

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 100**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/54** (2007.01)

**A61K 47/69** (2007.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 9/50** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2007 PCT/US2007/007927**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2008 WO08105773**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2007 E 07873722 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 2007435**

54 Título: **Sistema para el suministro dirigido de agentes terapéuticos**

30 Prioridad:

**31.03.2006 US 788532 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.07.2020**

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
(50.0%)  
5 Cambridge Center, Room NE 25-230  
Cambridge, MA 02142-1493, US y  
THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**FAROKHZAD, OMID, C.;  
CHENG, JIANJUN;  
TEPLEY, BENJAMIN, A.;  
LANGER, ROBERT, S. y  
ZALE, STEPHEN, E.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

### Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 776 100 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

Sistema para el suministro dirigido de agentes terapéuticos

## 5 Antecedentes de la invención

El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos. Más de un millón de personas desarrollan cáncer cada año y aproximadamente la mitad de todos los hombres y un tercio de todas las mujeres en los Estados Unidos desarrollarán cáncer durante sus vidas.

El cáncer de próstata es el segundo tipo de cáncer más común que se encuentra en los hombres estadounidenses (después del cáncer de piel) y la segunda causa principal de muerte por cáncer (después del cáncer de pulmón). La Sociedad Estadounidense del Cáncer (American Cancer Society, ACS) estima que 1 de cada 6 hombres desarrollará cáncer de próstata en su vida y 1 de cada 34 hombres morirá por causa de la enfermedad. La ACS estima adicionalmente que habrá aproximadamente 218.890 casos nuevos de cáncer de próstata y aproximadamente 27.050 muertes atribuibles al cáncer de próstata en los Estados Unidos en 2007.

La mayoría de los cánceres, incluyendo el cáncer de próstata, se tratan con frecuencia mediante una combinación de enfoques, incluyendo la extirpación quirúrgica de un tumor, la quimioterapia y/o la radioterapia. Los procedimientos quirúrgicos por lo general no son suficientes para extirpar un tumor en su totalidad, por lo que la cirugía con frecuencia va acompañada de quimioterapia y/o radioterapia. La quimioterapia implica el uso de fármacos para destruir las células tumorales y la radioterapia implica el tratamiento con rayos de alta energía (por ejemplo, rayos X) para destruir o reducir las células tumorales.

Desafortunadamente, sin embargo, la quimioterapia y la radiación provocan efectos secundarios graves y en ocasiones potencialmente mortales, incluyendo fatiga; náuseas; vómitos; dolor; pérdida de cabello; anemia; problemas del sistema nervioso central; infección; problemas de coagulación de la sangre; problemas de la boca, las encías y la garganta; diarrea; estreñimiento; efectos nerviosos y musculares; efectos renales y vesicales; síntomas similares a los de la gripe; retención de líquidos; y efectos sobre los órganos sexuales.

La quimioterapia provoca efectos secundarios tan graves porque el tratamiento implica la administración sistémica de agentes citotóxicos a un paciente. Estos agentes no pueden distinguir las células tumorales de las células normales y, por tanto, destruyen las células sanas así como las células tumorales. Los efectos secundarios empeoran porque debe administrarse una dosis muy grande al paciente con el fin de suministrarse una dosis terapéuticamente eficaz en el sitio del tumor. Aunque la radioterapia se administra de forma algo más local que la quimioterapia, el tratamiento con radiación aún da como resultado la destrucción del tejido normal en las proximidades del tumor.

Por tanto, el direccionamiento de un agente terapéutico (por ejemplo, a un tejido o tipo celular particular; a un tejido enfermo específico pero no a un tejido normal; etc.) es deseable en el tratamiento de enfermedades específicas de tejido tales como el cáncer (por ejemplo, el cáncer de próstata). Por ejemplo, al contrario que el suministro sistémico de un agente antineoplásico citotóxico, el suministro dirigido podría evitar que el agente destruya células sanas. Adicionalmente, el suministro dirigido permitiría la administración de una dosis más baja del agente, lo que podría reducir los efectos secundarios no deseados asociados habitualmente a la quimioterapia tradicional.

Por tanto, existe una gran necesidad en la técnica de sistemas para suministrarse selectivamente agentes terapéuticos a los tejidos o células deseados. Existe una necesidad adicional de sistemas para dirigir el suministro de agentes antineoplásicos citotóxicos a tumores, tales como los tumores asociados al cáncer de próstata. La capacidad de controlar el nivel y la ubicación precisos de un agente terapéutico en un paciente permitiría reducir las dosis, minimizar los efectos secundarios y abrir nuevas vías para la terapia "personalizada".

## Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y proporciona partículas para suministrarse selectivamente agentes terapéuticos, diagnósticos o profilácticos a tumores asociados al cáncer de próstata.

La presente invención proporciona partículas dirigidas que comprenden una matriz de polímeros, restos de direccionamiento inhibidores de peptidasa a base de urea de molécula pequeña que se unen específicamente al antígeno de membrana específico de próstata (AMEP), en donde los restos de direccionamiento de molécula pequeña se conjugan con los polímeros, y un agente terapéutico, de diagnóstico o profiláctico, en donde el agente está unido a, encapsulado o disperso dentro de las partículas. El agente terapéutico, de diagnóstico o profiláctico es susceptible de suministrarse a la próstata una vez que la diana se une específicamente al resto de direccionamiento.

En algunas realizaciones, las partículas son biodegradables y biocompatibles. En general, se considera que una sustancia es biocompatible si su adición a las células no induce efectos adversos. En general, una sustancia biodegradable es aquella que puede descomponerse en condiciones fisiológicas.

- En general, una partícula de acuerdo con la presente invención es cualquier entidad que tenga la dimensión más grande (por ejemplo, diámetro) inferior a 100 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ). En algunas realizaciones, las partículas de la invención tienen la dimensión más grande inferior a 10  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, las partículas de la invención tienen la dimensión más grande inferior a 1000 nanómetros (nm). En algunas realizaciones, las partículas de la invención tienen la dimensión más grande inferior a 900 nm, 800 nm, 700 nm, 600 nm, 500 nm, 400 nm, 300 nm, 200 nm o 100 nm.
- En algunas realizaciones, las partículas son esferas, esferoides, planas, en forma de placa, cubos, cuboides, óvalos, elipses, cilindros, conos o pirámides. En algunas realizaciones, las partículas son micropartículas (por ejemplo, microesferas). En algunas realizaciones, las partículas son nanopartículas (por ejemplo, nanoesferas). En algunas realizaciones, las partículas son liposomas. En algunas realizaciones, las partículas son micelas. Las partículas pueden ser sólidas o huecas y pueden comprender una o más capas (por ejemplo, nanocubiertas, nanoanillos).
- En algunas realizaciones, una matriz polimérica puede comprender polietilenos, policarbonatos, polianhídridos, polihidroxiácidos, polipropilfumaratos, policaprolactonas, poliamidas, poliacetales, poliéteres, poliésteres, poli(ortoésteres), policianoacrilatos, alcoholes polivinílicos, poliuretanos, polifosfacenos, poliácridatos, polimetacrilatos, poliureas, poliestirenos y/o poliaminas. En algunas realizaciones, una matriz polimérica puede comprender poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), polietilenglicol (PEG) y/o copolímeros de los mismos. En algunas realizaciones, una matriz polimérica puede comprender dendrímeros, proteínas, hidratos de carbono y/o ácidos nucleicos.
- En algunas realizaciones, las partículas pueden comprender opcionalmente uno o más tensioactivos, azúcares, lípidos o ingredientes retardantes de la liberación.
- La diana (es decir, el marcador) es el marcador de cáncer de próstata, antígeno de membrana específico de la próstata (AMEP), una glucoproteína transmembrana de 100 kDa que se expresa en la mayoría de los tejidos prostáticos, pero que se expresa más en el tejido canceroso prostático que en el tejido normal.
- De acuerdo con la presente invención, puede suministrarse cualquier agente, incluyendo, por ejemplo, agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes antineoplásicos), agentes de diagnóstico (por ejemplo, agentes de contraste; radionúclidos; y restos fluorescentes, luminiscentes y magnéticos), agentes profilácticos (por ejemplo, vacunas) y/o agentes nutracéuticos (por ejemplo, vitaminas, minerales, etc.). Los agentes de ejemplo que han de suministrarse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas (por ejemplo, agentes citotóxicos), ácidos nucleicos (por ejemplo, agentes de iARN), proteínas (por ejemplo, anticuerpos), lípidos, hidratos de carbono, hormonas, metales, radiactivo elementos y compuestos, fármacos, vacunas, agentes inmunológicos, etc., y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agente que ha de suministrarse es un agente útil en el tratamiento contra el cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata).
- En algunas realizaciones, el agente que ha de suministrarse puede ser una mezcla de agentes farmacéuticamente activos. En algunas realizaciones, el agente que ha de suministrarse puede ser una mezcla de agentes antineoplásicos. En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención se administran en combinación con uno o más de los agentes antineoplásicos que se describen en el presente documento.
- Las partículas dirigidas de la invención pueden fabricarse usando cualquier método disponible que no interfiera con la función de direccionamiento del resto de direccionamiento. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos se asocian covalentemente a una partícula y la liberación y el suministro del agente terapéutico a un sitio diana se produce interrumpiendo la asociación. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos no se asocian covalentemente a una partícula. Por ejemplo, los agentes terapéuticos pueden estar asociados a la superficie de, encapsulados dentro y/o distribuidos por toda la matriz polimérica. Los agentes terapéuticos pueden liberarse por difusión, degradación de la partícula y/o combinación de las mismas.
- La asociación física puede conseguirse de diversas maneras diferentes. La asociación física puede ser covalente o no covalente y puede implicar o no una etapa de reticulación. La partícula y el agente terapéutico pueden asociarse directamente entre sí, por ejemplo, por uno o más enlaces covalentes, o la asociación puede estar mediada por uno o más enlazadores, al igual que el enlace covalente del resto de direccionamiento a los polímeros. En algunas realizaciones, un enlazador es un enlazador escindible. En algunas realizaciones, un enlazador es un enlazador alifático o heteroalifático. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador de polialquilo. En determinadas realizaciones, el enlazador es un enlazador de poliéter. En determinadas realizaciones, el enlazador es un enlazador de polietileno. En determinadas realizaciones específicas, el enlazador es un enlazador de polietilenglicol (PEG).
- En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de acuerdo con la presente invención pueden usarse para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención pueden usarse para tratar el cáncer de próstata. Las composiciones, de acuerdo con el método de la presente invención, pueden administrarse usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración

eficaces para el tratamiento.

En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la presente invención pueden usarse para diagnosticar una enfermedad, trastorno y/o afección. En determinadas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención pueden usarse para diagnosticar el cáncer de próstata. En algunas realizaciones, dichos métodos de diagnóstico pueden implicar el uso de partículas dirigidas de la invención para detectar y/o localizar físicamente un tumor dentro del cuerpo de un sujeto. En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención comprenden partículas que tienen propiedades intrínsecamente detectables (por ejemplo, partículas magnéticas). En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención comprenden partículas que no tienen propiedades intrínsecamente detectables pero que se asocian a una sustancia que es detectable (por ejemplo, un resto fluorescente o radiactivo).

También se desvelan kits útiles para realizar diversos aspectos de la invención. Un kit puede incluir, por ejemplo, (i) la partícula dirigida de la invención; e (ii) instrucciones para administrar la partícula dirigida a un sujeto que lo necesite.

### Breve descripción de los dibujos

Todos los dibujos se refieren al Ejemplo de Referencia 1.

*Figura 1:* Síntesis de nanopartículas (NP) de PLGA-b-PEG-COOH y asociación de aptámero a nanopartículas. Se encapsuló docetaxel dentro de NP de PLGA-b-PEG-COOH usando el método de nanoprecipitación. Se asoció NP de PLGA-PEG/Docetaxel covalentemente a un aptámero (Apt) de antígeno de membrana específico de próstata (AMEP) A10 terminado en amina en presencia de EDC.

*Figura 2:* Efecto de parámetros de formulación variables sobre el tamaño de las nanopartículas. (A) Relación disolvente:agua variable (1:1, 1:2, 1:5, 1:10) mientras se mantiene constante el polímero PLGA-b-PEG a 10 mg/ml. (B) Concentraciones de polímeros variables en fase orgánica (5, 10, 20 o 50 mg/ml) mientras se mantiene constante la relación disolvente:agua a 1:2.

*Figura 3:* Correlación de tamaños volumétricos de nanopartículas con concentraciones de polímero a una relación disolvente:agua constante.

*Figura 4:* Efecto de la carga de docetaxel sobre la polidispersabilidad de nanopartículas de PLGA-b-PEG.

*Figura 5:* Estabilidad del tamaño de NP de PLGA-b-PEG. (A) Efecto de la centrifugación frente a la ultrafiltración sobre el tamaño de las nanopartículas (12000 x g durante 15 minutos frente a 3000 x g durante 15 minutos). (B) Efecto de la sacarosa antes de la liofilización sobre el tamaño de las nanopartículas, después del almacenamiento y la resuspensión.

*Figura 6:* Confirmación de la asociación nanopartícula-Apt. Se incubó aptámero (Apt) de AMEP A10 con nanopartículas de PLGA-b-PEG en ausencia (-) o presencia (+) de EDC. Las reacciones se resolvieron en una PAGE de TBE al 10 %-Urea directamente o después del lavado para retirar cualquier Apt no asociado. Las bandas correspondientes al Apt de AMEP A10 y a nanopartícula-Apt se indican con flechas. El marcador de peso molecular (PM) de ácido nucleico se muestra a la izquierda.

*Figura 7:* Direccionamiento al tumor mediante nanopartículas de PLGA-b-PEG y nanopartícula-Apt después de la administración sistémica (media  $\pm$  DT; n = 4; \* P < 0,002).

*Figura 8:* Biodistribución sistémica de (A) nanopartículas de PLGA-b-PEG y (B) nanopartícula-Apt (media  $\pm$  DT; n = 4).

### Definiciones

**Aminoácido:** Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que puede incorporarse en una cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, un aminoácido tiene la estructura general  $H_2N-C(H)(R)-COOH$ . En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido de origen natural. En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido sintético; en algunas realizaciones, un aminoácido es un D-aminoácido; en algunas realizaciones, un aminoácido es un L-aminoácido. "Aminoácido convencional" o "aminoácido natural" se refiere a cualquiera de los veinte L-aminoácidos convencionales que se encuentran habitualmente en péptidos de origen natural. "Aminoácido no convencional" se refiere a cualquier aminoácido, distinto de los aminoácidos convencionales, independientemente de si se prepara mediante síntesis o se obtiene de una fuente natural. Como se usa en el presente documento, "aminoácido no natural" abarca aminoácidos producidos químicamente o modificados, incluyendo, pero sin limitación, sales, derivados de aminoácidos (tales como amidas) y/o sustituciones. Los aminoácidos, incluyendo los aminoácidos carboxi y/o amino terminales en péptidos, pueden modificarse mediante metilación, amidación, acetilación y/o sustitución con otros grupos químicos que pueden cambiar la semivida circulante del péptido sin afectar negativamente a su actividad. Los aminoácidos pueden participar en un enlace disulfuro. El término "aminoácido" se usa indistintamente con "resto de aminoácido", y puede referirse a un aminoácido libre y/o a un resto de aminoácido de un péptido. Será evidente a partir del contexto en el que se usa el término si se refiere a un aminoácido libre o a un resto de un péptido.

**Animal:** Como se usa en el presente documento, el término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal que tenga una próstata. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a seres humanos, en cualquier fase de

desarrollo. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a animales no humanos, en cualquier fase de desarrollo. En determinadas realizaciones, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, vacas, un primate y/o un cerdo). En algunas realizaciones, un animal puede ser un animal transgénico, un animal modificado genéticamente mediante ingeniería genética y/o un clon.

**Anticuerpo:** Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier inmunoglobulina, ya sea natural o producida entera o parcialmente de forma sintética. También se incluyen en el término todos los derivados de la misma que mantienen la capacidad de unión específica. El término también incluye cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo o en gran parte homólogo a un dominio de unión de inmunoglobulina. Dichas proteínas pueden derivar de fuentes naturales, o producirse parcial o enteramente de forma sintética. Un anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Un anticuerpo puede ser miembro de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo cualquiera de las clases humanas: IgG, IgM, IgA, IgD y IgE. Como se usan en el presente documento, las expresiones "fragmento de anticuerpo" o "porción característica de un anticuerpo" se usan indistintamente y se refieren a cualquier derivado de un anticuerpo que sea inferior a la longitud completa. En general, un fragmento de anticuerpo conserva al menos una porción significativa de la capacidad de unión específica del anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fv, diacuerpo de dsFv y fragmentos Fd. Un fragmento de anticuerpo puede producirse por cualquier medio. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede producirse enzimática o químicamente mediante la fragmentación de un anticuerpo intacto y/o puede producirse de forma recombinante a partir de un gen que codifica la secuencia de anticuerpo parcial. Como alternativa o adicionalmente, un fragmento de anticuerpo puede producirse entera o parcialmente de forma sintética. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un fragmento de anticuerpo monocatenario. Como alternativa o adicionalmente, un fragmento de anticuerpo puede comprender múltiples cadenas que están unidas entre sí, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un complejo multimolecular. Un fragmento de anticuerpo funcional normalmente comprenderá al menos aproximadamente 50 aminoácidos y más normalmente comprenderá al menos aproximadamente 200 aminoácidos.

**Aproximadamente:** Como se usa en el presente documento, en general se considera que los términos "aproximadamente" o "alrededor" en referencia a un número incluyen números que se encuentran dentro de un intervalo del 5 %, el 10 %, el 15 % o el 20 % en cualquier dirección (superior o inferior) con respecto al número, a menos que se indique lo contrario o sea evidente a partir del contexto (excepto cuando dicho número sea inferior al 0 % o supere el 100 % de un valor posible).

**Asociado a:** Como se usa en el presente documento, la expresión "asociado a" se refiere al estado de dos o más entidades que se unen mediante una interacción covalente o no covalente directa o indirecta. En algunas realizaciones, una asociación es covalente. En algunas realizaciones, una asociación covalente está mediada por un resto enlazador. En algunas realizaciones, una asociación es no covalente (por ejemplo, interacciones de carga, interacciones de afinidad, coordinación de metales, adsorción física, interacciones hospedador-huésped, interacciones hidrófobas, interacciones de apilamiento TT, interacciones de enlace de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electroestáticas, interacciones dipolo-dipolo, etc.). Por ejemplo, en algunas realizaciones, una entidad (por ejemplo, un resto de direccionamiento o un agente terapéutico que ha de suministrarse) puede estar asociada covalentemente a una partícula. En algunas realizaciones, una entidad (por ejemplo, un grupo de direccionamiento o un agente terapéutico que ha de suministrarse) puede estar asociada de forma no covalente a una partícula, (por ejemplo, la entidad puede estar asociada a la superficie de, encapsulada dentro, rodeada por y/o distribuida por toda una matriz polimérica de una partícula de la invención).

**Biocompatible:** Como se usa en el presente documento, el término "biocompatible" se refiere a sustancias que no son tóxicas para las células. En algunas realizaciones, se considera que una sustancia es "biocompatible" si su adición a las células *in vitro* da como resultado una muerte celular menor o igual a aproximadamente el 20 %. En algunas realizaciones, se considera que una sustancia es "biocompatible" si su adición a las células *in vivo* no induce inflamación y/u otros efectos adversos *in vivo*.

**Biodegradable:** Como se usa en el presente documento, el término "biodegradable" se refiere a sustancias que se degradan en condiciones fisiológicas. En algunas realizaciones, una sustancia biodegradable es una sustancia que se descompone por la maquinaria celular. En algunas realizaciones, una sustancia biodegradable es una sustancia que se descompone por procesos químicos.

**Tipo celular:** Como se usa en el presente documento, la expresión "tipo celular" se refiere a una forma de célula que tiene un conjunto distinto de características morfológicas, bioquímicas y/o funcionales que definen el tipo celular. Un experto en la materia reconocerá que un tipo celular puede definirse con niveles variables de especificidad. Por ejemplo, las células endoteliales de la próstata y las células endoteliales del sistema circulatorio son tipos celulares distintos, que pueden distinguirse entre sí, pero comparten determinadas características que son características del tipo celular "endotelial" más amplio del que los dos son miembros. Normalmente, las células de diferentes tipos pueden distinguirse entre sí basándose en su expresión diferencial de diversos genes que se denominan en la técnica "marcadores" de un tipo o tipos celulares particulares (por ejemplo, tipos celulares de un linaje particular). Un "marcador específico de tipo celular" es un producto génico o versión modificada del mismo que se expresa a un

nivel significativamente mayor por uno o más tipos celulares que por todos o la mayoría de los otros tipos celulares y cuya expresión es característica de ese tipo celular. Muchos marcadores específicos de tipo celular son reconocidos como tales en la técnica. De manera similar, un "marcador específico de tejido" es aquel que es expresado a un nivel significativamente mayor por células de un tipo que es característico de un tejido particular que por células que son características de la mayoría o de todos los demás tejidos.

*Porción característica:* Como se usa en el presente documento, la expresión "porción característica" de una sustancia, en el sentido más amplio, es aquella que comparte algún grado de secuencia y/o identidad estructural y/o al menos una característica funcional con la sustancia intacta pertinente. Por ejemplo, una "porción característica" de un polinucleótido es aquella que contiene un tramo continuo de nucleótidos, o una colección de tramos continuos de nucleótidos, que juntos son característicos de un polinucleótido. En algunas realizaciones, cada tramo continuo de este tipo generalmente contendrá al menos 2, 5, 10, 15, 20 o más nucleótidos. En algunas realizaciones, la porción característica puede ser biológicamente activa.

*Gen:* Como se usa en el presente documento, el término "gen" tiene el significado que se entiende en la técnica. Los expertos habituales en la materia apreciarán que el término "gen" puede incluir secuencias reguladoras de genes (por ejemplo, promotores, potenciadores, etc.) y/o secuencias intrónicas. Se apreciará adicionalmente que las definiciones de gen incluyen referencias a ácidos nucleicos que no codifican proteínas sino que codifican moléculas de ARN (por ejemplo, moléculas de ARN funcionales, tales como ARNr y/o ARNt).

*Producto génico o producto de expresión:* Como se usa en el presente documento, las expresiones "producto génico" o "producto de expresión" generalmente se refieren a un ARN transcrito a partir del gen (pre y/o post-procesamiento) o un polipéptido (pre y/o post-modificación) codificado por un ARN transcrito a partir del gen.

*Homología:* Como se usa en el presente documento, el término "homología" se refiere a la relación global entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. En algunas realizaciones, se considera que las moléculas poliméricas son "homólogas" entre sí si sus secuencias son idénticas en al menos un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 %. En algunas realizaciones, se considera que las moléculas poliméricas son "homólogas" entre sí si sus secuencias son similares en al menos un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 %.

*Identidad:* Como se usa en el presente documento, el término "identidad" se refiere a la relación global entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. El cálculo del porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, puede realizarse alineando las dos secuencias con fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas secuencias de ácido nucleico primera y segunda para una alineación óptima y pueden descartarse secuencias no idénticas con fines de comparación). En determinadas realizaciones, la longitud de una secuencia alineada con fines de comparación es al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o un 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Después se comparan los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando se ocupa una posición en la primera secuencia por el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden lograrse usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el algoritmo de Meyers y Miller (CABIOS, 1989, 4: 11-17), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) usando una tabla de restos de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse, como alternativa, usando el programa GAP en el paquete de software GCG usando una matriz NWSgapdna.CMP.

*In vitro:* Como se usa en el presente documento, la expresión "*in vitro*" se refiere a eventos que se producen en un entorno artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en cultivo celular, etc., en lugar de dentro de un organismo (por ejemplo, animal, planta y/o microbio).

*In vivo:* Como se usa en el presente documento, la expresión "*in vivo*" se refiere a eventos que se producen dentro de un organismo (por ejemplo, animal, planta y/o microbio).

*Ácido nucleico:* Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que puede incorporarse en una cadena de oligonucleótidos. Como se usa en el presente documento, las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" pueden usarse indistintamente. En algunas realizaciones, "ácido nucleico" abarca ARN, así como ADN monocatenario y/o bicatenario, y/o ADNc. Además, las expresiones "ácido nucleico", "ADN", "ARN" y/o términos similares incluyen análogos de ácido nucleico,

es decir, análogos que tienen una cadena principal diferente del fosfodiéster. Por ejemplo, los denominados "ácidos nucleicos peptídicos", que son conocidos en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en la cadena principal, se consideran dentro del alcance de la presente invención. La expresión "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y/o codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y/o ARN pueden incluir intrones. Los ácidos nucleicos pueden purificarse a partir de fuentes naturales, producirse usando sistemas de expresión recombinantes y, opcionalmente, purificarse, sintetizarse químicamente, etc. Cuando sea adecuado, por ejemplo, en el caso de moléculas sintetizadas químicamente, los ácidos nucleicos pueden comprender análogos de nucleósidos tales como análogos que tengan bases o azúcares modificados químicamente, modificaciones de la cadena principal, etc. La expresión "secuencia de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, puede referirse al propio material de ácido nucleico y no se restringe a la información de secuencia (por ejemplo, la sucesión de letras elegidas, por ejemplo, entre las cinco letras base A, G, C, T o U) que caracteriza bioquímicamente un ácido nucleico específico, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN. Una secuencia de ácido nucleico se presenta en la dirección 5' a 3' a menos que se indique lo contrario. La expresión "segmento de ácido nucleico" se usa en el presente documento para referirse a una secuencia de ácido nucleico que es una porción de una secuencia de ácido nucleico más larga. En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" o "polinucleótido" comprende nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina); análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metil adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y 2-tiocitidina); bases modificadas químicamente; bases modificadas biológicamente (por ejemplo, bases metiladas); bases intercaladas; azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa); y/o grupos fosfato modificados (por ejemplo, fosforotioatos y enlaces de 5'-N-fosforamidita).

**Partícula:** Como se usa en el presente documento, una "partícula" se refiere a cualquier entidad que tenga un diámetro inferior a 100 micrómetros (µm). Normalmente, las partículas tienen la dimensión más larga (por ejemplo, diámetro) de 1000 nm o menos. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 300 nm o menos. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de 200 nm o menos. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de 100 nm o menos. En general, las partículas son de mayor tamaño que el límite de excreción renal, pero son lo suficientemente pequeñas como para evitar la acumulación en el hígado. En algunas realizaciones, una población de partículas puede ser relativamente uniforme en términos de tamaño, forma y/o composición. En general, las partículas de la invención son biodegradables y/o biocompatibles. Las partículas de la invención pueden ser sólidas o huecas y pueden comprender una o más capas. En algunas realizaciones, las partículas son esferas, esferoides, planas, en forma de placa, cubos, cuboides, óvalos, elipses, cilindros, conos o pirámides. Las partículas comprenden una matriz de polímeros. En algunas realizaciones, la matriz está reticulada. En algunas realizaciones, la formación de la matriz implica una etapa de reticulación. En algunas realizaciones, la matriz no está sustancialmente reticulada. En algunas realizaciones, la formación de la matriz no implica una etapa de reticulación. Las partículas de la invención pueden ser micropartículas, nanopartículas, liposomas y/o micelas. Como se usa en el presente documento, el término "nanopartícula" se refiere a cualquier partícula que tenga un diámetro inferior a 1000 nm.

**Puro:** Como se usa en el presente documento, una sustancia y/o entidad es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. Por ejemplo, una preparación que contiene más de aproximadamente el 90 % de una sustancia o entidad particular normalmente se considera una preparación pura. En algunas realizaciones, una sustancia y/o entidad tiene una pureza de al menos el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %.

**Similitud:** Como se usa en el presente documento, el término "similitud" se refiere a la relación global entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. El cálculo del porcentaje de similitud de las moléculas poliméricas entre sí puede realizarse de la misma manera que el cálculo del porcentaje de identidad, excepto por que el cálculo del porcentaje de similitud tiene en cuenta las sustituciones conservadoras como se entiende en la técnica.

**Molécula pequeña:** En general, una "molécula pequeña" se entiende en la técnica como una molécula orgánica que tiene un tamaño inferior a aproximadamente 2000 g/mol. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es inferior a aproximadamente 1500 g/mol o inferior a aproximadamente 1000 g/mol. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es inferior a aproximadamente 800 g/mol o inferior a aproximadamente 500 g/mol. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas son no poliméricas y/o no oligoméricas. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas no son proteínas, péptidos o aminoácidos. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas no son ácidos nucleicos o nucleótidos. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas no son sacáridos o polisacáridos.

**Unión específica:** Como se usa en el presente documento, la expresión "unión específica" se refiere a la asociación

física no covalente de un primer y un segundo resto en donde la asociación entre los restos primero y segundo es al menos 10 veces tan fuerte, al menos 50 veces tan fuerte o al menos 100 veces tan fuerte como la asociación de cualquier resto con la mayoría o todos los demás restos presentes en el entorno en el que se produce la unión. La unión de dos o más entidades puede considerarse específica si la constante de disociación en equilibrio,  $K_d$ , es de  $10^{-3}$  M o menos,  $10^{-4}$  M o menos,  $10^{-5}$  M o menos,  $10^{-6}$  M o menos,  $10^{-7}$  M o menos,  $10^{-8}$  M o menos,  $10^{-9}$  M o menos,  $10^{-10}$  M o menos,  $10^{-11}$  M o menos o  $10^{-12}$  M o menos en las condiciones empleadas, por ejemplo, en condiciones fisiológicas tales como aquellas dentro de una célula o coherentes con la supervivencia celular. En algunas realizaciones, la unión específica puede lograrse mediante una pluralidad de interacciones más débiles (por ejemplo, una pluralidad de interacciones individuales, en donde cada interacción individual se caracteriza por una  $K_d$  superior a  $10^{-3}$  M). En algunas realizaciones, la unión específica, que puede denominarse "reconocimiento molecular", es una interacción de unión saturable entre dos entidades que depende de la orientación complementaria de los grupos funcionales de cada entidad. Los ejemplos de interacciones de unión específica incluyen interacciones diana aptámero-aptámero, interacciones anticuerpo-antígeno, interacciones avidina-biotina, interacciones ligando-receptor, interacciones metal-quelato, hibridación entre ácidos nucleicos complementarios, etc.

**Sujeto:** Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier organismo al que se le pueda administrar una composición de la presente invención, por ejemplo, con fines experimentales, de diagnóstico y/o terapéuticos. Los sujetos típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y seres humanos) y/o plantas.

**Que padece:** Un individuo que "padece" una enfermedad, trastorno y/o afección ha sido diagnosticado con o muestra uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección.

**Susceptible a:** Un individuo que es "susceptible a" una enfermedad, trastorno y/o afección no ha sido diagnosticado y/o puede no presentar síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, cáncer) puede caracterizarse por uno o más de los siguientes: (1) una mutación genética asociada al desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, una mutación en un gen que codifica un oncogén); (2) un polimorfismo genético asociado al desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, un polimorfismo en la región promotora de un gen que codifica un oncogén); (3) el aumento y/o disminución de la expresión y/o actividad de una proteína asociada a la enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, sobreexpresión del receptor de EGF o TGF- $\alpha$ ); (4) hábitos y/o estilos de vida asociados al desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, tabaquismo u obesidad); (5) antecedentes familiares de la enfermedad, trastorno o afección (por ejemplo, progenitor con cáncer); (6) infección por un microbio asociado al desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, infección por un virus como el VPH). En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección no desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección.

**Dirigido:** En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento se une específicamente a la diana en condiciones estrictas. Una partícula dirigida de la invención que comprende un resto de direccionamiento se considera "dirigida" si el resto de direccionamiento se une específicamente a la diana, suministrando de este modo toda la composición de partículas dirigidas a la próstata.

**Resto de direccionamiento:** El resto de direccionamiento de la presente invención es una molécula pequeña como se define en las reivindicaciones adjuntas.

**Cantidad terapéuticamente eficaz:** Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un agente terapéutico y/o de diagnóstico (por ejemplo, partícula dirigida de la invención) que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar y/o diagnosticar la enfermedad, trastorno y/o afección.

**Agente terapéutico:** Como se usa en el presente documento, la expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que, cuando se administra a un sujeto, tiene un efecto terapéutico y/o diagnóstico y/o desencadena un efecto biológico y/o farmacológico deseado.

**Tratamiento:** Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia, parcial o totalmente, de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección particular. Por ejemplo, "tratar" el cáncer puede referirse a inhibir la supervivencia, el crecimiento y/o la propagación de un tumor. El tratamiento puede administrarse a un sujeto que no presenta signos de una enfermedad, trastorno y/o afección, y/o a un sujeto que presenta solamente signos precoces de una enfermedad, trastorno y/o afección con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar la patología asociada a la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende el suministro de una partícula dirigida de la invención a un sujeto.

## Descripción detallada de determinadas divulgaciones preferidas



En el presente documento se describen sistemas para suministrarse selectivamente agentes terapéuticos a órganos, tejidos, células y/o compartimentos intracelulares particulares. En determinadas divulgaciones, los agentes terapéuticos han de suministrarse específicamente a tejidos enfermos. En determinadas divulgaciones específicas, los agentes terapéuticos han de suministrarse específicamente a tumores (por ejemplo, tumores malignos o tumores benignos). En divulgaciones específicas, los agentes terapéuticos han de suministrarse a tumores asociados a cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata).

La presente invención proporciona partículas dirigidas que comprenden una matriz de polímeros, restos de direccionamiento inhibidores de peptidasa a base de urea de molécula pequeña que se unen específicamente al AMEP, en donde los restos de direccionamiento de molécula pequeña se conjugan con los polímeros, y un agente terapéutico, de diagnóstico o profiláctico, en donde el agente está unido a, encapsulado o disperso dentro de la partícula.

#### *Partículas*

En algunas realizaciones, las partículas son biodegradables y biocompatibles. En general, una sustancia biocompatible no es tóxica para las células. En algunas realizaciones, se considera que una sustancia es biocompatible si su adición a las células da como resultado menos de un determinado umbral de muerte celular. En algunas realizaciones, se considera que una sustancia es biocompatible si su adición a las células no induce efectos adversos. En general, una sustancia biodegradable es aquella que se descompone en condiciones fisiológicas en el transcurso de un período de tiempo terapéuticamente pertinente (por ejemplo, semanas, meses o años). En algunas realizaciones, una sustancia biodegradable es una sustancia que puede descomponerse por la maquinaria celular. En algunas realizaciones, una sustancia biodegradable es una sustancia que puede descomponerse por procesos químicos. En algunas realizaciones, una partícula es una sustancia que es tanto biocompatible como biodegradable. En algunas realizaciones, una partícula es una sustancia que es biocompatible, pero no biodegradable. En algunas realizaciones, una partícula es una sustancia que es biodegradable, pero no biocompatible.

En algunas realizaciones, una partícula que es biocompatible y/o biodegradable puede asociarse a un agente terapéutico que no es biocompatible, no es biodegradable, o ni es biocompatible ni biodegradable (por ejemplo, un agente citotóxico). En algunas realizaciones, una partícula que es biocompatible y/o biodegradable puede asociarse a un agente terapéutico que también es biocompatible y/o biodegradable.

En general, una partícula de acuerdo con la presente invención es cualquier entidad que tenga la dimensión más grande (por ejemplo, diámetro) inferior a 100 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ). En algunas realizaciones, las partículas de la invención tienen la dimensión más grande inferior a 10  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, las partículas de la invención tienen la dimensión más grande inferior a 1000 nanómetros (nm). En algunas realizaciones, las partículas de la invención tienen la dimensión más grande inferior a 900 nm, 800 nm, 700 nm, 600 nm, 500 nm, 400 nm, 300 nm, 200 nm o 100 nm. Normalmente, las partículas de la invención tienen la dimensión más grande (por ejemplo, diámetro) de 300 nm o menos. En algunas realizaciones, las partículas de la invención tienen la dimensión más grande (por ejemplo, diámetro) de 250 nm o menos. En algunas realizaciones, las partículas de la invención tienen la dimensión más grande (por ejemplo, diámetro) de 200 nm o menos. En algunas realizaciones, las partículas de la invención tienen la dimensión más grande (por ejemplo, diámetro) de 150 nm o menos. En algunas realizaciones, las partículas de la invención tienen la dimensión más grande (por ejemplo, diámetro) de 100 nm o menos. En algunas realizaciones de la invención se usan partículas más pequeñas, por ejemplo, que tienen la dimensión más grande de 50 nm o menos. En algunas realizaciones, las partículas de la invención tienen la dimensión más grande que varía entre 25 nm y 200 nm.

En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 1000 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 750 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 500 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 450 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 400 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 350 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 300 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 275 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 250 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 225 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 200 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 175 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 150 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 125 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 100 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 75 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 50 nm. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de aproximadamente 25 nm.

En determinadas realizaciones, las partículas tienen un tamaño superior al límite de excreción renal (por ejemplo, partículas que tienen diámetros superiores a 6 nm). En determinadas realizaciones, las partículas son lo suficientemente pequeñas como para evitar el aclaramiento de partículas del torrente sanguíneo por el hígado (por

ejemplo, partículas que tienen diámetros inferiores a 1000 nm). En general, las características fisicoquímicas de las partículas deberían permitir que una partícula dirigida circule más tiempo en el plasma disminuyendo la excreción renal y el aclaramiento hepático.

- 5 Con frecuencia es deseable usar una población de partículas que sea relativamente uniforme en términos de tamaño, forma y/o composición de manera que cada partícula tenga propiedades similares. Por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de las partículas pueden tener un diámetro o la dimensión más grande dentro del 5 %, el 10 % o el 20 % del diámetro promedio o la dimensión más grande. En algunas realizaciones, una población de partículas puede ser heterogénea con respecto al tamaño, forma y/o composición.

- 10 El potencial zeta es una medida del potencial superficial de una partícula. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta que varía entre -50 mV y +50 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta que varía entre -25 mV y +25 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta que varía entre -10 mV y +10 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta que varía entre -5 mV y +5 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta que varía entre 0 mV y +50 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta que varía entre 0 mV y +25 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta que varía entre 0 mV y +10 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta que varía entre 0 mV y +5 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta que varía entre -50 mV y 0 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta que varía entre -25 mV y 0 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta que varía entre -10 mV y 0 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta que varía entre -5 mV y 0 mV. En algunas realizaciones, las partículas tienen un potencial zeta sustancialmente neutro (es decir, aproximadamente 0 mV).

- 25 Puede usarse diversas partículas diferentes de acuerdo con la presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas. En algunas realizaciones, las partículas son esferas o esferoides. En algunas realizaciones, las partículas son esferas o esferoides. En algunas realizaciones, las partículas son planas o en forma de placa. En algunas realizaciones, las partículas son cubos o cuboides. En algunas realizaciones, las partículas son óvalos o elipses. En algunas realizaciones, las partículas son cilindros, conos o pirámides.

- 30 En algunas realizaciones, las partículas son micropartículas (por ejemplo, microesferas). En general, una "micropartícula" se refiere a cualquier partícula que tenga un diámetro inferior a 1000  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, las partículas son nanopartículas (por ejemplo, nanoesferas). En general, una "nanopartícula" se refiere a cualquier partícula que tenga un diámetro inferior a 1000 nm. En algunas realizaciones, partículas son picopartículas (por ejemplo, picoesferas). En general, una "picopartícula" se refiere a cualquier partícula que tenga un diámetro inferior a 1 nm. En algunas realizaciones, las partículas son liposomas. En algunas realizaciones, las partículas son micelas.

- Las partículas pueden ser sólidas o huecas y pueden comprender una o más capas (por ejemplo, nanocubiertas, nanoanillos). En algunas realizaciones, cada capa tiene una composición única y propiedades únicas con respecto a la otra capa o capas. Por proporcionar un solo ejemplo, las partículas pueden tener una estructura de núcleo/cubierta, en donde el núcleo es una capa y la cubierta es una segunda capa. Las partículas pueden comprender una pluralidad de capas diferentes. En algunas realizaciones, una capa puede estar sustancialmente reticulada, una segunda capa no está sustancialmente reticulada y así sucesivamente. En algunas realizaciones, una, algunas o todas las capas diferentes pueden comprender uno o más agentes terapéuticos que han de suministrarse. En algunas realizaciones, una capa comprende un agente terapéutico que ha de suministrarse, una segunda capa no comprende un agente terapéutico que ha de suministrarse y así sucesivamente. En algunas realizaciones, cada capa individual comprende un agente terapéutico diferente o un conjunto de agentes terapéuticos que han de suministrarse.

- 50 En determinadas realizaciones de la invención, una partícula es porosa, lo que significa que la partícula contiene orificios o canales, que normalmente son pequeños en comparación con el tamaño de una partícula. Las partículas pueden tener poros que varían de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 50 nm de diámetro, por ejemplo, entre aproximadamente 1 y 20 nm de diámetro. Entre aproximadamente el 10 % y el 95 % del volumen de una partícula puede consistir en huecos dentro de los poros o canales.

- 55 Las partículas pueden tener una capa de recubrimiento. El uso de una capa de recubrimiento biocompatible puede ser ventajoso, por ejemplo, si las partículas contienen materiales que son tóxicos para las células. Los materiales de recubrimiento adecuados incluyen, pero sin limitación, proteínas naturales tales como albúmina sérica bovina (BSA), polímeros hidrófilos biocompatibles tales como polietilenglicol (PEG) o un derivado de PEG, fosfolípido-(PEG), sílice, lípidos, polímeros, hidratos de carbono tales como dextrano, otras nanopartículas que pueden asociarse a las nanopartículas de la invención, etc. Los recubrimientos pueden aplicarse o ensamblarse de diversas maneras, tal como mediante inmersión, usando una técnica capa-por-capas, mediante auto-ensamblaje, conjugación, etc. El auto-ensamblaje se refiere a un proceso de ensamblaje espontáneo de una estructura de orden superior que se basa en la atracción natural de los componentes de la estructura de orden superior (por ejemplo, moléculas) entre sí. Normalmente se produce a través de movimientos aleatorios de las moléculas y de la formación de enlaces en función del tamaño, la forma, la composición o las propiedades químicas.

En algunas realizaciones, las partículas pueden comprender opcionalmente uno o más medios de dispersión, tensioactivos o ingredientes retardantes de la liberación. En algunas realizaciones, las partículas pueden comprender opcionalmente uno o más plastificantes o aditivos.

## 5 Partículas que comprenden una matriz polimérica

Las partículas comprenden una matriz de polímeros. En algunas realizaciones, un agente terapéutico puede asociarse covalentemente a la superficie de una matriz polimérica. En algunas realizaciones, la asociación covalente está mediada por un enlazador. En algunas realizaciones, un agente terapéutico puede asociarse de forma no covalente a la superficie de una matriz polimérica.

Se conoce una amplia diversidad de polímeros y métodos para formar partículas a partir de los mismos en la técnica del suministro de fármacos. En algunas realizaciones de la invención, la matriz de una partícula comprende uno o más polímeros. Puede usarse cualquier polímero de acuerdo con la presente invención. Los polímeros pueden ser polímeros naturales o no naturales (sintéticos). Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros que comprendan dos o más monómeros. En términos de secuencia, los copolímeros pueden ser aleatorios, de bloque o comprender una combinación de secuencias aleatorias y de bloque. Normalmente, los polímeros de acuerdo con la presente invención son polímeros orgánicos.

Los ejemplos de polímeros incluyen polietilenos, policarbonatos (por ejemplo, poli(1,3-dioxan-2-ona)), polianhídridos (por ejemplo, poli(anhídrido sebácico)), polihidroxiácidos (por ejemplo, poli( $\beta$ -hidroxialcanoato)), polipropilfumaratos, policaprolactonas, poliamidas (por ejemplo, policaprolactama), poliacetales, poliéteres, poliésteres (por ejemplo, polilactida, poliglicolida), poli(ortoésteres), policianoacrilatos, alcoholes polivinílicos, poliuretanos, polifosfocenos, poliácridatos, polimetacrilatos, poliureas, poliestirenos y poliaminas. En algunas realizaciones, los polímeros de acuerdo con la presente invención incluyen polímeros que se han aprobado para su uso en seres humanos por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU. (FDA) a tenor de 21 CFR § 177.2600, incluyendo, pero sin limitación, poliésteres (por ejemplo, ácido poliláctico, poli(ácido láctico-co-glicólico), policaprolactona, polivalerolactona, poli(1,3-dioxan-2ona)); polianhídridos (por ejemplo, poli(anhídrido sebácico)); poliéteres (por ejemplo, polietilenglicol); poliuretanos; polimetacrilatos; poliácridatos; y policianoacrilatos.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser hidrófilos. Por ejemplo, los polímeros pueden comprender grupos aniónicos (por ejemplo, grupo fosfato, grupo sulfato, grupo carboxilato); grupos catiónicos (por ejemplo, grupo amina cuaternaria); o grupos polares (por ejemplo, grupo hidroxilo, grupo tiol, grupo amina).

En algunas realizaciones, los polímeros pueden modificarse con uno o más restos y/o grupos funcionales. Puede usarse cualquier resto o grupo funcional de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, los polímeros pueden modificarse con polietilenglicol (PEG), con un hidrato de carbono y/o con poliacetales acíclicos derivados de polisacáridos (Papisov, 2001, *ACS Symposium Series*, 786: 301).

En algunas realizaciones, los polímeros pueden modificarse con un lípido o grupo ácido graso, cuyas propiedades se describen con más detalle a continuación. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser uno o más de entre ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico o lignocérico. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser uno o más de entre ácido palmitoleico, oleico, vaccénico, linoleico, alfa-linoleico, gamma-linoleico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico o erúcico.

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

En algunas realizaciones, un polímero puede ser PLGA. PLGA es un copolímero biocompatible y biodegradable de ácido láctico y ácido glicólico y diversas formas de PLGA se caracterizan por la relación de ácido láctico:ácido glicólico. El ácido láctico puede ser ácido L-láctico, ácido D-láctico o ácido D,L-láctico. La velocidad de degradación de PLGA puede ajustarse alterando la relación ácido láctico:ácido glicólico. En algunas realizaciones, el PLGA que ha de usarse de acuerdo con la presente invención se caracteriza por una relación ácido láctico: ácido glicólico de aproximadamente 85:15, aproximadamente 75:25, aproximadamente 60:40, aproximadamente 50:50, aproximadamente 40:60, aproximadamente 25:75 o aproximadamente 15:85.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser uno o más polímeros acrílicos. En determinadas realizaciones, los polímeros acrílicos incluyen, por ejemplo, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), copolímero de alquilamida de ácido metacrílico, poli(metacrilato de metilo), poli(anhídrido de ácido metacrílico), metacrilato de metilo, polimetacrilato, copolímero de poli(metacrilato de metilo), poli(acrilamida), copolímero de metacrilato de aminoalquilo, copolímeros de metacrilato de glicidilo, policianoacrilatos y combinaciones que comprenden uno o más de los polímeros anteriores. El polímero acrílico puede comprender copolímeros totalmente polimerizados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un contenido bajo de grupos amonio cuaternario.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser polímeros catiónicos. En general, los polímeros catiónicos son capaces de condensar y/o proteger cadenas de ácidos nucleicos cargadas negativamente (por ejemplo, ADN, ARN o derivados de los mismos). Los polímeros que contienen amina tales como poli(lisina) (Zauner et al., 1998, *Adv. Drug Del. Rev.*, 30: 97; y Kabanov et al., 1995, *Bioconjugate Chem.*, 6: 7), poli(etilenimina) (PEI; Boussif et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1995, 92: 7297) y dendrímeros de poli(amidoamina) (Kukowska-Latallo et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93: 4897; Tang et al., 1996, *Bioconjugate Chem.*, 7: 703; y Haensler et al., 1993, *Bioconjugate Chem.*, 4: 372) están cargados positivamente a pH fisiológico, forman pares iónicos con ácidos nucleicos y median la transfección en diversas estirpes celulares.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres degradables que llevan cadenas laterales catiónicas (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32: 3658; Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 11010; Kwon et al., 1989, *Macromolecules*, 22: 3250; Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 5633; y Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23: 3399). Los ejemplos de estos poliésteres incluyen poli(L-lactida-co-L-lisina) (Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 11010), poli(éster de serina) (Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23: 3399), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32: 3658; y Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 5633). Se demostró que la poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) condensa el ADN plasmídico a través de interacciones electrostáticas y media la transferencia de genes (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32: 3658; y Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 5633). Estos nuevos polímeros son menos tóxicos que la poli(lisina) y la PEI y se degradan en metabolitos no tóxicos.

En algunas realizaciones, un polímero de acuerdo con la presente invención puede ser un hidrato de carbono, cuyas propiedades se describen con más detalle a continuación. En algunas realizaciones, un hidrato de carbono puede ser un polisacárido que comprende azúcares simples (o derivados de los mismos) conectados por enlaces glucosídicos, como se sabe en la técnica. En algunas realizaciones, un hidrato de carbono puede ser uno o más de entre pululano, celulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxixelulosa, metilcelulosa, dextrano, ciclodextrano, glucógeno, almidón, hidroxietilalmidón, carragenina, glucón, amilosa, quitosano, N,O-carboximetilquitosano, algina y ácido alginico, almidón, quitina, heparina, konjac, glucomanano, pustulano, heparina, ácido hialurónico, curdlano y xantano.

En algunas realizaciones, un polímero de acuerdo con la presente invención puede ser una proteína o péptido, cuyas propiedades se describen con más detalle a continuación. Las proteínas de ejemplo que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, albúmina, colágeno, un poli(aminoácido) (por ejemplo, polilisina), un anticuerpo, etc.

En algunas realizaciones, un polímero de acuerdo con la presente invención puede ser un ácido nucleico (es decir, un polinucleótido), cuyas propiedades se describen con más detalle a continuación. Los polinucleótidos de ejemplo que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, ADN, ARN, etc.

Las propiedades de estos y otros polímeros y métodos para prepararlos son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. 6.123.727; 5.804.178; 5.770.417; 5.736.372; 5.716.404; 6.095.148; 5.837.752; 5.902.599; 5.696.175; 5.514.378; 5.512.600; 5.399.665; 5.019.379; 5.010.167; 4.806.621; 4.638.045; y 4.946.929; Wang et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123: 9480; Lim et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123: 2460; Langer, 2000, *Acc. Chem. Res.*, 33: 94; Langer, 1999, *J. Control. Release*, 62: 7; y Uhrich et al., 1999, *Chem. Rev.*, 99: 3181). De manera más general, se describe diversos métodos para sintetizar polímeros adecuados en la *Concise Encyclopedia of Polymer Science y Polymeric Amines and Ammonium Salts*, Ed. por Goethals, Pergamon Press, 1980; *Principles of Polymerization* de Odian, John Wiley & Sons, cuarta edición, 2004; *Contemporary Polymer Chemistry* de Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, *Nature*, 390: 386; y en las Patentes de los EE.UU. 6.506.577, 6.632.922, 6.686.446 y 6.818.732.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser polímeros lineales o ramificados. En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser dendrímeros. En algunas realizaciones, los polímeros pueden estar sustancialmente reticulados entre sí. En algunas realizaciones, los polímeros pueden estar sustancialmente libres de reticulaciones. En algunas realizaciones, los polímeros pueden usarse de acuerdo con la presente invención sin experimentar una etapa de reticulación.

Ha de comprenderse adicionalmente que las partículas dirigidas de la invención pueden comprender copolímeros de

bloque, copolímeros de injerto, combinaciones, mezclas y/o aductos de cualquiera de los polímeros anteriores y otros.

Los expertos en la materia reconocerán que los polímeros que se enumeran en el presente documento representan una lista de ejemplo, no exhaustiva, de polímeros que pueden usarse de acuerdo con la presente invención.

#### Preparación de partículas

Pueden prepararse partículas (por ejemplo, nanopartículas, micropartículas) usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las formulaciones de partículas pueden formarse mediante métodos como nanoprecipitación, enfoque de flujo usando canales fluidicos, secado por pulverización, evaporación de disolvente en emulsión simple y doble, extracción con disolvente, separación de fases, molienda, procedimientos de microemulsión, micro fabricación, nanofabricación, capas de sacrificio, coacervación simple y compleja y otros métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Como alternativa o adicionalmente, se han descrito síntesis de disolventes orgánicos y acuosos para nanopartículas semiconductoras semidispersas, conductoras, magnéticas, orgánicas y de otro tipo (Pellegrino et al., 2005, *Small*, 1:48; Murray et al., 2000, *Ann. Rev. Mat. Sci.*, 30: 545; y Trindade et al., 2001, *Chem. Mat.*, 13: 3843).

En determinadas realizaciones, las partículas se preparan mediante el proceso de nanoprecipitación o el secado por pulverización. Las condiciones utilizadas en la preparación de partículas pueden alterarse para producir partículas de un tamaño o propiedad deseados (por ejemplo, hidrofobia, hidrofilia, morfología externa, "adherencia", forma, etc.). El método de preparación de la partícula y las condiciones (por ejemplo, disolvente, temperatura, concentración, caudal de aire, etc.) utilizadas pueden depender del agente terapéutico que ha de suministrarse y/o de la composición de la matriz polimérica.

Se describen en la literatura métodos para preparar micropartículas para el suministro de agentes encapsulados (véase, por ejemplo, Doubrow, Ed., "*Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy*", CRC Press, Boca Ratón, 1992; Mathiowitz et al., 1987, *J. Control. Release*, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, *Reactive Polymers*, 6: 275; y Mathiowitz et al., 1988, *J. Appl. Polymer Sci.*, 35: 755).

Si las partículas preparadas mediante cualquiera de los métodos anteriores tienen un intervalo de tamaño fuera del intervalo deseado, las partículas pueden dimensionarse, por ejemplo, usando un tamiz.

#### Tensioactivos

En algunas realizaciones, las partículas pueden comprender opcionalmente uno o más tensioactivos. En algunas realizaciones, un tensioactivo puede promover la producción de partículas con estabilidad aumentada, uniformidad mejorada o viscosidad aumentada. Los tensioactivos pueden ser particularmente útiles en realizaciones que utilizan dos o más medios de dispersión. El porcentaje de tensioactivo en las partículas puede variar del 0 % al 99 % en peso, del 10 % al 99 % en peso, del 25 % al 99 % en peso, del 50 % al 99 % en peso o del 75 % al 99 % en peso. En algunas realizaciones, el porcentaje de tensioactivo en las partículas puede variar del 0 % al 75 % en peso, del 0 % al 50 % en peso, del 0 % al 25 % en peso o del 0 % al 10 % en peso. En algunas realizaciones, el porcentaje de tensioactivo en las partículas puede ser de aproximadamente el 1 % en peso, aproximadamente el 2 % en peso, aproximadamente el 3 % en peso, aproximadamente el 4 % en peso, aproximadamente el 5 % en peso, aproximadamente el 10 % en peso, aproximadamente el 15 % en peso, aproximadamente el 20 % en peso, aproximadamente el 25 % en peso o aproximadamente el 30 % en peso.

Cualquier tensioactivo conocido en la técnica es adecuado para su uso en la preparación de partículas de acuerdo con la presente invención. Dichos tensioactivos incluyen, pero sin limitación, fosfoglicéridos; fosfatidilcolinas; dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC); dioleilfosfatidil etanolamina (DOPE); dioleiloxipropiltriethylamonio (DOTMA); dioleoilfosfatidilcolina; colesterol; éster de colesterol; diacilglicerol; diacilglicerolsuccinato; difosfatidil glicerol (DPPG); hexanodecanol; alcoholes grasos tales como polietilenglicol (PEG); polioxietilen-9-lauril éter; un ácido graso tensioactivo, tal como ácido palmítico o ácido oleico; ácidos grasos; monoglicéridos de ácidos grasos; diglicéridos de ácidos grasos; amidas de ácidos grasos; glicocolato de trioleato de sorbitano (Span 85); monolaurato de sorbitano (Span 20); polisorbato 20 (Tween-20); polisorbato 60 (Tween-60); polisorbato 65 (Tween-65); polisorbato 80 (Tween-80); polisorbato 85 (Tween-85); monoestearato de polioxietileno; surfactina; un poloxámero; un éster de ácido graso de sorbitano tal como trioleato de sorbitano; lecitina; lisolecitina; fosfatidilserina; fosfatidilinositol; esfingomielina; fosfatidiletanolamina (cefalina); cardiolipina; ácido fosfatídico; cerebrosidos; dicetilfosfato; dipalmitoilfosfatidilglicerol; estearilamina; dodecilamina; hexadecilamina; palmitato de acetilo; ricinoleato de glicerol; estearato de hexadecilo; miristato de isopropilo; tiloxapol; poli(etilenglicol)5000-fosfatidiletanolamina; poli(etilenglicol)400-monoestearato; fosfolípidos; detergentes sintéticos y/o naturales que tienen propiedades tensioactivas elevadas; desoxicolatos; ciclodextrinas; sales caótropas; agentes de apareamiento de iones; y combinaciones de los mismos. El componente tensioactivo puede ser una mezcla de diferentes tensioactivos. Estos tensioactivos pueden extraerse y purificarse de una fuente natural o pueden prepararse de forma sintética en un laboratorio. En determinadas realizaciones específicas, los tensioactivos están disponibles en el mercado.

Los expertos en la materia reconocerán que esta es una lista de ejemplo, no exhaustiva, de sustancias con actividad tensioactiva. Puede usarse cualquier tensioactivo en la producción de partículas que han de usarse de acuerdo con la presente invención.

## 5 Lípidos

En algunas realizaciones, las partículas pueden comprender opcionalmente uno o más lípidos. En algunas realizaciones, el porcentaje de lípidos en las partículas puede variar del 0 % al 75 % en peso, del 0 % al 50 % en peso, del 0 % al 25 % en peso o del 0 % al 10 % en peso. En algunas realizaciones, el porcentaje de lípidos en las partículas puede ser de aproximadamente el 1 % en peso, aproximadamente el 2 % en peso, aproximadamente el 3 % en peso, aproximadamente el 4 % en peso, aproximadamente el 5 % en peso, aproximadamente el 10 % en peso, aproximadamente el 15 % en peso, aproximadamente el 20 % en peso, aproximadamente el 25 % en peso o aproximadamente el 30 % en peso.

En algunas realizaciones, los lípidos son aceites. En general, puede incluirse cualquier aceite conocido en la técnica en partículas. En algunas realizaciones, un aceite puede comprender uno o más grupos ácidos grasos o sales de los mismos. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede comprender hidratos de carbono digeribles, de cadena larga (por ejemplo,  $C_8$ - $C_{50}$ ), sustituidos o no sustituidos. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser un ácido graso  $C_{10}$ - $C_{20}$  o una sal del mismo. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser un ácido graso  $C_{15}$ - $C_{25}$  o una sal del mismo. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede estar insaturado. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede estar monoinsaturado. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede estar poliinsaturado. En algunas realizaciones, un doble enlace de un grupo ácido graso insaturado puede estar en la conformación *cis*. En algunas realizaciones, un doble enlace de un ácido graso insaturado puede estar en la conformación *trans*.

En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser uno o más de entre ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico o lignocérico. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser uno o más de entre ácido palmitoleico, oleico, vaccénico, linoleico, alfa-linoléico, gamma-linoleico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico o erúico.

En algunas realizaciones, el aceite es un triglicérido líquido.

Los aceites adecuados para su uso con la presente invención incluyen, pero sin limitación, almendra, nuez de albaricoque, aguacate, babasú, bergamota, semillas de grosella negra, borraja, enebro rojo, camomila, canola, alcaravea, carnaúba, ricino, canela, manteca de cacao, coco, hígado de bacalao, café, maíz, semillas de algodón, emú, eucalipto, onagra, pescado, semillas de lino, geraniol, calabacín, semillas de uva, avellanas, hisopo, jojoba, nuez de kukui, lavandina, lavanda, limón, litsea cubeba, nuez de macadamia, malva, semillas de mango, semillas de hierba de la pradera, visón, nuez moscada, aceituna, naranja, reloj anaranjado, palma, nuez de palma, nuez de melocotón, cacahuete, semillas de amapola, semillas de calabaza, colza, salvado de arroz, romero, cártamo, madera de sándalo, camelia sasquana, ajedrea, espinos cervat, sésamo, manteca de karité, silicona, soja, girasol, árbol del té, cardo, camelia, vetiver, nuez y aceites de germen de trigo y combinaciones de los mismos. Los aceites adecuados para su uso con la presente invención incluyen, pero sin limitación, estearato de butilo, triglicérido caprílico, triglicérido cáprico, ciclometicona, sebacato de dietilo, dimeticona 360, miristato de isopropilo, aceite mineral, octildodecanol, alcohol oleílico, aceite de silicona y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, un lípido es una hormona (por ejemplo, estrógeno, testosterona), esteroide (por ejemplo, colesterol, ácido biliar), vitamina (por ejemplo, vitamina E), fosfolípido (por ejemplo, fosfatidilcolina), esfingolípido (por ejemplo, ceramidas) o lipoproteína (por ejemplo, apolipoproteína).

## Hidratos de carbono

En algunas realizaciones, las partículas pueden comprender opcionalmente uno o más hidratos de carbono. En algunas realizaciones, el porcentaje de hidratos de carbono en las partículas puede variar del 0 % al 75 % en peso, del 0 % al 50 % en peso, del 0 % al 25 % en peso o del 0 % al 10 % en peso. En algunas realizaciones, el porcentaje de hidratos de carbono en las partículas puede ser de aproximadamente el 1 % en peso, aproximadamente el 2 % en peso, aproximadamente el 3 % en peso, aproximadamente el 4 % en peso, aproximadamente el 5 % en peso, aproximadamente el 10 % en peso, aproximadamente el 15 % en peso, aproximadamente el 20 % en peso, aproximadamente el 25 % en peso o aproximadamente el 30 % en peso.

Los hidratos de carbono pueden ser naturales o sintéticos. Un hidrato de carbono puede ser un hidrato de carbono natural derivado. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono es un monosacárido, incluyendo, pero sin limitación, glucosa, fructosa, galactosa, ribosa, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, celobiosa, manosa, xilosa, arabinosa, ácido glucurónico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina y ácido neuramínico. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono es un disacárido, incluyendo, pero sin limitación, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa y celobiosa. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono es un

polisacárido, incluyendo, pero sin limitación, pululano, celulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), hidroxixelulosa (HC), metilcelulosa (MC), dextrano, ciclodextrano, glucógeno, almidón, hidroxietilalmidón, carragenina, glucón, amilosa, quitosano, N,O-carboximetilquitosano, algina y ácido algínico, almidón, quitina, heparina, konjac, glucomanano, pustulano, heparina, ácido hialurónico, curdlano y xantano. En determinadas realizaciones, el hidrato de carbono es un alcohol de azúcar, incluyendo, pero sin limitación, manitol, sorbitol, xilitol, eritritol, maltitol y lactitol.

#### *Restos de direccionamiento*

- 10 Las partículas de direccionamiento de la invención comprenden restos de direccionamiento inhibidores de peptidasa a base de urea de molécula pequeña que se unen específicamente al AMEP.

El objetivo es un AMEP, que es un antígeno que es más prevalente en el cáncer de próstata que en el tejido normal.

- 15 La diana se expresa preferentemente en tejidos tumorales frente a tejidos normales. Cuando se compara con la expresión en tejidos normales, la expresión del antígeno de membrana específico de próstata (AMEP) se sobreexpresa al menos 10 veces en la próstata maligna con respecto al tejido normal y el nivel de expresión de AMEP se regula positivamente aún más a medida que la enfermedad progresa a fases metastásicas (Silver et al., 1997, *Clin. Cancer Res.*, 3: 81).

- 20 En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención comprenden menos del 50 % en peso, menos del 40 % en peso, menos del 30 % en peso, menos del 20 % en peso, menos del 15 % en peso, menos del 10 % en peso, menos del 5 % en peso, menos del 1 % en peso o menos del 0,5 % en peso del resto de direccionamiento.

- 25 Los restos de direccionamiento se asocian covalentemente a una partícula. En algunas realizaciones, la asociación covalente está mediada por un enlazador.

#### Restos de direccionamiento de molécula pequeña

- 30 El resto de direccionamiento de acuerdo con la presente invención es una molécula pequeña. En determinadas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen un tamaño de menos de aproximadamente 2000 g/mol. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen menos de aproximadamente 1500 g/mol o menos de aproximadamente 1000 g/mol. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen menos de aproximadamente 800 g/mol o menos de aproximadamente 500 g/mol.

- 35 Un experto en la materia apreciará que puede usarse de acuerdo con la presente invención cualquier inhibidor de peptidasa a base de urea de molécula pequeña que se una específicamente a AMEP.

- 40 Los inhibidores de peptidasa de AMEP a base de urea incluyen ZJ 43, ZJ 11, ZJ 17, ZJ 38 (Nan et al., 2000, *J. Med. Chem.*, 43: 772; y Kozikowski et al., 2004, *J. Med. Chem.*, 47: 1729) y/o análogos y derivados de los mismos.

#### *Agentes que han de suministrarse*

- 45 De acuerdo con la presente invención, pueden usarse partículas dirigidas de la invención para el suministro de cualquier agente terapéutico, de diagnóstico y/o profiláctico. Los agentes de ejemplo que han de suministrarse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas, compuestos organometálicos, ácidos nucleicos, proteínas (incluyendo proteínas multiméricas, complejos de proteínas, etc.), péptidos, lípidos, hidratos de carbono, hormonas, metales, radiactivo elementos y compuestos, fármacos, vacunas, agentes inmunológicos, etc., y/o combinaciones de los mismos.

- 50 En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención comprenden menos del 50 % en peso, menos del 40 % en peso, menos del 30 % en peso, menos del 20 % en peso, menos del 15 % en peso, menos del 10 % en peso, menos del 5 % en peso, menos del 1 % en peso o menos del 0,5 % en peso del agente terapéutico que ha de suministrarse.

- 55 En algunas realizaciones, el agente que ha de suministrarse puede ser una mezcla de agentes farmacéuticamente activos. Por ejemplo, puede suministrarse un anestésico local en combinación con un agente antiinflamatorio tal como un esteroide. Por proporcionar otro ejemplo, un antibiótico puede combinarse con un inhibidor de la enzima habitualmente producida por las bacterias para inactivar el antibiótico (por ejemplo, penicilina y ácido clavulánico).

- 60 En algunas realizaciones, el agente que ha de suministrarse puede ser una mezcla de agentes antineoplásicos. En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención se administran en combinación con uno o más de los agentes antineoplásicos que se describen en el presente documento. La terapia combinada se describe con más detalle a continuación, en la sección titulada "Administración". Por proporcionar un solo ejemplo, en algunas realizaciones, se administran composiciones de la invención que comprenden un agente antineoplásico que ha de suministrarse en combinación con terapia hormonal. El crecimiento de algunos tipos de tumores puede inhibirse

proporcionando o bloqueando determinadas hormonas. Por ejemplo, los esteroides (por ejemplo, dexametasona) pueden inhibir el crecimiento tumoral o el edema asociado y pueden provocar la regresión de tumores malignos de los ganglios linfáticos. En algunos casos, el cáncer de próstata con frecuencia es sensible a la finasterida, un agente que bloquea la conversión periférica de testosterona en dihidrotestosterona.

5

#### Agentes de molécula pequeña

En algunas realizaciones, el agente que ha de suministrarse es una molécula pequeña y/o un compuesto orgánico con actividad farmacéutica. En algunas realizaciones, el agente es un fármaco utilizado clínicamente. En algunas realizaciones, el fármaco es un agente antineoplásico.

10

En determinadas realizaciones, el agente terapéutico que ha de suministrarse es un agente antineoplásico (es decir, agentes citotóxicos). La mayoría de los agentes antineoplásicos pueden dividirse en las siguientes categorías: agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales y hormonas y antagonistas.

15

Los agentes antineoplásicos normalmente afectan a la división celular y/o a la síntesis de ADN. Sin embargo, algunos agentes quimioterapéuticos no interfieren directamente con el ADN.

Los agentes alquilantes se denominan de este modo debido a su capacidad para añadir grupos alquilo a muchos grupos electronegativos en condiciones presentes en las células. Los agentes alquilantes funcionan normalmente modificando químicamente el ADN celular. Los agentes alquilantes de ejemplo incluyen mostazas nitrogenadas (por ejemplo, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (1-sarcolisina), clorambucilo, etileniminas y metilmelaminas (por ejemplo, altretamina (hexametilmelamina; HMM), tiotepa (trietileno tiofosforamida), trietilenomelamina (TEM)), alquil sulfonatos (por ejemplo, busulfán), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina (BCNU), lomustina (CCMU), semustina (metil-CCNU), estreptozocina (estreptozotocina)) y triazenos (por ejemplo, dacarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazolcarboxamida)).

20

25

Los antimetabolitos actúan imitando los metabolitos de molécula pequeña (por ejemplo, ácido fólico, pirimidinas y purinas) con el fin de incorporarse al ADN celular de nueva síntesis. Dichos agentes también afectan a la síntesis de ARN. Un análogo de ácido fólico de ejemplo es el metotrexato (ametofterina). Los análogos de pirimidina de ejemplo incluyen fluorouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina; FUdR) y citarabina (arabinósido de citosina). Los análogos de purina de ejemplo incluyen mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), azatioprina, tioguanina (6-tioguanina; TG), fosfato de fludarabina, pentostatina (2'-desoxicoformicina), cladribina (2-clorodesoxiadenosina; 2-CdA) y eritrohidroxinoniladenina (EHNA).

30

35

Los productos naturales de molécula pequeña que pueden usarse como agentes antineoplásicos incluyen antibióticos y alcaloides vegetales. Los alcaloides y los terpenoides vegetales (por ejemplo, los alcaloides de la vinca, podofilotoxina, taxanos, etc.) normalmente bloquean la división celular impidiendo la función de los microtúbulos. Los alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina (VLB), vinorelbina, vindesina, etc.) se unen a la tubulina e inhiben el ensamblaje de la tubulina en los microtúbulos. Los alcaloides de la vinca derivan de la vincapervinca de Madagascar, *Catharanthus roseus* (conocida anteriormente como *Vinca rosea*). La podofilotoxina es un compuesto derivado de plantas que se usa para producir otros dos agentes terapéuticos citostáticos, etopósido y tenipósido, que evitan que las células entren en las fases G1 y S del ciclo celular. La podofilotoxina se obtiene principalmente del podófilo americano (*Podophyllum peltatum*) y del podófilo del Himalaya (*Podophyllum hexandrum*). Los taxanos (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel, etc.) derivan del tejo. Los taxanos potencian la estabilidad de los microtúbulos, evitando la separación de los cromosomas durante la anafase.

40

45

Los antibióticos que pueden usarse como agentes antineoplásicos incluyen dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina (daunomicina; rubidomicina), doxorubicina, idarrubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) y mitomicina (mitomicina C).

50

Otras moléculas pequeñas que pueden usarse como agentes antineoplásicos incluyen complejos de coordinación de platino (por ejemplo, cisplatino (*cis*-DDP), carboplatino), antracenodiona (por ejemplo, mitoxantrona), urea sustituida (por ejemplo, hidroxiurea), derivados de metilhidrazina (por ejemplo, procarbazona (N-metilhidrazina, MIH) y supresores corticosuprarrenales (por ejemplo, mitotano (o,p'-DDD), aminoglutetimida).

55

Los inhibidores de topoisomerasas actúan inhibiendo la función de las topoisomerasas, que son enzimas que mantienen la topología del ADN. La inhibición de las topoisomerasas de tipo I o de tipo II interfiere con la transcripción y la replicación del ADN alterando el superenrollamiento de ADN adecuado. Algunos inhibidores de topoisomerasas de tipo I de ejemplo incluyen camptotecinas (por ejemplo, irinotecán, topotecán, etc.). Algunos inhibidores de topoisomerasas de tipo II de ejemplo incluyen amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, etc., que son derivados semisintéticos de epipodofilotoxinas, analizados en el presente documento.

60

En determinadas realizaciones, un agente de molécula pequeña puede ser cualquier fármaco. En algunas realizaciones, el fármaco es uno que ya ha sido considerado seguro y eficaz para su uso en seres humanos o animales por la agencia gubernamental o el organismo regulador apropiados. Por ejemplo, la FDA enumera

65



fármacos aprobados para su uso humano a tenor de 21 C.F.R. §§ 330.5, 331 a 361 y 440 a 460; la FDA enumera fármacos para su uso veterinario a tenor de 21 CFR §§ 500 a 589. Todos los fármacos enumerados se consideran aceptables para su uso de acuerdo con la presente invención.

- 5 Puede encontrarse una lista más completa de clases y fármacos específicos adecuados para su uso en la presente invención en *Pharmaceutical Drugs: Syntheses, Patents, Applications* de Axel Kleemann y Jurgen Engel, Thieme Medical Publishing, 1999 y el *Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, Ed. de Budavari et al., CRC Press, 1996.

#### 10 Agentes de ácido nucleico

En determinadas realizaciones de la invención, se usa una partícula dirigida de la invención para suministrarse uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN funcionales, ADN funcionales, etc.) a una ubicación específica tal como un tejido, célula o localización subcelular.

#### 15 *ARN funcional*

En general, un "ARN funcional" es un ARN que no codifica una proteína sino que pertenece a una clase de moléculas de ARN cuyos miembros poseen característicamente una o más funciones o actividades diferentes dentro de una célula. Se apreciará que las actividades relativas de las moléculas de ARN funcionales que tienen diferentes secuencias pueden diferir y pueden depender al menos en parte del tipo celular particular en el que el ARN está presente. Por tanto, la expresión "ARN funcional" se usa en el presente documento para referirse a una clase de molécula de ARN y no pretende implicar que todos los miembros de la clase muestren de hecho la actividad característica de esa clase en cualquier conjunto particular de condiciones. En algunas realizaciones, los ARN funcionales incluyen agentes de iARN (por ejemplo, ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN en horquilla corto y microARN), ribozimas, ARNt, ARNr, ARN útiles para la formación de triple hélice, etc.

la iARN es un proceso conservado evolutivamente en el que la presencia de una molécula de ARN bicatenario al menos parcialmente en una célula eucariota conduce a la inhibición específica de secuencia de la expresión génica. La iARN se describió originariamente como un fenómeno en el que la introducción de ARNbc largo (normalmente cientos de nucleótidos) en una célula da como resultado la degradación de ARNm que contiene una región complementaria a una cadena del ARNbc (Patente de los EE.UU. 6.506.559; y Fire et al., 1998, *Nature*, 391: 806). Estudios posteriores en *Drosophila* mostraron que los ARNbc largos son procesados por una enzima similar a la RNasa III intracelular denominada Dicer en ARNbc más pequeños compuestos principalmente por dos cadenas de aproximadamente 21 nucleótidos (nt) que forman un dúplex de 19 pares de bases con salientes 3' de 2 nt en cada extremo y grupos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo (véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 01/75164; las Publicaciones de Patente de los EE.UU. 2002/0086356 y 2003/0108923; Zamore et al., 2000, *Cell*, 101: 25; y Elbashir et al., 2001, *Genes Dev.*, 15: 188).

Los ARNbc cortos que tienen estructuras tales como esta, denominados ARNip, silencian la expresión de genes que incluyen una región que es sustancialmente complementaria a una de las dos cadenas. Esta cadena se denomina cadena "antisentido" o "guía", y la otra cadena con frecuencia se denomina cadena "sentido". El ARNip se incorpora en un complejo ribonucleoproteínico denominado complejo silenciador inducido por ARN (RISC) que contiene un miembro o miembros de la familia de proteínas Argonauta. Después de la asociación del ARNip con RISC, una actividad helicasa desenrolla el dúplex, permitiendo que un dúplex alternativo forme la cadena guía y un ARNm diana que contiene una porción sustancialmente complementaria a la cadena guía. Una actividad endonucleasa asociada a la proteína o proteínas Argonauta presentes en RISC es responsable de "cortar" el ARNm diana, que después es degradada adicionalmente por la maquinaria celular.

Se consiguió un progreso considerable hacia la aplicación práctica de la iARN con el descubrimiento de que la introducción exógena de ARNip en células de mamíferos puede reducir eficazmente la expresión de genes diana de una manera específica de secuencia a través del mecanismo descrito anteriormente. Una estructura típica de ARNip incluye una porción bicatenaria de 19 nucleótidos, que comprende una cadena guía y una cadena antisentido. Cada cadena tiene un saliente 3' de 2 nt. Normalmente, la cadena guía del ARNip es perfectamente complementaria a su gen diana y el transcrito de ARNm en al menos 17-19 nucleótidos contiguos y, normalmente, las dos cadenas del ARNip son perfectamente complementarias entre sí en la porción dúplex. Sin embargo, como apreciará un experto habitual en la técnica, no se requiere una complementariedad perfecta. En cambio, uno o más desapareamientos en el dúplex formado por la cadena guía y el ARNm diana con frecuencia se tolera, en particular en determinadas posiciones, sin reducir la actividad silenciadora por debajo de niveles útiles. Por ejemplo, puede haber 1, 2, 3 o incluso más desapareamientos entre el ARNm diana y la cadena guía (sin tener en cuenta los salientes). Por tanto, como se usan en el presente documento, dos porciones de ácido nucleico tales como una cadena guía (sin tener en cuenta los salientes) y una porción de un ARNm diana que son "sustancialmente complementarias" pueden ser perfectamente complementarias (es decir, se hibridan entre sí para formar un dúplex en el que cada nucleótido es un miembro de un par de bases complementario) o pueden tener un menor grado de complementariedad suficiente para que se produzca la hibridación. Un experto en la materia apreciará que no es necesario que las dos cadenas del dúplex de ARNip sean perfectamente complementarias. Normalmente, al menos el 80 %, preferentemente al

menos el 90 % o más de los nucleótidos en la cadena guía de un ARNip eficaz son complementarios al ARNm diana en al menos aproximadamente 19 nucleótidos contiguos. El efecto de los desapareamientos sobre la eficacia del silenciamiento y las ubicaciones en las que los desapareamientos pueden tolerarse más fácilmente son áreas de estudio activo (véase, por ejemplo, Reynolds et al., 2004, *Nat. Biotechnol.*, 22: 326).

Se apreciará que las moléculas que tienen la estructura apropiada y el grado de complementariedad a un gen diana apropiado presentarán un intervalo de eficiencias de silenciamiento diferentes. Se ha desarrollado diversos criterios de diseño adicionales para ayudar en la selección de secuencias de ARNip eficaces. Hay disponibles numerosos programas de software que pueden usarse para elegir secuencias de ARNip que se predice que son particularmente eficaces para silenciar un gen diana de elección (véase, por ejemplo, Yuan et al., 2004, *Nucl. Acids. Res.*, 32: W130; y Santoyo et al., 2005, *Bioinformatics*, 21: 1376).

Como apreciará un experto habitual en la técnica, la iARN puede estar mediada eficazmente por moléculas de ARN que tienen diversas estructuras que difieren en uno o más aspectos de las descritas anteriormente. Por ejemplo, la longitud del dúplex puede variarse (por ejemplo, de aproximadamente 17-29 nucleótidos); no es necesario que los salientes estén presentes y, si están presentes, su longitud y la identidad de los nucleótidos en los salientes pueden variar (aunque mucho más habitualmente se emplean salientes de dTdT simétricos en ARNip sintéticos).

Existen estructuras adicionales, denominadas ARN en horquilla corto (ARNhc), que son capaces de mediar la interferencia de ARN. Un ARNhc es una cadena de ARN simple que contiene dos regiones complementarias que se hibridan entre sí para formar un "tallo" bicatenario, conectándose las dos regiones complementarias mediante un bucle monocatenario. Dicer procesa los ARNhc intracelularmente para formar una estructura de ARNip que contiene una cadena guía y una cadena antisentido. Aunque los ARNhc pueden suministrarse exógenamente a las células, más normalmente, la síntesis intracelular de ARNhc se consigue introduciendo un plásmido o vector que contiene un promotor unido operativamente a un molde para la transcripción del ARNhc en la célula, por ejemplo, para crear una estirpe celular o un organismo transgénico estables.

Aunque la escisión específica de secuencia del ARNm diana es actualmente el medio utilizado más ampliamente para conseguir el silenciamiento génico mediante el suministro exógeno de agentes de iARN cortos a las células, se conocen mecanismos adicionales de silenciamiento específico de secuencia mediados por especies de ARN corto. Por ejemplo, puede producirse silenciamiento de genes postranscripcional mediado por moléculas de ARN pequeño mediante mecanismos que implican represión traduccional. Determinadas moléculas de ARN expresadas endógenamente forman estructuras en horquilla que contienen una porción dúplex imperfecta en la que el dúplex se ve interrumpido por uno o más desapareamientos y/o protuberancias. Estas estructuras en horquilla se procesan intracelularmente para producir especies de ARN monocatenario denominadas microARN (miARN), que median la represión traduccional de un transcrito diana con el que se hibridan con una complementariedad menos que perfecta. Se ha demostrado que las moléculas similares a ARNip diseñadas para imitar la estructura de los precursores de miARN dan como resultado la represión traduccional de genes diana cuando se administran a células de mamífero.

Por tanto, el mecanismo exacto por el que un agente de iARN corto inhibe la expresión génica parece depender, al menos en parte, de la estructura de la porción dúplex del agente de iARN y/o la estructura del híbrido formado por una cadena del agente de iARN y un transcrito diana. Los mecanismos de iARN y la estructura de diversas moléculas de ARN que se sabe que median la iARN, por ejemplo, ARNip, ARNhc, miARN y sus precursores, se han revisado ampliamente (véase, por ejemplo, Dykxhorn et al., 2003, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4: 457; Hannon et al., 2004, *Nature*, 431: 3761; y Meister et al., 2004, *Nature*, 431: 343). Es de esperar que desarrollos futuros revelen mecanismos adicionales por los que pueda conseguirse iARN y revelen agentes de iARN cortos adicionales eficaces. Cualquier agente de iARN corto actualmente conocido o descubierto posteriormente está dentro del alcance de la presente invención.

Un agente de iARN corto que se suministra de acuerdo con los métodos de la invención y/o que está presente en una composición de la invención puede diseñarse para silenciar cualquier gen eucariota. El gen puede ser un gen de mamífero, por ejemplo, un gen humano. El gen puede ser un gen de tipo silvestre, un gen mutante, un alelo de un gen polimórfico, etc. El gen puede ser uno asociado a una enfermedad, por ejemplo, un gen cuya sobreexpresión, subexpresión o mutación contribuye o se asocia al desarrollo o progresión de una enfermedad. Por ejemplo, el gen puede ser un oncogén. El gen puede codificar un receptor o un supuesto receptor para un agente infeccioso tal como un virus (véase, por ejemplo, Dykxhorn et al., 2003, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4: 457 para ejemplos específicos).

En algunas realizaciones, los ARNt son moléculas de ARN funcionales cuyo suministro a las células eucariotas puede controlarse usando las composiciones y métodos que se describen en el presente documento. La estructura y la función de los ARNt en la síntesis de proteínas son bien conocidas (Soll y Rajbhandary, (eds.) *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*, ASM Press, 1995). La forma de hoja de trébol de los ARNt incluye varios "tallos" bicatenarios que surgen como resultado de la formación de pares de bases intramoleculares entre regiones complementarias de la cadena de ARNt monocatenaria. Existe un interés considerable en la síntesis de polipéptidos que incorporen aminoácidos no naturales tales como análogos de aminoácidos o aminoácidos marcados en

posiciones particulares dentro de la cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, Köhrer y RajBhandary, "*Proteins carrying one or more unnatural amino acids*", Capítulo 33, en Ibba et al., (eds.), *Aminoacyl-tRNA Synthetases*, Landes Bioscience, 2004). Un enfoque para sintetizar dichos polipéptidos es suministrarse un ARNt supresor que se aminoacila con un aminoácido no natural a una célula que expresa un ARNm que codifica el polipéptido deseado pero incluye un codón sin sentido en una o más posiciones. El codón sin sentido es reconocido por el ARNt supresor, dando como resultado la incorporación del aminoácido no natural en un polipéptido codificado por el ARNm (Kohrer et al., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 98: 14310; y Kohrer et al., 2004, *Nucleic Acids Res.*, 32: 6200). Sin embargo, como en el caso del suministro de ARNip, los métodos existentes de suministro de ARNt a las células dan como resultado niveles variables de suministro, complicando los esfuerzos para analizar dichas proteínas y sus efectos sobre las células.

La invención contempla el suministro de ARNt, por ejemplo, ARNt supresores, y partículas detectables óptica o magnéticamente a células eucariotas con el fin de conseguir la síntesis de proteínas que incorporan un aminoácido no natural con el que el ARNt se aminoacila. El análisis de proteínas que incorporan uno o más aminoácidos no naturales tiene una amplia diversidad de aplicaciones. Por ejemplo, la incorporación de aminoácidos modificados con restos detectables (por ejemplo, fluorescentes) puede permitir el estudio del tráfico y la secreción de proteínas, etc., con una alteración mínima de la estructura proteínica nativa. Como alternativa o adicionalmente, la incorporación de restos reactivos (por ejemplo, grupos fotoactivables y/o reticulables) puede usarse para identificar compañeros de interacción proteínica y/o para definir motivos estructurales tridimensionales. La incorporación de aminoácidos fosforilados tales como fosfotirosina, fosfotreonina o fosfoserina, o análogos de los mismos, en proteínas, puede usarse para estudiar vías y requisitos de señalización celular.

En una realización de la invención, el ARN funcional es una ribozima. Una ribozima está diseñada para escindir catalíticamente transcritos de ARNm diana y puede usarse para evitar la traducción de un ARNm diana y/o la expresión de una diana (véase, por ejemplo, Publicación PCT WO 90/11364; y Sarver et al., 1990, *Science* 247: 1222).

En algunas realizaciones, la expresión del gen diana endógeno puede reducirse dirigiendo secuencias desoxirribonucleotídicas complementarias a la región reguladora del gen diana (es decir, el promotor y/o los potenciadores del gen diana) para formar estructuras helicoidales triples que eviten la transcripción del gen diana en células musculares diana en el cuerpo (véase, en general, Helene, 1991, *Anticancer Drug Des.* 6: 569; Helene et al., 1992, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660: 27; y Maher, 1992, *Bioassays* 14: 807).

Los ARN tales como los agentes de iARN, los ARNt, las ribozimas, etc., para el suministro a las células eucariotas pueden prepararse de acuerdo con cualquier técnica disponible, incluyendo, pero sin limitación, síntesis química, síntesis enzimática, escisión enzimática o química de un precursor más largo, etc. Se conocen en la técnica métodos de síntesis de moléculas de ARN (véase, por ejemplo, Gait, M.J. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford (Oxfordshire), Washington, DC: IRL Press, 1984; y Herdewijn, P. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: methods and applications, Methods in Molecular Biology*, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005). Hay disponibles en el mercado agentes de iARN cortos, tales como ARNip, en varios proveedores diferentes. Hay disponibles ARNip sometidos a ensayo previamente dirigidos a una amplia diversidad de genes diferentes, por ejemplo, en Ambion (Austin, TX), Dharmacon (Lafayette, CO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Cuando los ARNip se sintetizan *in vitro*, a las dos cadenas normalmente se les permite hibridarse antes de ponerlas en contacto con células. Se apreciará que no es necesario que la composición de ARNip resultante consista enteramente en moléculas (hibridadas) bicatenarias. Por ejemplo, un agente de iARN habitualmente incluye una pequeña proporción de ARN monocatenario. Generalmente, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o incluso al menos aproximadamente el 99 %-100 % de los ARN en una composición de ARNip son bicatenarios cuando se ponen en contacto con células. Sin embargo, puede usarse una composición que contenga una proporción menor de ARNbc, a condición de que contenga ARNbc suficiente para que se eficaz.

#### Vectores

En algunas realizaciones, un ácido nucleico que ha de suministrarse es un vector. Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico (normalmente, pero no necesariamente, una molécula de ADN) que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un vector puede conseguir una replicación y/o expresión extracromosómica de ácidos nucleicos a los que se une en una célula hospedadora (por ejemplo, una célula dirigida por partículas dirigidas de la presente invención). En algunas realizaciones, un vector puede conseguir la integración en el genoma de la célula hospedadora.

En algunas realizaciones, los vectores se usan para dirigir la expresión de proteínas y/o ARN. En algunas realizaciones, la proteína y/o el ARN que han de expresarse normalmente no son expresados por la célula. En algunas realizaciones, la proteína y/o el ARN que han de expresarse normalmente son expresados por la célula, pero a niveles más bajos de lo que se expresan cuando no se ha suministrado el vector a la célula.

En algunas realizaciones, un vector dirige la expresión de cualquiera de las proteínas que se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, un vector dirige la expresión de una proteína con actividad antineoplásica. En algunas realizaciones, un vector dirige la expresión de cualquiera de los ARN funcionales que se describen en el presente documento, tales como agentes de iARN, ribozimas, etc. En algunas realizaciones, un vector dirige la expresión de un ARN funcional con actividad antineoplásica.

#### Agentes proteínicos

En algunas realizaciones, el agente que ha de suministrarse puede ser una proteína o péptido. En determinadas realizaciones, los péptidos varían de aproximadamente 5 a 500, 5 a 250, 5 a 100, o 5 a 50 o 5 a 25 aminoácidos de tamaño. Pueden usarse péptidos de paneles de péptidos que comprenden secuencias aleatorias y/o secuencias que se han variado sistemáticamente para proporcionar un panel de péptidos diverso al máximo.

Los términos "proteína", "polipéptido", y "péptido" se usan indistintamente en el presente documento, normalmente con referencia a un polipéptido que tiene una longitud inferior a aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 aminoácidos. Los polipéptidos pueden contener L-aminoácidos, D-aminoácidos, o ambos, y pueden contener cualquiera de diversas modificaciones o análogos de aminoácidos conocidos en la técnica. Las modificaciones útiles incluyen, por ejemplo, acetilación terminal, amidación, etc. En algunas realizaciones, los polipéptidos pueden comprender aminoácidos convencionales, aminoácidos no convencionales, aminoácidos sintéticos y combinaciones de los mismos, como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, el agente que ha de suministrarse puede ser un péptido, hormona, eritropoyetina, insulina, citocina, antígeno para vacunación, etc. En algunas realizaciones, el agente que ha de suministrarse puede ser un anticuerpo y/o una porción característica del mismo. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden incluir, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos (es decir, "humanizados", monocatenarios (recombinantes). En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden tener funciones efectoras reducidas y/o moléculas biespecíficas. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden incluir fragmentos Fab y/o fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, como se ha descrito en más detalle anteriormente.

En algunas realizaciones, el agente que ha de suministrarse puede ser un agente antineoplásico. Son agentes antineoplásicos proteínicos de ejemplo enzimas (por ejemplo, L-asparaginasa) y modificadores de la respuesta biológica, tales como interferones (por ejemplo, interferón- $\alpha$ ), interleucinas (por ejemplo, interleucina 2; IL-2), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF). En algunas realizaciones, un agente antineoplásico proteínico es un anticuerpo o una porción característica del mismo que es citotóxico para las células tumorales.

#### Agentes de hidrato de carbono

En algunas realizaciones, el agente que ha de suministrarse es un hidrato de carbono, tal como un hidrato de carbono que está asociado a una proteína (por ejemplo, glucoproteína, proteoglicano, etc.). Un hidrato de carbono puede ser natural o sintético. Un hidrato de carbono también puede ser un hidrato de carbono natural derivado. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono puede ser un azúcar simple o complejo. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono es un monosacárido, incluyendo, pero sin limitación, glucosa, fructosa, galactosa y ribosa. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono es un disacárido, incluyendo, pero sin limitación, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa y celobiosa. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono es un polisacárido, incluyendo, pero sin limitación, celulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), metilcelulosa (MC), dextrosa, dextrano, glucógeno, goma de xantano, goma gellan, almidón y pululano. En determinadas realizaciones, un hidrato de carbono es un alcohol de azúcar, incluyendo, pero sin limitación, manitol, sorbitol, xilitol, eritritol, malitol y lactitol.

#### Agentes lipídicos

En algunas realizaciones, el agente que ha de suministrarse es un lípido, tal como un lípido que está asociado a una proteína (por ejemplo, lipoproteína). Los lípidos de ejemplo que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, aceites, ácidos grasos, ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados, ácidos grasos esenciales, ácidos grasos *cis*, ácidos grasos *trans*, glicéridos, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, hormonas, esteroides (por ejemplo, colesterol, ácidos biliares), vitaminas (por ejemplo, vitamina E), fosfolípidos, esfingolípidos y lipoproteínas.

En algunas realizaciones, el lípido puede comprender uno o más grupos ácidos grasos o sales de los mismos. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede comprender hidrocarburos digeribles, de cadena larga (por ejemplo,  $C_8$ - $C_{50}$ ), sustituidos o no sustituidos. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede ser un ácido graso  $C_{10}$ - $C_{20}$  o una sal del mismo. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede ser un ácido graso  $C_{15}$ - $C_{20}$  o una sal del mismo. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede ser un ácido graso  $C_{15}$ - $C_{25}$  o una sal del mismo. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede estar insaturado. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede estar monoinsaturado. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede estar poliinsaturado.

En algunas realizaciones, un doble enlace de un grupo ácido graso insaturado puede estar en la conformación *cis*. En algunas realizaciones, un doble enlace de un ácido graso insaturado puede estar en la conformación *trans*.

En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede ser uno o más de entre ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico o lignocérico. En algunas realizaciones, el grupo ácido graso puede ser uno o más de entre ácido palmitoleico, oleico, vaccénico, linoleico, alfa-linolénico, gamma-linoleico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico o erúico.

#### Agentes de diagnóstico

En algunas realizaciones, el agente que ha de suministrarse es un agente de diagnóstico. En algunas realizaciones, los agentes de diagnóstico incluyen gases; agentes de formación de imágenes disponibles en el mercado utilizados en tomografía por emisión de positrones (TEP), tomografía asistida por ordenador (TAO), tomografía informatizada por emisión de fotón único, rayos X, fluoroscopia y formación de imágenes por resonancia magnética (IRM); antieméticos; y agentes de contraste. Los ejemplos de materiales adecuados para su uso como agentes de contraste en IRM incluyen quelatos de gadolinio, así como hierro, magnesio, manganeso, cobre y cromo. Los ejemplos de materiales útiles para la formación de imágenes por rayos X y TAO incluyen materiales a base de yodo.

En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención pueden comprender un agente de diagnóstico utilizado en la formación de imágenes por resonancia magnética (IRM), tal como partículas de óxido de hierro o complejos de gadolinio. Los complejos de gadolinio que se han aprobado para su uso clínico incluyen quelatos de gadolinio con DTPA, DTPA-BMA, DOTA y HP-DO3A (revisados en Aime et al., 1998, *Chemical Society Reviews*, 27: 19).

En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención pueden comprender radionúclidos como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. Entre los radionúclidos utilizados, los emisores gamma, los positrones y los emisores de rayos X son adecuados para diagnóstico y/o terapia, mientras que los emisores beta y los emisores alfa también pueden usarse para terapia. Los radionúclidos adecuados para formar la partícula dirigida de la invención incluyen, pero sin limitación,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{130}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{133}\text{I}$ ,  $^{135}\text{I}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{72}\text{Se}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{88}\text{Y}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{100}\text{Pd}$ ,  $^{101}\text{mRh}$ ,  $^{119}\text{Sb}$ ,  $^{128}\text{Ba}$ ,  $^{197}\text{Hg}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{99}\text{mTc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$  y  $^{18}\text{F}$ .

En algunas realizaciones, un agente de diagnóstico puede ser un resto fluorescente, luminiscente o magnético. En algunas realizaciones, un resto detectable tal como un colorante fluorescente o luminiscente, etc., está atrapado, embebido o encapsulado por un núcleo de partícula y/o una capa de recubrimiento.

Los restos fluorescentes y luminiscentes incluyen diversas diferentes moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas habitualmente denominadas "colorantes", "marcadores" o "indicadores". Los ejemplos incluyen fluoresceína, rodamina, colorantes de acridina, colorantes Alexa, colorantes de cianina, etc. Los restos fluorescentes y luminiscentes pueden incluir diversas proteínas de origen natural y derivados de las mismas, por ejemplo, variantes genéticamente modificadas. Por ejemplo, las proteínas fluorescentes incluyen proteína verde fluorescente (GFP), GFP potenciada, proteínas fluorescentes de color rojo, azul, amarillo, cian y zafiro, proteína fluorescente de color coral de arrecife, etc. Las proteínas luminiscentes incluyen luciferasa, aequorina y derivados de las mismas. Se conocen numerosos colorantes y proteínas fluorescentes y luminiscentes en la técnica (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de los EE.UU. 2004/0067503; Valeur, B., "*Molecular Fluorescence: Principles and Applications*", John Wiley and Sons, 2002; *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes*, 9ª edición, 2002; y *The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Invitrogen, 10ª edición, disponible en el sitio web de Invitrogen).

#### Agentes profilácticos

En algunas realizaciones, el agente que ha de suministrarse es un agente profiláctico. En algunas realizaciones, los agentes profilácticos incluyen vacunas. Las vacunas pueden comprender proteínas o péptidos aislados, organismos y virus inactivados, organismos y virus muertos, organismos o virus genéticamente alterados y extractos celulares. Los agentes profilácticos pueden combinarse con interleucinas, interferón, citocinas y adyuvantes como la toxina colérica, alumbre, adyuvante de Freund, etc. Estos antígenos pueden estar en forma de organismos muertos completos, péptidos, proteínas, glucoproteínas, hidratos de carbono o combinaciones de los mismos.

Los expertos en la materia reconocerán que esta es una lista de ejemplo, no exhaustiva, de agentes terapéuticos que pueden suministrarse usando las partículas dirigidas de la presente invención. Puede asociarse a partículas cualquier agente terapéutico para el suministro dirigido de acuerdo con la presente invención.

#### Producción de partículas dirigidas

Las partículas dirigidas de la invención pueden prepararse usando cualquier método disponible. Es deseable que la partícula dirigida pueda evitar la captación por el sistema fagocítico mononuclear después de la administración sistémica, de manera que pueda alcanzar tejidos y células específicos en el cuerpo.

En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos no se asocian covalentemente a una partícula. Por ejemplo, las partículas pueden tener agentes terapéuticos asociados a la superficie de, encapsulados dentro y/o distribuidos por todo el polímero de una partícula de la invención. Los agentes terapéuticos se liberan por difusión, degradación de la partícula y/o combinación de las mismas. En algunas realizaciones, los polímeros se degradan por erosión en masa. En algunas realizaciones, los polímeros se degradan por erosión superficial.

En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos se asocian covalentemente a una partícula. Para dichas partículas dirigidas, la liberación y el suministro del agente terapéutico a un sitio diana se produce interrumpiendo la asociación. Por ejemplo, si un agente terapéutico se asocia a una partícula mediante un enlazador escindible, el agente terapéutico se libera y se suministra al sitio diana tras la escisión del enlazador.

La asociación física puede conseguirse de diversas maneras diferentes. La asociación física puede ser covalente o no covalente. La partícula y el agente terapéutico pueden asociarse directamente entre sí, por ejemplo, por uno o más enlaces covalentes, o pueden asociarse por medio de uno o más enlazadores. En una realización, un enlazador forma uno o más enlaces covalentes o no covalentes con la partícula y uno o más enlaces covalentes o no covalentes con el resto de direccionamiento, uniéndolos de este modo entre sí. En algunas realizaciones, un primer enlazador forma un enlace covalente o no covalente con la partícula y un segundo enlazador forma un enlace covalente o no covalente con el resto de direccionamiento. Los dos enlazadores forman uno o más enlaces covalentes o no covalentes entre sí.

En una realización, el enlazador forma uno o más enlaces covalentes o no covalentes con la partícula y uno o más enlaces covalentes o no covalentes con el agente terapéutico, uniéndolos de este modo entre sí. En algunas realizaciones, un primer enlazador forma un enlace covalente o no covalente con la partícula y un segundo enlazador forma un enlace covalente o no covalente con el agente terapéutico. Los dos enlazadores forman uno o más enlaces covalentes o no covalentes entre sí.

En una realización, el enlazador forma uno o más enlaces covalentes o no covalentes con el agente terapéutico y uno o más enlaces covalentes o no covalentes con el resto de direccionamiento, uniéndolos de este modo entre sí. En algunas realizaciones, un primer enlazador forma un enlace covalente o no covalente con el agente terapéutico y un segundo enlazador forma un enlace covalente o no covalente con el resto de direccionamiento. Los dos enlazadores forman uno o más enlaces covalentes o no covalentes entre sí.

Puede usarse cualquier enlazador adecuado de acuerdo con la presente invención. Los enlazadores pueden usarse para formar enlaces amida, enlaces éster, enlaces disulfuro, etc. Los enlazadores pueden contener átomos de carbono o heteroátomos (por ejemplo, nitrógeno, oxígeno, azufre, etc.). Normalmente, los enlazadores tienen de 1 a 50 átomos de longitud, de 1 a 40 átomos de longitud, de 1 a 25 átomos de longitud, de 1 a 20 átomos de longitud, de 1 a 15 átomos de longitud, de 1 a 10 átomos de longitud o de 1 a 10 átomos de longitud. Los enlazadores pueden estar sustituidos con diversos sustituyentes incluyendo, pero sin limitación, átomos de hidrógeno, grupos alquilo, alqueno, alquino, amino, alquilamino, dialquilamino, trialkilamino, hidroxilo, alcoxi, halógeno, arilo, heterociclilo, heterociclilo aromático, ciano, amida, carbamoilo, ácido carboxílico, éster, tioéter, alquiltioéter, tiol y ureido. Como apreciaría un experto en esta materia, cada uno de estos grupos puede a su vez estar sustituido.

En algunas realizaciones, un enlazador es un enlazador alifático o heteroalifático. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador de polialquilo. En determinadas realizaciones, el enlazador es un enlazador de poliéter. En determinadas realizaciones, el enlazador es un enlazador de polietileno. En determinadas realizaciones específicas, el enlazador es un enlazador de polietilenglicol (PEG).

En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador escindible. Por proporcionar unos pocos ejemplos, los enlazadores escindibles incluyen enlazadores peptídicos escindibles por proteasas, enlazadores de ácido nucleico sensibles a nucleasas, enlazadores lipídicos sensibles a lipasas, hidratos de carbono sensibles a glucosidasas, enlazadores sensibles al pH, enlazadores sensibles a la hipoxia, enlazadores fotoescindibles, enlazadores lábiles al calor, enlazadores escindibles por enzimas (por ejemplo, enlazador escindible por esterasas), enlazadores sensibles al ultrasonido, enlazadores escindibles por rayos X, etc. En algunas realizaciones, el enlazador no es un enlazador escindible.

Puede usarse cualquiera de diversos métodos para asociar un enlazador a una partícula. Las estrategias generales incluyen adsorción pasiva (por ejemplo, a través de interacciones electrostáticas), quelación multivalente, unión no covalente de alta afinidad entre miembros de un par de unión específico, formación de enlaces covalentes, etc. (Gao et al., 2005, *Curr. Op. Biotechnol.*, 16: 63). En algunas realizaciones, puede usarse química clic para asociar un enlazador a una partícula (por ejemplo, reacción de Diels-Alder, cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen, sustitución nucleófila, química de carbonilo, epoxidación, dihidroxilación, etc.).

Puede emplearse un reactivo de reticulación bifuncional. Dichos reactivos contienen dos grupos reactivos, proporcionando de este modo un medio para asociar covalentemente dos grupos diana. Los grupos reactivos en un reactivo químico de reticulación normalmente pertenecen a diversas clases de grupos funcionales tales como

ésteres de succinimidilo, maleimidas y piridildisulfuros. Los agentes de reticulación de ejemplo incluyen, por ejemplo, carbodiimidas, ácido N-hidroxisuccinimidil-4-azidosalicílico (NHS-ASA), diclorhidrato de pimelimidato de dimetilo (DMP), suberimidato de dimetilo (DMS), 3,3'-ditiobispropionimidato (DTBPim), N-Succinimidil 3-[2-piridilditio]propionamido (SPDP),  $\alpha$ -metilbutanoato de succinimidilo, éster de N-hidroxi-succinimida del ácido biotinamidoheptanoil-6-amino-heptanoico (SMCC), éster de succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-dodecaetilenglicol] (NHS-PEO12), etc. Por ejemplo, la formación de amida mediada por carbodiimida y el acoplamiento de amina y sulfhidrilo mediado por éster de maleimida activo son métodos ampliamente utilizados.

Los esquemas comunes para formar una partícula dirigida implican el acoplamiento de un grupo amina en una molécula con un grupo tiol en una segunda molécula, en ocasiones mediante una secuencia de reacción de dos o tres etapas. Una molécula que contiene tiol puede hacerse reaccionar con una molécula que contiene amina usando un reactivo de reticulación heterobifuncional, por ejemplo, un reactivo que contiene tanto un éster de succinimidilo como una maleimida, un piridildisulfuro o una yodoacetamida. Puede usarse reticulación de ácido amino-carboxílico y ácido tiol-carboxílico, químicas de acoplamiento de maleimida-sulfhidrilo (por ejemplo, el método de éster de maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida (MBS)), etc. Los polipéptidos pueden unirse convenientemente a partículas a través de grupos amina o tiol en cadenas laterales de lisina o cisteína respectivamente o mediante un grupo amino N-terminal. Los ácidos nucleicos tales como los ARN pueden sintetizarse con un grupo amino terminal. Puede usarse diversos reactivos de acoplamiento (por ejemplo, 3-(2-piridilditio)propionato de succinimidilo (SPDP) y sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) para asociar los diversos componentes de las partículas diana. Las partículas pueden prepararse con grupos funcionales, por ejemplo, grupos amina o carboxilo, disponibles en la superficie para facilitar la asociación a una biomolécula.

Pueden emplearse interacciones de unión específicas no covalentes. Por ejemplo, puede funcionalizarse una partícula o una biomolécula con biotina funcionalizándose la otra con estreptavidina. Estos dos restos se unen específicamente entre sí de forma no covalente y con una afinidad alta, asociando de este modo la partícula y la biomolécula. Podrían usarse de manera similar otros pares de unión específicos. Como alternativa, pueden asociarse biomoléculas marcadas con histidina a partículas conjugadas con ácido níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA).

Puede unirse cualquier biomolécula a una partícula, a un resto de direccionamiento y/o agente terapéutico. El espaciador puede ser, por ejemplo, una cadena peptídica corta, por ejemplo, de entre 1 y 10 aminoácidos de longitud, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos de longitud, un ácido nucleico, una cadena alquílica, etc.

Para información general adicional sobre métodos de asociación y/o conjugación y reticuladores, véase la revista *Bioconjugate Chemistry*, publicada por la Sociedad Estadounidense de Química (American Chemical Society), Columbus OH, Apartado de Correos 3337, Columbus, OH, 43210; "Cross-Linking", Pierce Chemical Technical Library, disponible en el sitio web de Pierce y publicado originariamente en el Catálogo de Pierce 1994-95, y las referencias citadas en el mismo; Wong SS, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press Publishers, Boca Ratón, 1991; y Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Inc., San Diego, 1996.

Ha de comprenderse que las composiciones de la invención pueden prepararse como se describe en las reivindicaciones adjuntas. La selección de un método apropiado puede requerir prestar atención a las propiedades de los restos particulares que se asocian.

Si se desea, pueden usarse diversos métodos para separar las partículas dirigidas con un resto de direccionamiento y/o agente terapéutico unido de las partículas dirigidas a las que el resto de direccionamiento y/o agente terapéutico no se ha unido, o para separar partículas dirigidas que tienen diferentes números de restos de direccionamiento o agentes terapéuticos unidos a las mismas. Por ejemplo, pueden usarse cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis en gel de agarosa o filtración para separar poblaciones de partículas dirigidas que tienen diferentes números de restos unidos a las mismas y/o para separar partículas dirigidas de otras entidades. Algunos métodos incluyen cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio aniónico.

Puede usarse cualquier método para determinar si se han formado agregados de partículas dirigidas, incluyendo medir coeficientes de extinción, microscopía de fuerza atómica (MFA), etc. Un coeficiente de extinción, en términos generales, es una medida de la turbidez y/u opacidad de una sustancia. Si la radiación EM puede pasar a través de una sustancia muy fácilmente, la sustancia tiene un coeficiente de extinción bajo. Por el contrario, si la radiación EM apenas penetra una sustancia, pero rápidamente se "extingue" dentro de ella, el coeficiente de extinción es alto. Por ejemplo, para determinar si se han formado agregados de partículas dirigidas, la radiación EM se dirige hacia y se deja pasar a través de una muestra. Si la muestra contiene principalmente agregados de partículas dirigidas, la radiación EM se desviará y se dispersará en un patrón que es diferente del patrón producido por una muestra que contiene principalmente partículas dirigidas individuales.

En general, la MFA utiliza un tipo de alta resolución de microscopio de sonda de barrido y alcanza una resolución de fracciones de un Angstrom. El microscopio tiene un soporte de palanca de microescala con una punta afilada (sonda) en su extremo que se usa para hacer un barrido de la superficie de una muestra de ensayo. El soporte de palanca es frecuentemente de silicio o nitruro de silicio con un radio de curvatura de la punta del orden de

nanómetros. Cuando la punta se aproxima a la superficie de una muestra, las fuerzas entre la punta y la muestra conducen a una deformación del soporte de palanca de acuerdo con la ley de Hooke. Normalmente, se emplea un mecanismo de retroalimentación para ajustar la distancia de la punta a la muestra para mantener una fuerza constante entre la punta y la muestra. Las muestras por lo general se extienden en una capa delgada a través de una superficie (por ejemplo, mica), que se monta sobre un tubo piezoeléctrico que puede mover la muestra en la dirección z para mantener una fuerza constante, y las direcciones x e y para barrer la muestra.

En general, las fuerzas que se miden en la MFA pueden incluir la fuerza de contacto mecánica, las fuerzas de Van der Waals, las fuerzas capilares, el enlace químico, las fuerzas electrostáticas, las fuerzas magnéticas, las fuerzas Casimir, las fuerzas de solvatación, etc. Normalmente, la deformación se mide usando un punto láser reflejado desde la parte superior del soporte de palanca hacia una matriz de fotodiodos. Como alternativa o adicionalmente, la deformación puede medirse usando interferometría óptica, detección capacitiva o sondas de MFA piezorresistentes.

#### *Aplicaciones terapéuticas*

Los sujetos incluyen, pero sin limitación, seres humanos y/u otros primates; mamíferos, incluyendo mamíferos comercialmente relevantes tales como ganado, cerdos, caballos, ovejas, gatos y/o perros.

#### Métodos de tratamiento

En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de acuerdo con la presente invención pueden usarse para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención pueden usarse para tratar el cáncer. En determinadas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención pueden usarse para tratar el cáncer de próstata.

El cáncer puede asociarse a diversos síntomas físicos. Los síntomas del cáncer generalmente dependen del tipo y la ubicación del tumor. Por ejemplo, el cáncer de pulmón puede provocar tos, dificultad para respirar y dolor en el pecho, mientras que el cáncer de colon con frecuencia provoca diarrea, estreñimiento y sangre en las heces. Sin embargo, por proporcionar unos pocos ejemplos, los siguientes síntomas se asocian con frecuencia a muchos tipos de cáncer: fiebre, escalofríos, sudores nocturnos, tos, disnea, pérdida de peso, pérdida de apetito, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, anemia, ictericia, hepatomegalia, hemoptisis, fatiga, malestar, disfunción cognitiva, depresión, trastornos hormonales, neutropenia, dolor, llagas que no se curan, ganglios linfáticos agrandados, neuropatía periférica y disfunción sexual.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para el tratamiento contra el cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata). En algunas realizaciones, el tratamiento contra el cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de partículas dirigidas de la invención a un sujeto que lo necesite, en las cantidades y durante el tiempo que sean necesarios para conseguir el resultado deseado. En determinadas realizaciones de la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una partícula dirigida de la invención es la cantidad eficaz para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características del cáncer.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para administrar composiciones de la invención a un sujeto que padece cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata). En algunas realizaciones, dichos métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de partículas dirigidas de la invención a un sujeto en dichas cantidades y durante el tiempo que sea necesario para conseguir el resultado deseado (es decir, el tratamiento contra el cáncer). En determinadas realizaciones de la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una partícula dirigida de la invención es la cantidad eficaz para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características del cáncer.

Los protocolos terapéuticos de la invención implican administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula dirigida de la invención a un individuo sano (es decir, un sujeto que no muestra ningún síntoma de cáncer y/o que no ha sido diagnosticado con cáncer). Por ejemplo, los individuos sanos pueden ser "inmunizados" con una partícula dirigida de la invención antes del desarrollo de cáncer y/o la aparición de síntomas de cáncer; los individuos en riesgo (por ejemplo, pacientes con antecedentes familiares de cáncer; los pacientes portadores de una o más mutaciones genéticas asociadas al desarrollo de cáncer; los pacientes con un polimorfismo genético asociado al desarrollo de cáncer; los pacientes infectados por un virus asociado al desarrollo de cáncer; los pacientes con hábitos y/o estilos de vida asociados al desarrollo de cáncer; etc.) pueden ser tratados de manera sustancialmente simultánea (por ejemplo, a las 48 horas, a las 24 horas o a las 12 horas) a la aparición de síntomas de cáncer. Por supuesto, las personas que se sabe que tienen cáncer pueden recibir un tratamiento de la invención en cualquier momento.

#### Métodos de diagnóstico

En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la presente invención pueden usarse para diagnosticar una



enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención pueden usarse para diagnosticar el cáncer. En determinadas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención pueden usarse para diagnosticar el cáncer de próstata. En algunas realizaciones, dichos métodos de diagnóstico pueden implicar el uso de partículas dirigidas de la invención para detectar y/o localizar físicamente un tumor dentro del cuerpo de un sujeto.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para el diagnóstico de cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata). En algunas realizaciones, el diagnóstico de cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de partículas dirigidas de la invención a un sujeto, en las cantidades y durante el tiempo que sean necesarios para conseguir el resultado deseado. En determinadas realizaciones de la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una partícula dirigida de la invención es la cantidad eficaz para diagnosticar el cáncer.

En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención comprenden partículas que tienen propiedades intrínsecamente detectables (que se describen con más detalle a continuación). En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención comprenden partículas que no tienen propiedades intrínsecamente detectables pero que se asocian a una sustancia que es detectable.

#### *A. Partículas dirigidas que comprenden un agente detectable*

En determinadas realizaciones de la invención, la partícula comprende un material en masa que no es intrínsecamente detectable. La partícula puede comprender uno o más restos fluorescentes, luminiscentes o magnéticos. Por ejemplo, la partícula puede comprender sustancias fluorescentes o luminiscentes o partículas más pequeñas de un material magnético. En algunas realizaciones, un resto ópticamente detectable tal como un colorante fluorescente o luminiscente, etc., está atrapado, embebido o encapsulado por un núcleo de partícula y/o una capa de recubrimiento. Los restos fluorescentes y luminiscentes incluyen diversas moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas diferentes, como se ha descrito en más detalle anteriormente.

La fluorescencia o la luminiscencia pueden detectarse usando cualquier enfoque conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitación, espectrometría, microscopia de fluorescencia, citometría de flujo, etc. Normalmente se usan espectrofluorómetros y lectores de microplacas para medir las propiedades promedio de una muestra mientras que los microscopios de fluorescencia resuelven la fluorescencia como una función de coordenadas espaciales en dos o tres dimensiones para objetos microscópicos (por ejemplo, menos de aproximadamente 0,1 mm de diámetro). Por tanto, los sistemas basados en microscopio son adecuados para detectar y opcionalmente cuantificar partículas dentro de células individuales.

La citometría de flujo mide propiedades tales como la dispersión de la luz y/o la fluorescencia en células individuales en una corriente que fluye, lo que permite identificar, analizar y opcionalmente cuantificar subpoblaciones dentro de una muestra (véase, por ejemplo, Mattheakis et al., 2004, *Analytical Biochemistry*, 327: 200). Hay disponibles citómetros de flujo multiparamétricos. En determinadas realizaciones de la invención, se usa citometría de barrido láser (Kamentsky, 2001, *Methods Cell Biol.*, 63: 51). La citometría de barrido láser puede proporcionar datos equivalentes a un citómetro de flujo, pero normalmente se aplica a células sobre un soporte sólido, tal como un portaobjetos. Permite mediciones de dispersión de luz y fluorescencia y registra la posición de cada medición. Las células de interés pueden reubicarse, visualizarse, teñirse, analizarse y/o fotografiarse. Hay disponibles citómetros de barrido láser, por ejemplo, en CompuCyte (Cambridge, MA).

En determinadas realizaciones de la invención, se usa un sistema de formación de imágenes que comprende un microscopio de epifluorescencia equipado con un láser (por ejemplo, un láser de argón de 488 nm) para la excitación y filtro o filtros de emisión apropiados. Los filtros deben permitir la discriminación entre diferentes poblaciones de partículas utilizadas en el ensayo particular. Por ejemplo, en una realización, el microscopio está equipado con quince filtros de paso de banda de 10 nm espaciados para cubrir una porción del espectro de entre 520 y 660 nm, lo que permitiría la detección de una amplia diversidad de partículas fluorescentes diferentes. Pueden obtenerse espectros de fluorescencia de poblaciones de partículas usando un espectrómetro de UV/visible convencional.

#### *B. Partículas dirigidas que comprenden partículas con propiedades detectables intrínsecamente*

En algunas realizaciones, las partículas tienen propiedades ópticas y/o magnéticas detectables, aunque podrían usarse partículas que puedan detectarse mediante otros enfoques. Una partícula ópticamente detectable es aquella que puede detectarse dentro de una célula viva usando medios ópticos compatibles con la viabilidad celular. La detección óptica se logra mediante la detección de la dispersión, la emisión y/o la absorción de luz que cae dentro de la región óptica del espectro, es decir, esa porción del espectro que se prolonga de aproximadamente 180 nm a varios micrómetros. Opcionalmente, una muestra que contiene células se expone a una fuente de energía electromagnética. En algunas realizaciones de la invención, la absorción de energía electromagnética (por ejemplo, la luz de una longitud de onda dada) por la partícula o un componente de la misma va seguida de la emisión de luz a longitudes de onda más largas y se detecta la luz emitida. En algunas realizaciones, se detecta la dispersión de luz por las partículas. En determinadas realizaciones de la invención, se detecta luz que cae dentro de la porción visible del espectro electromagnético, es decir, la porción del espectro que es detectable por el ojo humano (de

aproximadamente 400 nm a aproximadamente 700 nm). En algunas realizaciones de la invención, se detecta luz que cae dentro de la región infrarroja o ultravioleta del espectro.

Una propiedad óptica puede ser una característica de un espectro de absorción, emisión o dispersión, o un cambio en una característica de un espectro de absorción, emisión o dispersión. Una propiedad óptica puede ser una característica detectable visualmente tal como, por ejemplo, color, tamaño aparente o visibilidad (es decir, simplemente si la partícula es visible o no en condiciones particulares). Las características de un espectro incluyen, por ejemplo, la longitud de onda o la frecuencia máximas (la longitud de onda o la frecuencia a la que se produce la emisión máxima, la intensidad de dispersión, la extinción, la absorción, etc.), la magnitud máxima (por ejemplo, el valor de emisión máximo, la intensidad de dispersión máxima, el valor de absorbancia máximo, etc.), el ancho máximo a media altura o las métricas derivadas de cualquiera de los anteriores, tales como la relación de la magnitud máxima con respecto al ancho máximo. Determinados espectros pueden contener múltiples picos, de los cuales uno es normalmente el pico principal y tiene una intensidad significativamente superior a la de los otros. Cada pico espectral tiene características asociadas. Normalmente, para cualquier espectro particular, las características espectrales tales como la longitud de onda o la frecuencia máximas, la magnitud máxima, el ancho máximo a media altura, etc., se determinan con respecto al pico principal. Las características de cada pico, el número de picos, la separación entre picos, etc., pueden considerarse características del espectro en su conjunto. Las características anteriores pueden medirse en función de la dirección de polarización de la luz que ilumina las partículas; de este modo puede medirse la dependencia de la polarización. Pueden medirse las características asociadas a la hiperdispersión de Rayleigh. La detección de fluorescencia puede incluir la detección de modos de fluorescencia y cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento.

Las partículas intrínsecamente fluorescentes o luminiscentes, las partículas que comprenden restos fluorescentes o luminiscentes, las partículas resonantes por plasmón y las partículas magnéticas se encuentran entre las partículas detectables que se usan en diversas realizaciones de la invención. Dichas partículas pueden tener diversas formas diferentes, incluyendo esferas, esferoides achatados en los polos, cilindros, cubiertas, cubos, pirámides, varillas (por ejemplo, cilindros o estructuras alargadas que tienen una sección transversal cuadrada o rectangular), tetrápodes (partículas que tienen cuatro apéndices en forma de patas), triángulos, prismas, etc. En general, las partículas deben tener dimensiones lo suficientemente pequeñas para permitir su captación por células eucariotas. Normalmente, las partículas tienen una dimensión recta más larga (por ejemplo, diámetro) de 200 nm o menos. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 100 nm o menos. Se usan partículas más pequeñas, por ejemplo, que tienen diámetros de 50 nm o menos, por ejemplo, 5-30 nm, en algunas realizaciones de la invención. En algunas realizaciones, el término "partícula" abarca agrupamientos atómicos, que tienen un diámetro típico de 1 nm o menos y generalmente contienen desde varios (por ejemplo, 3-4) hasta varios cientos de átomos.

En determinadas realizaciones de la invención, las partículas pueden ser puntos cuánticos (PC). Los PC son nanocristales brillantes y fluorescentes con dimensiones físicas lo suficientemente pequeñas para que el efecto del confinamiento cuántico dé lugar a propiedades ópticas y electrónicas únicas. Los PC semiconductores con frecuencia están compuestos por átomos de los grupos II-VI o III-V en la tabla periódica, pero son posibles otras composiciones (véase, por ejemplo, Zheng et al., 2004, *Phys. Rev. Lett.*, 93: 7, que describe PC de oro). Mediante la variación de su tamaño y composición, la longitud de onda de emisión puede sintonizarse (es decir, ajustarse de manera predecible y controlable) del azul al infrarrojo cercano. Los PC generalmente tienen un espectro de absorción amplio y un espectro de emisión estrecho. Por tanto, diferentes PC que tienen propiedades ópticas distinguibles (por ejemplo, longitud de onda de emisión máxima) pueden excitarse usando una sola fuente. Los PC son aproximadamente 10 veces más brillantes que la mayoría de los colorantes fluorescentes convencionales (Wu et al., 2003, *Nat. Biotechnol.*, 21: 41; y Gao et al., 2004, *Nat. Biotechnol.*, 22: 969) y han sido significativamente más fáciles de detectar que la GFP entre la autofluorescencia de fondo *in vivo* (Gao et al., 2004, *Nat. Biotechnol.*, 22: 969). Además, Los PC son menos susceptibles al fotoblanqueo, son más de 20 veces más fluorescentes que los colorantes fluorescentes convencionales bajo exposición continua a lámparas de mercurio (Derfus et al., 2004, *Advanced Materials*, 16: 961).

En determinadas realizaciones de la invención, las partículas ópticamente detectables son partículas metálicas. Los metales de uso en las partículas incluyen, pero sin limitación, oro, plata, hierro, cobalto, cinc, cadmio, níquel, gadolinio, cromo, cobre, manganeso, paladio, estaño y aleaciones de los mismos. Pueden usarse óxidos de cualquiera de estos metales.

Se prefieren los metales nobles (por ejemplo, oro, plata, cobre, platino, paladio) para partículas resonantes por plasmón, que se analizan con más detalle a continuación. Por ejemplo, puede usarse oro, plata o una aleación que comprenda oro, plata y, opcionalmente, uno o más metales. Pueden usarse partículas de núcleo/cubierta (por ejemplo, que tengan un núcleo de plata con una cubierta externa de oro o viceversa). Pueden usarse partículas que contengan un núcleo metálico y una cubierta externa inorgánica u orgánica no metálica, o viceversa. En determinadas realizaciones, el núcleo o la cubierta no metálicos comprenden un material dieléctrico tal como sílice. Pueden usarse partículas compuestas en las que una pluralidad de partículas metálicas están embebidas o atrapadas en un material no metálico (por ejemplo, un polímero o una cubierta de sílice). En algunas realizaciones se usan partículas metálicas huecas (por ejemplo, nanocubiertas huecas) que tienen un espacio o cavidad interior. En algunas realizaciones, se usa una nanocubierta que comprende dos o más esferas huecas concéntricas. Una

partícula de este tipo comprende opcionalmente un núcleo, por ejemplo, hecho de un material dieléctrico.

En determinadas realizaciones de la invención, al menos el 1 % o normalmente al menos el 5 % de la masa o el volumen de la partícula o número de átomos en la partícula son aportados por átomos metálicos. En determinadas realizaciones de la invención, la cantidad de metal en la partícula o en un núcleo o capa de recubrimiento que comprende un metal, varía aproximadamente del 5 % al 100 % en masa, volumen o número de átomos, o puede asumir cualquier valor u oscilar entre el 5 y el 100 %.

Determinadas partículas metálicas, denominadas partículas resonantes por plasmón, presentan el bien conocido fenómeno de la resonancia por plasmón. Cuando una partícula metálica (por lo general hecha de un metal noble tal como oro, plata, cobre, platino, etc.) se somete a un campo eléctrico externo, sus electrones de conducción se desplazan de sus posiciones de equilibrio con respecto a los núcleos, que a su vez ejercen una fuerza atrayente y restauradora. Si el campo eléctrico oscila (como en el caso de la radiación electromagnética, tal como la luz), el resultado es una oscilación colectiva de los electrones de conducción en la partícula, conocida como resonancia por plasmón (Kelly et al., 2003, *J. Phys. Chem. B.*, 107: 668; Schultz et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 97: 996; y Schultz, 2003, *Curr. Op. Biotechnol.*, 14: 13). El fenómeno de resonancia por plasmón da como resultado una absorción y dispersión de luz dependientes de la longitud de onda extremadamente eficientes por las partículas sobre bandas particulares de frecuencias, con frecuencia en el intervalo visible. La dispersión y la absorción dan lugar a una serie de propiedades ópticas distintivas que pueden detectarse usando diversos enfoques, incluyendo visualmente (es decir, a simple vista o usando técnicas microscópicas apropiadas) y/u obteniendo un espectro, por ejemplo, un espectro de dispersión, un espectro de extinción (dispersión + absorción) o un espectro de absorción a partir de la partícula o partículas.

Determinadas partículas dopadas con iones de lantánidos presentan una fuerte fluorescencia y se usan en determinadas realizaciones de la invención. Puede usarse diversas diferentes moléculas dopantes. Por ejemplo, se han producido partículas de vanadiato de itrio dopado con europio (YVO<sub>4</sub>) fluorescentes (Beaureparie et al., 2004, *Nano Letters*, 4: 2079). Estas partículas pueden sintetizarse en agua y se funcionalizan fácilmente con biomoléculas.

Se usan partículas magnéticas en la invención. Las "partículas magnéticas" se refieren a partículas magnéticamente sensibles que contienen uno o más metales u óxidos o hidróxidos de los mismos. Dichas partículas normalmente reaccionan a la fuerza magnética resultante de un campo magnético. El campo puede atraer o repeler la partícula hacia o lejos de la fuente del campo magnético, respectivamente, provocando opcionalmente una aceleración o movimiento en una dirección deseada en el espacio. Una partícula magnéticamente detectable es una partícula magnética que puede detectarse dentro de una célula viva como consecuencia de sus propiedades magnéticas. Las partículas magnéticas pueden comprender uno o más materiales ferrimagnéticos, ferromagnéticos, paramagnéticos y/o superparamagnéticos. Las partículas útiles pueden estar hechas en su totalidad o en parte de uno o más materiales seleccionados entre el grupo que consiste en: hierro, cobalto, níquel, niobio, óxidos de hierro magnéticos, hidróxidos tales como maghemita ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), feroxihiita (FeO(OH)), óxidos o hidróxidos dobles de hierro de bi o trivalente con otros iones metálicos bi o trivalentes, tales como los de la primera fila de metales de transición, tales como Co(II), Mn(II), Cu(II), Ni(II), Cr(III), Gd(III), Dy(III), Sm(III), mezclas de los óxidos o hidróxidos mencionados anteriormente y mezclas de cualquiera de los anteriores. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. 5.916.539 para métodos de síntesis adecuados para algunas de estas partículas. Los materiales adicionales que pueden usarse en partículas magnéticas incluyen itrio, europio y vanadio.

Una partícula magnética puede contener un material magnético y uno o más materiales no magnéticos, que pueden ser un metal o no un metal. En determinadas realizaciones de la invención, la partícula es una partícula compuesta que comprende un núcleo interno o capa que contiene un primer material y una capa externa o cubierta que contiene un segundo material, en donde al menos uno de los materiales es magnético. Opcionalmente, ambos materiales son metales. En una realización, la partícula es una partícula de óxido de hierro, por ejemplo, la partícula tiene un núcleo de óxido de hierro. Opcionalmente el óxido de hierro es monocristalino. En una realización, la partícula es una partícula de óxido de hierro superparamagnética, por ejemplo, la partícula tiene un núcleo de óxido de hierro superparamagnético.

La detección de partículas magnéticas puede realizarse usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede emplearse un magnetómetro o un detector basado en el fenómeno de resonancia magnética (RMN). Pueden usarse dispositivos de interferencia cuántica superconductora (SQUID), que usan las propiedades de coherencia de onda de pares de electrones y uniones Josephson para detectar campos magnéticos muy pequeños. Puede usarse microscopía de fuerza magnética o lectores magnéticos de mano. La Publicación de Patente de los EE.UU. 2003/009029 describe diversos métodos adecuados. La microscopía de resonancia magnética ofrece un enfoque (Wind et al., 2000, *J. Magn. Reson.*, 147: 371).

En algunas realizaciones, el uso de partículas magnéticas permite el uso de un imán para colocar la partícula dirigida en la proximidad de la célula o tejido diana. Por ejemplo, una partícula dirigida que comprende una partícula magnética puede administrarse a un sujeto por vía intravenosa y los imanes externos pueden colocarse de manera que se cree un campo magnético dentro del cuerpo en el sitio de un tejido diana. La partícula magnética es atraída al campo magnético y queda retenida ahí hasta que se retira el imán.

Composiciones farmacéuticas

La presente invención proporciona partículas dirigidas novedosas como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

- 5 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden partículas dirigidas de la invención como se describe en el presente documento. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente una o más sustancias terapéuticamente activas adicionales. De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona un método de administración de una composición farmacéutica que comprende composiciones de la invención a un sujeto que lo necesite. En algunas realizaciones, se administran
- 10 composiciones de la invención a seres humanos. Para los fines de la presente invención, la frase "principio activo" generalmente se refiere a una partícula dirigida de la invención que comprende una partícula, uno o más restos de direccionamiento (por ejemplo, aptámeros) y uno o más agentes terapéuticos que han de suministrarse.

- 15 Aunque las descripciones de las composiciones farmacéuticas que se proporcionan en el presente documento se refieren principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración a seres humanos, el experto en la materia entenderá que dichas composiciones son generalmente adecuadas para la administración a animales de todo tipo. La modificación de las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a seres humanos con el fin de hacer que las composiciones sean adecuadas para la administración a diversos animales se entiende bien y el farmacólogo veterinario de experiencia habitual en la materia puede diseñar y/o
- 20 realizar dicha modificación con experimentación meramente habitual, si la hubiera. Los sujetos para los que se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero sin limitación, seres humanos y/u otros primates; mamíferos, incluyendo mamíferos comercialmente relevantes tales como ganado, cerdos, caballos, ovejas, gatos y/o perros.

- 25 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier método conocido o desarrollado posteriormente en la técnica de la farmacia. En general, dichos métodos preparatorios incluyen la etapa de asociar el principio activo a uno o más excipientes y/o uno o más ingredientes adyuvantes adicionales y después, si es necesario y/o deseable, conformar y/o acondicionar el producto en una unidad de dosis individual o múltiple.

- 30 Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, acondicionarse y/o comercializarse a granel, como dosis unitaria individual y/o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Como se usa en el presente documento, una "dosis unitaria" es una cantidad pequeña de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del principio activo. La cantidad del principio activo es generalmente igual a la dosificación del principio activo que se administraría a un sujeto y/o una fracción conveniente de dicha dosificación tal como, por
- 35 ejemplo, una mitad o un tercio de una dosificación de este tipo.

- Las cantidades relativas del principio activo, el excipiente o excipientes farmacéuticamente aceptables y/o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de la invención variarán, dependiendo de la identidad, el
- 40 tamaño y/o el estado del sujeto tratado y, adicionalmente, dependiendo de la vía por la que ha de administrarse la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre el 0,1 % y el 100 % (p/p) de principio activo.

- 45 Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable, que, como se usa en el presente documento, incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma farmacéutica particular deseada. *Remington's The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª Edición, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)
- 50 desvela diversos excipientes utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Excepto en la medida en que cualquier excipiente convencional sea incompatible con una sustancia o sus derivados, tal como mediante la producción de cualquier efecto biológico no deseable o la interacción de otro modo de forma perjudicial con cualquier otro componente o componentes de la composición farmacéutica, su uso se contempla dentro del alcance de la presente invención.

- 55 En algunas realizaciones, el excipiente farmacéuticamente aceptable es puro en al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 %. En algunas realizaciones, el excipiente está aprobado para su uso en seres humanos y para su uso veterinario. En algunas realizaciones, el excipiente está aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos. En algunas realizaciones, el excipiente es de grado farmacéutico. En algunas
- 60 realizaciones, el excipiente cumple con los criterios de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), la Farmacopea Europea (EP), la Farmacopea Británica y/o la Farmacopea Internacional.

- Los excipientes farmacéuticamente aceptables utilizados en la fabricación de composiciones farmacéuticas incluyen, pero sin limitación, diluyentes inertes, agentes de dispersión y/o granulación, tensioactivos y/o emulsionantes,
- 65 agentes disgregantes, agentes aglutinantes, conservantes, agentes tamponantes, agentes lubricantes y/o aceites. Dichos excipientes pueden incluirse opcionalmente en las formulaciones de la invención. Puede haber presentes en

la composición excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorio, agentes colorantes, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, de acuerdo con el criterio del experto en formulación.

5 Los diluyentes de ejemplo incluyen, pero sin limitación, carbonato de calcio, carbonato de sodio, fosfato de calcio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, hidrogenofosfato de calcio, lactosa fosfato de sodio, sacarosa, celulosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, sorbitol, inositol, cloruro de sodio, almidón seco, almidón de maíz, azúcar en polvo, etc. y combinaciones de los mismos.

10 Los agentes granulantes y/o dispersantes de ejemplo incluyen, pero sin limitación, almidón de patata, almidón de maíz, almidón de tapioca, glicolato sódico de almidón, arcillas, ácido algínico, goma guar, pulpa de cítricos, agar, bentonita, celulosa y productos de madera, esponja natural, resinas de intercambio catiónico, carbonato de calcio, silicatos, carbonato de sodio, poli(vinilpirrolidona) reticulada (crospovidona), carboximetil almidón de sodio (glicolato de almidón de sodio), carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio reticulada (croscarmelosa), metilcelulosa,

15 almidón pregelatinizado (almidón 1500), almidón microcristalino, almidón insoluble en agua, carboximetilcelulosa de calcio, silicato de aluminio y magnesio (Veegum), lauril sulfato de sodio, compuestos de amonio cuaternario, etc. y combinaciones de los mismos.

Los agentes tensioactivos y/o emulsionantes de ejemplo incluyen, pero sin limitación, emulsionantes naturales (por ejemplo, goma arábiga, agar, ácido algínico, alginato de sodio, tragacanto, chondrus, colesterol, xantano, pectina, gelatina, yema de huevo, caseína, lanolina, colesterol, cera y lecitina), arcillas coloidales (por ejemplo, bentonita [silicato de aluminio] y Veegum [silicato de aluminio y magnesio]), derivados de aminoácidos de cadena larga, alcoholes de alto peso molecular (por ejemplo, alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol oleílico, monoestearato de triacetina, diestearato de etilenglicol, monoestearato de glicerilo y monoestearato de propilenglicol, alcohol polivinílico), carbómeros (por ejemplo, carboxipolimetileno, ácido poliacrílico, polímero de ácido acrílico y polímero de carboxivinilo), carragenina, derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, celulosa en polvo, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa), ésteres de ácido graso de sorbitano (por ejemplo, monolaurato de sorbitano polioxietilenado [Tween 20], sorbitano polioxietilenado [Tween 60], monooleato de sorbitano polioxietilenado [Tween 80], monopalmitato de sorbitano [Span 40], monoestearato de sorbitano [Span 60], triestearato de sorbitano [Span 65], monooleato de glicerilo, monooleato de sorbitano [Span 80]), ésteres de polioxietileno (por ejemplo, monoestearato de polioxietileno [Myrj 45], aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado, aceite de ricino polioxietilenado, estearato polioxietilenado y Solutol), ésteres de ácido graso de sacarosa, ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol (por ejemplo, Cremophor), éteres de polioxietileno, (por ejemplo, polioxietileno lauril éter [Brij 30]), poli(vinilpirrolidona), monolaurato de dietilenglicol, oleato de trietanolamina, oleato de sodio, oleato de potasio, oleato de etilo, ácido oleico, laurato de etilo, lauril sulfato de sodio, Pluronic F 68, Poloxámero 188, bromuro de cetrimonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio, docusato de sodio, etc., y/o combinaciones de los mismos.

Los agentes aglutinantes de ejemplo incluyen, pero sin limitación, almidón (por ejemplo, almidón de maíz y pasta de almidón); gelatina; azúcares (por ejemplo, sacarosa, glucosa, dextrosa, dextrina, melaza, lactosa, lactitol, manitol); gomas naturales y sintéticas (por ejemplo, goma arábiga, alginato de sodio, extracto de musgo de Irlanda, goma panwar, goma ghatti, mucílago de cáscara de isapol, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, acetato de celulosa, poli(vinilpirrolidona), silicato de aluminio y magnesio (Veegum) y arabogalactano de alerce); alginatos; óxido de polietileno; polietilenglicol; sales de calcio inorgánicas; ácido silícico; polimetacrilatos; ceras; agua; alcohol; etc.; y combinaciones de los mismos.

Los conservantes de ejemplo pueden incluir antioxidantes, agentes quelantes, conservantes antimicrobianos, conservantes antifúngicos, conservantes alcohólicos, conservantes ácidos y otros conservantes. Los antioxidantes de ejemplo incluyen, pero sin limitación, alfa tocoferol, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, monotioglicerol, metabisulfito de potasio, ácido propiónico, galato de propilo, ascorbato de sodio, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio y sulfito de sodio. Los agentes quelantes de ejemplo incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), monohidrato de ácido cítrico, edetato disódico, edetato dipotásico, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, ácido fosfórico, edetato de sodio, ácido tartárico y edetato trisódico. Los conservantes antimicrobianos de ejemplo incluyen, pero sin limitación, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, bronopol, cetrimida, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, cloroxilenol, cresol, alcohol etílico, glicerina, hexetidina, imidurea, fenol, fenoxietanol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, propilenglicol y timerosal. Los conservantes antifúngicos de ejemplo incluyen, pero sin limitación, butil parabeno, metil parabeno, etil parabeno, propil parabeno, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, benzoato de potasio, sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio y ácido sórbico. Los conservantes alcohólicos de ejemplo incluyen, pero sin limitación, etanol, polietilenglicol, fenol, compuestos fenólicos, bisfenol, clorobutanol, hidroxibenzoato y alcohol feniletílico. Los conservantes ácidos de ejemplo incluyen, pero sin limitación, vitamina A, vitamina C, vitamina E, beta-caroteno, ácido cítrico, ácido acético, ácido deshidroacético, ácido ascórbico, ácido sórbico y ácido fítico. Otros conservantes incluyen, pero sin limitación, tocoferol, acetato de tocoferol, mesilato de deferroxime, cetrimida, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), etilendiamina, lauril sulfato de sodio (SLS), lauril éter sulfato de sodio (SLS), bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de potasio,

metabisulfito de potasio, Glydant Plus, Phenonip, metilparabeno, Germall 115, Germaben II, Neolone, Kathon y Euxyl. En determinadas realizaciones, el conservante es un antioxidante. En otras realizaciones, el conservante es un agente quelante.

5 Los agentes tamponantes de ejemplo incluyen, pero sin limitación, soluciones de tampón citrato, soluciones de tampón acetato, soluciones de tampón fosfato, cloruro de amonio, carbonato de calcio, cloruro de calcio, citrato de calcio, glucobionato de calcio, gluceptato de calcio, gluconato de calcio, ácido D-glucónico, glicerofosfato de calcio, lactato de calcio, ácido propanoico, levulinato de calcio, ácido pentanoico, fosfato de calcio dibásico, ácido fosfórico, fosfato de calcio tribásico, hidróxidofosfato de calcio, acetato de potasio, cloruro de potasio, gluconato de potasio, mezclas potásicas, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico, mezclas de fosfato de potasio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, lactato de sodio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, mezclas de fosfato de sodio, trometamina, hidróxido de magnesio, hidróxido de aluminio, ácido alginico, agua apirógena, solución salina isotónica, solución de Ringer, alcohol etílico, etc. y combinaciones de los mismos.

15 Los agentes lubricantes de ejemplo incluyen, pero sin limitación, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, sílice, talco, malta, behenato de glicerilo, aceites vegetales hidrogenados, polietilenglicol, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, leucina, lauril sulfato de magnesio, lauril sulfato de sodio, etc. y combinaciones de los mismos.

20 Los aceites de ejemplo incluyen, pero sin limitación, aceites de almendra, nuez de albaricoque, aguacate, babasú, bergamota, semillas de grosella negra, borraja, enebro rojo, camomila, canola, alcaravea, carnaúba, ricino, canela, manteca de cacao, coco, hígado de bacalao, café, maíz, semillas de algodón, emú, eucalipto, onagra, pescado, semillas de lino, geraniol, calabacín, semillas de uva, avellanas, hisopo, miristato de isopropilo, jojoba, nuez de kukui, lavandina, lavanda, limón, litsea cubeba, nuez de macadamia, malva, semillas de mango, semillas de hierba de la pradera, visón, nuez moscada, aceituna, naranja, reloj anaranjado, palma, nuez de palma, nuez de melocotón, cacahuete, semillas de amapola, semillas de calabaza, colza, salvado de arroz, romero, cártamo, madera de sándalo, camelia sasquana, ajedrea, espinos cervical, sésamo, manteca de karité, silicona, soja, girasol, árbol del té, cardo, camelia, vetiver, avellana y germen de trigo. Los aceites de ejemplo incluyen, pero sin limitación, estearato de butilo, triglicérido caprílico, triglicérido cáprico, ciclometicona, sebacato de dietilo, dimeticona 360, miristato de isopropilo, aceite mineral, octildodecanol, alcohol oleílico, aceite de silicona y combinaciones de los mismos.

35 Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral y parenteral incluyen, pero sin limitación, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los principios activos, las formas farmacéuticas líquidas pueden comprender diluyentes inertes utilizados habitualmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de algodón, cacahuete, maíz, germen, aceituna, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes. En determinadas realizaciones para la administración parenteral, las partículas dirigidas de la invención se mezclan con agentes solubilizantes tales como Cremophor, alcoholes, aceites, aceites modificados, glicoles, polisorbatos, ciclodextrinas, polímeros y combinaciones de los mismos.

45 Las preparaciones inyectables, por ejemplo, las suspensiones acuosas u oleosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente atóxico por vía parenteral aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, se usan convencionalmente aceites fijos estériles en forma de un disolvente o un medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables.

55 Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o mediante incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

60 Con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, con frecuencia es deseable ralentizar la absorción del fármaco desde la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende por tanto de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Como alternativa, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

Las composiciones para la administración rectal o vaginal son normalmente supositorios que pueden prepararse mezclando las partículas dirigidas de la presente invención con excipientes no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera para supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y, por tanto, se derretirán en el recto o en la cavidad vaginal y liberarán el principio activo.

Las formas farmacéuticas sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el principio activo se mezcla con al menos un excipiente inerte, farmacéuticamente aceptable, tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o a) cargas o diluyentes, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes, tales como glicerol, d) agentes disgregantes, tales como agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algnico, determinados silicatos y carbonato de sodio, e) agentes retardantes de la solución, tales como parafina, f) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita e i) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma farmacéutica puede comprender agentes tamponantes.

También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas rellenas de gelatina blanda y dura usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas farmacéuticas sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Pueden comprender opcionalmente agentes opacificantes y también pueden ser de una composición de manera que liberen a el principio o principios activos únicamente, o, preferentemente, en una parte determinada del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones embebidas que pueden utilizarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas rellenas de gelatina blanda y dura usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Los principios activos pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes, como se ha indicado anteriormente. Las formas farmacéuticas sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el principio activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas farmacéuticas pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes para la formación de comprimidos y otros adyuvantes para la compresión, tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas farmacéuticas pueden comprender agentes tamponantes. Pueden comprender opcionalmente agentes opacificantes y también pueden ser de una composición de manera que liberen a el principio o principios activos únicamente, o, preferentemente, en una parte determinada del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones embebidas que pueden utilizarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Las formas farmacéuticas para la administración tópica y/o transdérmica de una partícula dirigida de la presente invención pueden incluir pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhaladores y/o parches. Generalmente, el componente activo se mezcla en condiciones estériles con un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier conservante y/o tampón necesario según sea necesario. Adicionalmente, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que con frecuencia tienen la ventaja añadida de proporcionar el suministro controlado de un principio activo al organismo. Dichas formas farmacéuticas pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo y/o dispensando el principio activo en el medio adecuado. Como alternativa o adicionalmente, la velocidad puede controlarse proporcionando una membrana que controla la velocidad y/o dispersando el principio activo en una matriz polimérica y/o gel.

Los dispositivos adecuados para su uso en el suministro de composiciones farmacéuticas intradérmicas que se describen en el presente documento incluyen dispositivos de aguja corta tales como los que se describen en las patentes de los EE.UU. 4.886.499; 5.190.521; 5.328.483; 5.527.288; 4.270.537; 5.015.235; 5.141.496; y 5.417.662. Las composiciones intradérmicas pueden administrarse mediante dispositivos que limitan la longitud de penetración eficaz de una aguja en la piel, tales como los que se describen en la publicación PCT WO 99/34850 y equivalentes funcionales de los mismos. Son adecuados los dispositivos de inyección de chorro que suministran vacunas líquidas a la dermis a través de un inyector de chorro líquido y/o a través de una aguja que perfora el estrato córneo y produce un chorro que alcanza la dermis. Se describen dispositivos de inyección de chorro, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. 5.480.381; 5.599.302; 5.334.144; 5.993.412; 5.649.912; 5.569.189; 5.704.911; 5.383.851; 5.893.397; 5.466.220; 5.339.163; 5.312.335; 5.503.627; 5.064.413; 5.520.639; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 4.940.460; y en las Publicaciones PCT WO 97/37705 y WO 97/13537. Son adecuados los dispositivos de suministro balístico de polvo/partículas que usan gas comprimido para acelerar la vacuna en forma de polvo a través de las capas exteriores de la piel hasta alcanzar la dermis. Como alternativa o adicionalmente, pueden usarse jeringuillas

convencionales en el método clásico de mantoux de administración intradérmica.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen, pero sin limitación, preparaciones líquidas y/o semilíquidas tales como linimentos, lociones, emulsiones de aceite en agua y/o de agua en aceite tales como cremas, pomadas y/o pastas, y/o soluciones y/o suspensiones. Las formulaciones que pueden administrarse por vía tópica, por ejemplo, comprenden de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 % (p/p) de principio activo, aunque la concentración del principio activo puede ser tan alta como el límite de solubilidad del principio activo en el disolvente. Las formulaciones para la administración tópica pueden comprender adicionalmente uno o más de los ingredientes adicionales que se describen en el presente documento.

Una composición farmacéutica puede prepararse, acondicionarse y/o comercializarse en una formulación adecuada para la administración pulmonar a través de la cavidad bucal. Una formulación de este tipo puede comprender partículas secas que comprenden el principio activo y que tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 7 µm o de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 6 µm. Dichas composiciones están convenientemente en forma de polvos secos para la administración usando un dispositivo que comprende un depósito de polvo seco al que se puede dirigir una corriente de propulsor para dispersar el polvo y/o usar un depósito autopropulsor dispensador de disolvente/polvo tal como un dispositivo que comprende el principio activo disuelto y/o suspendido en un propulsor de bajo punto de ebullición en un recipiente sellado. Dichos polvos comprenden partículas en las que al menos el 98 % en peso de las partículas tienen un diámetro superior a 0,5 µm y al menos el 95 % de las partículas en número tienen un diámetro inferior a 7 µm. Como alternativa, al menos el 95 % de las partículas en peso tienen un diámetro superior a 1 µm y al menos el 90 % de las partículas en número tienen un diámetro inferior a 6 µm. Las composiciones de polvo seco pueden incluir un diluyente de polvo fino sólido tal como azúcar y se proporcionan convenientemente en una forma de dosis unitaria.

Los propulsores de bajo punto de ebullición por lo general incluyen propulsores líquidos que tienen un punto de ebullición inferior a 18,3 °C (65 °F) a presión atmosférica. Por lo general, el propulsor puede constituir del 50 al 99,9 % (p/p) de la composición, y el principio activo puede constituir del 0,1 al 20 % (p/p) de la composición. El propulsor puede comprender adicionalmente ingredientes adicionales tales como un tensioactivo no iónico líquido y/o un tensioactivo aniónico sólido y/o un diluyente sólido (que puede tener un tamaño de partícula del mismo orden que las partículas que comprenden el principio activo).

Las composiciones farmacéuticas de la invención formuladas para el suministro pulmonar pueden proporcionar el principio activo en forma de gotitas de una solución y/o suspensión. Dichas formulaciones pueden prepararse, acondicionarse y/o comercializarse como soluciones y/o suspensiones alcohólicas acuosas y/o diluidas, opcionalmente estériles, que comprenden el principio activo, y pueden administrarse convenientemente usando cualquier dispositivo de nebulización y/o atomización. Dichas formulaciones pueden comprender adicionalmente uno o más ingredientes adicionales incluyendo, pero sin limitación, un agente aromatizante tal como sacarina de sodio, un aceite volátil, un agente tamponante, un agente tensioactivo y/o un conservante tal como hidroxibenzoato de metilo. Las gotitas proporcionadas por esta vía de administración pueden tener un diámetro promedio en el intervalo de aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 200 µm.

Las formulaciones que se describen en el presente documento como útiles para el suministro pulmonar son útiles para el suministro intranasal de una composición farmacéutica de la invención. Otra formulación adecuada para la administración intranasal es un polvo grueso que comprende el principio activo y que tiene una partícula promedio de aproximadamente 0,2 a 500 micrómetros. Dicha formulación se administra de la manera en que se toma el tabaco, es decir, por inhalación rápida a través de la fosa nasal desde un recipiente del polvo que se mantiene cerca de las fosas nasales.

Las formulaciones adecuadas para la administración nasal pueden, por ejemplo, comprender de aproximadamente tan solo el 0,1 % (p/p) y tanto como el 100 % (p/p) del principio activo y pueden comprender uno o más de los ingredientes adicionales que se describen en el presente documento. Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, acondicionarse y/o comercializarse en una formulación adecuada para la administración bucal. Dichas formulaciones pueden estar, por ejemplo, en forma de comprimidos y/o pastillas para chupar preparados usando métodos convencionales, y pueden comprender, por ejemplo, del 0,1 al 20 % (p/p) de principio activo, comprendiendo el resto una composición soluble y/o degradable por vía oral y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales que se describen en el presente documento. Como alternativa, las formulaciones adecuadas para la administración bucal pueden comprender un polvo y/o una solución y/o suspensión aerosolizada y/o atomizada que comprende el principio activo. Dichas formulaciones en polvo, aerosolizadas y/o en aerosol, cuando se dispersan, pueden tener un tamaño de partícula promedio y/o gotitas en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 nanómetros y pueden comprender adicionalmente uno o más de los ingredientes adicionales que se describen en el presente documento.

Una composición farmacéutica puede prepararse, acondicionarse y/o comercializarse en una formulación adecuada para la administración oftálmica. Dichas formulaciones pueden estar, por ejemplo, en forma de colirio incluyendo, por ejemplo, una solución y/o suspensión al 0,1/1,0 % (p/p) del principio activo en un excipiente líquido acuoso u oleoso. Dichas gotitas pueden comprender adicionalmente agentes tamponantes, sales y/o uno o más de los ingredientes



adicionales que se describen en el presente documento. Otras formulaciones administrables por vía oftálmica que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina y/o en una preparación liposómica. Las gotas óticas y/o los colirios se consideran comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

- 5 Pueden encontrarse consideraciones generales en la formulación y/o fabricación de agentes farmacéuticos, por ejemplo, en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* 21ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

#### Administración

- 10 En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la invención se suministra a un paciente y/u organismo antes de, simultáneamente y/o después del diagnóstico de una enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, una cantidad terapéutica de una composición de la invención se suministra a un paciente y/u organismo antes, simultáneamente y/o después de la aparición de los síntomas de una enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, la cantidad de partícula dirigida de la invención es suficiente para
- 15 tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de la enfermedad, trastorno y/o afección.

- Las composiciones, de acuerdo con el uso de la presente invención, pueden administrarse usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaces para el tratamiento. La cantidad exacta necesaria variará de un
- 20 sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la infección, la composición particular, su modo de administración, su modo de actividad y similares. Las composiciones de la invención se formulan normalmente en forma farmacéutica unitaria para su facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Se comprenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones de la presente invención se decidirá por el médico especialista dentro del alcance del buen criterio médico. El nivel de dosis terapéuticamente
- 25 eficaz específico para cualquier sujeto u organismo particular dependerá de diversos factores incluyendo el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del principio activo específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la alimentación del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del principio activo específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o a la vez con el principio activo específico empleado; y factores similares bien conocidos en la técnica médica.
- 30

- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran por diversas vías, incluyendo la oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, subcutánea, intraventricular,
- 35 transdérmica, intradérmica, rectal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, pomadas, cremas y/o gotas), transdérmica, mucosa, nasal, bucal, enteral, sublingual; mediante instilación intratraqueal, instilación bronquial y/o inhalación; y/o como una pulverización oral, nasal y/o un aerosol. Las vías específicamente contempladas son la inyección intravenosa sistémica, la administración local mediante suministro de sangre y/o linfa, y/o la administración directa a un sitio afectado. En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención se
- 40 administran por vía parenteral. En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención se administran por vía intravenosa. En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención se administran por vía oral.

- En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención se administran directamente a un sitio afectado. Por ejemplo, las partículas dirigidas de la invención pueden administrarse localmente cerca de un tumor y/o pueden
- 45 administrarse directamente a un tumor. En algunas realizaciones, la administración local se refiere a la administración de partículas dirigidas directamente a un órgano específico (por ejemplo, inyección en la próstata). En algunas realizaciones, la administración local se refiere a la administración de partículas dirigidas directamente a un tejido particular. La administración local puede conseguirse a través de la inyección de partículas específicas directamente en un tumor o en la proximidad de un tumor. La administración local puede conseguirse mediante la
- 50 administración tópica de partículas dirigidas en o cerca del sitio de un tumor. La administración local puede conseguirse mediante la implantación de partículas específicas en o cerca del sitio de un tumor mediante cirugía estereotáctica. La administración local puede conseguirse mediante la implantación de partículas específicas en o cerca del sitio de un tumor durante la extirpación quirúrgica del tumor. En algunas realizaciones, la administración local se refiere a la administración de partículas dirigidas a una célula específica o población de células (por ejemplo,
- 55 células de cáncer de próstata).

- En general, la vía de administración más adecuada dependerá de diversos factores incluyendo la naturaleza del agente (por ejemplo, su estabilidad en el entorno del tracto gastrointestinal), el estado del sujeto (por ejemplo, si el sujeto puede tolerar la administración oral), etc. En la actualidad, la vía de aerosol y/o de pulverización oral y/o nasal
- 60 se usa más habitualmente para suministrarse agentes terapéuticos directamente a los pulmones y/o al sistema respiratorio. Sin embargo, la invención abarca el suministro de la composición farmacéutica de la invención por cualquier vía adecuada teniendo en cuenta los posibles avances en las ciencias del suministro de fármacos.

- En determinadas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención pueden administrarse como agente
- 65 terapéutico en cantidades que varían de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente

- 40 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado. La dosificación deseada puede suministrarse tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, en días alternos, cada tres días, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas. En determinadas realizaciones, la dosificación deseada puede suministrarse usando administraciones múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o más administraciones).
- En algunas realizaciones, la presente invención abarca "cócteles terapéuticos" que comprenden partículas dirigidas de la invención. En algunas realizaciones, las partículas dirigidas comprenden una sola especie de resto de direccionamiento que puede unirse al AMEP. En algunas realizaciones, diferentes partículas dirigidas comprenden diferentes especies de restos de direccionamiento y todas las diferentes especies de restos de direccionamiento pueden unirse al AMEP. En algunas divulgaciones, diferentes partículas dirigidas comprenden diferentes especies de restos de direccionamiento y todas las diferentes especies de restos de direccionamiento pueden unirse a diferentes dianas. En algunas divulgaciones, dichas dianas diferentes pueden asociarse al mismo tipo celular. En algunas divulgaciones, dichas dianas diferentes pueden asociarse a diferentes tipos celulares.
- Se apreciará que las partículas dirigidas y las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden emplearse en terapias combinadas. La combinación particular de terapias (tratamientos o procedimientos terapéuticos) que han de emplearse una posología combinada tendrá en cuenta la compatibilidad de los tratamientos y/o procedimientos terapéuticos deseados y el efecto terapéutico deseado que han de conseguirse. Se apreciará que las terapias empleadas pueden conseguir un efecto deseado para el mismo fin (por ejemplo, una partícula dirigida de la invención útil para detectar tumores puede administrarse simultáneamente con otro agente útil para detectar tumores) o pueden conseguir efectos diferentes (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso).
- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse ya sea solas o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. Por "en combinación con" no se pretende implicar que los agentes deban administrarse al mismo tiempo y/o formularse para el suministro conjunto, aunque estos métodos de suministro están dentro del alcance de la invención. Las composiciones pueden administrarse simultáneamente, antes o posteriormente a, uno o más de los diferentes procedimientos terapéuticos o médicos deseados. En general, cada agente se administrará en una dosis y/o en un cronograma determinado para ese agente. Adicionalmente, la invención abarca el suministro de las composiciones farmacéuticas de la invención en combinación con agentes que pueden mejorar su biodisponibilidad, reducir y/o modificar su metabolismo, inhibir su excreción y/o modificar su distribución dentro del organismo.
- La combinación particular de terapias (tratamientos y/o procedimientos terapéuticos) que han de emplearse una posología combinada tendrá en cuenta la compatibilidad de los tratamientos y/o procedimientos terapéuticos deseados y/o el efecto terapéutico deseado que han de conseguirse. Se apreciará que las terapias empleadas pueden conseguir un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, una partícula dirigida de la invención puede administrarse simultáneamente con otro agente terapéutico utilizado para tratar el mismo trastorno) y/o pueden conseguir diferentes efectos (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso). En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención se administran con un segundo agente terapéutico que está aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU.
- Se apreciará adicionalmente que los agentes terapéuticamente activos utilizados en combinación pueden administrarse juntos en una composición única o administrarse por separado en diferentes composiciones.
- En general, se espera que los agentes utilizados en combinación se utilicen a niveles que no superen los niveles a los que se utilizan individualmente. En algunas realizaciones, los niveles utilizados en combinación serán menores que los utilizados individualmente.
- En algunas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse en combinación con cualquier agente terapéutico o pauta terapéutica que sea útil para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio, inhibir la progresión, reducir la gravedad, y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características del cáncer. Por ejemplo, pueden administrarse composiciones de la invención en combinación con terapias tradicionales contra el cáncer incluyendo, pero sin limitación, cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia, terapia complementaria o alternativa y cualquier combinación de estas terapias.
- En algunas realizaciones, se administran composiciones de la invención en combinación con cirugía para retirar un tumor. Debido a que la extirpación completa de un tumor con un daño mínimo o nulo en el resto del cuerpo del paciente es normalmente el objetivo del tratamiento contra el cáncer, con frecuencia se realiza una cirugía para extirpar físicamente parte o la totalidad de un tumor. Si mediante cirugía no puede extirparse totalmente un tumor, pueden emplearse terapias adicionales (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia, terapia complementaria o alternativa).

En algunas realizaciones, se administran composiciones de la invención en combinación con radioterapia. La radioterapia (también conocida como terapia de radiación, terapia de rayos X o irradiación) es el uso de radiación ionizante para destruir células cancerosas y reducir el tamaño de tumores. La radioterapia puede usarse para tratar casi cualquier tipo de tumor sólido, incluyendo los tumores de cerebro, mama, cuello del útero, laringe, pulmón, páncreas, próstata, piel, estómago, útero o sarcomas de tejidos blandos. La radiación puede usarse para tratar la leucemia y el linfoma. La radioterapia puede administrarse por vía externa a través de radioterapia de haz externo (RTHE) o por vía interna a través de braquiterapia. Normalmente, los efectos de la radioterapia son localizados y se limitan a la región que se está tratando. La radioterapia daña o destruye las células tumorales en un área que se está tratando (por ejemplo, un órgano, tejido y/o célula diana) mediante el daño de su material genético, evitando que las células tumorales crezcan y se dividan. En general, la radioterapia intenta dañar tantas células tumorales como sea posible limitando al mismo tiempo el daño al tejido sano cercano. Por tanto, con frecuencia se administra en dosis múltiples, lo que permite que el tejido sano se recupere entre fracciones.

En algunas realizaciones, se administran composiciones de la invención en combinación con inmunoterapia. La inmunoterapia es el uso de mecanismos inmunitarios contra tumores que pueden usarse en diversas formas de cáncer, tales como el cáncer de mama (por ejemplo, trastuzumab/Herceptin®), la leucemia (por ejemplo, gemtuzumab ozogamicina/Mylotarg®) y el linfoma no Hodgkin (por ejemplo, rituximab/Rituxan®). En algunas realizaciones, los agentes de inmunoterapia son anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas que son características de las células del cáncer en cuestión. En algunas realizaciones, los agentes de inmunoterapia son citocinas que modulan la respuesta del sistema inmunitario. En algunas realizaciones, los agentes de inmunoterapia pueden ser vacunas.

En algunas realizaciones, pueden administrarse vacunas para prevenir y/o retrasar la aparición del cáncer. En algunas realizaciones, las vacunas contra el cáncer previenen y/o retrasan la aparición del cáncer previniendo la infección por agentes infecciosos oncogénicos. En algunas realizaciones, las vacunas contra el cáncer previenen y/o retrasan la aparición del cáncer montando una respuesta inmunitaria contra epítomos específicos de cáncer. Por proporcionar un solo ejemplo de una vacuna contra el cáncer, se demostró que una vacuna experimental para los tipos 16 y 18 del VPH tiene un 100 % de éxito en la prevención de la infección con estos tipos de VPH y, por tanto, puede prevenir la mayoría de los casos de cáncer cervical (Harper et al., 2004, *Lancet*, 364: 1757).

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención se administran en combinación con tratamientos de medicina complementaria y alternativa. Algunas medidas complementarias de ejemplo incluyen, pero sin limitación, medicina botánica (por ejemplo, el uso de extracto de muérdago combinado con quimioterapia tradicional para el tratamiento de tumores sólidos); acupuntura para controlar las náuseas y los vómitos asociados a la quimioterapia y para controlar el dolor asociado a la cirugía; oración; enfoques psicológicos (por ejemplo, "formación de imágenes" o meditación) para ayudar a aliviar el dolor o mejorar el estado de ánimo. Algunas medidas alternativas de ejemplo incluyen, pero sin limitación, dieta y otros cambios en el estilo de vida (por ejemplo, dieta vegetariana, la dieta de uva y la dieta de repollo).

En algunas realizaciones, se administran composiciones de la invención en combinación con cualquiera de los tratamientos tradicionales contra el cáncer que se describen en el presente documento, que con frecuencia se asocian a efectos secundarios desagradables, incómodos y/o peligrosos. Por ejemplo, el dolor crónico con frecuencia es resultado del daño tisular continuo debido al cáncer en sí o debido al tratamiento (es decir, cirugía, radiación, quimioterapia). Como alternativa o adicionalmente, dichas terapias con frecuencia se asocian a pérdida de cabello, náuseas, vómitos, diarrea, estreñimiento, anemia, desnutrición, depresión del sistema inmunitario, infección, sepsis, hemorragia, neoplasias secundarias, cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, ototoxicidad, etc. Por tanto, las composiciones de la invención que se administran en combinación con cualquiera de los tratamientos tradicionales contra el cáncer que se describen en el presente documento también puede administrarse en combinación con cualquier agente terapéutico o pauta terapéutica que sea útil para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más efectos secundarios del tratamiento contra el cáncer. Por proporcionar unos pocos ejemplos, el dolor puede tratarse con opioides y/o analgésicos (por ejemplo, morfina, oxicodona, antieméticos, etc.); las náuseas y los vómitos pueden tratarse con inhibidores de 5-HT<sub>3</sub> (por ejemplo, dolasetrón/Anzemet®, granisetrón/Kytril®, ondansetrón/Zofran®, palonsetrón/Aloxi®) y/o inhibidores de la sustancia P (por ejemplo, aprepitant/Emend®); la inmunosupresión puede tratarse con una transfusión de sangre; la infección y/o la sepsis pueden tratarse con antibióticos (por ejemplo penicilinas, tetraciclinas, cefalosporinas, sulfonamidas, aminoglucósidos, etc.); y así sucesivamente.

En algunas realizaciones, pueden administrarse composiciones de la invención y/o pueden realizarse métodos de diagnóstico de la invención en combinación con cualquier agente terapéutico o pauta terapéutica que sea útil para diagnosticar uno o más síntomas o características del cáncer (por ejemplo, detectar la presencia y/o localizar un tumor). En algunas realizaciones, pueden usarse partículas dirigidas de la invención en combinación con uno o más agentes de diagnóstico. Por proporcionar un solo ejemplo, pueden administrarse partículas dirigidas utilizadas para detectar tumores en combinación con otros agentes útiles en la detección de tumores. Por ejemplo, pueden administrarse partículas dirigidas de la invención en combinación con una biopsia de tejido tradicional seguida de tinción inmunohistoquímica y ensayos serológicos (por ejemplo, ensayo de antígeno sérico prostático). Como alternativa o adicionalmente, las partículas dirigidas de la invención pueden administrarse en combinación con un

agente de contraste para su uso en tomografía computarizada (TC) y/o IRM.

#### Kits

- 5 La solicitud describe diversos kits que comprenden una o más de las partículas dirigidas de la invención. Por ejemplo, la solicitud describe un kit que comprende una partícula dirigida de la invención e instrucciones para su uso. Un kit puede comprender múltiples partículas dirigidas diferentes. Un kit puede comprender cualquiera de una serie de componentes o reactivos adicionales en cualquier combinación.
- 10 De acuerdo con determinadas divulgaciones, un kit puede incluir, por ejemplo, (i) una partícula dirigida que comprende una partícula, un resto de direccionamiento específico y uno o más agentes terapéuticos particulares que han de suministrarse; (ii) instrucciones para administrar la partícula dirigida a un sujeto que lo necesite.

- De acuerdo con determinadas divulgaciones, puede proporcionarse un kit que incluye materiales útiles para
- 15 identificar y/o seleccionar restos de direccionamiento novedosos. Un kit de este tipo puede incluir, por ejemplo, (i) una partícula dirigida que comprende una partícula, una colección de restos de direccionamiento y uno o más agentes terapéuticos que han de suministrarse; (ii) una partícula dirigida que puede servir como control positivo; (iii) una partícula dirigida que puede servir como control negativo. En algunas divulgaciones, una partícula dirigida que puede servir como control positivo puede comprender un resto de direccionamiento que ya se sabe que se dirige a
- 20 un órgano, tejido, célula, compartimento intracelular, etc. específicos. En algunas divulgaciones, una partícula dirigida que puede servir como control positivo puede comprender un agente terapéutico que ya se sabe que trata y/o diagnostica una enfermedad, trastorno y/o afección particular. En algunas divulgaciones, una partícula dirigida que puede servir como control negativo puede comprender un resto de direccionamiento que ya se sabe que *no* se dirige a una diana específica (por ejemplo, una diana asociada a un órgano, tejido, célula, compartimento intracelular, etc. específicos).
- 25 En algunas divulgaciones, una partícula dirigida que puede servir como control negativo puede comprender un agente terapéutico que ya se sabe que *no* trata y/o diagnostica una enfermedad, trastorno y/o afección particular. En algunas divulgaciones, una partícula dirigida que puede servir como control negativo puede comprender un resto de direccionamiento que ya se sabe que se dirige a una diana específica (por ejemplo, una diana asociada a un órgano, tejido, célula, compartimento intracelular, etc., particular, pero no comprende un agente terapéutico. En algunas divulgaciones, una partícula dirigida que puede servir como control
- 30 negativo puede comprender un agente terapéutico que ya se sabe que trata y/o diagnostica una enfermedad, trastorno y/o afección particular, pero no comprende un resto de direccionamiento.

- Los kits normalmente incluyen instrucciones para el uso de partículas dirigidas de la invención. Las instrucciones pueden, por ejemplo, comprender protocolos y/o describir condiciones para la producción de partículas dirigidas, la administración de partículas dirigidas a un sujeto que lo necesite, el diseño de partículas diana novedosas, etc. Los kits generalmente incluirán uno o más recipientes o contenedores para que algunos o todos los componentes y reactivos individuales puedan alojarse por separado. Los kits también pueden incluir un medio para encerrar recipientes individuales en un confinamiento relativamente estrecho para la venta comercial, por ejemplo, una caja
- 40 de plástico, en la que pueden encerrarse instrucciones, materiales de embalaje tales como espuma de poliestireno, etc. Un identificador, por ejemplo, un código de barras, etiqueta de identificación (ID) por radiofrecuencia, etc., puede estar presente en o sobre el kit o en uno o más de los recipientes o contenedores incluidos en el kit. Puede usarse un identificador, por ejemplo, para identificar de forma particular el kit con fines de control de calidad, control de inventario, seguimiento, movimiento entre estaciones de trabajo, etc.

#### Ejemplificación

##### Ejemplo de referencia 1: Formulación de nanopartículas de PLGA-PEG funcionalizadas para el suministro de fármacos dirigido in vivo

##### 50 Materiales y métodos

##### *Materiales*

- 55 Se adquirieron docetaxel y <sup>14</sup>C-paclitaxel en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se obtuvo poli(<sub>D,L</sub>-lactida-co-glicolida) (50/50) con grupos carboxilato terminales (PLGA, viscosidad inherente de 0,20 dl/g en hexafluoroisopropanol, PM aproximadamente 17 kDa) en Absorbable Polymers International (Pelham, AL). Se adquirió NH<sub>2</sub>-PEG-COOH (PM 3400) en Nektar Therapeutics (San Carlos, CA). Todos los reactivos eran de calidad analítica o superior y se usaron como se recibieron, a menos que se indique lo contrario. Se adquirieron tampones de biología molecular en Boston
- 60 BioProducts (Worcester, MA). Se obtuvieron reactivos de cultivo tisular y la estirpe celular LNCaP en American Type Culture Collection (Manassas, VA). El aptámero de ARN (secuencia: 5'-NH<sub>2</sub>-espaciador-[GGG/AGG/ACG/AUG/CGG/AUC/AGC/CAU/GUU/ UAC/GUC/ACU/CCU/UGU/CAA/ UCC/UCA/UCG/GCIT-3' (SEQ ID NO.: 3)) con 2'-fluoro pirimidinas, un grupo 5'-amino unido por un espaciador de hexaetilenglicol y un capuchón T invertido 3') se sintetizó a medida por ARN-TEC (Leuven, Bélgica) con una pureza superior al 90 %.

##### 65 *Síntesis de PLGA-b-PEG*

Se sintetizó copolímero funcionalizado con carboxilato PLGA-b-PEG mediante la unión de COOH-PEG-NH<sub>2</sub> a PLGA-COOH. Se convirtió PLGA-COOH (5 g, 0,28 mmol) en cloruro de metileno (10 ml) en PLGA-NHS con exceso de N-hidroxisuccinimida (NHS, 135 mg, 1,1 mmol) en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC, 230 mg, 1,2 mmol). Se precipitó PLGA-NHS con etil éter (5 ml) y se lavó repetidamente en una mezcla helada de etil éter y metanol para retirar el NHS residual. Después de secar al vacío, se disolvió PLGA-NHS (1 g, 0,059 mmol) en cloroformo (4 ml) seguido de la adición de NH<sub>2</sub>-PEG-COOH (250 mg, 0,074 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (28 mg, 0,22 mmol). El copolímero se precipitó con metanol frío después de 12 horas y se lavó con el mismo disolvente (5 ml, 3 veces) para retirar el PEG sin reaccionar. El copolímero de *bloque* PLGA-PEG resultante se secó al vacío y se usó para la preparación de nanopartículas (NP) sin tratamiento adicional. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> a 300 Hz) δ 5,2 (m, ((OCH(CH<sub>3</sub>)C(O)OCH<sub>2</sub>C(O))<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>), 4,8 (m, ((OCH(CH<sub>3</sub>)C(O)OCH<sub>2</sub>C(O))<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>), 3,7 (s, ((OCH(CH<sub>3</sub>)C(O)OCH<sub>2</sub>C(O))<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>), 1,6 (d, ((OCH(CH<sub>3</sub>)C(O)OCH<sub>2</sub>C(O))<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>).

#### Formulación de NP de PLGA-b-PEG cargadas de fármaco de taxano

El método de nanoprecipitación se empleó para la formación de NP de PLGA-b-PEG carboxilado encapsuladas por fármaco, de manera similar a como se ha descrito anteriormente (Farokhzad et al., 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 103: 6315; y Fonseca et al., 2002, *J. Control. Release*, 83: 273). Brevemente, se disolvió docetaxel (o <sup>14</sup>C-paclitaxel) en diversos disolventes orgánicos que son miscibles con agua. El polímero se disolvió análogamente y se mezcló con el fármaco. Las NP se formaron añadiendo la solución de fármaco-polímero a agua, un no disolvente. La suspensión de NP resultante se dejó en agitación sin cubrir durante 6 horas a temperatura ambiente. Las NP se purificaron mediante centrifugación (10 minutos a 10.000 x g) o mediante ultrafiltración (15 minutos a 3000 x g, Amicon Ultra, membrana Ultracel con 100.000 LPMN, Millipore, Billerica, MA). Las NP de PLGA-b-PEG se resuspendieron, se lavaron con agua y se recogieron análogamente.

Los parámetros que controlan la formación de NP se variaron sistemáticamente en este estudio. Generalmente, la formulación de partida fue la siguiente: se disolvieron PLGA-b-PEG (10 mg/ml) y docetaxel (0,1 mg/ml) en acetonitrilo. La mezcla se añadió gota a gota a un volumen 2 x de agua en agitación. Las NP se produjeron con el método de nanoprecipitación en cuatro disolventes: N,N-dimetilformamida (DMF), acetona, acetonitrilo y tetrahidrofurano (THF). Los efectos de los diversos disolventes se sometieron a ensayo en el tamaño global de las NP. Para cada disolvente, la relación de disolvente a agua varió de 0,1 a 1,0 (usando polímero 10 mg/ml para cada uno). Adicionalmente, se usó un intervalo de concentraciones de polímero en la fase orgánica de 5 mg/ml a 50 mg/ml para la formación de las NP en un volumen 2 veces mayor de agua. Las NP se procesaron como anteriormente por triplicado, observándose tendencias en los parámetros de formulación. En otro estudio, se sintetizaron NP que contenían cantidades variables de docetaxel ajustando la carga del fármaco docetaxel del 0 % al 10 % en peso del polímero añadido, formulando las NP a partir de polímero 10 mg/ml en acetonitrilo y un volumen de agua 2 veces mayor.

La estabilidad posterior a la formulación de las NP se estudió para las etapas tanto de purificación como de formación de partículas y durante el almacenamiento en estado sólido después de la liofilización. Las NP también se congelaron ultrarrápido en nitrógeno líquido antes de la liofilización para la liofilización.

#### Determinación de tamaños de partícula y polidispersabilidades

Las distribuciones de tamaños de partículas se midieron mediante dispersión dinámica de la luz (Brookhaven Instruments Corporation 90 plus Particle Sizer, láser de 676 nm) a 25 °C y a un ángulo de dispersión de 90 ° a una concentración de aproximadamente 1 mg de NP/ml de agua. El valor medio ponderado por intensidad se registró como el promedio de tres mediciones.

#### Determinación del contenido de fármaco

Se disolvieron NP en acetonitrilo y se midieron mediante HPLC por triplicado para determinar el contenido de docetaxel. El HPLC Agilent 1100 (Palo Alto, CA) estaba equipado con un detector UV y una columna de pentafluorofenilo de fase inversa (Curosil-PFP, 250 x 4,6 mm, 5 µ, Phenomenex, Torrance, CA) con una fase móvil sin gradiente de agua y acetonitrilo (v/v 50/50) a un caudal constante de 1 ml/minuto. El pico de docetaxel se midió a una longitud de onda de 227 nm y se determinó cuantitativamente comparándolo con una curva patrón.

#### Asociación de aptámero con NP de PLGA-b-PEG-COOH

Se suspendieron NP de PLGA-b-PEG (10 µg/µl) en agua y se incubaron con EDC (400 mM) y NHS (200 mM) durante 20 minutos. Las NP se lavaron repetidamente en agua sin ADNasa y sin RNasa (15 ml, 3 veces) seguido de ultrafiltración. Las NP activadas por NHS se hicieron reaccionar con un aptámero de 5'-amino-ARN (1 µg/µl). Las partículas dirigidas NP-Apt resultantes se lavaron con agua ultrapura (15 ml) mediante ultrafiltración y los aptámeros unidos a la superficie se desnaturalizaron a 90 °C y se les permitió asumir una conformación de unión durante el enfriamiento rápido en hielo. Las suspensiones de NP se mantuvieron a 4 °C hasta su uso.

La bioasociación NP-Apt se confirmó en PAGE de TBE al 10 %-Urea. Las NP se incubaron como anteriormente con (+ EDC) y sin (- EDC) reticulante para confirmar la asociación covalente. Se separaron aptámero, NP, NP+Apt (+ EDC), NP+Apt (- EDC), NP+Apt lavado (+ EDC) y NP+Apt lavado (- EDC) por PAGE. El marcador de ADN de peso molecular (PM) y el aptámero libre sirvieron como patrones para una banda de 57 pares de bases en el gel.

#### 5 *Direccionamiento tumoral in vivo y biodistribución de partículas dirigidas de NP-Apt*

Todos los estudios en animales se realizaron con la supervisión de la División de Medicina Comparativa del MIT (Instituto Tecnológico de Massachusetts) y de conformidad con los *Principios de Cuidado de Animales de Laboratorio* de los NIH (Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU.). Se indujeron tumores de cáncer de próstata con xenoinjerto humano en ratones desnudos balb/c de 8 semanas de edad (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). A los ratones se les inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho  $3 \times 10^6$  células LNCaP (es decir, una estirpe celular establecida a partir de una lesión metastásica de adenocarcinoma prostático humano) suspendidas en una mezcla 1:1 de medio y matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Antes del uso en la inducción tumoral, las células LNCaP se cultivaron en medio RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10 %, penicilina G 100 unidades/ml y estreptomycin 100 µg/ml.

Se realizaron estudios de direccionamiento tumoral después de que los ratones desarrollaron aproximadamente 100 mg de tumores. Los ratones se dividieron en grupos de cuatro, minimizando las variaciones de tamaño tumoral entre los grupos. Los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de avertina (200 mg/kg de peso corporal) y se les administraron NP o partículas dirigidas de NP-Apt mediante inyección retro-orbital. Las NP se rastrearon encapsulando  $^{14}\text{C}$ -paclitaxel y se suspendieron en 200 µl de PBS (1 vez) antes de la administración. Se sacrificaron diferentes grupos a las 2, 6 o 24 horas y se extrajeron 200 µl de sangre por punción cardíaca de cada ratón. Se extrajeron el tumor, el corazón, los pulmones, el hígado, el bazo y los riñones de cada animal. Se sometió a ensayo el contenido de  $^{14}\text{C}$  de los tejidos en un analizador de centelleo Packard Tri-Carb (Downers Grove, IL). Los tejidos se solubilizaron en Solvable (Packard) y la actividad se contó en cóctel de centelleo Hionic-Fluor (PerkinElmer, Boston, MA). El hígado de cada ratón se homogeneizó debido a su gran tamaño y se colocaron aproximadamente 100 mg de tejido en un vial de centelleo para su análisis. Los otros órganos se colocaron directamente en viales de centelleo. Cada órgano se solubilizó en 2 ml de Solvable durante aproximadamente 12 horas a 60 °C y la solución resultante se decoloró con 200 µl de peróxido de hidrógeno durante 1 hora a 60 °C. Para la sangre, se añadieron 400 µl de Solvable y los viales se trataron por lo demás de manera similar a los tejidos. Para determinar la dosis del 100 %, se contaron los viales de las NP formuladas junto con los tejidos. Los datos se presentan como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido.

#### 35 *Análisis estadístico*

El análisis estadístico de las muestras se realizó mediante un ensayo t de Student y los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos. Todos los datos publicados son medias +/-desviaciones típicas, a menos que se indique de otro modo.

#### 40 Resultados

##### *Síntesis del copolímero PLGA-b-PEG*

El copolímero PLGA-b-PEG funcionalizado con carboxilo se sintetizó mediante modificación covalente de PLGA-COOH con  $\text{NH}_2$ -PEG-COOH, ambos con longitud de bloque fija, para generar PLGA-b-PEG-COOH (Figura 1). El grupo carboxilo en el copolímero está en el extremo terminal del bloque de PEG hidrófilo; por tanto, tras la formulación de NP, el PEG debería facilitar la presentación de los grupos carboxilo sobre la superficie de las nanopartículas para que estén disponibles para la química de la superficie. Los aptámeros de ARN se sintetizan con grupos 5'-amino que pueden asociarse covalentemente a los grupos carboxilo sobre la superficie de NP usando química de acoplamiento de carbodiimida (Figura 1). Después de preparar el polímero, la eficiencia de la reacción de acoplamiento se determinó mediante RMN  $^1\text{H}$ , lo que reveló que aproximadamente el 83 % del PLGA estaba asociado al segmento de PEG.

#### 55 *Efectos de parámetros de formulación variables para controlar el tamaño de las nanopartículas*

Como punto de partida para controlar la distribución del tamaño de NP, se analizó el efecto de variar el tipo de disolvente orgánico utilizado para solubilizar el fármaco y el polímero. Estudios anteriores han sugerido que la miscibilidad del disolvente orgánico en el agua puede afectar al tamaño de la NP para un sistema disolvente:agua dado (Galindo-Rodriguez et al., 2004, *Pharm. Res.*, 21: 1428; y Bilati et al., 2005, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 24: 67). Generalmente, la miscibilidad puede expresarse cuantitativamente comparando los parámetros de solubilidad ( $\delta$ ) tanto del disolvente como del agua (Yu et al., *General principles governing dissolution of materials in solvents*, ChemTec Publishing, 2001). A medida que los disolventes se vuelven más miscibles, se minimiza la diferencia en los parámetros de solubilidad entre los disolventes ( $\Delta\delta$ ). La relación del tamaño de NP y la miscibilidad del disolvente con el agua se midió usando cuatro disolventes orgánicos, se observó una dependencia del tamaño de NP de los parámetros de solubilidad. Como se muestra en la Figura 2, los tamaños de las NP de PLGA-b-PEG y la miscibilidad

en agua de los cuatro disolventes orgánicos utilizados en este estudio en general se correlacionaron; un aumento de la miscibilidad en agua (disminución de  $\Delta\delta$ , como indica la flecha que se muestra en la Figura 2) condujo a una disminución en el tamaño medio de NP, manteniéndose constantes todos los demás parámetros de formulación. Las NP preparadas en DMF, el disolvente más miscible en agua sometido a ensayo, dieron como resultado las partículas más pequeñas. Sin desear quedar ligado a teoría alguna concreta, esto puede deberse a la difusión más eficiente del disolvente y la dispersión del polímero en agua.

Junto con la investigación del efecto de la miscibilidad disolvente-agua, se analizó el efecto de alterar la relación disolvente:agua durante la formulación de NP. Cuando se variaron las relaciones disolvente:agua para una concentración de polímero fija (10 mg/ml) como se muestra en la Figura 2A, no se observó una correlación clara del tamaño de partícula con la relación disolvente-agua. La mayoría de los tamaños de NP permanecieron relativamente sin cambios cuando la relación estaba en un intervalo de 0,1-0,5. En acetona, por ejemplo, los tamaños de NP aumentaron de  $115,3 \pm 5,1$  nm a  $120,9 \pm 6,9$  nm a medida que la relación  $V_{\text{disolvente}}/V_{\text{agua}}$  aumentó de 0,1 a 0,5, respectivamente (media  $\pm$  d.t.,  $n = 3$  para cada formulación;  $p > 0,05$ ). Para el THF, el tamaño permaneció constante a medida que la relación varió de 0,1 a 0,5, con tamaños respectivos de  $130 \pm 0,5$  nm y  $129 \pm 15,5$  nm. A la relación disolvente:agua de 1,0, se observó un gran aumento en el tamaño de partícula. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría en particular, esto se debe presumiblemente a una mala separación de fases: las NP formuladas en acetonitrilo y THF tenían un tamaño superior a 200 nm ( $p < 0,05$ , comparando tamaños para una relación de 1 frente a 0,5).

Cuando se variaron las concentraciones de polímero durante la formulación de NP en una relación disolvente fija:agua (Figura 2B), se observó una tendencia a aumentar el tamaño de NP con una concentración de polímero creciente. Por ejemplo, los tamaños de NP aumentaron de 69,0 nm a 165,0 nm en DMF a medida que la concentración de polímero aumentó 10 veces de 5 mg/ml a 50 mg/ml. Se observaron tendencias similares en todos los demás disolventes investigados. La interpretación de los datos en términos de cambios en el tamaño volumétrico mostró un acuerdo lineal entre el tamaño y la concentración de polímero. Los valores de  $R^2$  para el gráfico del volumen medio de NP y la concentración de polímero (Figura 3) fueron 0,997, 0,985, 0,998 y 0,997 para DMF, acetona, THF y acetonitrilo, respectivamente. Para el sistema polimérico de la invención, el uso de la correlación lineal del tamaño volumétrico de NP y la concentración de polímero permite la formulación de NP con tamaños deseados y predefinidos.

#### *Polidispersabilidad de nanopartículas a diferentes cargas de fármaco*

Se analizó el efecto de la carga de docetaxel sobre las distribuciones de tamaño de NP resultantes, comparando las NP cargadas con docetaxel al 1 %, al 5 % y al 10 %. Para una formulación de NP dada (NP de 150 nm), la polidispersabilidad de las preparaciones de partículas aumentó con la concentración de docetaxel de la siguiente manera: de 0,154 para la carga del 1 % a 0,203 para la carga del 5 % y 0,212 para la carga del 10 %. La distribución de tamaños de NP mostró una tendencia bifásica con una distribución de partículas de menor diámetro acompañada de una distribución de partículas de mayor diámetro (Figura 4). La distribución correspondiente a las partículas más pequeñas no cambió con el aumento de la concentración de fármaco. El locus de mayor diámetro de las dos distribuciones de tamaño se desplazó más hacia arriba a medida que aumentaba la carga de fármaco (el tamaño aumentó de aproximadamente 300 nm a 1200 nm, Figura 4). Puesto que la única diferencia entre estas formulaciones es la cantidad de carga de fármaco, una cantidad significativa de las NP formadas puede deberse a la agregación de docetaxel sin encapsular, debido a su escasa solubilidad en agua.

#### *Control del tamaño de las nanopartículas durante el tratamiento posterior a la formulación*

Las NP formadas mediante nanoprecipitación generalmente no requieren tensioactivo; sin embargo, la falta de tensioactivo puede provocar la agregación de las NP después de la formulación. La centrifugación a alta velocidad, por ejemplo, puede aumentar sustancialmente el tamaño de partícula debido a la agregación tras granular. Después de que se centrifugasen las NP (aproximadamente 80 nm) a 10.000 x g durante 10 minutos, se observó un aumento en el diámetro de aproximadamente el 20 % - 30 % para cada una de las etapas de centrifugación (Figura 5A). Sin embargo, la fuerza mecánica que provoca la agregación puede evitarse sustancialmente mediante ultrafiltración a baja velocidad (Figura 5A). El uso de un dispositivo de filtración centrífuga disponible en el mercado controla de forma reproducible el tamaño de partícula durante las múltiples etapas de lavado.

Para la traducción al uso clínico de cualquier formulación biodegradable, la estabilidad tras el almacenamiento es una preocupación. La criodesecación de NP y el almacenamiento congeladas en estado sólido es un enfoque común y los azúcares como la sacarosa pueden actuar como un lioprotector durante el proceso (De Jaeghere et al., 2000, *Pharm. Dev. Technol.*, 5: 473; y Konan et al., 2003, *Eur. J. Pharmaceutics Biopharmaceutics*, 55: 115). La adición de sacarosa al 10 % a una suspensión acuosa de NP (10 mg/ml) permite la recuperación de las NP de un tamaño muy similar al formulado originariamente (Figura 5B). Sin sacarosa como un lioprotector, las NP se agregaron a unos pocos micrómetros de tamaño y no fueron útiles tras la reconstitución para el suministro sistémico *in vivo* (Figura 5B).

#### *Asociación de aptámero con nanopartícula*

Se usó PAGE para examinar la asociación de las NP con aptámeros y para demostrar la retirada satisfactoria de aptámeros que no se habían asociado a las NP después de la reacción. La mezcla de aptámero y NP sin la adición del agente de acoplamiento (-EDC, Figura 6) no mostró ninguna banda de aptámero sin asociar, lo que indica una falta de interacción no específica entre el aptámero y la NP. La asociación con la adición de EDC (+EDC, Figura 6) conduce a bandas de ARN coherentes con el ARN unido covalentemente a las NP e incapaces de correr sobre el gel, tanto antes como después del lavado. Después del lavado repetitivo mediante ultrafiltración, el aptámero no asociado ya no fue detectable (Figura 6).

#### 10 *Direccionamiento tumoral in vivo y biodistribución de partículas dirigidas de nanopartícula-aptámero*

Como resultado de investigaciones de parámetros de formulación y sus efectos sobre el tamaño de NP, se eligió una formulación de NP óptima en términos de tamaño y carga de fármaco para el estudio *in vivo*. Para el estudio, se encapsuló  $^{14}\text{C}$ -paclitaxel (que sirve como agente de rastreo) con una carga de fármaco del 1 % en las NP de PLGA-b-PEG. El paclitaxel es un fármaco taxano emparentado con el docetaxel y está disponible en el mercado como radioquímico. Las NP resultantes se dimensionaron a  $156,8 \pm 3,9$  nm y después de la bioasociación con los aptámeros, se midió que el tamaño final de las partículas dirigidas de NP-Apt era de  $188,1 \pm 4,0$  nm. En los tres puntos temporales, la dosis de  $^{14}\text{C}$ -paclitaxel recuperada en el tumor fue mayor para los grupos dirigidos por NP-Apt en comparación con los grupos de NP control (Figura 7). Los valores en % de dosis inyectada por gramo de tejido a las 2, 6 y 24 horas para el grupo de NP-Apt fueron de  $1,49 \pm 0,92$ ,  $1,98 \pm 1,72$  y  $0,83 \pm 0,21$ , respectivamente (media  $\pm$  D.T.,  $n = 4$ ). Para el grupo de control de NP, los valores respectivos a las 2, 6 y 24 horas fueron de  $1,10 \pm 0,20$ ,  $0,96 \pm 0,44$  y  $0,22 \pm 0,07$ . En el punto final del estudio de 24 horas, el nivel en el tumor fue 3,77 veces mayor para el grupo de NP-Apt ( $p = 0,002$ ,  $n = 4$ ). En los puntos temporales de 2 y 6 horas, el nivel de NP-Apt en el tumor fue 1,35 veces y 2,06 veces superior al del control, respectivamente, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En los grupos de 2 y 6 horas, las concentraciones intratumorales de NP-Apt aumentaron en comparación con el control de NP, mientras que los niveles en la mayoría de los demás tejidos disminuyeron en paralelo a menos NP en circulación. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, es posible que la concentración de fármaco recuperado en el tumor en el tiempo muestre tanto el efecto de permeabilidad y retención potenciadas (PRP) como el efecto de direccionamiento. La capacidad de las partículas dirigidas de NP-Apt para mantener una concentración significativamente mayor en el tumor a las 24 horas posiblemente se deba a la captación por las células LNCaP diana, mientras que el grupo de NP sin ligando de direccionamiento difundió fuera del tumor con el tiempo en ausencia de captación celular. Se observó una fuerte unión similar de las partículas dirigidas de NP-Apt a células LNCaP *in vitro* (Farokhzad et al., 2004, *Cancer Research*, 64: 7668). Es posible que la concentración en el tumor para ambos grupos disminuya a partir de los puntos temporales de 6 y 24 h debido al efecto de estallido de las NP, que pueden liberar un gran porcentaje del fármaco durante este tiempo (Fonseca et al., 2002, *J. Control. Release*, 83: 273). El fármaco liberado en el sitio tumoral, si no es internalizado por las células, puede difundir o aclararse del sitio.

Los patrones de biodistribución al corazón, pulmones y riñones no mostraron acumulación sustancial en ninguno de los grupos y no fueron significativamente diferentes (Figura 8). Se observó que la captación por el sistema reticuloendotelial (SRE), incluyendo el bazo y el hígado, era mayor para las partículas dirigidas de NP-Apt en comparación con las NP de control. La capa externa de PEG, aunque proporcionaba un excelente escudo invisible para el grupo de NP, se modificó en el grupo de NP-Apt por asociación de aptámeros a la superficie de la partícula. Los aptámeros no se consideran inmunógenos y, por tanto, es probable que la causa de la captación por el SRE observada sea esta interrupción del escudo de PEG. Adicionalmente, la bioasociación dio como resultado un aumento moderado en el tamaño de partícula medio en comparación con el grupo de NP. El aumento de tamaño puede explicar parcialmente la captación aumentada del bazo (Storm et al., 1995, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 17: 31).

#### 50 **Equivalentes y alcance**

Los expertos en la materia reconocerán o serán capaces de determinar, usando únicamente experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención, que se describen en el presente documento. El alcance de la presente invención se establece en las reivindicaciones adjuntas.

En las reivindicaciones, los artículos tales como "un", "una" y "el", "la", "los" y "las" pueden significar uno o más de uno, a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una nanopartícula" incluye una pluralidad de dichas nanopartículas y la referencia a "la célula" incluye la referencia a una o más células conocidas por los expertos en la materia y así sucesivamente. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean o son relevantes de otro modo para un producto o proceso dado, a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente, se emplea o es relevante de otro modo para un producto o proceso dado. La invención incluye realizaciones en las que más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean o son relevantes de otro modo para un producto o proceso dado. Además, ha de comprenderse que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones enumeradas se



introducen en otra reivindicación. Por ejemplo, cualquier reivindicación que dependa de otra reivindicación puede modificarse para que incluya una o más limitaciones encontradas en cualquier otra reivindicación que dependa de la misma reivindicación base. Además, cuando las reivindicaciones citan una composición, ha de comprenderse que se desvelan métodos de uso de la composición para cualquiera de los fines que se desvelan en el presente documento, y se desvelan métodos de preparación de la composición de acuerdo con cualquiera de los métodos de preparación que se desvelan en el presente documento u otros métodos conocidos en la técnica, a menos que se indique lo contrario o a menos que sea evidente para un experto habitual en la materia que surgiría una contradicción o incoherencia.

- 5
- 10 Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en formato de grupo Markush, ha de comprenderse que también se desvela cada subgrupo de los elementos y cualquier elemento o elementos puede retirarse del grupo. Debería comprenderse que, en general, cuando se indica que la invención o los aspectos de la invención, comprenden elementos, características, etc. particulares, determinadas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, dichos elementos, características, etc. Con fines de simplicidad, esas realizaciones no se han expuesto de forma específica textualmente en el presente documento. Se observa que la expresión "que comprende" pretende ser abierta y permite la inclusión de elementos o etapas adicionales.
- 15

- 20 Cuando se proporcionan intervalos, se incluyen los puntos finales. Además, ha de comprenderse que, a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto y la comprensión de un experto habitual en la materia, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor específico o subintervalo dentro de los intervalos indicados en realizaciones diferentes de invención, a la décima parte de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

## REIVINDICACIONES

1. Partículas dirigidas que comprenden

- (a) una matriz de polímeros;
- (b) restos de direccionamiento inhibidores de peptidasa de AMEP a base de urea de molécula pequeña que se unen específicamente al antígeno de membrana específico de próstata (AM-EP), en donde los restos de direccionamiento de molécula pequeña se conjugan con los polímeros; y
- (c) un agente terapéutico, de diagnóstico o profiláctico,

en donde el agente está unido a, encapsulado o disperso dentro de las partículas.

2. Las partículas dirigidas de la reivindicación 1, en donde al menos el 80 % (preferentemente al menos el 90 %) de las partículas tienen una dimensión máxima inferior a 250 nm.

3. Las partículas dirigidas de la reivindicación 2, en donde las partículas tienen menos de 400 nm de diámetro, por ejemplo, entre 25 nm y 200 nm.

4. Las partículas dirigidas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el polímero se selecciona entre el grupo que consiste en poli(láctida-co-glicolida) (PLGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), policaprolactona y polianhídridos.

5. Las partículas dirigidas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde las partículas comprenden dos o más polímeros.

6. Las partículas dirigidas de la reivindicación 5, en donde al menos un polímero se selecciona entre el grupo que consiste en polietilenos, policarbonatos, polianhídridos, polihidroxiácidos, polipropilfumaratos, policaprolactonas, poliamidas, poliacetales, poliéteres, poliésteres, poli(ortoésteres), policianoacrilatos, alcoholes polivinílicos, poliuretanos, polifosfocenos, poliácridatos, polimetacrilatos, policianoacrilatos, poliureas, poliestirenos, poliaminas, polialquilenglicoles (por ejemplo, polietilenglicoles) y combinaciones de los mismos.

7. Las partículas dirigidas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el polímero conjugado comprende un copolímero de dos o más polímeros, por ejemplo, PLGA-PEG o PLA-PEG.

8. Las partículas dirigidas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde las partículas dirigidas comprenden una proteína, un lípido o un hidrato de carbono.

9. Las partículas dirigidas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el resto de direccionamiento es uno de los inhibidores a base de urea ZJ 43, ZJ 11, ZJ 17 o ZJ 38.

10. Las partículas dirigidas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la partícula comprende un agente terapéutico y la unión específica del resto de direccionamiento a una diana da como resultado el suministro del agente terapéutico.

11. Las partículas dirigidas de la reivindicación 10, en donde el agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos y combinaciones de los mismos.

12. Las partículas dirigidas de la reivindicación 10, en donde el agente terapéutico es un agente antineoplásico.

13. Las partículas dirigidas de la reivindicación 12, en donde el agente antineoplásico es un taxano.

14. Las partículas dirigidas de la reivindicación 13, en donde las partículas comprenden un agente terapéutico que es docetaxel.

15. Las partículas dirigidas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, opcionalmente asociadas a un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en medicina.

16. Las partículas dirigidas para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde las partículas dirigidas han de administrarse al sujeto por una vía intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, subcutánea o intraventricular.

17. Las partículas dirigidas para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde las partículas dirigidas han de administrarse (por ejemplo, mediante inyección) directamente a la próstata, por ejemplo, directamente a las células de cáncer de próstata, preferentemente mediante administración tópica.

18. Las partículas dirigidas para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde las partículas dirigidas han de administrarse al sujeto mediante la implantación de partículas dirigidas en o cerca de células de cáncer de próstata mediante cirugía estereotáctica o durante la extirpación quirúrgica de un tumor.

- 5 19. Un método de preparación de partículas dirigidas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 que comprende: *proporcionar* un agente terapéutico; proporcionar un polímero; proporcionar un resto de direccionamiento; mezclar el polímero con el agente terapéutico para preparar partículas; y asociar las partículas al resto de direccionamiento.
- 10 20. El método de la reivindicación 19 en donde el método comprende nanoprecipitación o enfoque de flujo usando canales fluidicos.

Figura 1

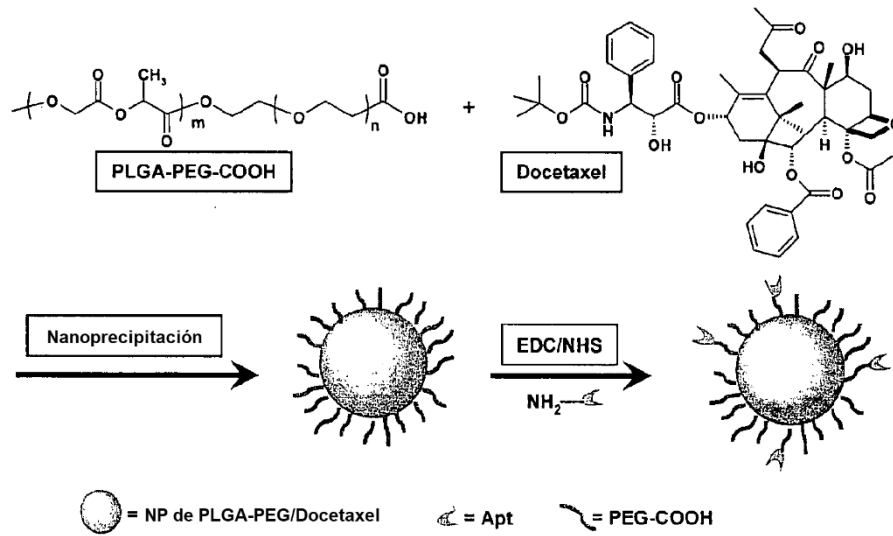
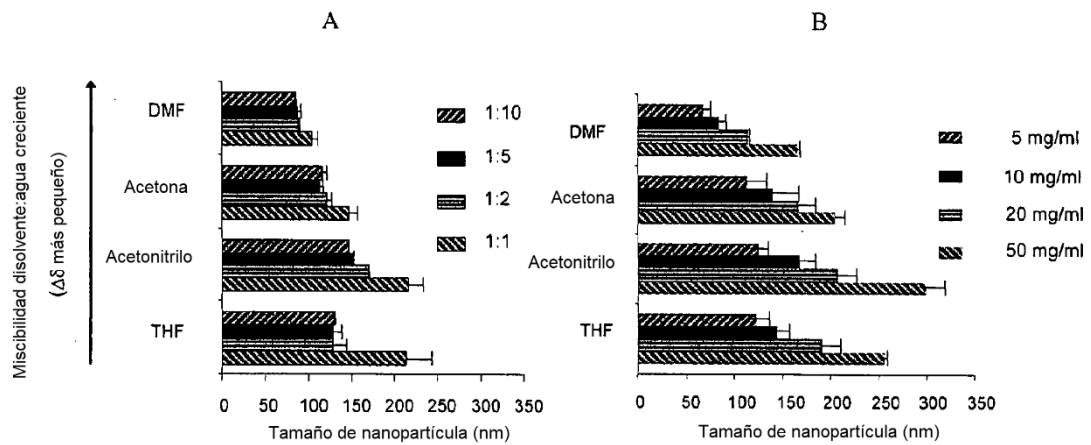
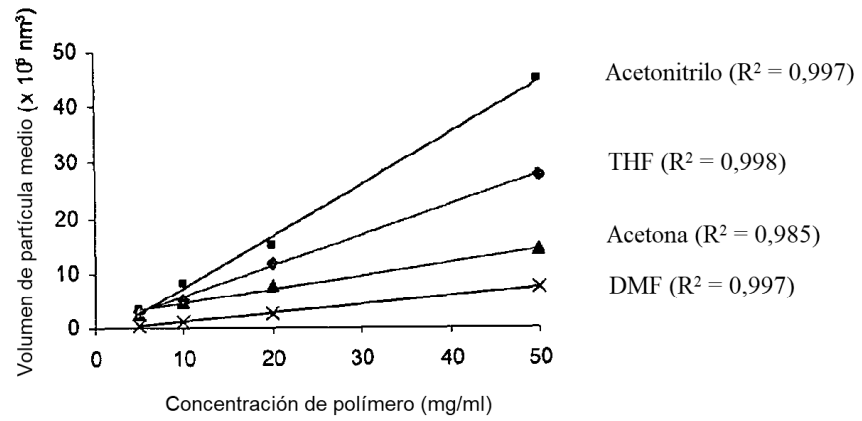


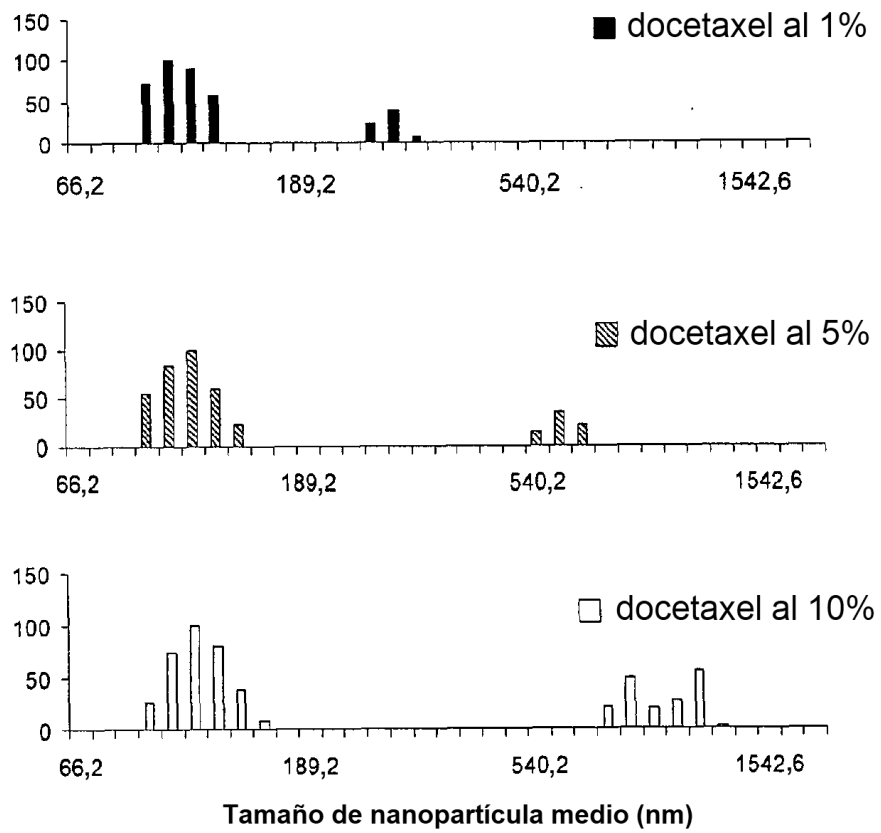
Figura 2



**Figura 3**

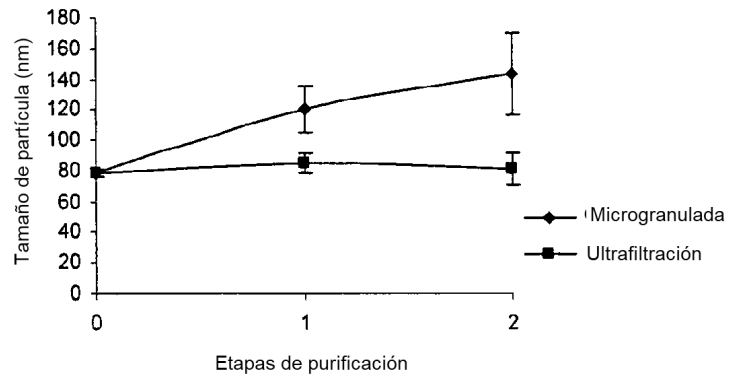


**Figura 4**

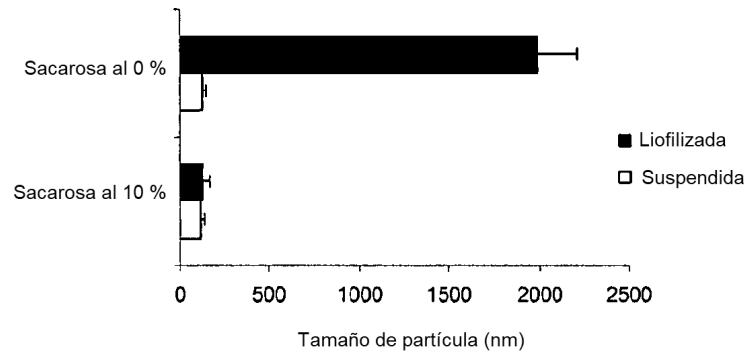


**Figura 5**

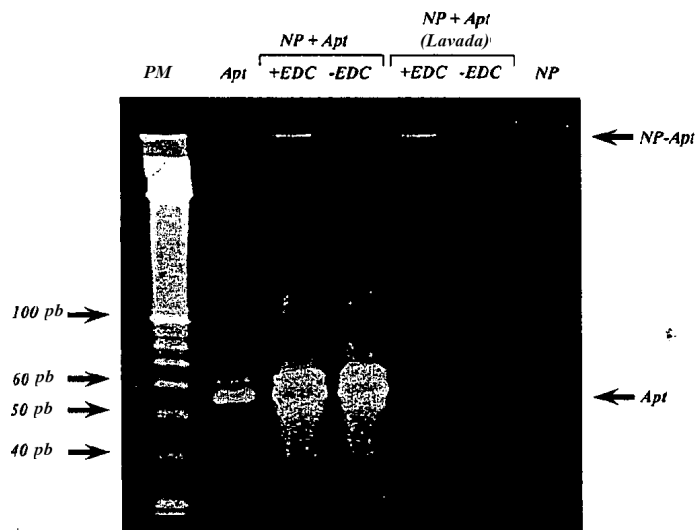
**A**



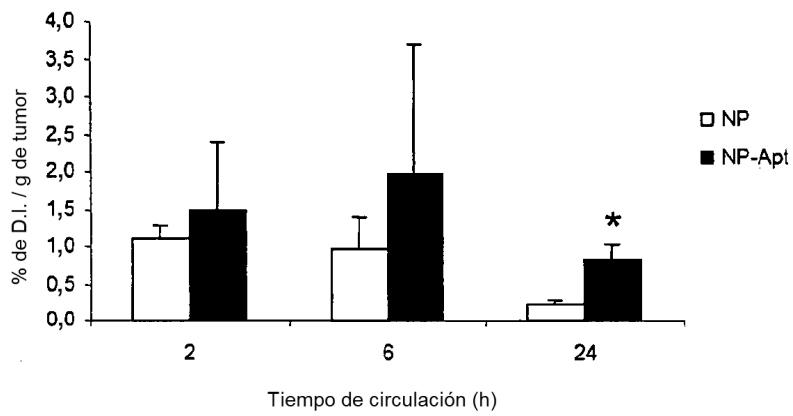
**B**



**Figura 6**



**Figura 7**



**Figura 8**

