectal, por vía bucal, por vía pulmonar, por vía tópica, por vía nasal, por vía transdérmica, administración quirúrgica, o cualquier otro método de administración en el que se logra el acceso a la diana mediante la composición. Los ejemplos de modalidades parentales que pueden usarse con la invención incluyen intravenosa, intradérmica, subcutánea, intracavitaria, intramuscular, intraperitoneal, epidural o intratecal. Los ejemplos de modalidades de implante incluyen cualquier sistema de administración de fármacos implantables o inyectables. La administración oral puede ser útil para algunos tratamientos debido a la conveniencia para el paciente, así como a la pauta de posología.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, las estructuras descritas en el presente documento, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la invención, se formulan para dar formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse en dosificaciones, por ejemplo, en la cantidad máxima evitando o minimizando cualquier efecto secundario potencialmente perjudicial. Las composiciones pueden administrarse en cantidades eficaces, solas o en combinación con otros compuestos. Por ejemplo, cuando se trata el cáncer, una composición puede incluir las estructuras descritas en el presente documento y un cóctel de otros compuestos que pueden usarse para tratar el cáncer. Cuando se tratan afecciones asociadas con niveles de lípidos anómalos, una composición puede incluir las estructuras descritas en el presente documento y otros compuestos que pueden usarse para reducir los niveles de lípidos (por ejemplo, agentes reductores de colesterol).

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el presente documento significa la cantidad de un material o composición que comprende una estructura de la invención que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado en un sujeto a una razón beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Por consiguiente, una cantidad terapéuticamente eficaz puede, por ejemplo, prevenir, minimizar o revertir la progresión de la enfermedad asociada con una enfermedad o afección corporal. La progresión de la enfermedad puede monitorizarse mediante observaciones clínicas, investigaciones de laboratorio y de imágenes evidentes para un experto en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad que es eficaz en una dosis única o una cantidad que es eficaz como parte de una terapia multidosis, por ejemplo, una cantidad que se administra en dos o más dosis o una cantidad que se administra crónicamente.

La cantidad eficaz de una cualquiera o más estructuras descritas en el presente documento puede ser desde aproximadamente 10 ng/kg de peso corporal hasta aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal, y la frecuencia de administración puede oscilar desde una vez al día hasta una vez al mes. Sin embargo, también pueden usarse otras frecuencias y cantidades de dosificación ya que la invención no está limitada a este respecto. Pueden administrarse a un sujeto una o más estructuras descritas en el presente documento en una cantidad eficaz para tratar una o más enfermedades o afecciones corporales descritas en el presente documento.

Una cantidad eficaz puede depender de la afección particular que va a tratarse. Un experto habitual en la técnica puede determinar lo que es una cantidad eficaz de la composición mediante, por ejemplo, métodos tales como valorar pruebas de la función hepática (por ejemplo transaminasas), pruebas de la función renal (por ejemplo creatinina), pruebas de la función cardíaca (por ejemplo troponina, CRP), pruebas de la función inmunitaria (por ejemplo citocinas como IL-1 y TNF-alfa), etc. Las cantidades eficaces dependerán, por supuesto, de factores tales como la gravedad de la afección que está tratándose; parámetros del paciente individual incluyendo edad, estado físico, tamaño y peso; tratamientos concurrentes; la frecuencia de tratamiento; o el modo de administración. Estos factores los conocen bien los expertos habituales en la técnica y pueden abordarse con no más que experimentación de rutina. En algunos casos, puede usarse una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta según el juicio médico razonable.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden variarse para contener una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad de la estructura de la invención particular empleada, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción o el metabolismo de la estructura particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con la estructura particular empleada, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

Un médico o veterinario con experiencia ordinaria en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o el veterinario podrían comenzar las dosis de las estructuras descritas en el presente documento empleadas en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y luego aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado.

En algunas realizaciones, una estructura o composición farmacéutica descrita en el presente documento se proporciona a un sujeto de forma crónica. Los tratamientos crónicos incluyen cualquier forma de administración repetida durante un periodo prolongado de tiempo, tales como administraciones repetidas durante uno o más meses, entre un mes y un año, uno o más años o más. En muchas realizaciones, un tratamiento crónico implica administrar una estructura o composición farmacéutica repetidamente durante la vida del sujeto. Por ejemplo, los tratamientos crónicos pueden implicar administraciones regulares, por ejemplo, una o más veces al día, una o más veces a la semana o una o más veces al mes. En general, una dosis adecuada tal como una dosis diaria de una estructura descrita en el presente documento será la cantidad de la estructura que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Tal dosis efectiva dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Generalmente, las dosis de las estructuras descritas en el presente documento para un paciente, cuando se usan para los efectos indicados, oscilarán desde aproximadamente 0,0001 hasta aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal por día. La dosis diaria puede oscilar desde 0,001 hasta 50 mg de compuesto por kg de peso corporal, o desde 0,01 hasta a aproximadamente 10 mg de compuesto por kg de peso corporal. Sin embargo, pueden usarse dosis más bajas o más altas. En algunas realizaciones, la dosis administrada a un sujeto puede modificarse a medida que la fisiología del sujeto cambia debido a la edad, la progresión de la enfermedad, el peso u otros factores.

Si se desea, la dosis diaria eficaz del compuesto activo puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias. Por ejemplo, las instrucciones y los métodos pueden incluir regímenes de dosificación en los que se administran dosis específicas de composiciones, especialmente aquellas que incluyen estructuras descritas en el presente documento que tienen un intervalo de tamaño particular, a intervalos de tiempo específicos y dosis específicas para lograr la reducción de colesterol (u otros lípidos) y/o tratamiento de enfermedades mientras se reducen o evitan los efectos adversos o no deseados. Por tanto, se describen los métodos para administrar las estructuras descritas en el presente documento, los métodos para reducir el colesterol total y LDL mediante la administración de las estructuras, los métodos para elevar el nivel o aumentar la eficacia del colesterol HDL mediante la administración de las estructuras descritas en el presente documento y los métodos de dosificación de estructuras en pacientes en necesidad de ello.

Si bien es posible que una estructura descrita en el presente documento se administre sola, puede administrarse

como una composición farmacéutica tal como se describió anteriormente. La presente invención también proporciona cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente útiles para diagnosticar, prevenir, tratar o gestionar una enfermedad o afección corporal empaquetada en kits, incluyendo opcionalmente instrucciones para el uso de la composición. Es decir, el kit puede incluir una descripción del uso de la composición para participar en cualquier enfermedad o afección corporal, incluidas las asociadas con niveles de lípidos anómalos. Los kits pueden incluir además una descripción del uso de las composiciones tal como se comenta en el presente documento. El kit también puede incluir instrucciones para el uso de una combinación de dos o más composiciones descritas en el presente documento. También pueden proporcionarse instrucciones para administrar la composición mediante cualquier técnica adecuada, tal como por vía oral, por vía intravenosa o por otra vía conocida de administración de fármacos.

Los kits descritos en el presente documento también pueden contener uno o más recipientes, que pueden contener componentes tales como las estructuras, entidades de señalización y/o biomoléculas tal como se describe. Los kits también pueden contener instrucciones para mezclar, diluir y/o administrar los compuestos. Los kits también pueden incluir otros recipientes con uno o más disolventes, tensioactivos, conservantes y/o diluyentes (por ejemplo, solución salina normal (NaCl al 0,9%) o dextrosa al 5%), así como recipientes para mezclar, diluir o administrar los componentes a la muestra o al paciente que necesita dicho tratamiento.

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

El kit, en un conjunto de realizaciones, puede comprender uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los recipientes uno de los elementos separados que van a usarse en el método. Por ejemplo, uno de los recipientes puede comprender un control positivo en el ensayo. Además, el kit puede incluir recipientes para otros componentes, por ejemplo, tampones útiles en el ensayo.

Tal como se usa en el presente documento, un "sujeto" o un "paciente" se refiere a cualquier mamífero (por ejemplo, un ser humano), por ejemplo, un mamífero que puede ser susceptible a una enfermedad o afección corporal tal como una enfermedad o afección corporal asociada con niveles de lípidos anómalos. Los ejemplos de sujetos o pacientes incluyen un humano, un primate no humano, una vaca, un caballo, un cerdo, una oveja, una cabra, un perro, un gato o un roedor tal como un ratón, una rata, un hámster o un conejillo de indias. Generalmente, la invención se refiere al uso con humanos. Un sujeto puede ser un sujeto diagnosticado con una determinada enfermedad o afección corporal o que se sabe de otro modo que tiene una enfermedad o afección corporal. En algunas realizaciones, un sujeto puede ser diagnosticado, o se sabe que está en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección corporal. En algunas realizaciones, a un sujeto se le puede diagnosticar, o se sabe que tiene una enfermedad o afección corporal asociada con niveles de lípidos anómalos, tal como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, un sujeto puede seleccionarse para tratamiento sobre la base de una enfermedad o afección corporal conocida en el sujeto. En algunas realizaciones, un sujeto puede seleccionarse para tratamiento sobre la base de una sospecha de enfermedad o afección corporal en el sujeto. En algunas realizaciones, la composición puede administrarse para prevenir el desarrollo de una enfermedad o afección corporal. Sin embargo, en algunas realizaciones, puede sospecharse la presencia de una enfermedad o afección corporal existente, pero aún no se ha identificado, y puede administrarse una composición de la invención para diagnosticar o prevenir un mayor desarrollo de la enfermedad o afección corporal.

Una "muestra biológica" tal como se usa en el presente documento, es cualquier muestra de célula, tejido corporal o fluido corporal obtenida de un sujeto. Los ejemplos no limitativos de fluidos corporales incluyen, por ejemplo, linfa, saliva, sangre, orina y similares. Pueden obtenerse muestras de tejido y/o células para su uso en los diversos métodos descritos en el presente documento a través de métodos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, biopsia de tejido, que incluye biopsia por punción y raspado de células, biopsia con aguja; o recolección de sangre u otros fluidos corporales por aspiración u otros métodos adecuados.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar determinadas realizaciones de la presente invención, pero no han de interpretarse como limitativos y no ejemplifican todo el alcance de la invención.

Ejemplos

Este ejemplo demuestra el uso de nanoestructuras sintéticas (por ejemplo, HDL-NP) para tratar cánceres, tales como cánceres que expresan SR-B1.

Se describen nanopartículas de lipoproteínas de alta densidad biomiméticas funcionales (HDL-NP) como terapia potencial para el linfoma de células B. Las HDL-NP parecen funcionar a través de su capacidad para seleccionar como diana el receptor eliminador de tipo B-1 (SR-B1) y su capacidad funcional para el secuestro de colesterol.

Como tal, HDL-NP es un imitador químico de superficie de las HDL esféricas; sin embargo, un molde de nanopartículas de oro usado para controlar el tamaño y la forma de la HDL-NP ocupa parte del espacio de partículas normalmente reservado para el colesterol esterificado. Por tanto, al igual que la HDL natural, la HDL-NP activa SR-B1, pero proporciona un colesterol mínimo a las células. Al mismo tiempo, la HDL-NP secuestra el colesterol celular libre en su superficie. Los datos en el presente documento demuestran que las HDL-NP se dirigen a SR-B1 expresados por las líneas celulares de linfoma de células B, producen la máxima salida de colesterol en comparación con las HDL naturales e inducen apoptosis. Las HDL derivadas de suero y Ac-LDL no inducen apoptosis. Por consiguiente, se ha demostrado una nanoestructura terapéutica funcional, sintética de una sola entidad que obtiene un beneficio terapéutico a través de la biomimética y el control sobre la función biológica inherente de la nanopartícula.

Expresión de SR-B1 en linfoma y en líneas celulares. Poco se sabe sobre las rutas moleculares del metabolismo del colesterol en el linfoma, incluida la prevalencia de receptores para la absorción de HDL ricas en colesterol. En consecuencia, se examinaron los perfiles de expresión génica de DLBCL (similar a ABC y similar a GC), linfoma de Burkitt (BL) y células B normales de muestras humanas en una base de datos generada usando matrices Affymetrix U133plus 2.0 (figura 2A). Se encontró que SR-B1 se expresó a -9-16 veces el nivel en los linfomas en comparación con las células B normales. A continuación, se determinó la expresión de la proteína SR-B1 en líneas celulares de linfoma y linfocitos periféricos humanos normales mediante inmunotransferencia (figura 2E y 2C). Se encontró que ABCA1 y ABCG1 se expresan a niveles relativamente constantes y bajos, mientras que SR-B1 se expresa altamente en múltiples líneas celulares de linfoma de células B (figura 2B). De manera interesante, SR-B1 no se expresa en Jurkat, una línea celular de linfoma de linaje de células T (figura 2B). SR-B1 se expresa en múltiples líneas celulares de linfoma de células B, pero no en linfocitos humanos normales o Jurkat, una línea celular de linfoma de linaje de células T (figura 2C). Las células de hepatoma hepático HepG2, conocidas por expresar SR-B, se incluyeron para comparación. Finalmente, el perfil de inmunotransferencia de tipo Western reveló que SR-B1 se expresa en múltiples líneas celulares de cáncer (figura 2E) así como en hepatocitos y macrófagos (figura 2F).

Viabilidad celular en líneas de células de linfoma tras la exposición a HDL-NP. Las líneas celulares Ramos y SUDHL-4 son líneas celulares B derivadas de GC de BL y DLBCL, respectivamente. Además, se eligió estudiar la línea DLBCL similar a ABC, LY3. Las células Jurkat y los linfocitos humanos normales proporcionaron controles negativos para el receptor SR-B1. Además, también se eligieron dos células primarias que se sabe que expresan SR-B1 que son tipos de células críticos que se acoplan de manera natural con HDL, hepatocitos y macrófagos. Para cada uno de los tipos de células, se midió la viabilidad celular mediante un ensayo MTS después del tratamiento con HDL (hHDL) o HDL-NP derivadas de suero humano. MTS es un ensayo colorimétrico en el que la magnitud de la absorbancia es proporcional a la viabilidad celular. Para cada tratamiento, y para cada comparación realizada a lo largo de los estudios, se añadieron dosis equivalentes de hHDL y HDL-NP en función de la cantidad de apolipoproteína A-1 (Apo A1). La adición de hHDL no cambió los valores de absorbancia relativos medidos usando el ensayo MTS para células LY3 o Jurkat, pero aumentó para células Ramos y SUDHL-4 (figura 3A). Por el contrario, el tratamiento con HDL-NP dio como resultado una disminución dependiente de la dosis en la absorbancia obtenida en las células Ramos y SUDHL-4, menos en las células LY3, y no en la línea Jurkat (figura 3B). El tratamiento con hHDL o HDL-NP no tuvo efecto en hepatocitos primarios o células de macrófagos (figuras 3C y 3D). Por tanto, en contraste directo con sus homólogos naturales de hHDL, las HDL-NP reducen selectivamente la viabilidad de las células de linfoma derivadas de GC y ABC y reservan Jurkat, hepatocitos humanos primarios y macrófagos humanos primarios.

Biomimetismo de HDL-NP. Con el fin de determinar la influencia de los componentes químicos libres de HDL-NP a partir de los constructos sintéticos de HDL-NP, cada uno (es decir, Apo A1 y fosfolípidos) se añadió a células Ramos, SUDHL-4, LY3 y Jurkat y se realizaron ensayos MTS. Los componentes libres no tuvieron un efecto significativo, excepto por una reducción relativamente pequeña pero estadísticamente significativa en el valor de absorbancia medido después de añadir el lípido que contiene disulfuro (PDP PE) a las células Ramos (figura 4). Estos datos demuestran que la toxicidad de HDL-NP hacia las líneas de células B sensibles deriva a través del biomimetismo, en lugar de cualquier efecto tóxico de los componentes individuales de HDL-NP.

Apoptosis en líneas celulares de linfoma. Debido a que los cambios en la absorbancia medidos con un ensayo MTS pueden ser multifactoriales, también se midió la apoptosis y la proliferación celular (figura 5A) después del tratamiento con hHDL y HDL-NP. Usando anexina V y marcaje de células con yoduro de propidio y citometría de flujo (véanse Materiales y métodos) se encontró que las HDL-NP indujeron apoptosis dependiente de la dosis y el tiempo en las líneas celulares de linfoma de células B (figura 5B) mientras se reservaba Jurkat (figura 5B). A nivel molecular, los datos demuestran que HDL-NP provocan un aumento dependiente de la dosis en la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) escindida y una reducción en los niveles de caspasa 3 de longitud completa en las células Ramos (figuras 5D y 5E). En las células SUDHL-4, los niveles de PARP escindidos comienzan a aumentar 24 horas después del tratamiento con HDL-NP (figura 5F). Además, usando un ensayo colorimétrico de la actividad de caspasa 3 activada (véanse Materiales y métodos), se encontró que el tratamiento con HDL-NP induce un aumento dependiente del tiempo y la dosis en la actividad de caspasa 3 activada en células Ramos y SUDHL-4, pero no en células Jurkat (figura 5C).

Investigación de hepatocitos, macrófagos y linfocitos normales. A continuación, se midió la toxicidad de HDL-NP para hepatocitos y macrófagos normales (figura 6A), así como para linfocitos humanos indiferenciados (figura 6B). En primer lugar, se midió la apoptosis tras exponer macrófagos y hepatocitos humanos normales a hHDL y HDL-NP durante 24, 48 y 72 h. No se observó ningún aumento en la apoptosis para células tratadas frente a las de control (figura 6A). A continuación, se extrajo sangre de un voluntario humano y se aislaron linfocitos usando un gradiente de Ficoll. Los linfocitos humanos normales no experimentaron apoptosis cuando se trataron durante 72 horas con dosis crecientes de HDL-NP (figura 6B) o tras la exposición a HDL-NP 10 nM, una dosis tóxica para células SUDHL-4 y Ramos, a las 48 horas y 5 días (figura 6B, recuadro). En conjunto, estos datos demuestran que las HDL-NP no son tóxicas para células normalmente seleccionadas como diana por HDL *in vivo* o células nucleadas halladas normalmente en la sangre.

Acoplamiento de SR-B1 por HDL-NP y rescate por HDL y Ac-LDL nativas. Se razonó que la inducción de apoptosis estaba relacionada con el acoplamiento de SR-B1 por HDL-NP que imitaba la captación de HDL maduras y ricas en colesterol. Se midió el contenido de oro por espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-EM) y se correlacionó el contenido de oro celular con la expresión celular de SR-B1 (figura 7A). Las mediciones del contenido de oro celular se normalizan a la proteína celular y en momentos posteriores se combinan células vivas y apoptóticas (72 horas). Los datos de espectrometría de masas indican que las NP-HDL se acoplaron inicialmente con las células a las dos horas, seguido de un aumento en el contenido de oro celular en células Ramos, SUDHL-4 y LY3 (pero no en Jurkat) hasta que se alcanzó una meseta de saturación a las 24 horas. En conjunto, estos datos son coherentes con la expresión de SR-B 1 medida por estos tipos de células. Además, con el fin de comprender si las hHDL naturales compiten con las HDL-NP por los mismos mecanismos de acoplamiento y absorción en cada uno de los tipos de células, se realizó un experimento de competición con concentraciones crecientes de hHDL. Se recogieron los datos en puntos temporales tempranos ($t = 2$ y 4 h) para aislar, y potencialmente inhibir, la unión celular temprana. Los datos demuestran que a medida que aumentan las concentraciones de hHDL, el contenido de oro celular disminuye constantemente en las células Ramos y SUDHL-4 (figura 7B). Hay una captación relativamente escasa por las células Jurkat negativas de SR-B1 en ambos puntos de tiempo (figura 7B). A continuación, se usó microscopía electrónica de transmisión (TEM) para visualizar el acoplamiento y la captación de HDL-NP en las células SUDHL-4 (figura 7C). Las micrografías demuestran la capacidad de AuNP por las células SUDHL-4 después del tratamiento con HDL-NP. A nivel subcelular, las AuNP se limitaron a la membrana celular, el citoplasma y las estructuras vesiculares tal como se muestra en la figura 7C. No se observaron AuNP en los núcleos celulares. En conjunto, estos datos sugieren que las HDL-NP compiten con las hHDL por SR-B1 y pueden internalizarlas las células diana.

Para explorar el papel del acoplamiento de SR-B1 y comprender mejor si el flujo de colesterol contribuye a la inducción de apoptosis después del tratamiento con células de HDL-NP, se realizó un experimento de rescate añadiendo agonistas particulados de SR-B1 conocidos que también son una fuente de colesterol. Las lipoproteínas de baja densidad acetiladas (Ac-LDL) y hHDL utilizan ambas SR-B1 para administrar colesterol a las células. Se midió la viabilidad y la apoptosis en presencia de concentraciones crecientes de Ac-LDL manteniendo la concentración de HDL-NP constante y a una dosis tóxica para las células Ramos y SUDHL-4 (10 nM). Los datos de absorbancia obtenidos usando el ensayo MTS demuestran que las células SUDHL-4 se rescataron mediante la adición de una concentración creciente de Ac-LDL (figura 8A). No se observaron cambios para las células Jurkat (figura 8A). Además, tanto Ac-LDL (figura 8B) como hHDL (figura 8C-8F) rescataron células Ramos y SUDHL-4, pero no Jurkat (figura 8B), de la apoptosis mediada por HDL-NP de manera dependiente de la dosis. Debido a que los cambios en la proliferación celular pueden confundir los datos proporcionados por los ensayos de viabilidad celular MTS, se evaluó la incorporación de ^3H -timidina como una medida de la proliferación celular en las cuatro líneas celulares (figura 5A). Los datos demuestran que las HDL-NP redujeron ligeramente la proliferación celular en las líneas celulares LY3, Ramos y SUDHL-4, pero no en las células Jurkat negativas para SR-B1. La adición de Ac-LDL rescató la proliferación celular a los niveles iniciales, pero no indujo una proliferación celular significativa en ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba cuando se añadieron solas (figura 5A). Por tanto, las HDL-NP seleccionan como diana SR-B1, inducen apoptosis y reducen ligeramente la proliferación celular alterando el flujo de colesterol a través de este receptor.

Mediciones de flujo de colesterol. Debido al potencial de SR-B1 para mediar tanto la entrada como la salida de colesterol, se midió el flujo de colesterol en líneas celulares y células primarias en presencia de hHDL y HDL-NP (figuras 9A-9F). En las líneas celulares de linfoma, el flujo de salida de colesterol fue el mayor después de la exposición a las HDL-NP (figura 9A). Las células Jurkat demostraron la menor cantidad de flujo de salida de colesterol. En células normales, el flujo de salida de colesterol medido fue mayor en macrófagos que en hepatocitos y la magnitud del flujo de salida fue similar para hHDL y HDL-NP (figura 9B).

A continuación, se determinó la capacidad de hHDL y HDL-NP para hacer que entre colesterol en células de linfoma cultivadas (figura 9C) y hepatocitos y macrófagos humanos normales (figura 9D). En comparación con hHDL, las HDL-NP administraron la menor cantidad de colesterol a cada una de las líneas celulares de linfoma sometidas a prueba (figura 9C). En células normales, la entrada de colesterol fue la mayor en hepatocitos frente a macrófagos y la magnitud fue relativamente igual a hHDL y HDL-NP (figura 9D). En conjunto, las HDL-NP parecen modular de manera diferencial el flujo de colesterol en las líneas celulares de linfoma en comparación con las células normales donde el flujo parece estar controlado de manera más uniforme. La combinación de los datos de muerte celular y

flujo de colesterol proporciona evidencia de que el mecanismo de acción de las HDL-NP se deriva de la manipulación diferencial del metabolismo del colesterol celular y las vías moleculares aguas abajo de SR-B1.

La inhibición de SR-B1 mediante BLT-1 bloquea el flujo de colesterol a HDL-NP. El bloqueante del transporte de lípidos 1 (BLT-1) es una molécula pequeña que se une a cisteína-384 en el dominio de bucle extracelular de SR-B1 e inhibe el flujo de colesterol a través de SR-B1 sin alterar la unión de partículas de HDL al receptor. Por tanto, el tratamiento de células SUDHL-4 con BLT-1 permitió una medición del acoplamiento y el flujo de colesterol a través de SR-B1. Los datos demuestran que BLT-1 inhibió el flujo de colesterol a hHDL y HDL-NP proporcionando evidencia de que el acoplamiento de SR-B1 por HDL-NP es responsable de alterar el flujo de colesterol y es coherente con los informes anteriores (figuras 9E y 9F).

Experimentos de xenoinjerto de linfoma. Para recapitular los datos *in vitro* en un modelo *in vivo*, se administraron HDL-NP por vía intravenosa a ratones SCID beige (C.B-*Igh-1b/GbmsTac-Prkdc^{scid}-Lyst^{bg}*N7) que portaban xenoinjertos de tumor en el flanco. También se sometió a prueba la especificidad de la toxicidad de HDL-NP para células SR-B1⁺ inoculando células Jurkat (SR-B1⁺) en el flanco opuesto (izquierda) a las células Ramos SR-B1⁺ (derecha). Se trataron los ratones ($N = 5$ / grupo) por vía intravenosa con PBS, hHDL (1 μ M, 100 μ l) o HDL-NP (1 μ M, 100 μ l) durante 11 días. Los ratones tratados con HDL-NP tuvieron volúmenes tumorales de células Ramos significativamente más pequeños en comparación con los tratados con hHDL y PBS (figura 10A). Tal como se esperaba, el tratamiento con HDL-NP no tuvo un efecto significativo sobre el volumen tumoral de células Jurkat (figura 10B). La inmunotransferencia de tipo Western de cuatro muestras tumorales representativas obtenidas en la necropsia el día 11 reveló que la expresión de SR-B1 se mantuvo en tumores de células Ramos y en gran parte estaba ausente en tumores de células Jurkat (figura 11A). La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de secciones de tejido obtenidas de tumores de células Ramos y Jurkat demuestra que la presencia de SR-B1, aunque mínima, observada en las inmunotransferencias de tipo Western de tumores de células Jurkat es probablemente el resultado de adipocitos u otros elementos de tejido conjuntivo presentes en la masa de células Jurkat recogida (figuras 11B-11E). A pesar del crecimiento global reducido de los xenoinjertos de células Jurkat, estos datos son coherentes con los datos *in vitro* y con la expresión de SR-B1 medida en las muestras tumorales. Estos datos también demuestran que las HDL-NP (100 μ l) cuando se inyectan de forma múltiple a una concentración de 1 μ M pueden superar a las HDL naturales en suero de ratón, lo que se estima que es una concentración aproximada igual a 20 μ M.

Datos no relacionados con linfoma. Basándose en los datos anteriores que demuestran que las nanoestructuras (por ejemplo, NP de HDL) indujeron apoptosis inducida por el tiempo y dependiente de la dosis en las líneas celulares de linfoma de células B que expresan SR-B1, se realizó un examen de otras células cultivadas que expresan SR-B1 con el fin de evaluar la aplicabilidad general de las nanoestructuras como agentes tóxicos a las células que expresan SR-B1. Se sometieron a prueba dos dosis diferentes de NP de HDL (10 y 50 nM) y se midió la viabilidad celular a las 24, 48, 72 y 96 horas después del tratamiento usando un ensayo de viabilidad celular MTT colorimétrico. Se hicieron comparaciones con ensayos de MTT realizados en células no tratadas a las 96 horas. Se analizaron las células que expresan SR-B1 y se sabe que interactúan con HDL naturales (por ejemplo, células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) (figura 12A) y células de hepatoma hepático (HepG2) (figura 12B)). Además, se analizaron varias líneas celulares de mama (figura 12E-12G), próstata (figura 12C, 12D) y melanoma (figura 12H, 12I). Los datos demuestran que las nanoestructuras redujeron la viabilidad celular en la línea celular de melanoma, A375 (figura 12I). Se midió una reducción en la viabilidad celular para la línea celular de melanoma C8161 a las 96 horas (dosis 50 nM) (figura 12H). La línea de células Ramos (figura 12J) demuestra la apoptosis dependiente del tiempo y la dosis durante el tratamiento con nanoestructuras, coherente con los datos anteriores. Los resultados se muestran en las figuras 12A-12J. Para todos los experimentos, NT fue el control no tratado, en un punto de tiempo de 96 horas.

Discusión. Las HDL-NP son nanoestructuras biológicamente funcionales que proporcionan un nuevo paradigma para el tratamiento de linfoma. Las HDL-NP inducen apoptosis en líneas celulares de linfoma de células B *in vitro* y reducen el crecimiento del linfoma de células B en un modelo de xenoinjerto. Las HDL-NP demuestran un mecanismo de acción que puede depender directamente de la presencia del molde de nanopartículas de oro usado para controlar el tamaño del conjugado, la forma, la química de superficie y, en última instancia, controlar el flujo de colesterol en la interfaz bionanométrica. Las HDL-NP imitan las HDL esféricas seleccionando SR-B1 como diana y luego pueden manipular diferencialmente el flujo de colesterol celular, lo que conduce a apoptosis en células de linfoma de células B. Por el contrario, las hHDL derivadas de suero humano y Ac-LDL no son tóxicas para células de linfoma de células B.

Los acontecimientos de señalización posteriores que parecen específicos de las células de linfoma de células B después de la exposición a HDL-NP aún no están definidos. Las líneas celulares de linfoma de células B derivadas del centro germinal pueden ser más sensibles a la manipulación del flujo de colesterol celular a través de SR-B1. Las células LY3 derivadas de ABC expresan SR-B1 y captan NP-HDL similares a las células derivadas de GC, pero son más resistentes a la apoptosis. Esto sugiere diferencias en las rutas de señalización posteriores en las células derivadas de ABC frente a las derivadas de GC, de acuerdo con las diferencias previamente observadas entre las células derivadas de ABC y las derivadas de GC. De manera similar, las células de hepatocitos y macrófagos humanos, que también expresan SR-B1, no son susceptibles a la muerte celular inducida por HDL-NP. Los datos demuestran la importancia de la homeostasis del colesterol en células normales frente a cancerosas, y el control

estricto que tienen las células normales sobre el metabolismo del colesterol, lo que es respaldado por los datos.

Las líneas celulares de linfoma de células B derivadas del centro germinal pueden ser más sensibles a la manipulación del flujo de colesterol celular a través de SR-B1 y esto proporciona una transición provocadora para comprender mejor los mediadores posteriores de este efecto. Se ha demostrado que el agotamiento del colesterol celular inhibe la infección viral de Epstein Barr (EBV) del linfoma de Burkitt, lo que implica la importancia del colesterol en la infección por EBV y en la oncogénesis. Como tal, la expresión aumentada de SR-B1 por células de linfoma de células B proporciona un mecanismo para competir con otros tejidos para colesterol, ésteres colesterílicos o promotores virales del crecimiento y la proliferación celular. Además, se ha demostrado que SR-B1 se localiza en balsas lipídicas de membrana celular y el acoplamiento de SR-B1 y la manipulación del contenido de colesterol y la fluidez de la membrana, incluidas las vías moleculares aguas abajo ancladas en las balsas lipídicas, pueden contribuir a la eficacia terapéutica de HDL-NP.

Los datos mostrados en las figuras 6 y 7 demuestran que las HDL-NP compiten con hHDL y Ac-LDL naturales para unirse a las células diana. De manera importante, los datos *in vivo* demuestran la capacidad de los HDL-NP de competir exitosamente por los receptores de HDL y lograr una reducción funcionalmente significativa en el crecimiento tumoral en presencia de HDL circulantes naturales. Esto es importante porque si este enfoque va a usarse en pacientes, la competición con hHDL será crítica para el éxito.

Las realizaciones descritas en el presente documento son muy prometedoras para desarrollar la próxima generación de tratamientos nuevos para la enfermedad humana. Los enfoques predominantes para la síntesis de las terapias de nanopartículas se centran en utilizar la nanopartícula como armazón para la administración de fármacos, no como entidad biológica funcional. La función terapéutica de los primeros tipos de nanopartículas no deriva de la nanoestructura sintética en sí, sino de la liberación de terapias activas contenidas dentro de la formulación de nanopartículas, tal como quimioterapias de moléculas pequeñas o ácidos nucleicos. Por el contrario, en algunas realizaciones descritas en el presente documento, las nanoestructuras descritas son una nanoestructura biomimética funcional con potente potencial terapéutico debido a la capacidad única de unirse a SR-B1 y/u otros receptores, debido a su forma esférica (entre otros factores), y capacidad de manipular el flujo de colesterol. Debido a su naturaleza biomimética, las nanoestructuras no son tóxicas para los linfocitos humanos normales y aumentan las oportunidades para una biointegración perfecta como terapia. Finalmente, las nanoestructuras descritas en el presente documento pueden ser una plataforma de nanopartículas sintéticas que pueden adaptarse para optimizar la función biológica, tal como la unión de SR-B1 y/o las propiedades de unión/flujo de colesterol para desarrollar terapias igualmente potentes y potencialmente mejorar las propiedades terapéuticas de las nanoestructuras biomiméticas notificadas en este caso.

Materiales - Síntesis, purificación y caracterización

Síntesis y caracterización de HDL-NP. Se añadió apolipoproteína A1 humana (Meridian Life Sciences) en un exceso molar de 5 veces a una disolución de nanopartículas de Au coloidales estabilizadas con citrato de 5 nm de diámetro (80-100 nM, Ted Pella, Inc.). Después de una hora, las Apo-AuNP se diluyeron en un 20% mediante la adición de etanol (Sigma Aldrich). Se prepararon disoluciones nuevas de dos fosfolípidos, propionato de 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)] [PDP PE, Avanti Polar Lipids, (Dis)] y 1,2-dipalmitoil-*sn*-la glicerina-3-fosfocolina (DPPC, lípidos Avanti Polar) en etanol a 1 mM. Cada lípido se añadió a la disolución de Apo-AuNP en un exceso molar de 250 veces a las AuNP y se dejó incubar en un agitador de fondo plano durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuación, las HDL-NP se purificaron por filtración de flujo tangencial usando un sistema de filtración de flujo tangencial Kros Flo II (Spectrum Labs, Inc) equipado con un tubo n.º 14 y un módulo de polietersulfona modificada MWCO (mPES) de 50 kDa. Para todas las purificaciones, el tampón (agua) se intercambiaba 7 veces para eliminar etanol, Apo A1 libre y fosfolípidos. La concentración de HDL-NP se determinó usando un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible (nanopartículas de oro coloidal de 5 nm, $\epsilon = 9,696 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La espectroscopía UV-visible se usa para medir la absorbancia máxima a , o cerca de, 520 nm, la longitud de onda correspondiente a la resonancia del plasmón superficial de coloide de Au de 5 nm. La concentración de HDL-NP se determina luego usando las relaciones definidas por la Ley de Beer: $A = \epsilon bc$, en donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de extinción en $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, b es la longitud de la trayectoria de la cubeta en cm y c es la concentración de AuNP en M. Se determinaron el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de las HDL-NP (15 nM) usando un instrumento Malvern Zetasizer ZS (figura 13). Se determinó el número de moléculas para Apo A1 por HDL-NP tal como se describe en la bibliografía publicada. En resumen, se marca Apo A1 con un fluoróforo molecular antes de la síntesis de las HDL-NP tal como se describió anteriormente. Luego, la Apo A1 marcada se libera de una cantidad molar conocida de HDL-NP (véase más arriba) y la concentración se calcula basándose en la señal fluorescente generada a partir de una curva de calibración de Apo A1 marcada.

Tabla 1. Caracterización de una muestra representativa del diámetro hidrodinámico de constructos de nanopartículas de oro. El diámetro hidrodinámico aumenta desde la AuNP de 5 nm no funcionalizada hasta la HDL-NP, a la que se han añadido proteínas y lípidos. Los valores $\lambda_{\text{máx}}$ son coherentes con una solución estable de AuNP.

	Diámetro hidrodinámico (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	potencial ζ (mV)	Índice de polidispersidad	de Apo A1 por partícula
AuNP de 5 nm	7,5 ± 0,9	517	-31 ± 11	0,17 ± 0,02	0
HDL-NP	12,8 ± 0,8	526	-56 ± 3	0,52 ± 0,02	2 ± 1

Cálculo de la concentración de Apo A1 para normalizar tratamientos de HDL (hHDL) y HDL-NP humanas. Se determina la concentración molar de HDL-NP tal como se comentó anteriormente y cada HDL-NP tiene aproximadamente tres copias de Apo A1 (tabla 1). Por tanto, Apo A1 está presente en un exceso molar de 3 veces en comparación con la HDL-NP. La HDL natural adquirida (Calbiochem) deriva de suero humano, y la concentración de proteína total se proporciona con cada lote de HDL humana adquirida. A partir de este valor, la concentración de Apo A1 se calcula basándose en el supuesto de que Apo A1 constituye el 70% de la concentración de proteína de HDL natural.

10 Métodos

Cultivo celular. Se adquirieron células Ramos, Jurkat, LY3 y HepG2 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Las células SUDHL-4 eran del Dr. Ron Gartenhaus (Universidad de Maryland, Baltimore, MD). Las células se cultivaron usando métodos convencionales. Se cultivaron células Jurkat, SUDHL-4 y Ramos en medio RPMI-1640 con L-glutamina, suero bovino fetal al 10% (FBS) y en presencia de penicilina/estreptomicina al 1% (Invitrogen). Se hicieron crecer células LY3 y se mantuvieron en RPMI 1640 con L-glutamina, FBS al 15%, penicilina/estreptomicina al 1%, D-glucosa 4,5 g/l y piruvato NG 1 mM. Se cultivaron células HepG2 en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) suplementado con FBS al 10%. Se cultivaron las células suspendidas en matraces T75 y se incubaron a 37°C y el 5% de CO₂.

Aislamiento de linfocitos humanos normales. Tras el consentimiento por escrito aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad del Noroeste, se extrajo sangre periférica de un voluntario sano en tubos recubiertos con Li-heparina. Se diluyó sangre humana completa nueva (<4 h después de la donación) 1:1 con medio RPMI. A un tubo de 50 ml, se le añadieron 10 ml de Ficoll Hystopaque y 20 ml de sangre diluida. Se centrifugaron las muestras (~480 g, 20 min, temperatura ambiente) y se retiró la capa superior de medio diluido/plaquetas. Los linfocitos, que aparecían como una capa blanca lechosa, se transfirieron a un tubo nuevo y se diluyeron hasta 50 ml con RPMI nuevo y se centrifugaron (~500 g, 6 min). La etapa de lavado se repitió dos veces y el sedimento final se resuspendió en 5 ml de medio de crecimiento (RPMI 1640 con L-glutamina, FBS al 10% y penicilina/estreptomicina al 1% (Invitrogen)). Si es necesario, los glóbulos rojos (RBC) se retiraron añadiendo 10 ml de tampón de lisis RBC frío al sedimento de linfocitos. Después de reposar 10 minutos en hielo, la muestra se lavó dos veces con RPMI. Luego, el sedimento final se resuspendió en medio de crecimiento a 1×10^6 células/ml.

Cultivo de hepatocitos humanos. Se obtuvieron hepatocitos humanos primarios de Lonza (Walkerville, Maryland). Se cultivaron los hepatocitos en medios de cultivo de hepatocitos (HCM), que consistían en medios basales de hepatocitos suplementados con HCM SingleQuot de Lonza, que contienen ácido ascórbico, suero de bovino libre de albúmina-ácido graso, hidrocortisona, factor de crecimiento epitelial humano, insulina, transferrina y gentamicina/anfotericina-B. Se sembraron hepatocitos en HCM suplementado con FBS al 2%. Después de 24 horas, se retiraron los medios de cultivo y se reemplazaron con HCM nuevo sin FBS.

Cultivo y diferenciación de monocitos CD14+. Se obtuvieron monocitos CD14+ humanos de Lonza. Se cultivaron los monocitos en RPMI 1640 suplementado con FBS al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%. Para diferenciar los monocitos en macrófagos, se añadieron las citocinas interleucina (IL)-4 (25 ng/ml, eBioscience, San Diego, CA), IL-6 (100 ng/ml, eBioscience) y factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF, 100 ng/ml, eBioscience) a los medios de cultivo durante 24 horas (3). Después de la diferenciación, los medios de cultivo se reemplazaron por medios nuevos sin citocinas.

Ensayo MTS. Para hepatocitos humanos primarios y monocitos CD14+, se sembraron 9×10^3 células/90 μ l en placas de 96 pocillos y se les permitió unirse y diferenciarse en el caso de los monocitos CD14+, durante 24 horas antes del inicio del tratamiento. Para todas las demás líneas celulares, se sembraron $2,5 \times 10^4$ células/90 μ l (experimentos de 24/48 h) o $1,0 \times 10^4$ células/90 μ l (experimentos de 72 h) en placas de 96 pocillos. A cada pocillo, se le añadieron 15 μ l de HDL-NP, Ac-LDL (Biomedical Technologies), hHDL (Calbiochem) o PBS. Después de la incubación a 37°C durante 24, 48 ó 72 horas, se añadieron 20 μ l de disolución MTS (MTS - Promega, G1112) a cada pocillo y se incubaron durante de 1 a 4 horas adicionales a 37°C. La absorbancia se leyó a 490 nm usando un lector de microplacas (MRX Revelation; DYNEX Technologies) y se expresó como un porcentaje del grupo de control. El valor de control se estableció en el 100%. La reducción de MTS se produce en células metabólicamente activas, por tanto, el nivel de actividad es una medida de la viabilidad celular.

Ensayo de apoptosis (anexina V/yoduro de propidio). En resumen, después del tratamiento celular y el lavado, se marcaron de 1×10^5 a 1×10^6 células con anexina V - FITC y reactivo de yoduro de propidio (PI) según las

instrucciones del kit de detección de apoptosis de anexina V - FITC (Invitrogen). La fluorescencia celular se leyó a 518 nm (FITC) y 620 nm (PI) en una máquina Beckman Coulter FACS. Para cada análisis, se registraron 30.000 eventos. Los resultados se analizaron y calcularon mediante el software FCS Express V3 y Excel. El porcentaje de apoptosis fue la suma de células de (anexina V-FITC⁺/PI⁻) y (anexina V-FITC⁺/PI⁺).

Ensayo de caspasa-3 activada. En resumen, se sembraron 450 μ l de células Jurkat, Ramos y SUDHL-4 en placas de 24 pocillos a una densidad de $1,1 \times 10^5$ células/ml. Durante las siguientes 72 horas, se añadieron 50 μ l de diversos tratamientos, incluyendo los controles, a cada pocillo. A las 72 h, se recogieron las células, se centrifugaron (450 g, 10 min) y se lavaron con PBS helado. Las células se resuspendieron en 40 μ l del tampón de lisis celular proporcionado por el fabricante y se lisaron mediante ciclos de congelación-descongelación que alternan entre -80°C y temperatura ambiente. A continuación, las muestras se normalizaron para el contenido de proteína preparando 4,7 μ g de equivalente de proteína de lisados celulares totales en un volumen total de 20 μ l [el déficit de volumen se llenó con tampón de lisis]. Usando todo el volumen de lisado, el ensayo se configuró en placas de 96 pocillos y se realizó según los protocolos del fabricante. El cambio colorimétrico se midió y analizó en el punto de tiempo de 4 horas. La absorbancia se leyó a 405 nm usando un lector de microplacas (BioTek Instruments, Synergy 2) y se expresó como un porcentaje del grupo de control.

Inmunotransferencia de tipo Western. Después de los tratamientos celulares, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron. Los sedimentos celulares se lisaron con tampón de extracción celular (Invitrogen) suplementado con fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) 1 mM y cóctel inhibidor de proteasa (Sigma), y la concentración de proteína se midió con un kit de ensayo de proteínas BCA colorimétrico (Pierce). Las muestras de proteínas totales (25-50 μ g) se separaron en geles de poliacrilamida prefabricados al 4-20% (BioRad) y se transfirieron a membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF). Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% en TBS-T, se incubaron con anticuerpos primarios seguidos de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP). Las proteínas inmunorreactivas se visualizaron usando quimioluminiscencia mejorada. Anticuerpos primarios: anti-SR-BI de conejo (Abcam ab52629), anti-PARP de conejo (señalización celular 9542), anti-caspasa 3 de conejo (señalización celular 9662).

Ensayo de salida de colesterol celular. Se incubaron las células en medios de cultivo apropiados con 1 μ Ci/ml [1,2-³H] colesterol (Perkin Elmer Inc.) durante la noche para etiquetar la agrupación de colesterol celular. Luego se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en medios de cultivo libres de suero apropiados. Se añadieron HDL o HDL-NP humanas a las células y se incubaron durante 6 horas. Al final del período de salida, las células y los medios de cultivo se recogieron por separado y se sometieron a recuento de centelleo líquido. El porcentaje de salida de colesterol se determinó usando la fórmula: recuento de medios/(recuento de células + recuento de medios) x 100. La salida de colesterol de fondo obtenida en ausencia de cualquier aceptor se restó de los valores de salida obtenidos con las muestras de prueba.

Ensayo de entrada de colesterol. Se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en medios apropiados, libres de suero, con 1 μ Ci/ml [1,2-³H] colesterol. Se añadieron HDL o HDL-NP humanas a las células y se incubaron durante 6 horas. Al final del período de entrada, las células se lavaron con PBS. Los lípidos celulares se extrajeron con isopropanol y luego se sometieron a recuento de centelleo líquido. La entrada se representa como número de recuentos de ³H colesterol y la entrada de colesterol de fondo obtenida en ausencia de cualquier aceptor (PBS) se restó de los valores de entrada obtenidos con HDL-NP o hHDL.

Ensayo de flujo de colesterol BLT-1. Las alteraciones en el flujo de colesterol después de la adición del bloqueante del transporte de lípidos 1 (BLT-1) se midieron tal como se describió anteriormente; sin embargo, las células se trataron previamente con BLT-1 10 μ M (2-hexil-1-ciclopentanona tiosemicarbazona, ChemBridge Corporation) durante 2 horas antes de los tratamientos celulares. Después de la entrada o salida de colesterol, las células se recogieron en medios nuevos para medir el flujo de colesterol tal como se describió anteriormente. La salida se expresa como un porcentaje de las células de control, que no se trataron con BLT-1. La entrada se expresa como un porcentaje de las células de control, que no se trataron con BLT-1.

Estudios *in vivo* de HDL-NP. Se realizaron estudios *in vivo* con la aprobación del Comité de Cuidado y Uso de Animales (ACUC) de la Universidad del Noroeste. Se mantuvieron las líneas celulares Ramos y Jurkat en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10%, al 5% de CO₂ y 37°C. Se adquirieron ratones beige SCID de cinco a seis semanas de edad, C.B-*Igh-1b/GbmsTac-Prkdc^{scid}-Lyst^{bg}* N7, de Taconic, Albany, Nueva York. Se inoculó la línea celular Ramos por vía subcutánea en el flanco derecho a una densidad de 5×10^5 células y la línea celular Jurkat se inoculó en el flanco izquierdo a una densidad de 1×10^7 células. La viabilidad de ambas células fue superior al 90%. Los animales se aclimataron hasta 2 días antes de la inoculación del tumor. El tratamiento farmacológico se inició después de que los xenoinjertos inoculados alcanzaron una ~ 100 mm³. Los animales se aleatorizaron en tres grupos diferentes: 5 ratones para el grupo de control (PBS) y 5 ratones cada uno para los grupos de tratamiento (hHDL y HDL-NP). Los grupos de control y tratamiento se inyectaron por vía intravenosa diariamente (5 administraciones por semana) con 100 μ l de PBS, hHDL 1 μ M o HDL-NP 1 μ M. La observación de la caja lateral se realizó diariamente, mientras que el volumen del tumor y la determinación del peso corporal se midieron dos veces por semana. Al final del estudio, cuando los xenoinjertos de Ramos alcanzaron los 2.000 mm³, se recolectaron tumores (Ramos y Jurkat)

para histología. La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de las muestras tumorales se realizó en el Laboratorio de Histología y Fenotipado de Ratones de la Universidad del Noroeste.

- 5 Inmunotransferencia de tumor animal. En resumen, se cargaron 20 µg de lisado tumoral en cada pocillo de un gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) al 10%. Los lisados tumorales se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de poli(fluoruro de vinilidina) y se sondearon tal como se indica. Se obtuvieron anticuerpos para el análisis de inmunotransferencia de los siguientes proveedores: SR-B1 de Abcam (Cambridge, MA) y alfa-tubulina de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).
- 10 Plasma acoplado inductivamente – Espectrometría de masas (ICP-EM). El contenido de oro de los sedimentos celulares en partes por mil millones (ppb) se determinó usando una curva de calibración y se calculó la concentración de nanopartículas de oro por célula. Se añadió indio a 5 ppb a todas las muestras y disoluciones patrón como patrón interno. Estos valores se normalizaron luego a la concentración de proteínas.
- 15 Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se sedimentaron y se resuspendieron las células tratadas y no tratadas con HDL-NP en tampón [cacodilato de sodio (SC) 0,1 M], se lavaron y se resuspendieron en fijador (paraformaldehído al 2%, glutaraldehído al 2%). Se incubaron las células durante 30 min a temperatura ambiente y se enjuagaron con SC 0,1 M y se colocaron en un fijador secundario que consiste en tetróxido de osmio al 2% en SC 0,1 M. Se enjuagaron las células y se tñeron con H₂O destilada y acetato de uranilo al 3%, respectivamente. Una vez fijadas, las células se enjuagaron con H₂O destilada y se deshidrataron con grados ascendentes de etanol. Se usó óxido de propileno como tampón de transición, y los tejidos se incrustaron en Epon 812 y resina Araldite y se curaron a 60°C. Los bloques se seccionaron usando un ultramicrotomo y se montaron en rejillas para microscopía electrónica de transmisión. Las micrografías TEM se obtuvieron usando un instrumento FEI Tecnai Spirit G2 a 120 kV.
- 20
- 25 Estadística. Se expresan los datos como la media ± DE. Las comparaciones entre dos valores se realizaron mediante la prueba de la *t* de Student. Para comparaciones múltiples entre diferentes grupos de datos, las diferencias significativas se determinaron mediante el método de Bonferroni. La significación se definió en $P \leq 0,05$.
- 30 Los artículos indefinidos “un” y “una”, tal como se usan en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que claramente se indique lo contrario, debe entenderse que significan “al menos uno.”
- También debe entenderse que, a menos que claramente se indique lo contrario, en cualquier método reivindicado en el presente documento que incluye más de una etapa o actuación, el orden de las etapas o actuaciones del método no está necesariamente limitado al orden en el que se enumeran las etapas o actuaciones del método.
- 35
- En las reivindicaciones, así como en la memoria descriptiva anterior, todas las expresiones de transición tales como “que comprende”, “que incluye”, “que porta”, “que tiene”, “que contiene”, “que implica”, “que sujeta”, “que se compone de”, y similares, han de entenderse como abiertas, es decir, que incluyen pero no se limitan a. Sólo las expresiones de transición “que consiste en” y “que consiste esencialmente en” han de ser expresiones de transición cerradas o semicerradas, respectivamente, tal como se establece en el Manual de Procedimientos de Examen de Patentes de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos, sección 2111.03.
- 40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende una nanoestructura sintética que controla la entrada y salida de colesterol en células cancerosas para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un sujeto, en la que la nanoestructura sintética es un bioimitador de lipoproteína de alta densidad esférica y madura y/o está adaptada para secuestrar colesterol y en la que la nanoestructura sintética comprende un núcleo de nanoestructura que comprende un material inorgánico y una cubierta y en la que el cáncer es linfoma de células B, melanoma o linfoma, y en la que el cáncer comprende células cancerosas que tienen un receptor de la superficie celular SR-B1.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, para su uso según la reivindicación 1, en la que el cáncer es linfoma no Hodgkin, caracterizado por células de linfoma de células B y caracterizado por células que tienen SR-B1.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1, para su uso según la reivindicación 1, en la que el material inorgánico es un metal.
- 20 4. Composición según la reivindicación 3, para su uso según la reivindicación 3, en la que el metal es oro.
5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el núcleo de nanoestructura sintética tiene la mayor dimensión de sección transversal de menos de o igual a aproximadamente 50 nm, o menos de o igual a aproximadamente 35 nm, o menos de o igual a aproximadamente 30 nm.
- 25 6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la nanoestructura sintética comprende una cubierta que comprende una capa lipídica que rodea y está unida a un núcleo de nanoestructura.
- 30 7. Composición según la reivindicación 6, para su uso según la reivindicación 6, en la que:
la capa lipídica es una bicapa lipídica
al menos una porción de la bicapa lipídica está unida de manera covalente al núcleo,
al menos una porción de la bicapa lipídica se adsorbe físicamente al núcleo,
35 la bicapa lipídica comprende un fosfolípido, y/o
la bicapa lipídica comprende 50-200 fosfolípidos.
- 40 8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la cubierta comprende una estructura de lipoproteína.
- 45 9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la cubierta comprende una apolipoproteína, en la que la apolipoproteína es opcionalmente apolipoproteína A-I, apolipoproteína A-II o apolipoproteína E.
- 50 10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la nanoestructura sintética incluye 1-6 apolipoproteínas.
- 55 11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la nanoestructura sintética comprende una cubierta que tiene una superficie interna y una superficie externa, y una proteína está asociada con al menos la superficie externa de la cubierta.
- 60 12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la nanoestructura sintética no incluye un fármaco contra el cáncer tal como un agente quimioterápico dentro de la nanoestructura.
13. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la nanoestructura sintética comprende un núcleo de nanoestructura que comprende un material inorgánico y una cubierta que comprende una capa lipídica que rodea y está unida al núcleo de nanoestructura, en la que la nanoestructura no incluye un ácido nucleico.

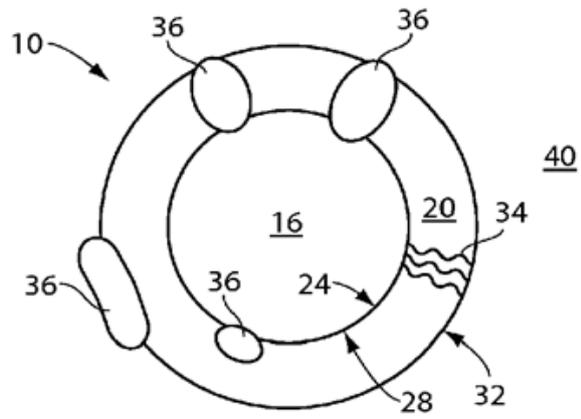


Fig. 1A

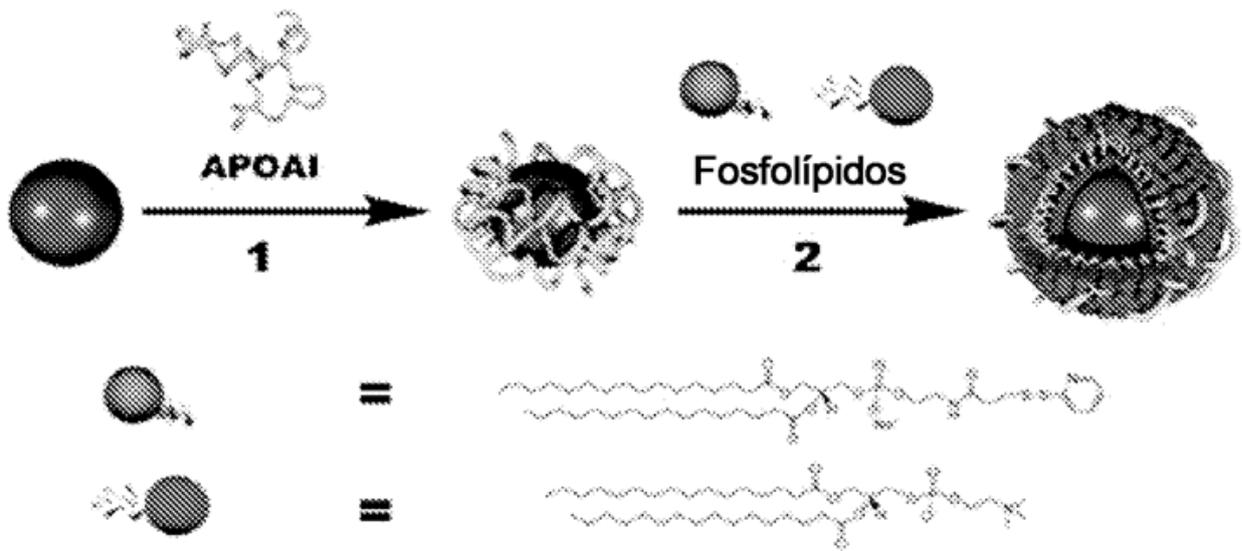


Fig. 1B

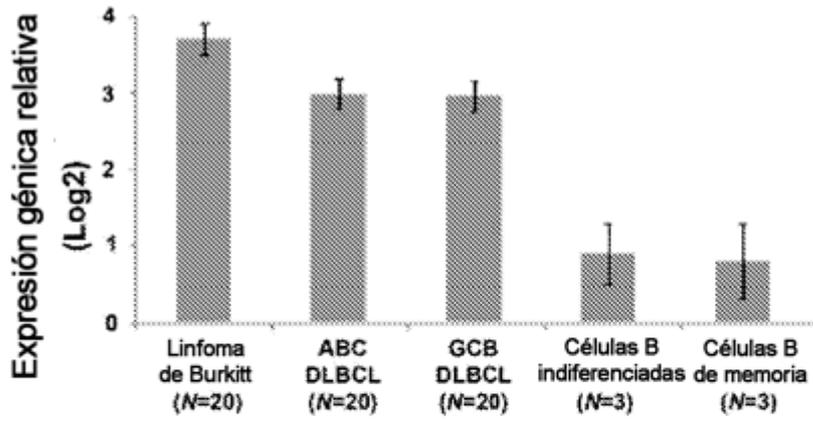


Fig. 2A

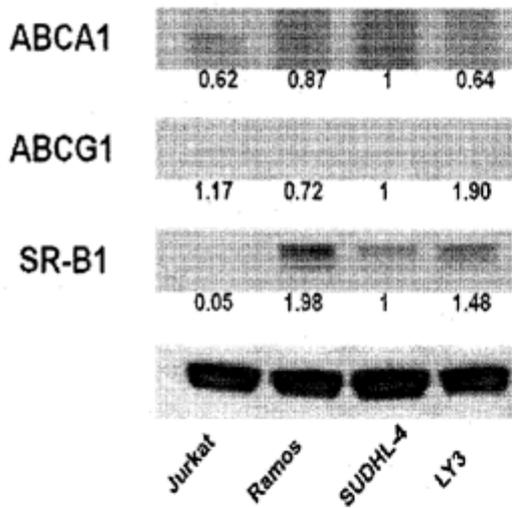


Fig. 2B

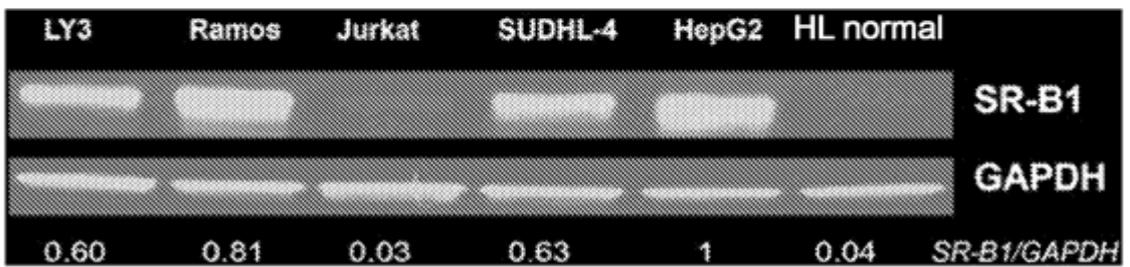


Fig. 2C

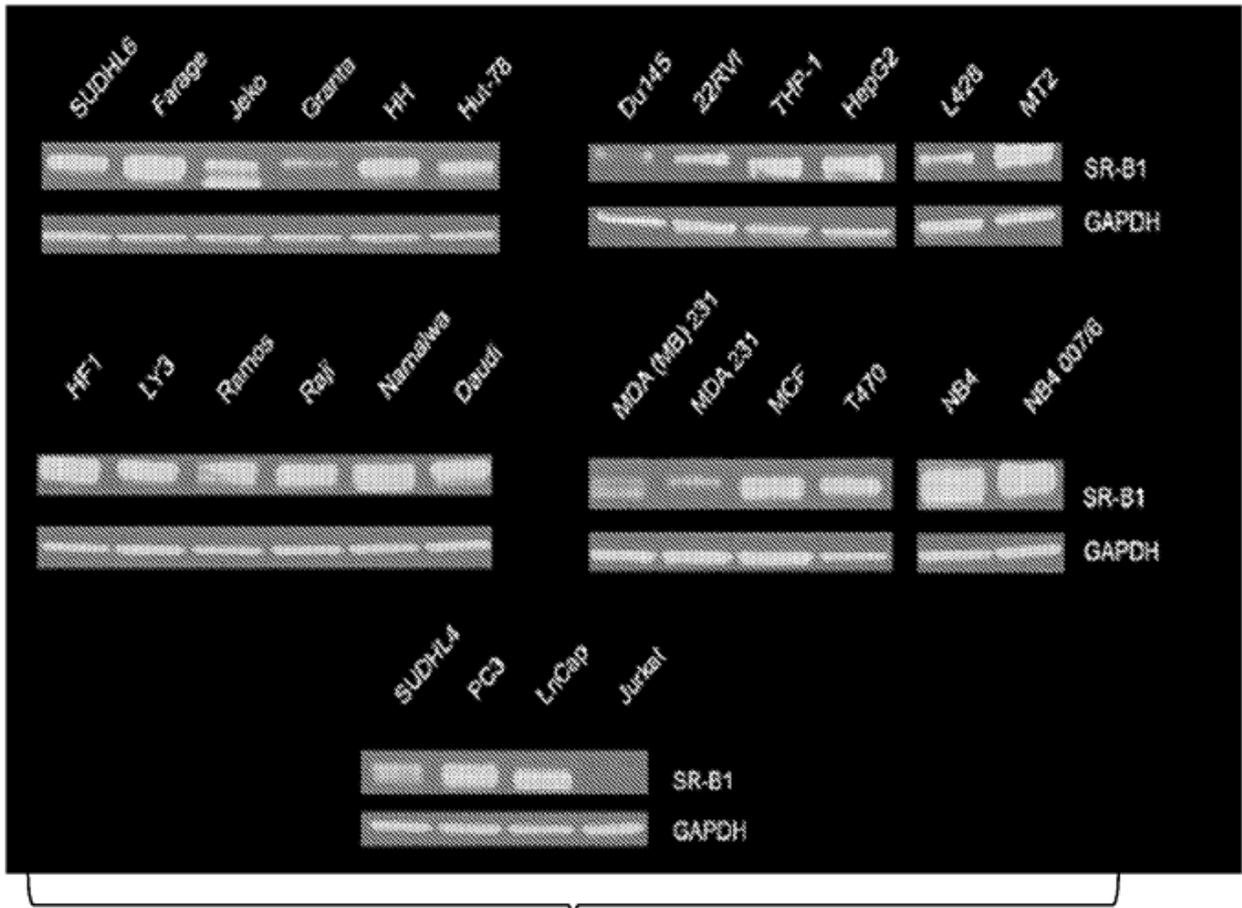


Fig. 2D

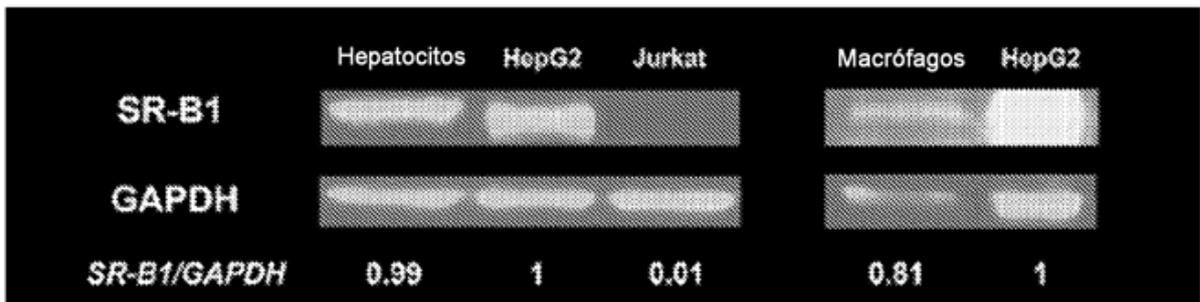


Fig. 2E

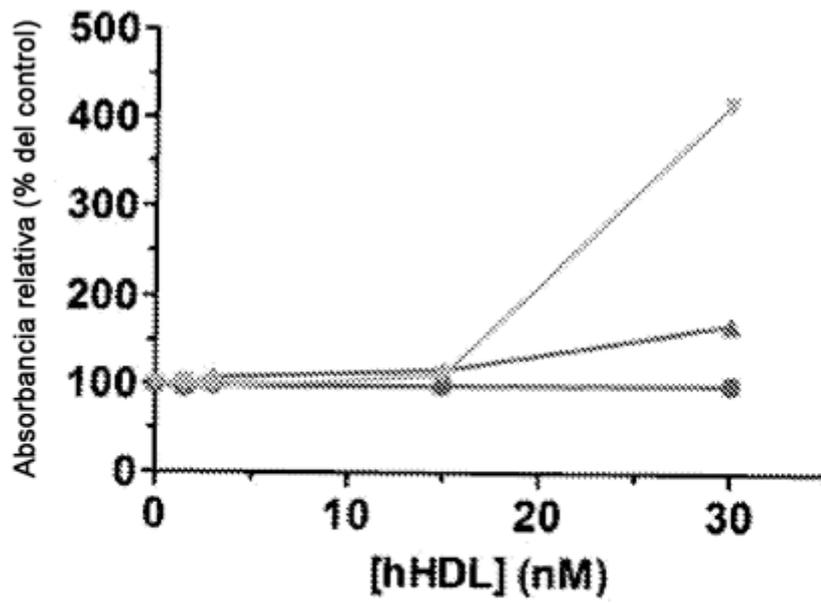


Fig. 3A

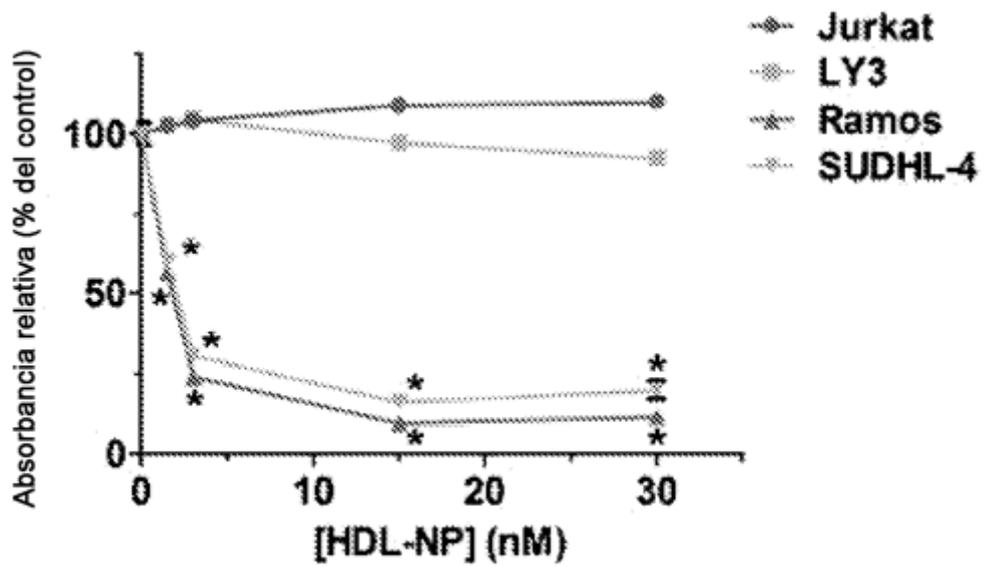


Fig. 3B

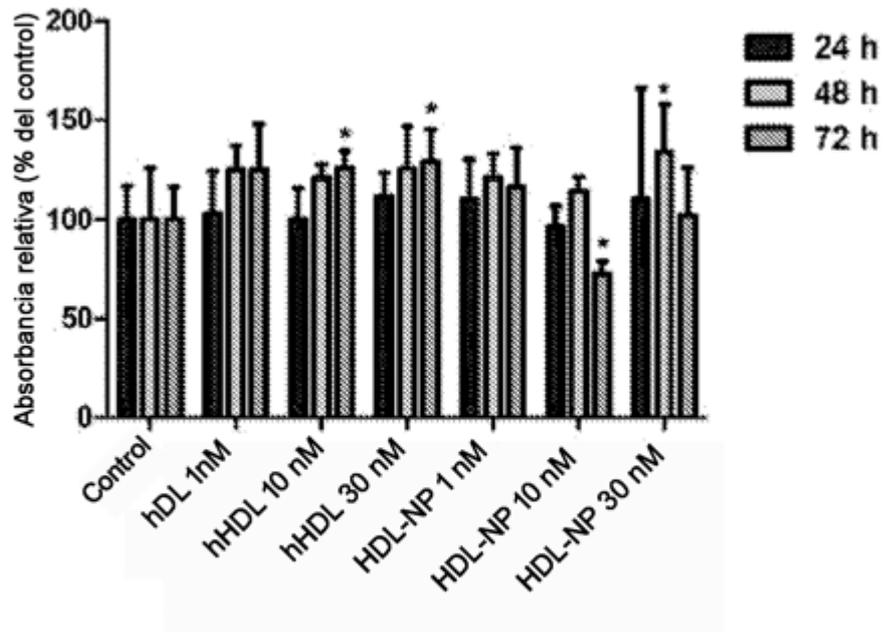


Fig. 3C

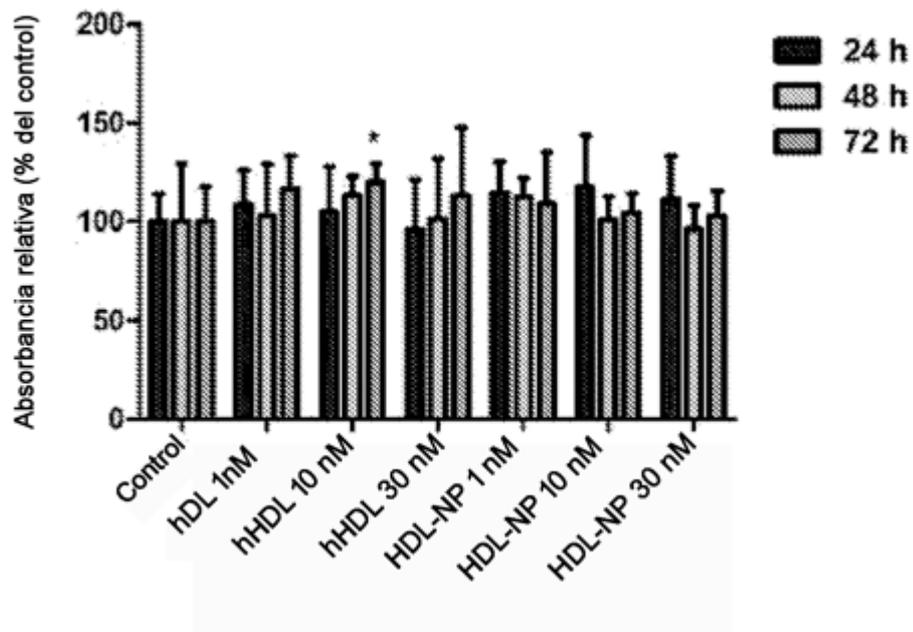


Fig. 3D

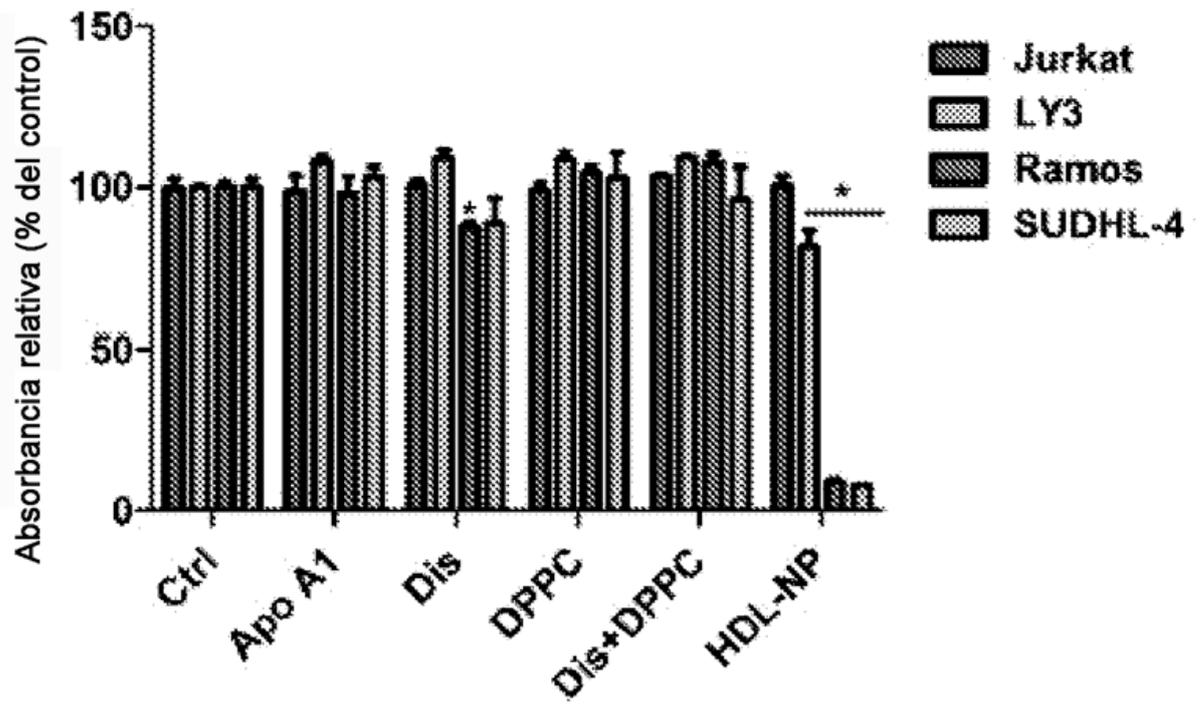


Fig. 4

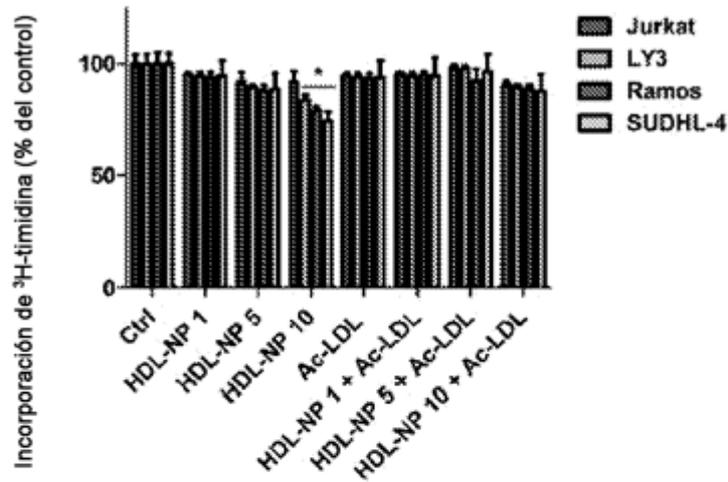


Fig. 5A

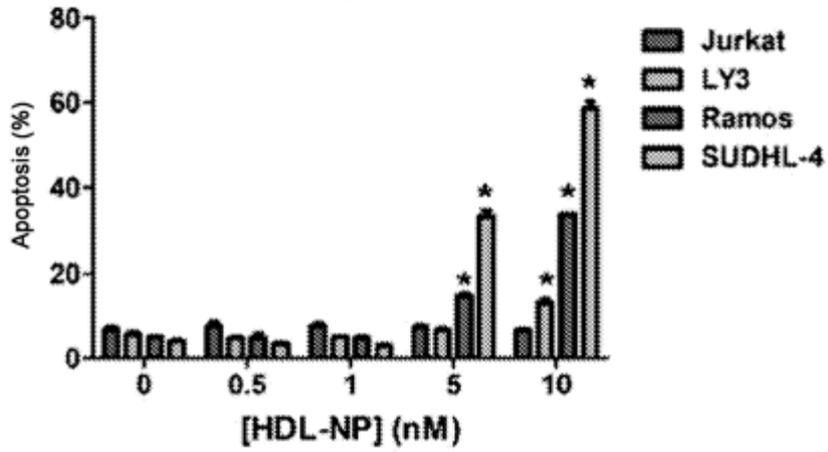


Fig. 5B

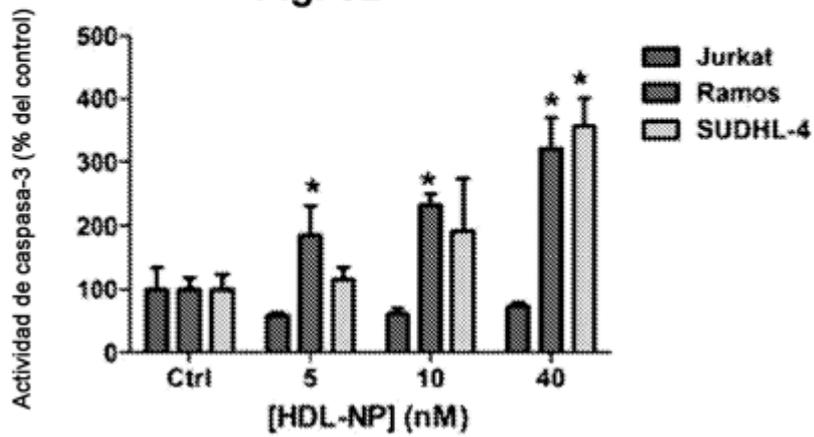


Fig. 5C

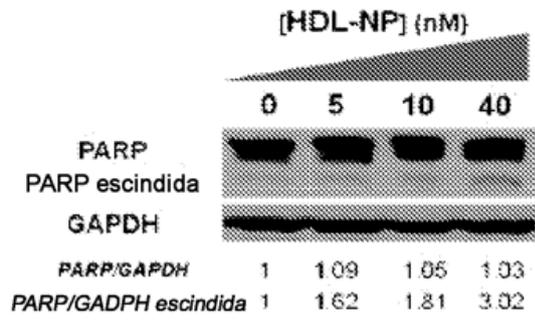


Fig. 5D

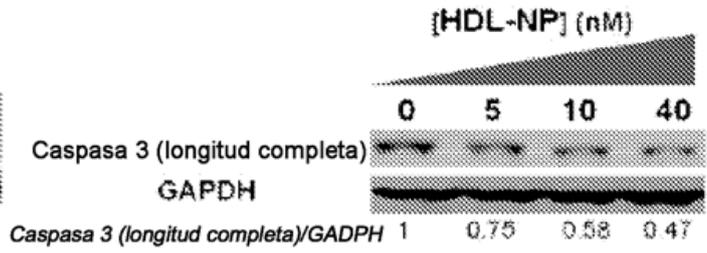


Fig. 5E

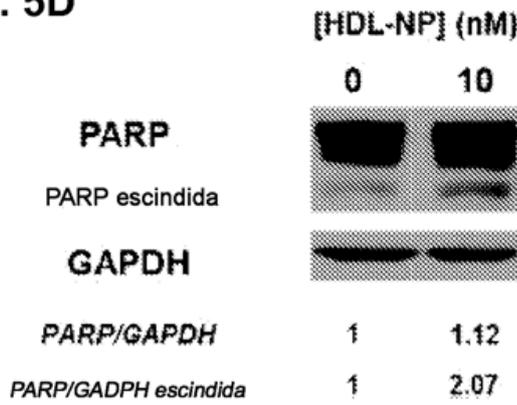


Fig. 5F

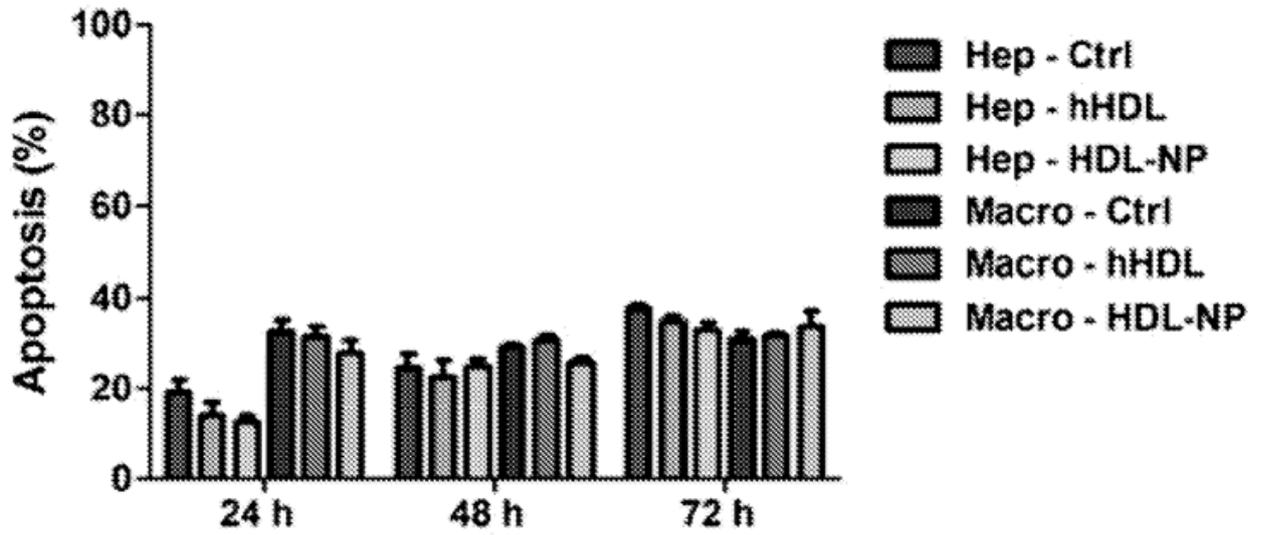


Fig. 6A

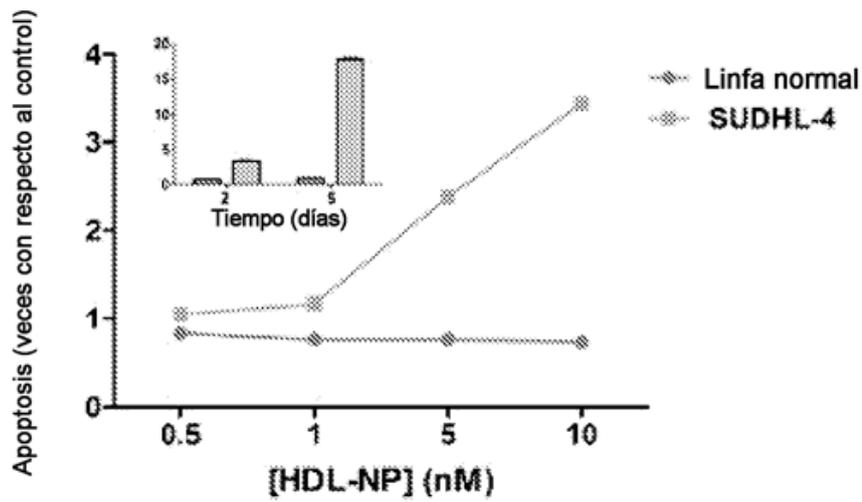
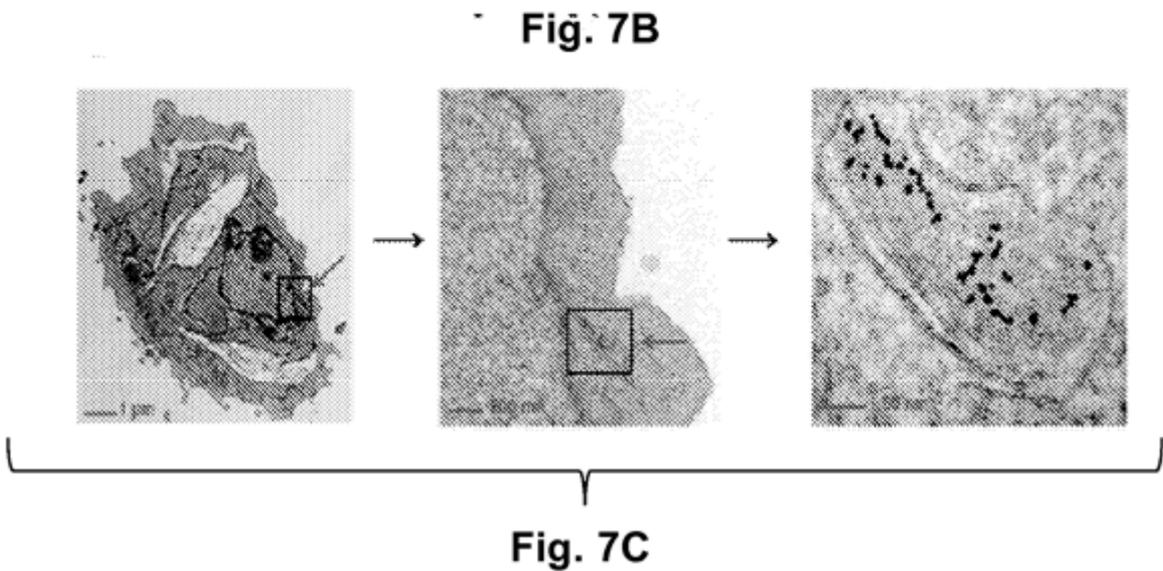
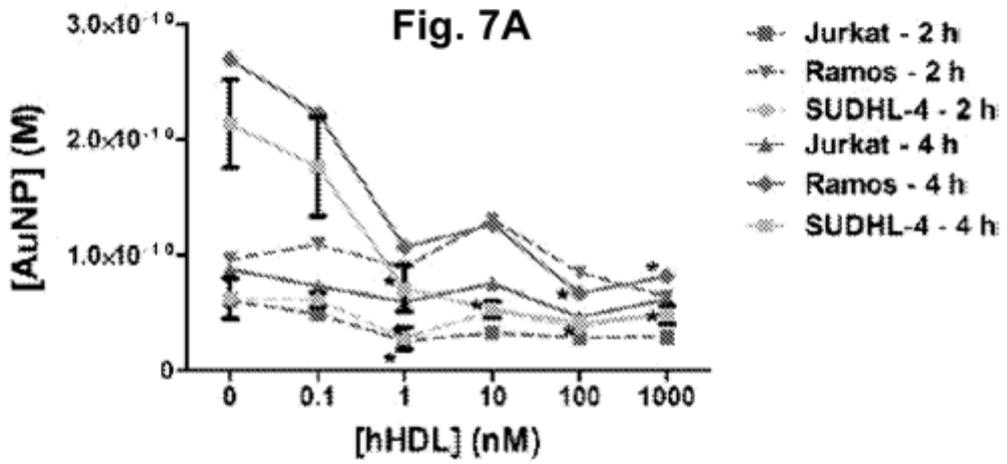
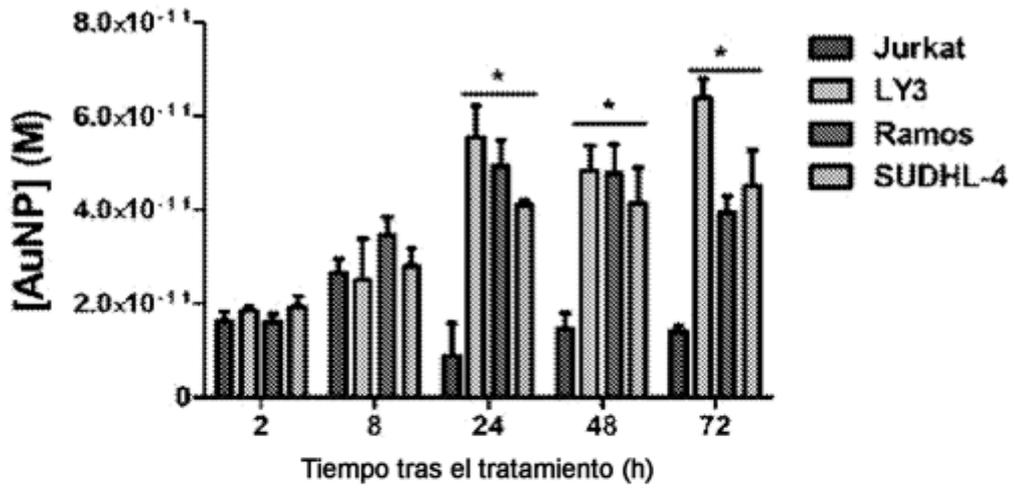


Fig. 6B



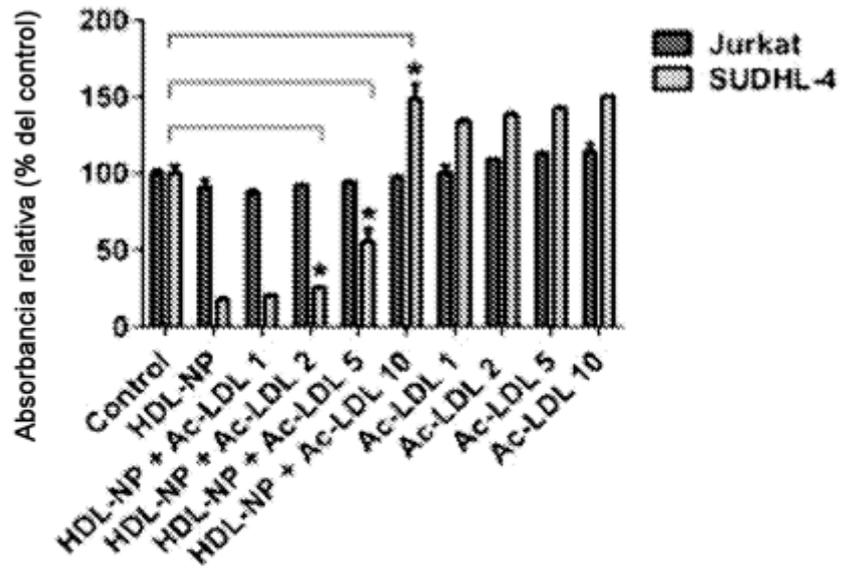


Fig. 8A

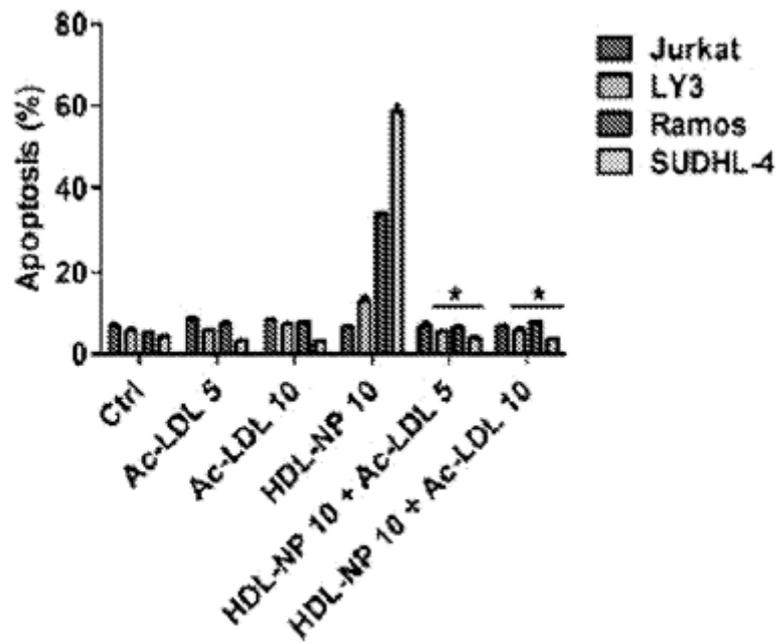


Fig. 8B

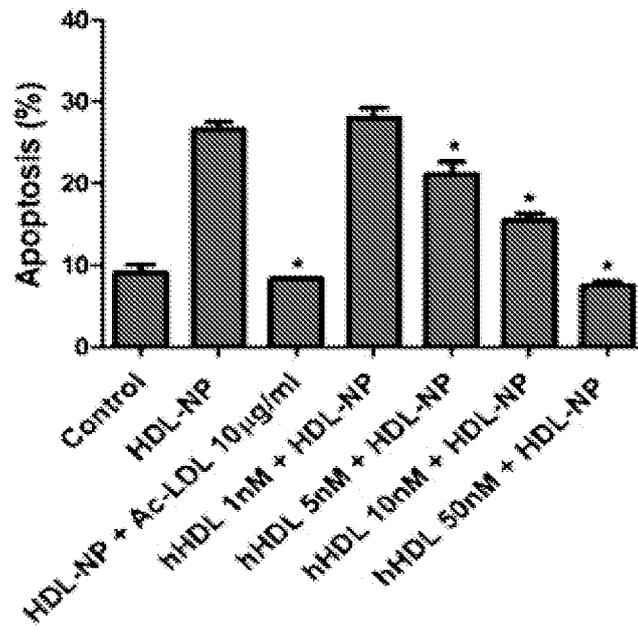


Fig. 8C

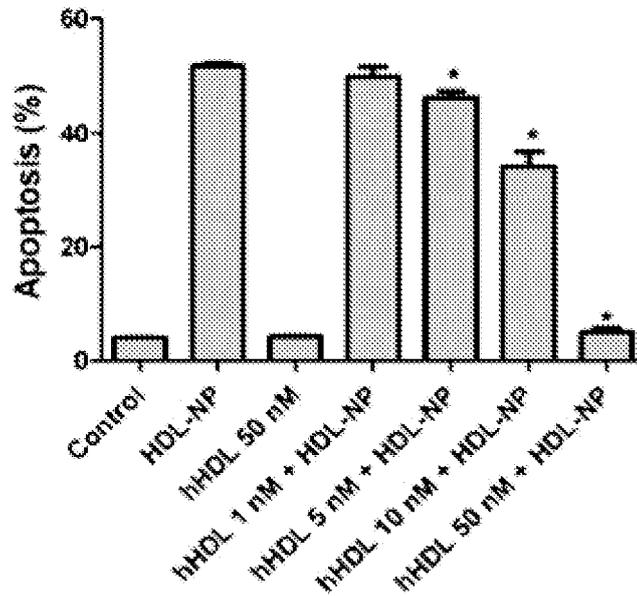


Fig. 8D

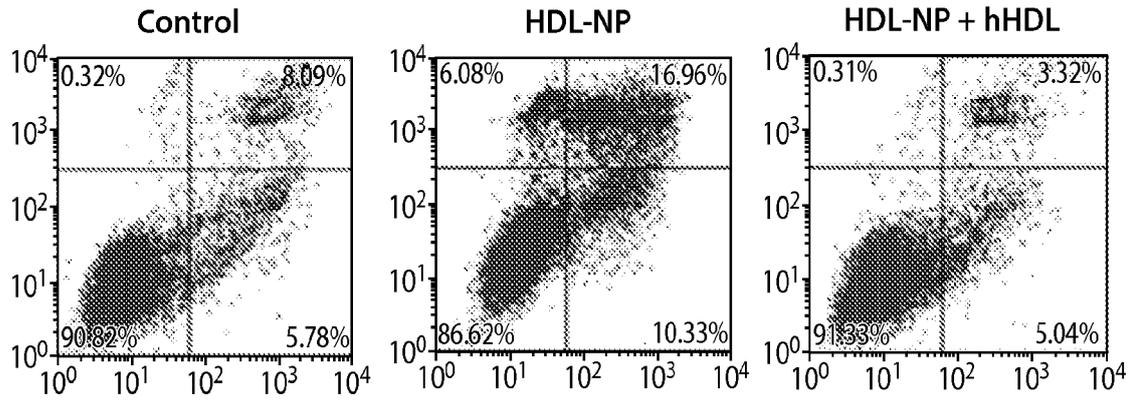


Fig. 8E

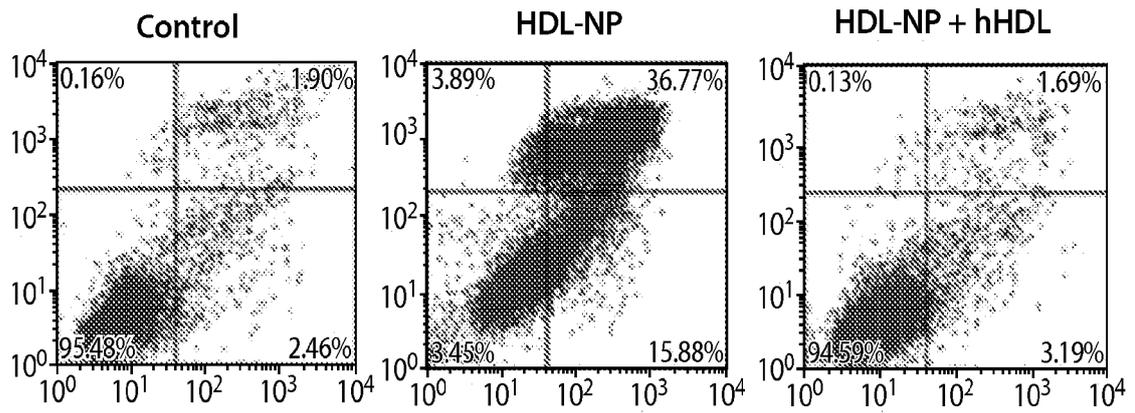


Fig. 8F

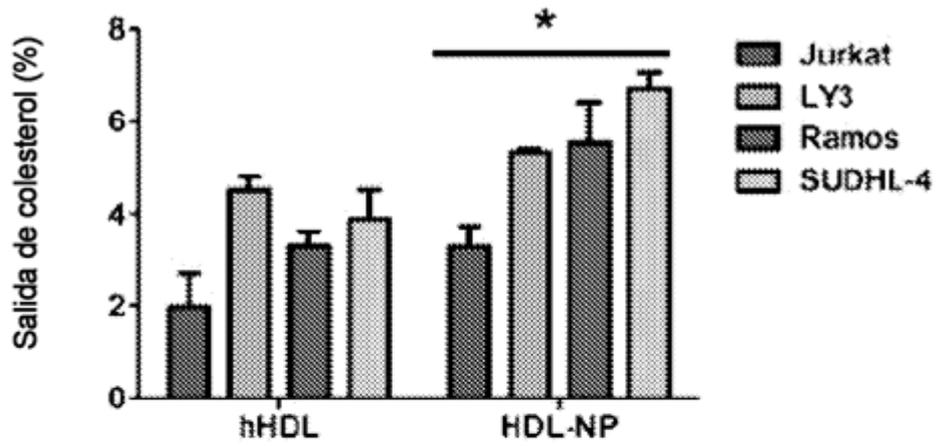


Fig. 9A

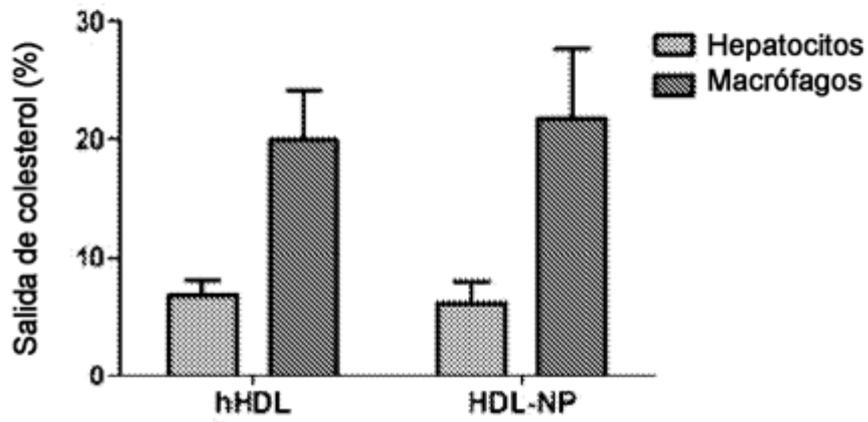


Fig. 9B

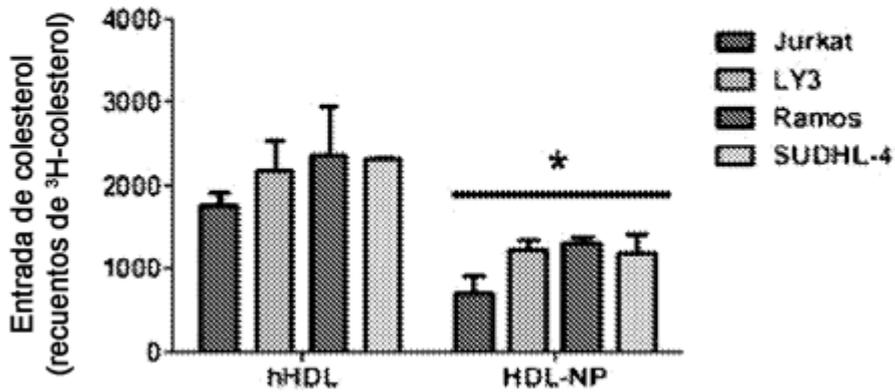


Fig. 9C

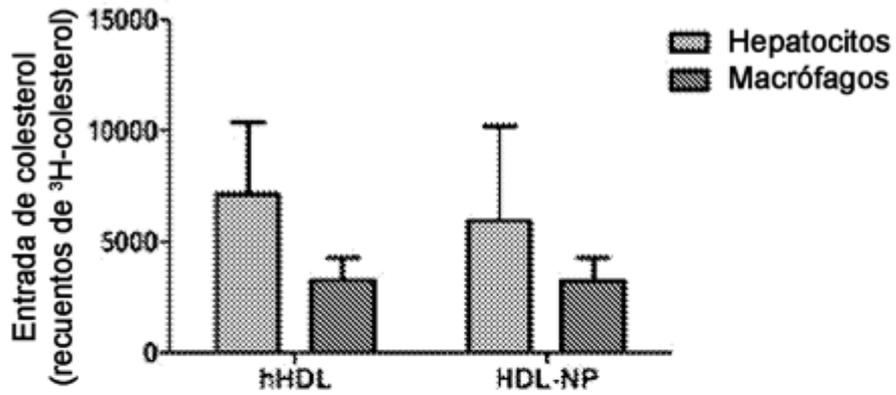


Fig. 9D

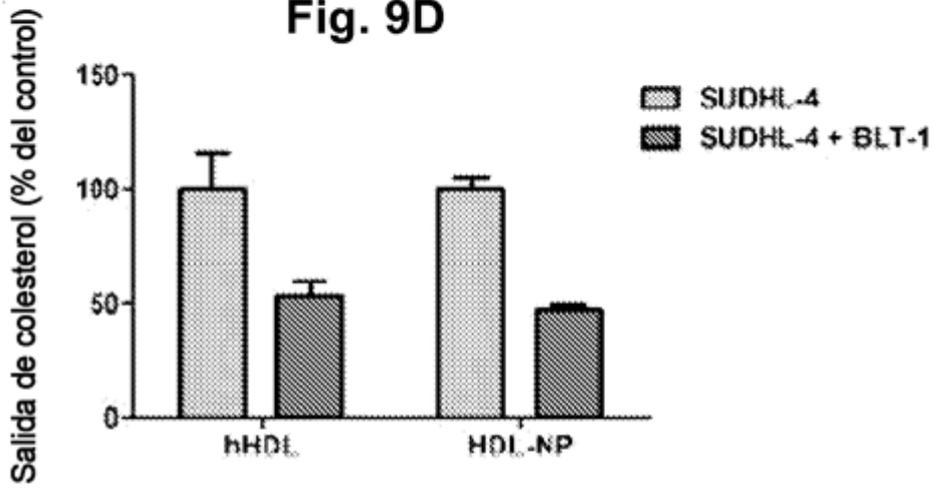


Fig. 9E

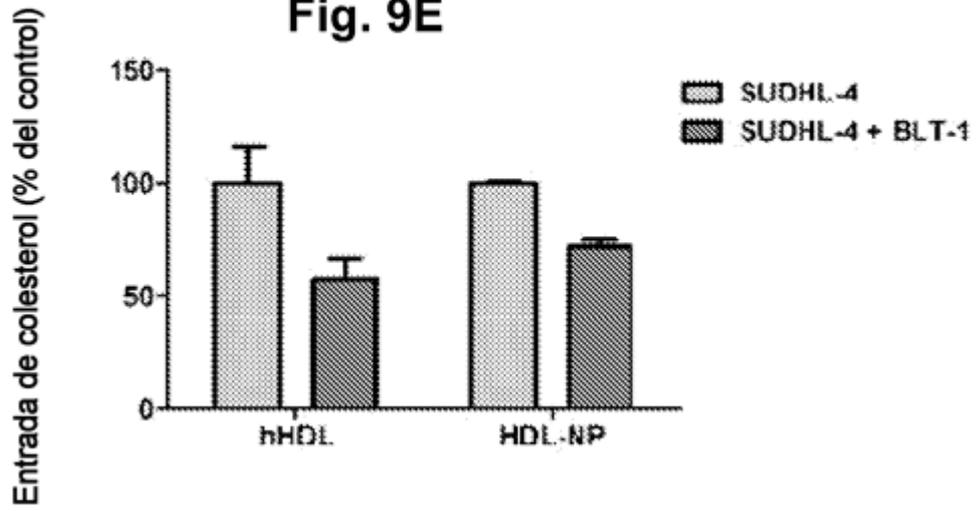


Fig. 9F

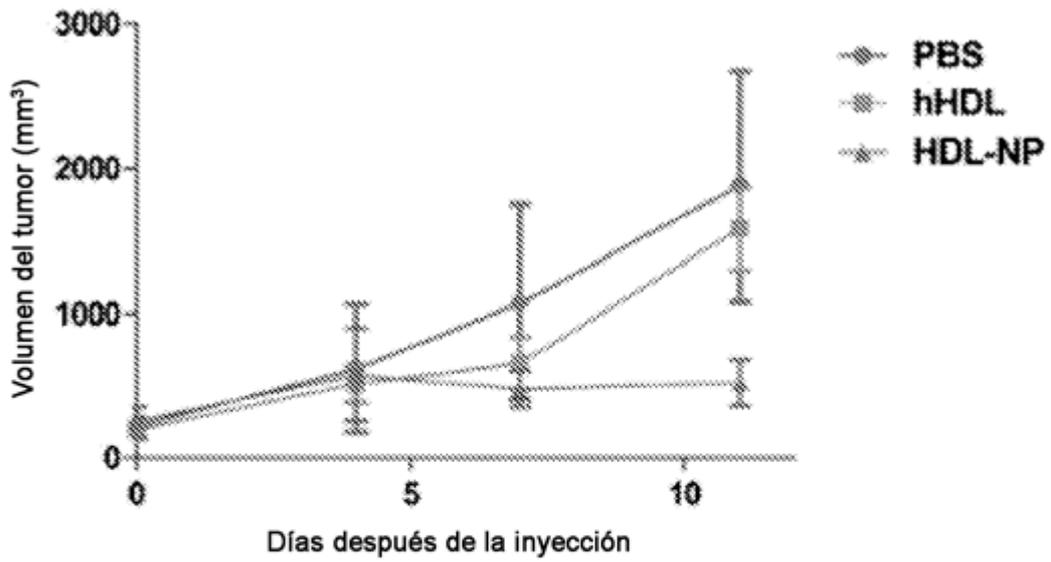


Fig. 10A

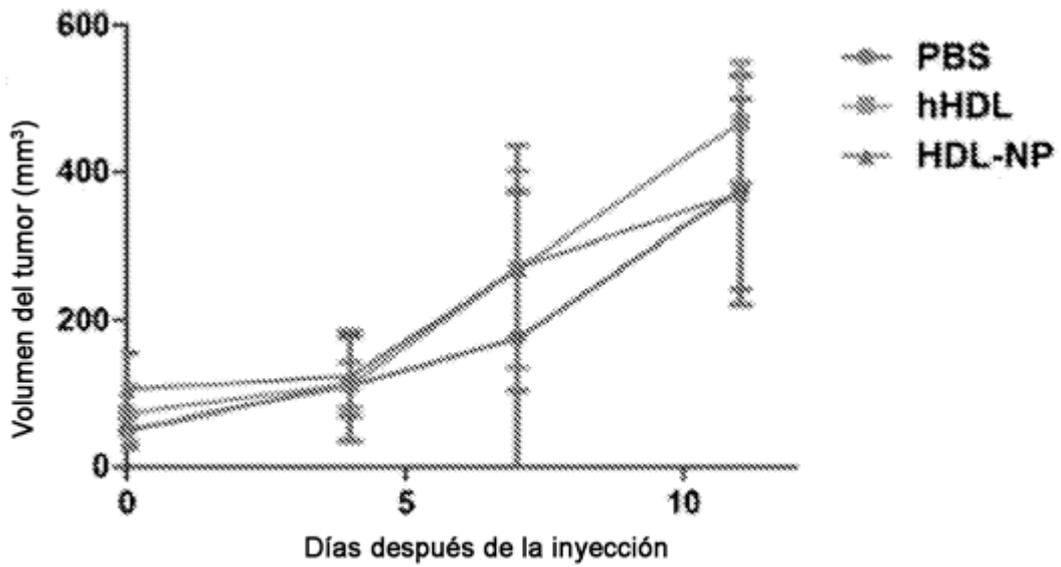


Fig. 10B

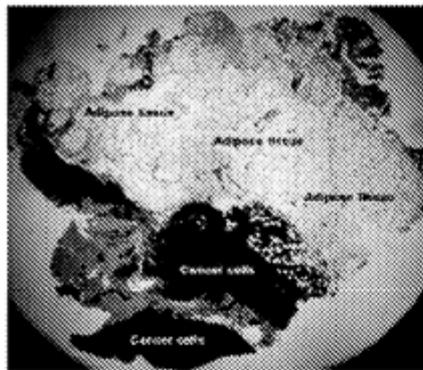
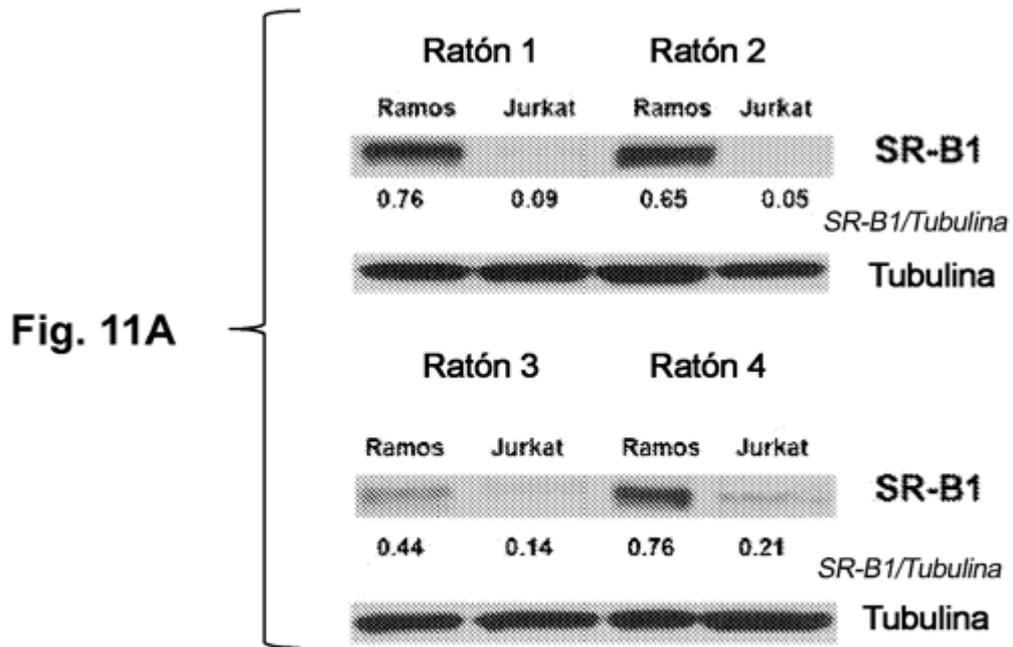


Fig. 11B

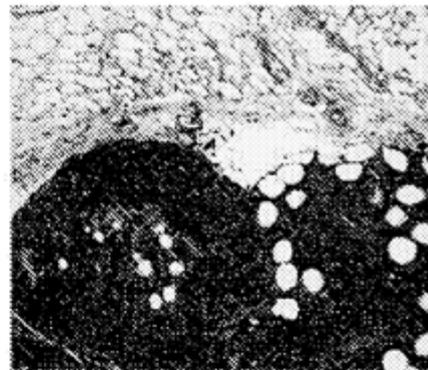


Fig. 11C

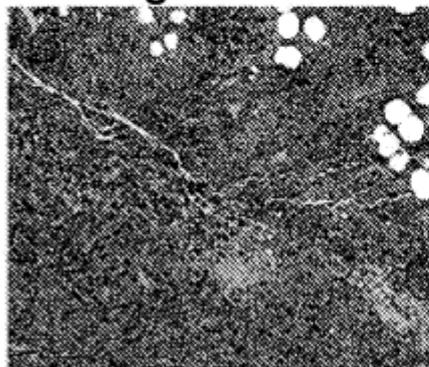


Fig. 11D

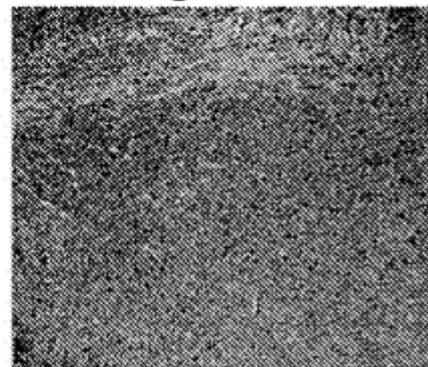
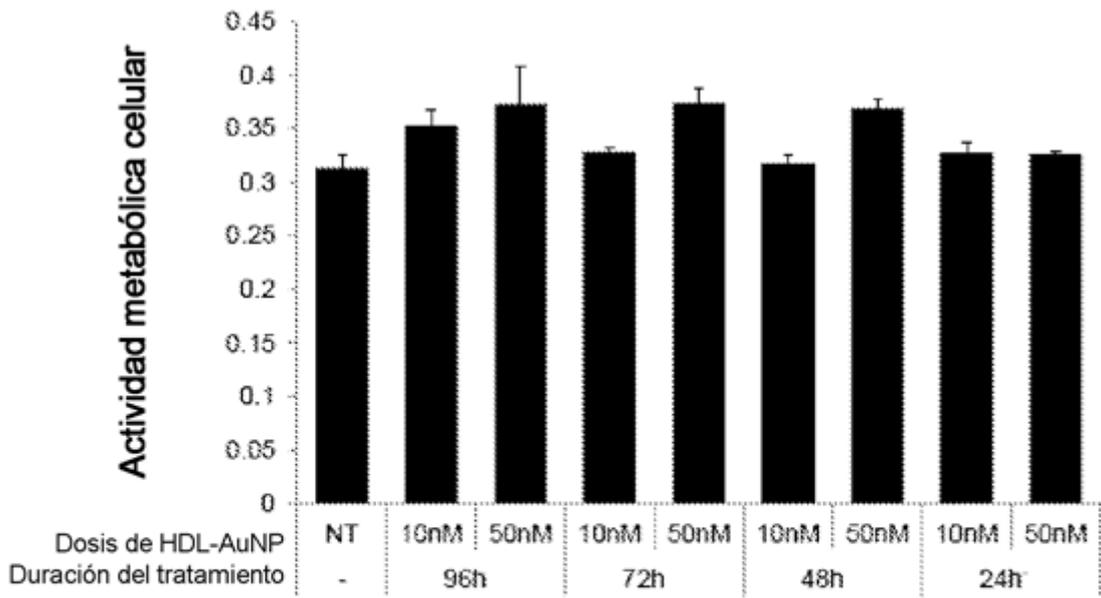


Fig. 11E



NT = no tratadas, control, punto temporal de 96 horas

Fig. 12A

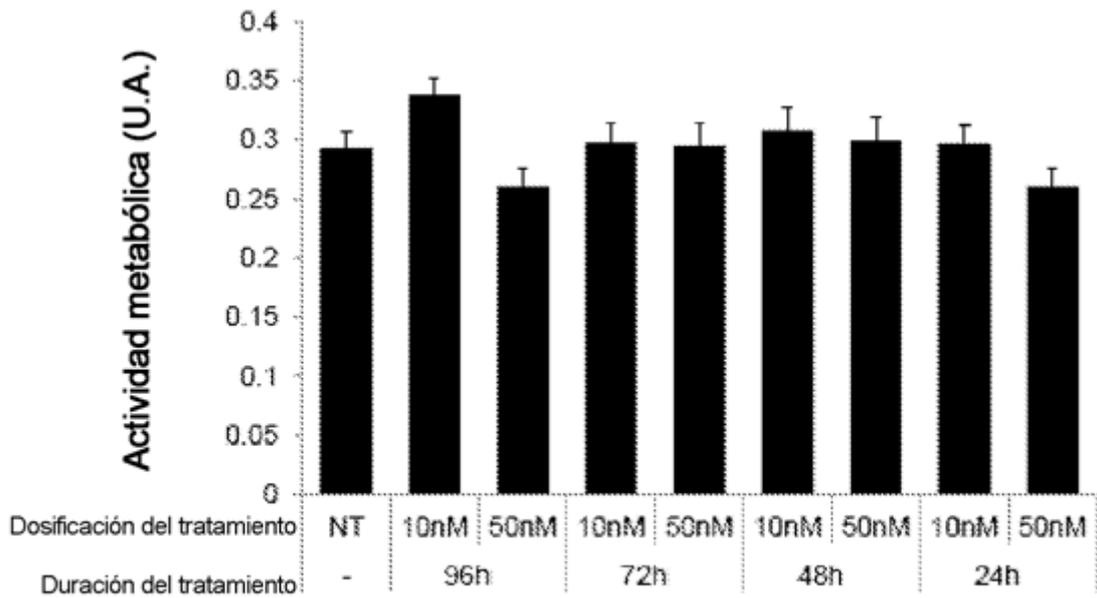


Fig. 12B

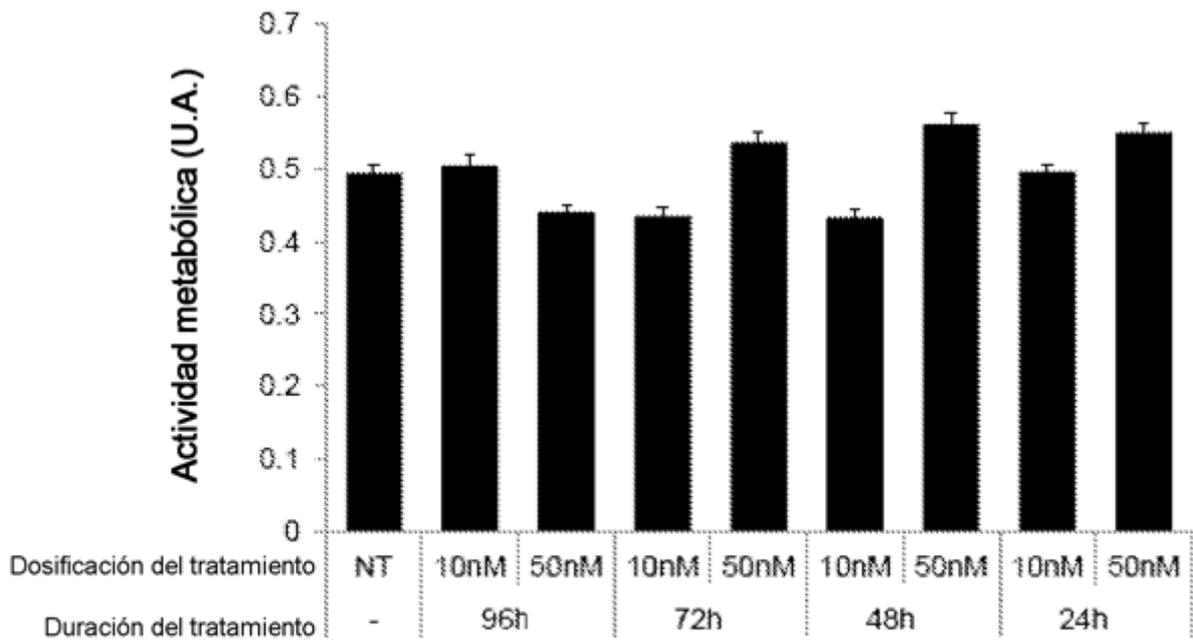


Fig. 12C

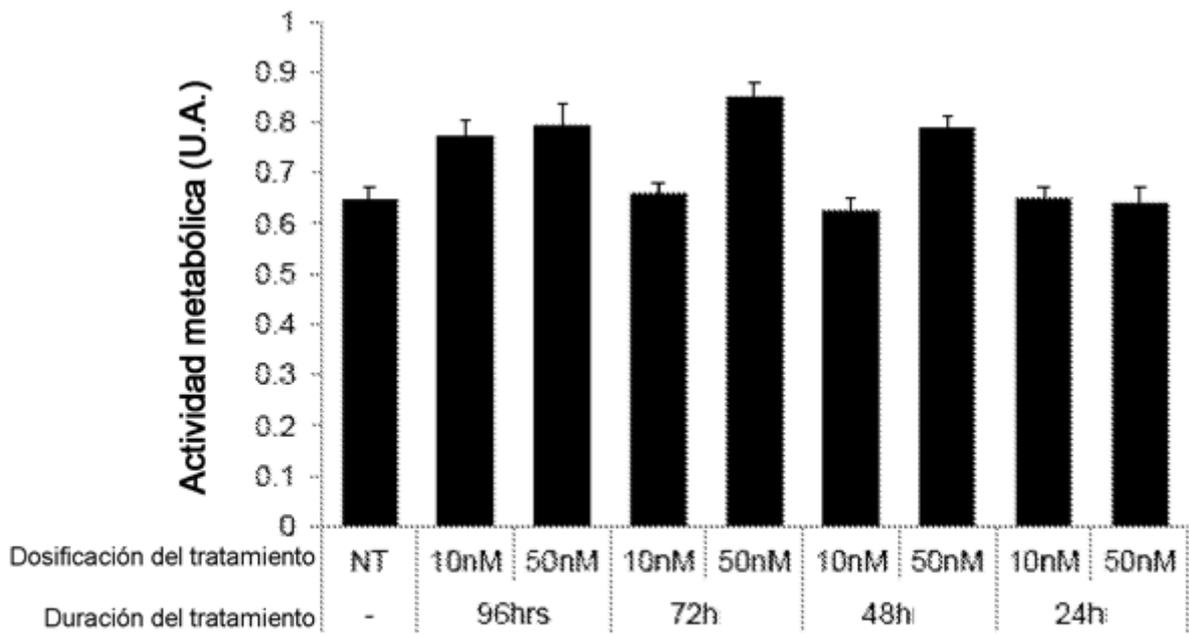


Fig. 12D

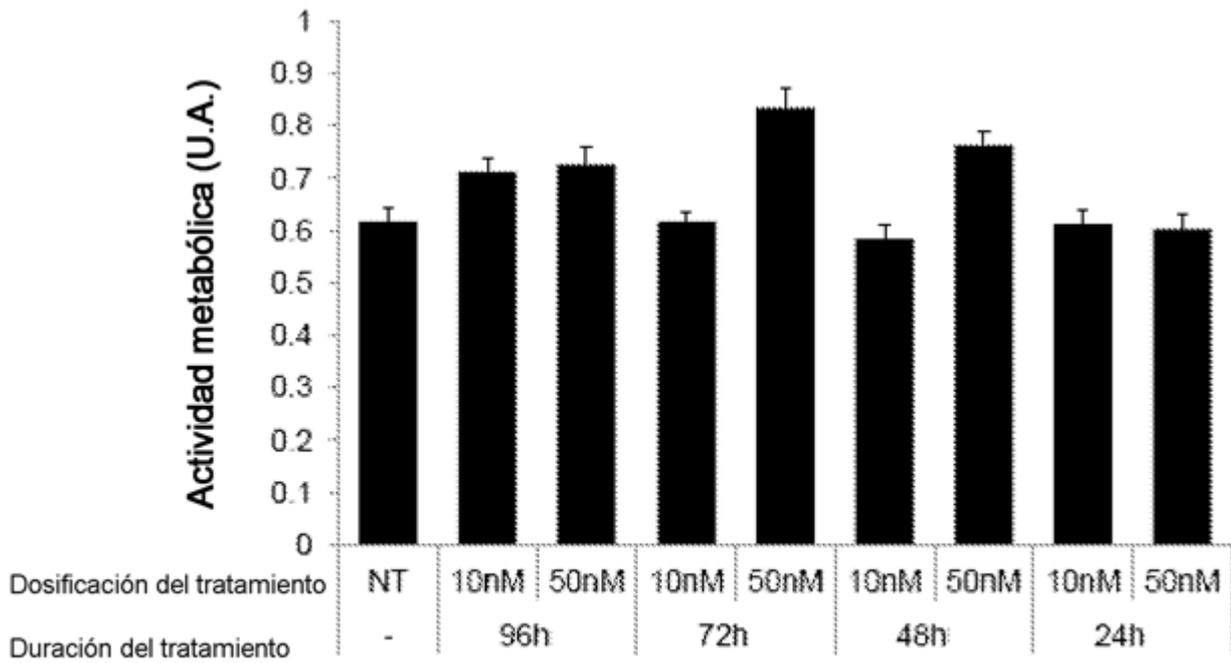


Fig. 12E

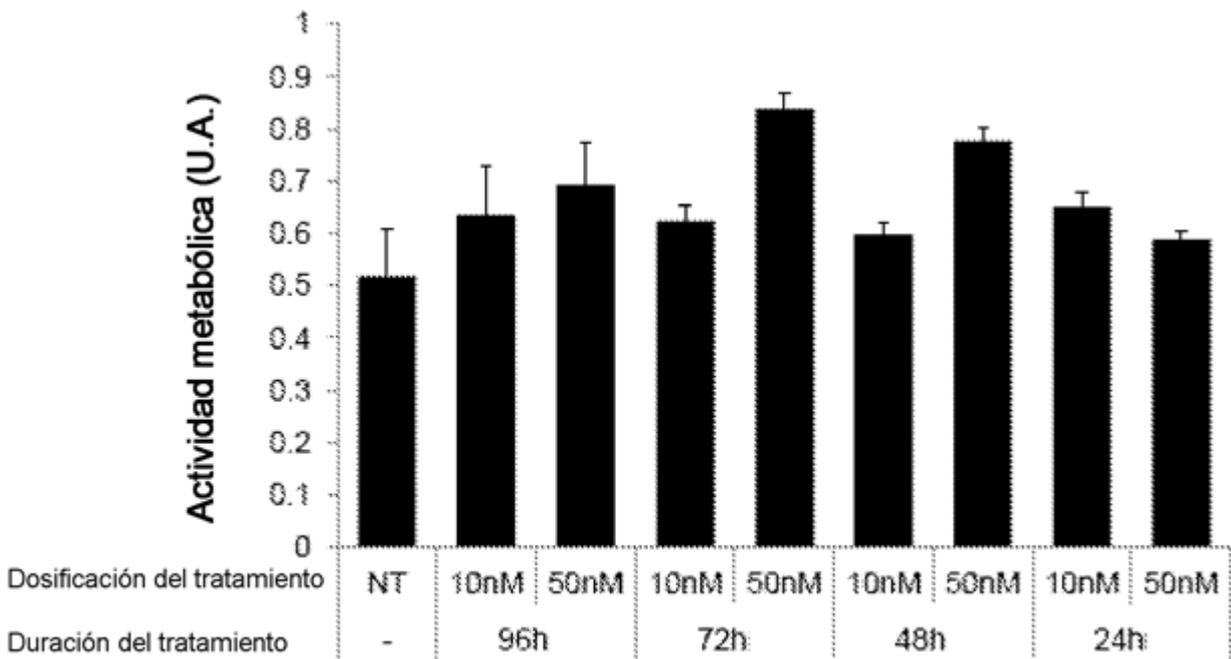


Fig. 12F

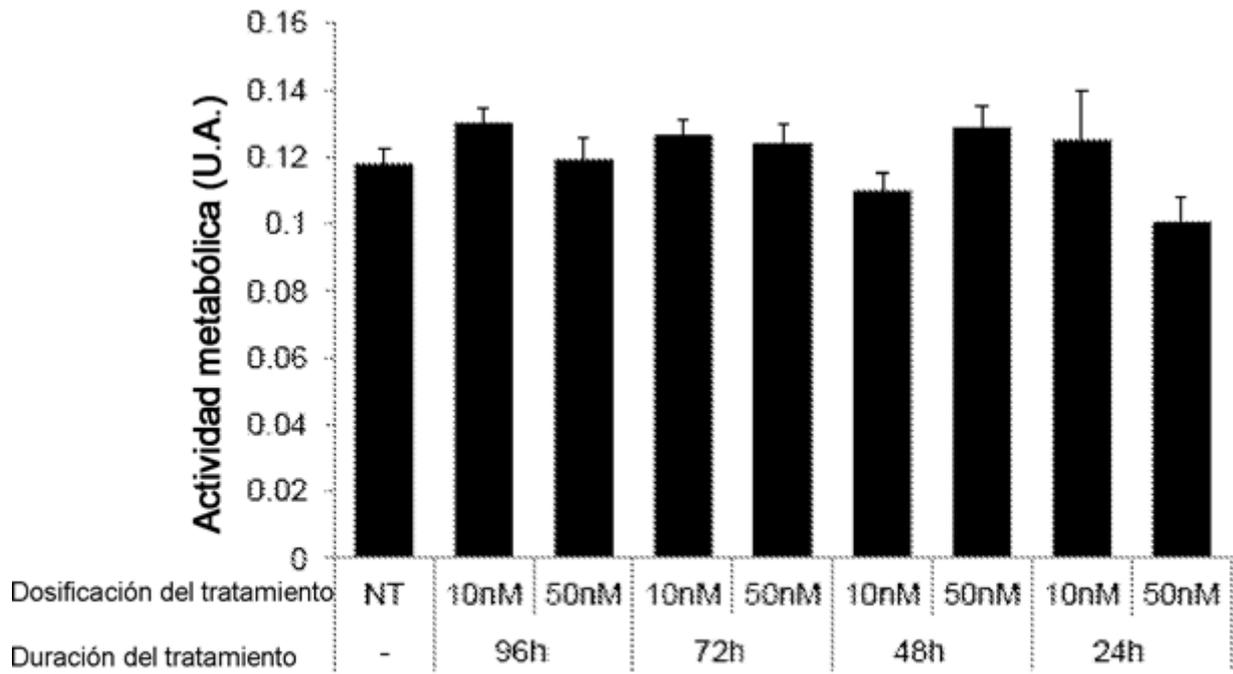


Fig. 12G

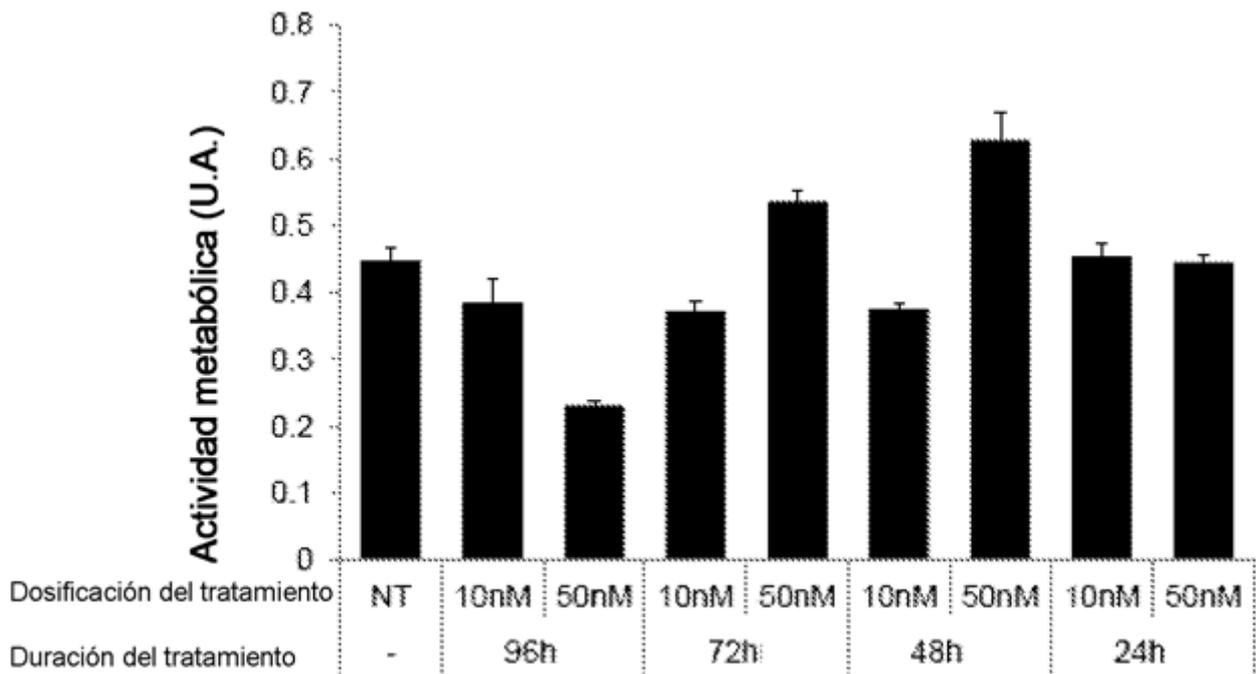


Fig. 12H

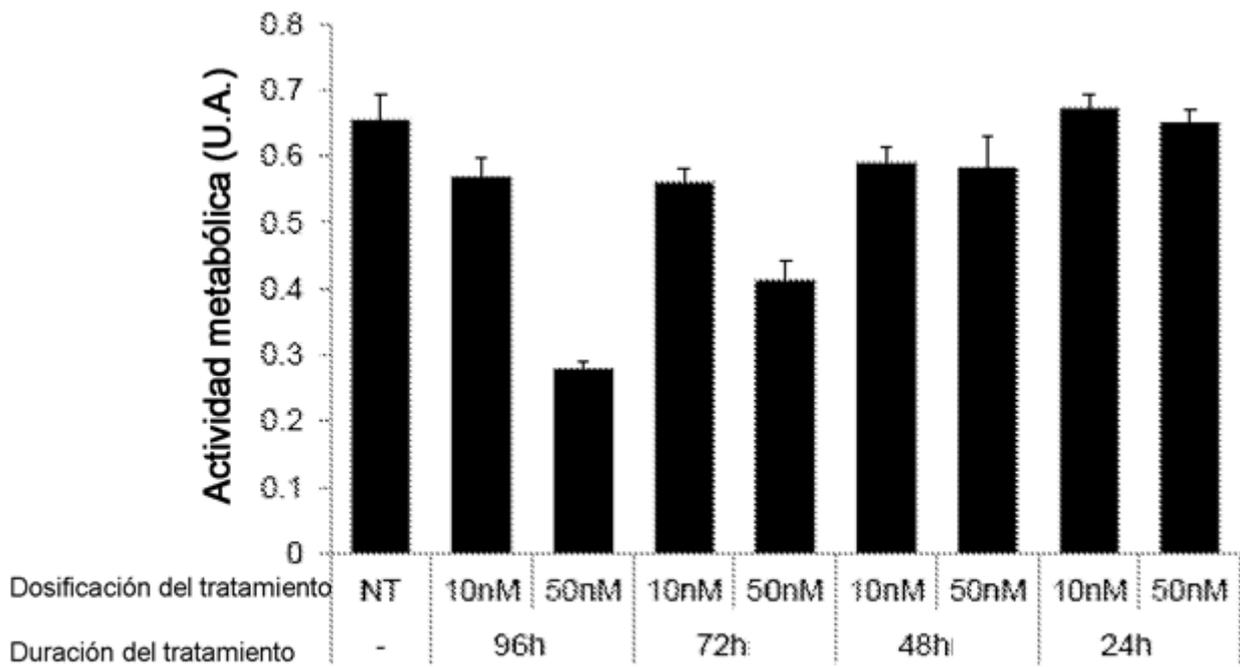


Fig. 12I

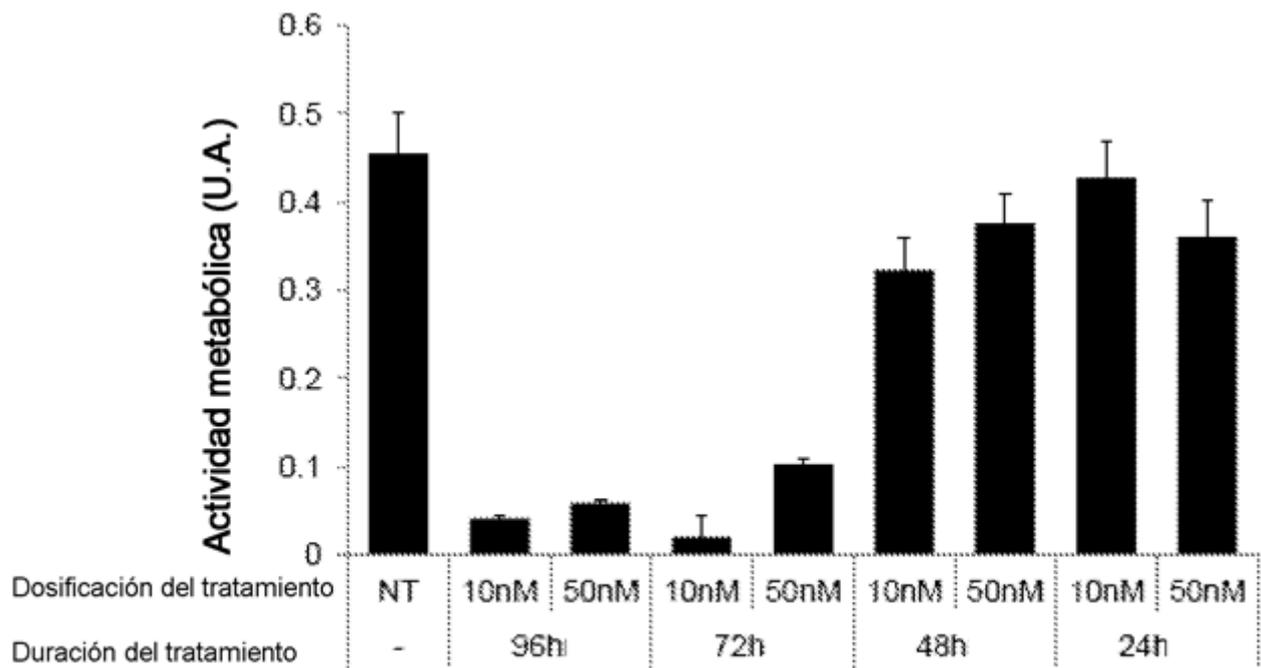


Fig. 12J

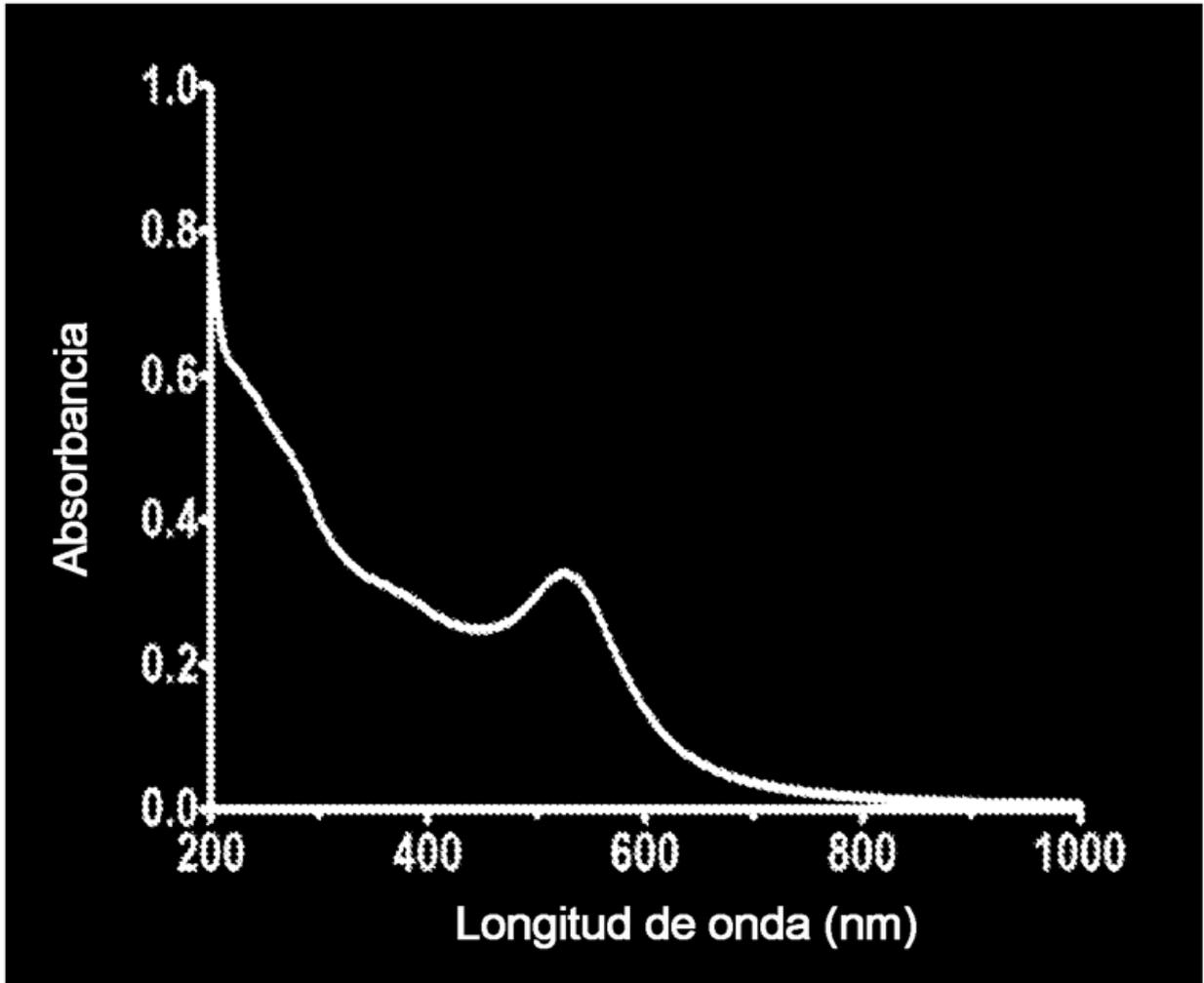


Fig. 13