(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 639 310**

(51) Int. CI.:

G01N 33/50 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2010 PCT/US2010/040994**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2011 WO11003109**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2010 E 10794842 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2449379**

(54) Título: **Nanopartículas fluorescentes basadas en sílice**

(30) Prioridad:

02.07.2009 US 222851 P
11.03.2010 US 312827 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.10.2017

(73) Titular/es:

SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH (50.0%)
1275 York Avenue
New York, NY 10065, US y
CORNELL UNIVERSITY (50.0%)

(72) Inventor/es:

BRADBURY, MICHELLE;
WIESNER, ULRICH;
PENATE MEDINA, OULA;
OW, HOOSWENG;
BURNS, ANDREW;
LEWIS, JASON y
LARSON, STEVEN

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas fluorescentes basadas en sílice

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nanopartículas fluorescentes basadas en sílice, y a métodos de uso de las nanopartículas para detectar, diagnosticar, o tratar enfermedades tales como el cáncer.

Antecedentes de la invención

La detección precoz de tumores y la selección del tratamiento es primordial para conseguir un éxito terapéutico y tasas de supervivencia a largo plazo. En su etapa temprana, muchos cánceres están localizados y se pueden tratar quirúrgicamente. Sin embargo, a menudo es difícil visualizar márgenes tumorales bien definidos con las técnicas actuales de imagenología. Esto ha conducido a un número desproporcionado de biopsias invasivas. Son necesarias sondas muy específicas, selectivas molecularmente, para la detección precoz de diferencias moleculares entre las células normales y las tumorales, tales como las alteraciones específicas del cáncer en los niveles de expresión de receptores. Cuando se combinan con las técnicas de imagenología de alta resolución, las sondas específicas selectivas molecularmente mejorarán enormemente la sensibilidad de detección, facilitando la caracterización, monitorización y tratamiento del cáncer.

Las sondas actuales de imagenología de fluorescencia consisten en general en un fluoróforo convencional individual (p.ej., colorantes orgánicos, proteínas fluorescentes), proteínas fluorescentes (p.ej., GFP) y puntos cuánticos semiconductores (puntos Q). Los fluoróforos individuales normalmente son inestables y tienen un brillo limitado para la imagenología. De manera similar a los colorantes, las proteínas fluorescentes tienden a exhibir interacciones del estado excitado que pueden conducir a parpadeo estocástico, apagamiento y fotoblanqueo. Los puntos Q se hacen en general de iones metálicos pesados tales como Pb^{2+} o Cd^{2+} y por lo tanto son tóxicos. Burns et al. "Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards "Lab on a Particle" architectures for nanobiotechnology", Chem. Soc. Rev., 2006, 35, 1028-1042.

Se conocen nanopartículas fluorescentes que tienen una cubierta eléctricamente conductora y un núcleo de sílice, y tienen utilidad en la administración modulada de un agente terapéutico. Patentes de EE.UU. nºs 6.344.272 y 6.428.811. Un defecto de las nanopartículas fluorescentes existentes es su brillo limitado y su baja detectabilidad como sondas fluorescentes en sistemas dispersos.

Las presentes nanopartículas basadas en sílice fluorescentes multifuncionales ofrecen muchas ventajas sobre otras sondas fluorescentes. Las nanopartículas son atóxicas, y tienen propiedades fotofísicas excelentes (lo que incluye la eficacia fluorescente y fotoestabilidad), una biocompatibilidad elevada, y una farmacocinética única para el diagnóstico y la terapia molecular. Las nanopartículas son de un tamaño relativamente pequeño, y tienen un revestimiento de PEG superficial que ofrece un aclaramiento renal excelente. Las nanopartículas fluorescentes de la presente invención contienen un núcleo fluorescente y una cubierta de sílice. Las arquitecturas núcleo-cubierta, la gran área superficial y la química superficial diversa de la nanopartícula permiten administrar múltiples funcionalidades simultáneamente a una célula objetivo. Por ejemplo, la nanopartícula se puede funcionalizar con restos selectivos, agentes de contraste para la formación médica de imágenes, agentes terapéuticos, u otros agentes. Los restos selectivos de la superficie de la nanopartícula pueden ser ligandos de tumores, que, cuando se combinan con agentes terapéuticos conjugados a nanopartículas, hacen de la nanopartícula un vehículo ideal para la selección como objetivo y potencialmente el tratamiento del cáncer. Webster et al. Optical calcium sensors: development of a generic method for their introduction to the cell using conjugated cell penetrating peptides. Analyst, 2005;130:163-70. La nanopartícula basada en sílice se puede marcar con agentes de contraste para la imagenología de PET, SPECT, CT, MRI, y óptica.

Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una nanopartícula fluorescente basada en sílice que comprende un núcleo basado en sílice que tiene un compuesto fluorescente colocado dentro del núcleo basado en sílice; una cubierta de sílice que rodea al menos una porción del núcleo; un polímero orgánico unido a la nanopartícula; de alrededor de 1 a alrededor de 20 ligandos unidos a la nanopartícula; y un agente de contraste o un quelato unido a la nanopartícula. El diámetro de la nanopartícula oscila de alrededor de 1 nm a alrededor de 25 nm, o de alrededor de 1 nm a alrededor de 8 nm. Los polímeros orgánicos que se pueden unir a la nanopartícula incluyen poli(etilen glicol) (PEG), polilactato, poli(ácidos lácticos), carbohidratos, lípidos, poli(ácido glutámico) (PGA), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(acetato de vinilo) (PVA), o las combinaciones de los mismos.

El ligando puede ser capaz de unirse a al menos un componente celular, tal como un marcador tumoral. El número de ligandos unidos a la nanopartícula también puede oscilar de alrededor de 1 a alrededor de 10. Los ejemplos del ligando incluyen un péptido, proteína, biopolímero, polímero sintético, antígeno, anticuerpo, microorganismo, virus, receptor, hapteno, enzima, hormona, compuesto químico, patógeno, toxina, modificador superficial, o combinaciones de los mismos. La presente invención abarca péptidos tales como el tripéptido RGD, el péptido cíclico cRGD,

octreotato, EPPT1 y los análogos peptídicos de alfa-MSH. Cualquier péptido lineal, cíclico o ramificado que contenga la secuencia RGD se halla dentro del alcance de la presente invención.

Se puede unir un agente de contraste, tal como un radionúclido que incluye ^{89}Zr, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{124}I y ^{177}Lu, a la nanopartícula. De manera alternativa, la nanopartícula se une a un quelato, por ejemplo, DFO, DOTA, TETA y DTPA, que está adaptado para la unión de un radionúclido. La nanopartícula de la presente invención se puede detectar mediante tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía computerizada de emisión monofotónica (SPECT), tomografía computerizada (CT), imagenología de resonancia magnética (MRI), imagenología óptica (tal como la imagenología de fluorescencia, que incluye la imagenología de fluorescencia en el infrarrojo cercano (FIRC)), imagenología de bioluminiscencia, o combinaciones de las mismas.

Se puede unir un agente terapéutico a la nanopartícula. Los agentes terapéuticos incluyen antibióticos, agentes antimicrobianos, antiproliferativos, antineoplásicos, antioxidantes, factores de crecimiento de células endoteliales, inhibidores de trombina, inmunosupresores, agentes anti-agregación plaquetaria, inhibidores de la síntesis de colágeno, anticuerpos terapéuticos, donantes de óxido nítrico, oligonucleótidos inversos, agentes de cicatrización de heridas, construcciones de transferencia de genes terapéuticos, componentes de la matriz extracelular, vasodilatadores, trombolíticos, antimetabolitos, agonistas de factores de crecimiento, antimitóticos, estatinas, esteroides, agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, inhibidores de la enzima conversora de angiotensina (ACE), depuradores de radicales libres, agonistas de PPAR-gamma, ARN pequeño de interferencia (siARN), microARN, y agentes quimioterápicos antineoplásicos. Los agentes terapéuticos abarcados por la presente invención también incluyen radionúclidos, por ejemplo, ^{90}Y, ^{131}I y ^{177}Lu. El agente terapéutico se puede radiomarcar, tal como mediante la unión a radioflúor ^{18}F.

Tras la administración de la nanopartícula a un sujeto, la semivida de permanencia en la sangre de la nanopartícula puede oscilar de alrededor de 2 horas a alrededor de 25 horas, de alrededor de 3 horas a alrededor de 15 horas, o de alrededor de 4 horas a alrededor de 10 horas. La semivida de permanencia en el tumor de la nanopartícula tras la administración de la nanopartícula a un sujeto puede oscilar de alrededor de 5 horas a alrededor de 5 días, de alrededor de 10 horas a alrededor de 4 días, o de alrededor de 15 horas a alrededor de 3,5 días. La proporción de la semivida de permanencia en el tumor respecto de la semivida de permanencia en la sangre de la nanopartícula tras la administración de la nanopartícula a un sujeto puede oscilar de alrededor de 2 a alrededor de 30, de alrededor de 3 a alrededor de 20, o de alrededor de 4 a alrededor de 15. El aclaramiento renal de la nanopartícula tras la administración de la nanopartícula a un sujeto puede oscilar de alrededor del 10% de DI (dosis inicial) a alrededor del 100% de DI en alrededor de 24 horas, de alrededor del 30% de DI a alrededor del 80% de DI en alrededor de 24 horas, o de alrededor del 40% de DI a alrededor del 70% de DI en alrededor de 24 horas. En una realización, tras administrar la nanopartícula a un sujeto, la semivida de permanencia en la sangre de la nanopartícula oscila de alrededor de 2 horas a alrededor de 25 horas, la semivida de permanencia en el tumor de la nanopartícula oscila de alrededor de 5 horas a alrededor de 5 días, y el aclaramiento renal de la nanopartícula oscila de alrededor del 30% de DI a alrededor del 80% de DI en alrededor de 24 horas.

Cuando las nanopartículas se administran a un sujeto en una cantidad de alrededor de 100 veces la dosis humana equivalente, no se observa sustancialmente anemia, pérdida de peso, agitación, respiración incrementada, alteración GI, comportamiento anormal, disfunción neurológica, anormalidades hematológicas, anormalidades bioquímicas, lesiones relacionadas con fármacos en la patología de órganos, mortalidad, o combinaciones de las mismas, en el sujeto en alrededor de 10 a alrededor de 14 días.

El aumento de la multivalencia de la nanopartícula puede oscilar de alrededor de 2 veces a alrededor de 4 veces.

También se describe una nanopartícula fluorescente basada en sílice que comprende un núcleo basado en sílice que comprende un compuesto fluorescente colocado dentro del núcleo basado en sílice; una cubierta de sílice que rodea al menos una porción del núcleo; un polímero orgánico unido a la nanopartícula; y un ligando unido a la nanopartícula, en el que la nanopartícula tiene un diámetro de entre alrededor de 1 nm y alrededor de 15 nm. Tras la administración de la nanopartícula a un sujeto, la semivida de permanencia en la sangre de la nanopartícula oscila de alrededor de 2 horas a alrededor de 25 horas, la semivida de permanencia en el tumor de la nanopartícula oscila de alrededor de 5 horas a alrededor de 5 días, y el aclaramiento renal de la nanopartícula oscila de alrededor del 30% de DI a alrededor del 80% de DI en alrededor de 24 horas. El número de ligandos unidos a la nanopartícula puede oscilar de alrededor de 1 a alrededor de 20, o de alrededor de 1 a alrededor de 10. El diámetro de la nanopartícula puede ser de entre alrededor de 1 nm y alrededor de 8 nm. Se puede unir un agente de contraste, tal como un radionúclido, a la nanopartícula. De manera alternativa, se puede unir un quelato a la nanopartícula. La nanopartícula se puede detectar mediante la imagenología de PET, SPECT, CT, MRI, óptica, imagenología de bioluminiscencia, o combinaciones de las mismas. Se puede unir un agente terapéutico a la nanopartícula. Tras la administración de la nanopartícula a un sujeto, la semivida de permanencia en la sangre de la nanopartícula puede oscilar también de alrededor de 3 horas a alrededor de 15 horas, o de alrededor de 4 horas a alrededor de 10 horas. La semivida de permanencia en el tumor de la nanopartícula tras la administración de la nanopartícula a un sujeto puede oscilar también de alrededor de 10 horas a alrededor de 4 días, o de alrededor de 15 horas a alrededor de 3,5 días. La proporción de la semivida de permanencia en el tumor respecto de la semivida de permanencia en la sangre de la nanopartícula tras la administración de la nanopartícula a un sujeto puede oscilar de alrededor de 2 a alrededor de 30, de alrededor de 3 a alrededor de 20, o de alrededor de 4 a alrededor de 15. El aclaramiento renal de la

nanopartícula puede oscilar también de alrededor del 40% de DI a alrededor del 70% de DI en alrededor de 24 horas tras la administración de la nanopartícula a un sujeto.

También se proporciona una nanopartícula fluorescente basada en sílice que comprende un núcleo basado en sílice que comprende un compuesto fluorescente colocado dentro del núcleo basado en sílice; una cubierta de sílice que rodea al menos una porción del núcleo; un polímero orgánico unido a la nanopartícula; y un ligando unido a la nanopartícula, en el que la nanopartícula tiene un diámetro de entre alrededor de 1 nm y alrededor de 8 nm. Tras la administración de la nanopartícula a un sujeto, la proporción de la semivida de permanencia en el tumor respecto de la semivida de permanencia en la sangre de la nanopartícula oscila de alrededor de 2 a alrededor de 30, y el aclaramiento renal de la nanopartícula oscila de alrededor del 30% de DI a alrededor del 80% de DI en alrededor de 24 horas.

La presente invención proporciona además un método para detectar un componente de una célula que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la célula con una nanopartícula fluorescente basada en sílice que comprende un núcleo basado en sílice que comprende un compuesto fluorescente colocado dentro del núcleo basado en sílice; una cubierta de sílice que rodea al menos una porción del núcleo; un polímero orgánico unido a la nanopartícula; de alrededor de 1 a alrededor de 20 ligandos unidos a la nanopartícula; y un agente de contraste o un quelato unido a la nanopartícula; y (b) monitorizar la unión de la nanopartícula a la célula o a un componente celular mediante al menos una técnica de imagenología.

La presente invención proporciona además un método para la selección como objetivo de una célula tumoral que comprende administrar a un paciente de cáncer una cantidad eficaz de una nanopartícula fluorescente basada en sílice que comprende un núcleo basado en sílice que comprende un compuesto fluorescente colocado dentro del núcleo basado en sílice; una cubierta de sílice que rodea al menos una porción del núcleo; un polímero orgánico unido a la nanopartícula; un ligando unido a la nanopartícula y capaz de unirse a un marcador tumoral; y al menos un agente terapéutico. La nanopartícula puede estar radiomarcada. La nanopartícula se puede administrar al paciente, pero sin limitación, mediante las siguientes vías: oral, intravenosa, nasal, subcutánea, local, intramuscular o transdérmica.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1a muestra una representación de la dispersión dinámica de luz (DLS) (número medio) del tamaño de partícula para nanopartículas de sílice que contienen Cy5 con sílice desnuda (gris) y revestida de PEG (negro).

La Figura 1b muestra la imagenología *in vivo* de la fluorescencia de partículas con Cy5 con desmezclado espectral (pseudocolor) superpuesta sobre la imagenología con luz visible de ratones atímicos 45 min tras la inyección de nanopartículas de sílice desnuda.

La Figura 1c muestra la imagenología *in vivo* de la fluorescencia de partículas con Cy5 con desmezclado espectral (pseudocolor) superpuesta sobre la imagenología con luz visible de ratones atímicos 45 min tras la inyección de nanopartículas con Cy5 y PEGiladas.

La Figura 1d muestra un estudio de biodistribución *in vivo* mediante el uso de PET-CT co-registrada. La fila superior es una imagen de PET-CT co-registrada en serie 24 hr tras la inyección de una nanopartícula revestida de PEG marcada con ^{124}I, flanqueada por los barridos de microCT y microPET adquiridos independientemente. La fila inferior es una imagenología de microPET en serie.

La Figura 2a muestra datos de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) y ajustes monoexponenciales para el colorante Cy5 (gris claro), nanopartículas revestidas de PEG que contienen Cy5 de 3,3 ±0,06 nm de diámetro (gris oscuro, media ± desviación estándar, *n*=9) y 6,0 ± 0,1 nm de diámetro (negro, media ± desviación estándar, *n*=6), que muestra las diferencias en el tiempo de difusión que resultan de los diferentes tamaños hidrodinámicos de las diferentes especies.

La Figura 2b muestra los espectros de absorción y de emisión del colorante Cy5 (gris claro), nanopartículas revestidas de PEG de 3,3 nm de diámetro (gris oscuro) y 6,0 nm de diámetro (negro).

La Figura 2c muestra una comparación del brillo relativo del colorante libre (gris claro) con nanopartículas de 3,3 nm (gris oscuro) y 6,0 nm de diámetro (negro), medido como la proporción de cuentas por molécula/partícula tal como se determina a partir de las curvas de FCS.

La Figura 2d muestra datos de fotoblanqueo para el colorante Cy5 (gris claro), nanopartículas revestidas de PEG de 3,3 nm de diámetro (gris oscuro), y 6,0 nm de diámetro (negro) con excitación mediante láser de ~3,5 mW.

La Figura 3a muestra el porcentaje de la dosis inicial (%DI) de partículas conservadas por la sangre (negro) y los tejidos: hígado (gris claro), pulmón (gris medio-bajo), bazo (gris medio), y riñón (gris medio-alto) para nanopartículas de 6,0 nm de diámetro en diversos momentos de 10 min a 48 h tras la inyección (*n*=3 ratones, media ± desviación estándar).

La Figura 3b muestra una representación de la concentración de partículas conservadas para nanopartículas de 3,3 nm (gris claro) y 6,0 nm (negro) de diámetro y los ajustes logarítmicos de su disminución y las semividas.

La Figura 3c muestra una representación de la excreción de partículas estimada para nanopartículas de 3,3 nm (gris claro) y 6,0 nm (negro) de diámetro y los ajustes logarítmicos asociados y las semividas (media ± desviación estándar, *n* = 9 (tres ratones por punto de tiempo)).

La Figura 4 muestra la biodistribución *in vivo* de las nanopartículas en ratones que no albergan tumores y en ratones que albergan tumores con xenoinjertos subcutáneos de C6. (A) Partículas de sílice desnudas; (B) Partículas PEGiladas con RGD.

La Figura 5 muestra datos de unión específica total para puntos (es decir, nanopartículas) de cRGD y PEGilados mediante el uso de citometría de flujo en el canal de Cy5 en función del tiempo (a) y la concentración de partículas (b).

La Figura 6 muestra un diseño de puntos C multimodal para la selección como objetivo y la caracterización de integrina $\alpha_v\beta_3$.

Figura 6a. Representación esquemática de las nanopartículas de sílice núcleo-cubierta ^{124}I-cRGDY-PEG-iladas con una superficie que alberga radiomarcadores y péptidos y un núcleo que contiene moléculas de colorante reactivo (recuadros).

Figura 6b. Resultados de FCS y ajustes monoexponenciales para las medidas de colorante Cy5 en disolución (negro), puntos revestidos de PEG (punto de PEG, rojo), y revestidos de PEG, marcados con cRGDY (azul, bajo el conjunto de datos en rojo) que muestran diferencias en el tiempo de difusión como resultado de los tamaños hidrodinámicos variables.

Figura 6c. Comparaciones de tamaños hidrodinámicos (media ± d.e., n=15), y de brillo relativo del colorante libre con los puntos revestidos de PEG y los puntos de cRGDY-PEG obtenidos de las curvas FCS, junto con las concentraciones correspondientes de colorante y partículas.

La Figura 7 muestra la purificación y el control de calidad de puntos de ^{124}I-RGDY-PEG mediante el uso de cromatografía en columna de exclusión por tamaño. Radiactividad (columna derecha) de puntos de ^{124}I-RGD y puntos de ^{124}I-PEG detectada mediante análisis con contador γ y la intensidad de señal de fluorescencia correspondiente (Cy5, columna izquierda) de puntos de ^{124}I-RGDY-PEG y puntos de ^{124}I-PEG en cada fracción eluida.

La Figura 8 muestra los estudios de unión competitiva a receptores de integrina con puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG, péptido cRGDY, y anticuerpo anti-$\alpha_v\beta_3$ mediante el uso de dos tipos de células.

Figura 8a. Unión específica y de afinidad elevada de puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG a células M21 mediante análisis con contador γ. El recuadro muestra el análisis de Scatchard de los datos de unión que representa la proporción de la concentración de radioligando unido al receptor (B) respecto del no unido (o libre, F), o proporción unido-libre, B/F, frente a la concentración unida al receptor, B; la pendiente corresponde a la constante de disociación, Kd.

Figura 8b. Bloqueo del receptor de integrina $\alpha_v\beta_3$ de células M21 mediante el uso de citometría de flujo y anticuerpo anti-$\alpha_v\beta_3$ o cRGD en exceso sin radiomarcar antes de la incubación con puntos de cRGDY-PEG.

Figura 8c. Unión específica de puntos de cRGDY-PEG a M21 y a células M21L sin expresión superficial de integrina mediante el uso de citometría de flujo.

Figura 8d. Unión específica de puntos de cRGDY-PEG a células HUVEC mediante citometría de flujo. Cada barra representa la media ± d.e. de tres réplicas.

La Figura 9 muestra los perfiles farmacocinéticos y de excreción de las sondas de partículas selectivas y no selectivas.

Figura 9a. Biodistribución de puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG en ratones que albergan tumores M21 en diversos momentos de 4 a 168 h p.i. El recuadro muestra un gráfico representativo de estos datos para la sangre para determinar la semivida de permanencia ($T_{1/2}$).

Figura 9b. Biodistribución de puntos de ^{124}I-PEG de 4 a 96 h tras la inyección.

Figura 9c. Perfil de aclaramiento de muestras de orina recogidas hasta 168 hr p.i. de puntos de cRGDY-PEG sin radiomarcar (n=3 ratones, media ± d.e.).

Figura 9d. %DI/g acumulativa correspondiente para heces a intervalos de hasta 168 hr p.i. (n=4 ratones). Para los estudios de biodistribución, las barras representan el medio ± d.e.

La Figura 10 muestra los resultados del ensayo de toxicidad aguda.

Figura 10a. Hígado representativo teñido con hematoxilina y eosina a 400x (recuadros superiores) y riñones teñidos a 200x (recuadros inferiores). Los ratones se trataron con una única dosis de puntos de ^{127}I-RGDY-PEG sin radiomarcar o puntos revestidos de ^{127}I-PEG (vehículo de control) por medio de inyección intravenosa, y se recogieron los órganos 14 días más tarde.

Figura 10b. Pesos diarios medios para cada grupo de tratamiento del estudio de toxicidad. La barra de escala de la Figura 10a corresponde a 100 µm.

La Figura 11 muestra la imagenología de PET *in vivo* en serie de la selección como objetivo de tumores.

Figura 11a. Imágenes de microPET frontales de cuerpo completo representativas a las 4 hrs p.i. que muestran las absorciones en tumores M21 (izquierda, flecha) y M21L (medio, flecha) de 3,6 y 0,7 %DI/g, respectivamente, y el contraste incrementado del tumor M21 a las 24 hrs (derecha).

Figura 11b. Absorción *in vivo* de puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG en tumores M21 que sobreexpresan integrina $\alpha_v\beta_3$ (negro, n=7 ratones) y tumores M21L que no la expresan (gris claro, n=5 ratones) y puntos de ^{124}I-PEG en tumores M21 (gris oscuro, n=5).

Figura 11c. Proporciones de tumor M21-músculo para puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG (negro) y puntos de ^{124}I-PEG (gris).

Figura 11d. Correlación de absorciones en tumores M21 *in vivo* y *ex vivo* de sondas marcadas con cRGDY y sin marcar. Cada barra representa la media ± d.e.

La Figura 12 muestra una cartografía nodular mediante el uso de la imagenología óptica de fluorescencia multi-escala en el infrarrojo cercano.

Figura 12a. Imagenología de fluorescencia de cuerpo completo en la localización del tumor (T) y nódulos de drenaje inguinal (ILN) y axilar (ALN) y canales linfáticos comunicantes (barra, LC) 1 hr p.i. en un animal vivo expuesto quirúrgicamente.

Figura 12b. Imágenes de fluorescencia de alta resolución y luz blanca co-registradas correspondientes (fila superior) e imágenes de fluorescencia solamente (fila inferior) que revelan la infraestructura nodular de nódulos locales y distantes, que incluye vénulas de endotelio alto (HEV). La mayor barra de escala de (b) corresponde a 500 µm.

La Figura 13a muestra el sistema experimental del uso del modelo de melanoma espontáneo en minicerdos para la cartografía de lechos de nódulos linfáticos y los vasos linfáticos regionales que drenan la localización de un tumor de melanoma primario conocido.

La Figura 13b muestra la imagen de PET de campo de visión pequeño 5 minutos tras la inyección subdérmica de partículas multimodales (puntos de ^{124}I-RGD-PEG) alrededor de la localización del tumor.

La Figura 14a muestra un barrido de PET dinámica de cuerpo completo con ^{18}F-fluorodesoxiglucosa (^{18}F-FDG) que muestra imágenes longitudinales, frontales, y axiales a través de la localización de la enfermedad nodular en el cuello.

La Figura 14b muestra barridos fusionados de PET-CT con ^{18}F-FDG que muestran imágenes longitudinales, frontales, y axiales a través de la localización de la enfermedad nodular en el cuello.

La Figura 14c muestra la imagen de cuerpo completo de un minicerdo.

La Figura 15 muestra los mismos grupos de imágenes de la Figura 14, pero a nivel de la lesión de melanoma primario, adyacente a la columna vertebral en la parte superior del lomo.

La Figura 16a muestra imágenes de PET dinámica de alta resolución tras la inyección subdérmica en 4 cuadrantes de puntos de ^{124}I-RGD-PEG alrededor de la localización del tumor a lo largo de un periodo de tiempo de 1 hora.

La Figura 16b muestra imágenes de PET-CT fusionadas tras la inyección subdérmica en 4 cuadrantes de puntos de ^{124}I-RGD-PEG alrededor de la localización del tumor a lo largo de un periodo de tiempo de 1 hora.

La Figura 16c muestra la imagenología con Cy5 (imagen superior), el nódulo extirpado (segunda imagen desde la parte superior), y la tinción con hematoxilina y eosina (las dos imágenes inferiores).

La Figura 17 muestra un esquema de una nanopartícula con un colorante fluorescente dentro del núcleo y un revestimiento superficial de PEG. La nanopartícula está provista de triples enlaces para la "química click" posterior con DFO y Tyr3-octreotato funcionalizados con grupos azida.

La Figura 18 muestra las estructuras de un derivado de PEG. Se usan reacciones químicas habituales para la

producción del PEG funcionalizado con triples enlaces, que después se unirá de manera covalente a la nanopartícula por medio del grupo silano.

La Figura 19 muestra las estructuras de los derivados de DFO.

La Figura 20a muestra las estructuras de Tyr3-octreotato.

La Figura 20b muestra la síntesis del ácido que contiene azida para la incorporación en Tyr3-Octreotato.

La Figura 21a muestra un esquema de la producción de nanopartículas funcionalizadas con un colorante fluorescente en IRC dentro de su núcleo, un revestimiento superficial de PEG, quelatos con DFO y Tyr3-octreotato.

La Figura 21b muestra un esquema de la producción de una nanopartícula marcada con ^{89}Zr multimodal (PET y fluorescencia) provista de Tyr3-octreotato.

La Figura 22 muestra imágenes microscópicas que demuestran la colocalización entre nanopartículas de cRGF-PEG y Lysotracker Red en la ruta endocítica.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una nanopartícula fluorescente basada en sílice que permite la detección precisa, caracterización, monitorización y tratamiento de una enfermedad, tal como el cáncer. La nanopartícula tiene un intervalo de diámetros que incluye entre alrededor de 0,1 nm y alrededor de 100 nm, entre alrededor de 0,5 nm y alrededor de 50 nm, entre alrededor de 1 nm y alrededor de 25 nm, entre alrededor de 1 nm y alrededor de 15 nm, o entre alrededor de 1 nm y alrededor de 8 nm. La nanopartícula tiene un compuesto fluorescente colocado dentro de la nanopartícula, y tiene un mayor brillo y rendimiento cuántico de fluorescencia que el compuesto fluorescente libre. La nanopartícula también exhibe una bioestabilidad y biocompatibilidad elevadas. Para facilitar la excreción urinaria eficaz de la nanopartícula, se puede revestir con un polímero orgánico, tal como poli(etilen glicol) (PEG). El pequeño tamaño de la nanopartícula, la base de sílice y el revestimiento de polímero orgánico minimiza la toxicidad de la nanopartícula cuando se administra *in vivo.* Para seleccionar como objetivo un tipo específico de célula, la nanopartícula se puede conjugar además a un ligando, que es capaz de unirse a un componente celular (p.ej., la membrana celular u otro componente intracelular) asociado al tipo específico de célula, tal como un marcador tumoral o un intermedio de una ruta de señalización. En una realización, se puede unir un agente terapéutico a la nanopartícula. Para permitir que la nanopartícula sea detectable no solamente mediante imagenología óptica (tal como imagenología de fluorescencia), sino también mediante otras técnicas de imagenología, tales como tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía computerizada de emisión monofotónica (SPECT), tomografía computerizada (CT), e imagenología de resonancia magnética (MRI), la nanopartícula se puede conjugar también con un agente de contraste, tal como un radionúclido.

Las propiedades de las nanopartículas posibilitan la excreción a través de los riñones, así como la absorción y retención selectivas en los tumores en comparación con los tejidos normales. Esto, junto con la ausencia de toxicidad *in vivo*, ha dado como resultado un producto único que es prometedor para su traslado al ámbito clínico.

La nanopartícula puede tener tanto un ligando como un agente de contraste. El ligando permite que la nanopartícula seleccione como objetivo un tipo específico de célula por medio de la unión específica entre el ligando y el componente celular. Esta selección del objetivo, combinada con la imagenología multimodal, tiene múltiples usos. Por ejemplo, se pueden usar las nanopartículas para cartografiar nódulos linfáticos centinela (NLC), así como para marcar los márgenes de los tumores o estructuras neuronales, lo que permite que el cirujano extirpe lesiones malignas bajo una visualización directa y evite complicaciones durante el procedimiento quirúrgico. El ligando también puede facilitar la entrada de la nanopartícula en la célula o el transporte a través de barreras, por ejemplo, para analizar el medio intracelular.

La nanopartícula se puede acoplar con un ligando y un agente terapéutico con o sin un radiomarcador. El radiomarcador puede servir además como agente terapéutico para crear una plataforma multiterapéutica. Este acoplamiento permite que el agente terapéutico se transporte al tipo específico de célula por medio de la unión específica entre el ligando y el componente celular. Esta selección del objetivo específica del agente terapéutico asegura el tratamiento selectivo de la localización de la enfermedad con efectos secundarios mínimos.

La nanopartícula fluorescente de la presente invención incluye un núcleo basado en sílice que comprende un compuesto fluorescente colocado dentro del núcleo, y una cubierta de sílice sobre el núcleo. La cubierta de sílice puede rodear al menos una porción del núcleo. De manera alternativa, la nanopartícula puede tener solamente el núcleo sin la cubierta. El núcleo de la nanopartícula puede contener el producto de reacción de un compuesto fluorescente reactivo y un compuesto de organosilano co-reactivo. En otra realización, el núcleo de la nanopartícula puede contener el producto de reacción de un compuesto fluorescente reactivo y un compuesto de organosilano co-reactivo, y sílice. El diámetro del núcleo puede ser de alrededor de 0,05 nm a alrededor de 100 nm, de alrededor de 0,1 nm a alrededor de 50 nm, de alrededor de 0,5 nm a alrededor de 25 nm, de alrededor de 0,8 nm a alrededor de 15 nm, o de alrededor de 1 nm a alrededor de 8 nm. La cubierta de la nanopartícula puede ser el producto de reacción de un compuesto que forma sílice. La cubierta de la nanopartícula puede tener un intervalo de capas. Por

ejemplo, la cubierta de sílice puede tener de alrededor de 1 a alrededor de 20 capas, de alrededor de 1 a alrededor de 15 capas, de alrededor de 1 a alrededor de 10 capas, o de alrededor de 1 a alrededor de 5 capas. El grosor de la cubierta puede oscilar de alrededor de 0,01 nm a alrededor de 90 nm, de alrededor de 0,02 nm a alrededor de 40 nm, de alrededor de 0,05 nm a alrededor de 20 nm, de alrededor de 0,05 nm a alrededor de 10 nm, o de alrededor de 0,05 nm a alrededor de 5 nm.

La cubierta de sílice de la nanopartícula puede cubrir solamente una porción de la nanopartícula o la partícula completa. Por ejemplo, la cubierta de sílice puede cubrir alrededor del 1 a alrededor del 100 por ciento, de alrededor del 10 a alrededor del 80 por ciento, de alrededor del 20 a alrededor del 60 por ciento, o de alrededor del 30 a alrededor del 50 por ciento de la nanopartícula. La cubierta de sílice puede ser sólida, es decir, sustancialmente no porosa, mesoporosa, tal como semiporosa, o porosa.

La presente nanopartícula fluorescente se puede sintetizar mediante las etapas de: conjugar de manera covalente un compuesto fluorescente, tal como un colorante fluorescente reactivo, con restos reactivos que incluyen, pero sin limitación, maleimida, yodoacetamida, tiosulfato, amina, éster de N-hidroxisuccimida, éster de 4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorofenilo (STP), éster de sulfosuccinimidilo, ésteres de sulfodiclorofenol, cloruro de sulfonilo, hidroxilo, isotiocianato, carboxilo, con un compuesto de organosilano, tal como un compuesto de organosilano co-reactivo, para formar un precursor de sílice fluorescente, y hacer reaccionar el precursor de sílice fluorescente para formar un núcleo fluorescente; conjugar de manera covalente un compuesto fluorescente, tal como un colorante fluorescente reactivo, con un compuesto de organosilano, tal como un compuesto de organosilano co-reactivo, para formar un precursor de sílice fluorescente, y hacer reaccionar el precursor de sílice fluorescente con un compuesto de formación de sílice, tal como tetraalcoxisilano, para formar un núcleo fluorescente; y hacer reaccionar el núcleo resultante con un compuesto de formación de sílice, tal como un tetraalcoxisilano, para formar una cubierta de sílice sobre el núcleo, para proporcionar la nanopartícula fluorescente.

La síntesis de las nanopartículas núcleo-cubierta monodispersas fluorescentes se basa en un proceso de dos etapas. Primero, se conjugan de manera covalente las moléculas de colorante orgánico, isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), con un precursor de sílice y se condensan para formar un núcleo rico en colorante. Segundo, se añaden los monómeros de gel de sílice para formar una red de sílice más densa alrededor del material del núcleo fluorescente, lo que proporciona protección hacia las interacciones con el disolvente que pueden ser perjudiciales para la fotoestabilidad. La versatilidad de la vía preparativa permite la incorporación de diferentes compuestos fluorescentes, tales como compuestos o colorantes orgánicos fluorescentes, dependiendo de la aplicación deseada de la nanopartícula. Los compuestos fluorescentes que se pueden incorporar en el núcleo rico en colorante pueden cubrir todo el espectro de absorción y emisión UV-visible a IR cercano. Solicitudes de patentes de EE.UU. nºs 10/306.614, 10/536.569 y 11/119.969. Wiesner et al., Peg-coated Core-shell Silica Nanoparticles and Mathods of Manufactire and Use, documento PCT/US2008/74894.

Para la síntesis de la nanopartícula núcleo-cubierta compacta, se añade el precursor de colorante a un recipiente de reacción que contiene cantidades adecuadas de amoniaco, agua y disolvente y se deja reaccionar durante la noche. El precursor de colorante se sintetiza mediante una reacción de adición entre un colorante del infrarrojo cercano específico de interés y 3-aminopropiltrietoxisilano en una proporción molar de 1:50, con exclusión de humedad. Tras completar la síntesis del núcleo compacto rico en colorante, se añade posteriormente ortosilicato de tetraetilo (TEOS) para hacer crecer la cubierta de sílice que rodea al núcleo.

La síntesis de la nanopartícula núcleo-cubierta expandida se lleva a cabo mediante la co-condensación de TEOS con el precursor de colorante, y permitiendo que la mezcla reaccione durante la noche. Después de completar la síntesis del núcleo expandido, se añade TEOS adicional para hacer crecer la cubierta de sílice que rodea al núcleo.

La síntesis de las nanopartículas homogéneas se lleva a cabo mediante la co-condensación de todos los reactivos, el precursor de colorante y TEOS, y permitiendo que la mezcla reaccione durante la noche.

Las nanopartículas pueden incorporar cualquier compuesto fluorescente conocido, tal como un compuesto orgánico fluorescente, colorantes, pigmentos, o combinaciones de los mismos. Se conoce una amplia diversidad de colorantes fluorescentes químicamente reactivos adecuados, véase, por ejemplo, MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, 6ª ed., R. P. Haugland, ed. (1996). Un fluoróforo típico es, por ejemplo, un compuesto aromático o heteroaromático fluorescente tal como un pireno, un antraceno, un naftaleno, una acridina, un estilbeno, un indol o bencindol, un oxazol o benzoxazol, un tiazol o benzotiazol, un 4-amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD), una cianina, una carbocianina, un carboestirilo, una porfirina, un salicilato, un antranilato, un azuleno, un perileno, una piridina, una quinolina, una cumarina (que incluye las hidroxicumarinas y aminocumarinas y los derivados fluorados de los mismos), y compuestos similares, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nºs 5.830.912, 4.774.339, 5.187.288, 5.248.782, 5.274.113, 5.433.896, 4.810.636 y 4.812.409. En una realización, se coloca Cy5, un colorante fluorescente del infrarrojo cercano (FIRC), dentro del núcleo de sílice de la presente nanopartícula. Las sondas que emiten en el infrarrojo cercano exhiben una atenuación tisular y autofluorescencia disminuidas. Burns et al. "Fluorescent silica nanoparticles with efficient urinary excretion for nanomedicine", Nano Letters, 2009, 9 (1), 442-448.

El compuesto fluorescente no limitante que se puede usar en la presente invención incluye Cy5, Cy5.5 (también

conocido como Cy5++), Cy2, isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), ficoeritrina, Cy7, fluoresceína (FAM), Cy3, Cy3.5 (también conocido como Cy3++), Rojo Texas, LightCycler-Red 640, LightCycler Red 705, tetrametilrodamina (TMR), rodamina, derivado de rodamina (ROX), hexaclorofluoresceína (HEX), rodamina 6G (R6G), el derivado de rodamina JA133, colorantes fluorescentes Alexa (tales como Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 555, y Alexa Fluor 647), 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), yoduro de propidio, AMCA, Verde Espectro, Naranja Espectro, Aguamarina Espectro, Lisamina, y complejos de metales de transición fluorescentes, tales como europio. El compuesto fluorescente que se puede usar también incluye proteínas fluorescentes, tales como GFP (proteína fluorescente verde), GFP mejorada (EGFP), proteína fluorescente azul y derivados (BFP, EBFP, EBFP2, Azurita, mKalama1), proteína fluorescente cian y derivados (CFP, ECFP, Cerúlea, CyPet) y proteína fluorescente amarilla y derivados (YFP, Citrina, Venus, YPet). Documentos WO2008142571, WO2009056282, WO9922026.

La superficie de la cubierta de sílice de las nanopartículas se puede modificar mediante el uso de agentes de entrecruzamiento conocidos para introducir grupos funcionales superficiales. Los agentes de entrecruzamiento incluyen, pero sin limitación, divinil benceno, dimetacrilato de etilen glicol, trimetacrilato de trimetilol propano, N,N'-metileno-bis-acrilamida, éteres de alquilo, carbohidratos, péptidos, fragmentos de ADN, u otros agentes funcionalmente equivalentes conocidos. El ligando se puede conjugar con la nanopartícula de la presente invención, por ejemplo, por medio de reacciones de acoplamiento mediante el uso de carbodiimida, carboxilatos, ésteres, alcoholes, carbamidas, aldehídos, aminas, óxidos de azufre, óxidos de nitrógeno, haluros, o cualquier otro compuesto adecuado conocido en la técnica. Patente de EE.UU. nº 6.268.222.

Se puede unir un polímero orgánico a la presente nanopartícula, p.ej., se puede unir a la superficie de la nanopartícula. Se puede unir un polímero orgánico a la cubierta de sílice de la presente nanopartícula. El polímero orgánico que se puede usar en la presente invención incluye PEG, polilactato, poli(ácidos lácticos), carbohidratos, lípidos, poli(ácido glutámico) (PGA), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(acetato de vinilo) (PVA), y las combinaciones de los mismos. La unión del polímero orgánico a la nanopartícula se puede llevar a cabo mediante un enlace covalente o no covalente, tal como mediante un enlace iónico, enlace de hidrógeno, enlace hidrófobo, coordinación, adhesión, y absorción física. En una realización, la nanopartícula se conjuga de manera covalente con PEG, lo que impide la adsorción de proteínas del suero, facilita la excreción urinaria eficaz y disminuye la agregación de la nanopartícula. Burns et al. "Fluorescent silica nanoparticles with efficient urinary excretion for nanomedicine", Nano Letters, 2009, 9 (1), 442-448.

La superficie de la nanopartícula se puede modificar para que incorpore al menos un grupo funcional. El polímero orgánico (p.ej., PEG) unido a la nanopartícula se puede modificar para que incorpore al menos un grupo funcional. Por ejemplo, el grupo funcional puede ser una maleimida o éster de *N*-hidroxisuccinimida (NHS). La incorporación del grupo funcional hace posible unir diversos ligandos, agentes de contraste y/o agentes terapéuticos a la nanopartícula.

Se puede unir un ligando a la presente nanopartícula. El ligando es capaz de unirse a al menos un componente celular. El componente celular puede estar asociado a tipos específicos de células, o puede tener niveles elevados en tipos específicos de células, tales como células cancerosas o células específicas de tejidos y órganos particulares. Por lo tanto, la nanopartícula puede seleccionar como objetivo un tipo de célula específica, y/o proporciona una administración selectiva para el tratamiento y el diagnóstico de una enfermedad. Tal como se usa en la presente memoria, el término "ligando" se refiere a una molécula o entidad que se puede usar para identificar, detectar, seleccionar como objetivo, monitorizar, o modificar un estado físico o afección, tal como un estado patológico o afección. Por ejemplo, se puede usar un ligando para detectar la presencia o ausencia de un receptor particular, nivel de expresión de un receptor particular, o niveles metabólicos de un receptor particular. El ligando puede ser, por ejemplo, un péptido, una proteína, un fragmento de proteína, una hormona peptídica, un carbohidrato (es decir, lectinas), un biopolímero, un polímero sintético, un antígeno, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo (p.ej., Fab, nanocuerpos), un aptámero, un virus o componente viral, un receptor, un hapteno, una enzima, una hormona, un compuesto químico, un patógeno, un microorganismo o un componente de los mismos, una toxina, un modificador de superficie, tal como un tensioactivo para alterar las propiedades superficiales o la histocompatibilidad de la nanopartícula o de un analito cuando se asocia una nanopartícula con él, y combinaciones de los mismos. Los ligandos preferidos son, por ejemplo, anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales o policlonales, y ligandos de receptores. En otra realización, el ligando es poli-L-lisina (pLisina).

Se puede unir un antígeno a la nanopartícula. Se puede usar la nanopartícula unida a un antígeno para una vacunación.

Las expresiones "componente de una célula" o "componente celular" se refieren, por ejemplo, a un receptor, un anticuerpo, un hapteno, una enzima, una hormona, un biopolímero, un antígeno, un ácido nucleico (ADN o ARN), un microorganismo, un virus, un patógeno, una toxina, combinaciones de los mismos, y componentes similares. El componente de una célula puede estar colocado sobre la célula (p.ej., un receptor transmembrana) o dentro de la célula. En una realización, el componente de una célula es un marcador tumoral. Tal como se usa en la presente memoria, el término "marcador tumoral" se refiere a una molécula, entidad o sustancia que se expresa o se sobreexpresa en una célula cancerosa, pero no en una célula normal. Por ejemplo, la sobreexpresión de ciertos receptores está asociada a muchos tipos de cáncer. Se puede conjugar un ligando capaz de unirse a un marcador

tumoral en la superficie de la presente nanopartícula, de forma que la nanopartícula puede seleccionar como objetivo de manera específica la célula tumoral.

Se puede unir un ligando a la presente nanopartícula directamente o por medio de un ligador. La unión del ligando a la nanopartícula se puede llevar a cabo mediante un enlace covalente o no covalente, tal como mediante un enlace iónico, enlace de hidrógeno, enlace hidrófobo, coordinación, adhesión, y absorción física. El ligando se puede revestir sobre la superficie de la nanopartícula. El ligando se puede embeber sobre la superficie de la nanopartícula. Tal como se usa en la presente memoria, "embeber" se refiere a la asimilación o captación. El ligando se puede unir a la superficie de la nanopartícula fluorescente, o se puede unir al núcleo cuando la cubierta es porosa o está cubriendo una porción del núcleo. Cuando el ligando se une a la nanopartícula por medio de un ligador, el ligador puede ser cualquier molécula adecuada, tal como un PEG funcionalizado. Los PEGs pueden tener múltiples grupos funcionales para la unión a la nanopartícula y a los ligandos. La partícula puede tener diferentes tipos de PEGs funcionalizados que albergan diferentes grupos funcionales que se pueden unir a múltiples ligandos. Esto puede aumentar los efectos de multivalencia y/o contraste en la localización seleccionada como objetivo, lo que permite el diseño y la optimización de una plataforma multimodal compleja con una detección, tratamiento, y medición *in vivo* selectivas mejoradas.

Se puede unir una diversidad de ligandos diferentes a la nanopartícula. Por ejemplo, se puede unir el tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD) a la nanopartícula. De manera alternativa, se puede unir el péptido cíclico cRGD (que puede contener otro(s) aminoácido(s), p.ej., cRGDY) a la nanopartícula. Cualquier péptido lineal, cíclico o ramificado que contenga la secuencia RGD se halla dentro del alcance de la presente invención. RGD se une a la integrina $\alpha_v\beta_3$, que se sobreexpresa en la superficie de las células endoteliales activadas durante la angiogénesis y en diversos tipos de células tumorales. Se ha demostrado que los niveles de expresión de la integrina $\alpha_v\beta_3$ se correlacionan bien con la agresividad de los tumores. Ruoslahti et al. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science 1987;238:491. Gladson et al. Glioblastoma expression of vitronectin and alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. J. Clin. Invest. 1991; 88:1924-1932. Seftor et al. Role of the alpha v beta 3 integrin in human melanoma cell invasion. Proc. Natl. Acad. Sci. 1992; 89:1557-1561.

De manera alternativa, el péptido sintético EPPT1 puede ser el ligando unido a la nanopartícula. EPPT1, obtenido del sitio de unión del anticuerpo monoclonal (ASM2), selecciona como objetivo MUC1 sin glicosilar (uMUC1). MUC1, un receptor transmembrana, está muy glicosilado en los tejidos normales; sin embargo, se sobreexpresa e infraglicosila de manera anormal en casi todos los adenocarcinomas de células epiteliales humanas, y está implicado en la patogénesis tumoral. Moore et al. In vivo targeting of underglycosylated MUC-1 tumor antigen using a multimodal imaging probe. Cancer Res. 2004; 64:1821-7. Patel et al. MUC1 plays a role in tumor maintenance in aggressive thryroid carcinomas. Surgery. 2005; 138:994-1001. Se pueden conjugar de manera alternativa anticuerpos específicos, que incluyen los anticuerpos monoclonales hacia uMUC1, a la nanopartícula para seleccionar como objetivo uMUC1.

En una realización, los análogos peptídicos de la hormona estimulante de α-melanotropina (α-MSH) son los ligandos unidos a la nanopartícula. Los análogos peptídicos de α-MSH son capaces de unirse a los receptores de melanocortina-1 (MC1R), una familia de receptores acoplados a proteína G sobreexpresados en las células de melanoma. Loir et al. Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand) 1999, 45:1083-1092.

En otra realización, el octreotato, un análogo peptídico de somatostatina de 14 aminoácidos, es el ligando unido a la nanopartícula. El octreótido, que tiene una semivida más larga que la somatostatina, es capaz de unirse a un receptor de somatostatina (SSTR). SSTR, un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G, se sobreexpresa sobre la superficie de varios tumores humanos. Reubi et al. Distribution of Somatostatin Receptors in Normal and Tumor-Tissue. Metab. Clin. Exp. 1990;39:78-81. Reubi et al. Somatostatin receptors and their subtypes in human tumors and in peritumoral vessels. Metab. Clin. Exp. 1996;45:39-41. Se pueden conjugar de manera alternativa otros análogos de somatostatina a la nanopartícula para seleccionar como objetivo SSTR, tales como Tyr3-octreótido (Y3-OC), octreotato (TATE), Tyr3-octreotato (Y3-TATE), y ^{111}In-DTPA-OC. Estos análogos de somatostatina se pueden utilizar para la imagenología de diagnóstico por PET y la radioterapia selectiva del cáncer. de Jong et al. Internalization of radio labelled [DTPA0]octreotide and [DOTA0, Tyr3]octreotide: peptides for somatostatin receptor targeted scintigraphy and radionuclide therapy. Nucl. Med. Commun. 1998;19:283-8. de Jong et al. Comparison of 111In-Labeled Somatostatin Analogues for Tumor Scintigraphy and Radionuclide Therapy. Cancer Res. 1998;58:437-41. Lewis et al. Comparison of four 64Cu-labeled somatostatin analogs in vitro and in a tumor-bearing rat model: evaluation of new derivatives for PET imaging and targeted radiotherapy. J Med Chem 1999;42:1341-7. Krenning et al. Somatostatin Receptor Scintigraphy with Indium-111-DTPA-D-Phe-1-Octreotide in Man: Metabolism, Dosimetry and Comparison with Iodine-123-Tyr-3-Octreotide. J Nucl. Med. 1992;33:652-8.

El número de ligandos unidos a la nanopartícula puede oscilar de alrededor de 1 a alrededor de 20, de alrededor de 2 a alrededor de 15, de alrededor de 3 a alrededor de 10, de alrededor de 1 a alrededor de 10, o de alrededor de 1 a alrededor de 6. El pequeño número de ligandos unidos a la nanopartícula ayuda a mantener el diámetro hidrodinámico de la presente nanopartícula, que cumple el intervalo de tamaños umbral para el aclaramiento renal. Hilderbrand et al., Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging, Curr. Opin. Chem. Biol., 14:71-9, 2010. El número de ligandos medido puede ser un número medio de los ligandos unidos a más de una nanopartícula. De manera alternativa, se puede medir una nanopartícula para determinar el número de ligandos

unidos. El número de ligandos unidos a la nanopartícula se puede medir mediante cualquier método adecuado, que puede o no estar relacionado con las propiedades de los ligandos. Por ejemplo, se puede estimar el número de péptidos cRGD unidos a la partícula mediante el uso de medidas basadas en FCS de las concentraciones de partículas absolutas y la concentración de partida de los reactivos para el péptido cRGD. Se puede determinar de manera colorimétrica el número medio de péptidos RGD por nanopartícula y la eficacia de acoplamiento de RGD para los grupos de PEG funcionalizados en condiciones alcalinas y con métodos espectrofotométricos de Biuret. El número de ligandos unidos a la nanopartícula se puede medir también mediante resonancia magnética nuclear (RMN), imagenología óptica, ensayo de radiactividad, etc. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente el método.

Se puede unir un agente de contraste a la presente nanopartícula para la imagenología médica o biológica. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "agente de contraste" se refiere a una sustancia, molécula o compuesto usado para aumentar la visibilidad de las estructuras o los fluidos en la imagenología médica o biológica. La expresión "agente de contraste" también se refiere a una molécula que produce contraste. Las técnicas de imagenología abarcadas por la presente invención incluyen la tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía computerizada de emisión monofotónica (SPECT), tomografía computerizada (CT), imagenología de resonancia magnética (MRI), imagenología óptica de bioluminiscencia, imagenología óptica de fluorescencia, y combinaciones de las mismas. El agente de contraste abarcado por la presente invención puede ser cualquier molécula, sustancia o compuesto conocido en la técnica para la imagenología de PET, SPECT, CT, MRI, y óptica. El agente de contraste puede ser radionúclidos, radiometales, emisores de positrones, emisores beta, emisores gamma, emisores alfa, iones metálicos paramagnéticos, e iones metálicos superparamagnéticos. Los agentes de contraste incluyen, pero sin limitación, yodo, flúor, cobre, circonio, lutecio, astato, itrio, galio, indio, tecnecio, gadolinio, disprosio, hierro, manganeso, bario y sulfato de bario. Los radionúclidos que se pueden usar como agente de contraste unido a la nanopartícula de la presente invención incluyen, pero sin limitación, ^{89}Zr, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{124}I y ^{177}Lu.

El agente de contraste se puede conjugar directamente a la nanopartícula. De manera alternativa, el agente de contraste se puede conjugar indirectamente a la nanopartícula, mediante la unión a ligadores o quelatos. El quelato se puede adaptar para unir un radionúclido. Los quelatos que se pueden unir a la presente nanopartícula pueden incluir, pero sin limitación, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), desferrioxamina (DFO) y trietilentetramina (TETA).

Los medios adecuados para la imagenología, detección, registro o medición de las presentes nanopartículas pueden incluir además, por ejemplo, un citómetro de flujo, un citómetro de barrido láser, un lector de microplacas de fluorescencia, un microscopio de fluorescencia, un microscopio confocal, un microscopio de campo brillante, un sistema de barrido de alto contenido, y dispositivos similares. Se puede usar más de un técnica de imagenología al mismo tiempo o consecutivamente para detectar las presentes nanopartículas. En una realización, se usa la imagenología óptica como herramienta sensible de cribado de alto rendimiento para adquirir múltiples puntos de tiempo en el mismo sujeto, lo que permite determinaciones semicuantitativas de los niveles de marcadores tumorales. Esto compensa la resolución temporal relativamente disminuida obtenida con PET, aunque PET es necesaria para conseguir una penetración de profundidad adecuada para obtener datos volumétricos, y para detectar, cuantificar, y monitorizar los cambios en los niveles de receptores y/u otros marcadores celulares como medio para estudiar la progresión o mejora de una enfermedad, así como para estratificar a los pacientes en protocolos de tratamiento adecuados.

Se puede unir un agente terapéutico a la nanopartícula fluorescente, por ejemplo, para el tratamiento selectivo de una enfermedad. El agente terapéutico se puede administrar en una localización de una enfermedad de una manera sumamente específica o localizada, con la liberación del agente terapéutico en la localización de la enfermedad. De manera alternativa, el agente terapéutico puede no liberarse. Se puede usar la nanopartícula fluorescente conjugada con el ligando para la administración selectiva de un agente terapéutico en una localización deseada en una diversidad de sistemas, tal como sobre, o dentro de, una célula o componente celular, dentro del cuerpo de un organismo, tal como un ser humano, o a través de la barrera hematoencefálica.

El agente terapéutico se puede unir a la nanopartícula directamente o indirectamente. El agente terapéutico se puede absorber en los intersticios o poros de la cubierta de sílice, o se puede revestir sobre la cubierta de sílice de la nanopartícula fluorescente. En otras realizaciones en las que la cubierta de sílice no cubre toda la superficie, el agente terapéutico se puede asociar al núcleo fluorescente, tal como mediante absorción física o mediante interacción con formación de enlaces. El agente terapéutico se puede asociar con el ligando que está unido a la nanopartícula fluorescente. El agente terapéutico también se puede asociar con el polímero orgánico o el agente de contraste. Por ejemplo, el agente terapéutico se puede unir a la nanopartícula por medio de PEG. Los PEGs pueden tener múltiples grupos funcionales para la unión a la nanopartícula y al agente terapéutico. La partícula puede tener diferentes tipos de PEGs funcionalizados que albergan diferentes grupos funcionales que se pueden unir a múltiples agentes terapéuticos. El agente terapéutico se puede unir a la nanopartícula de manera covalente o no covalente.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "agente terapéutico" se refiere a una sustancia que se puede usar en el diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad en un ser humano u otro animal. Tales agentes terapéuticos incluyen sustancias reconocidas en la Farmacopea oficial de los Estados Unidos,

la Farmacopea Homeopática oficial de los Estados Unidos, el Vademécum Nacional oficial, o cualquier suplemento de los mismos.

Los agentes terapéuticos que se pueden incorporar con las nanopartículas fluorescentes o las nanopartículas fluorescentes ligadas de la invención incluyen nucleósidos, análogos de nucleósidos, ARN pequeño de interferencia (siARN), microARN, oligopéptidos, polipéptidos, anticuerpos, inhibidores de COX-2, promotores de la apoptosis, agentes del tracto urinario, agentes vaginales, vasodilatadores como agentes anti-neurodegenerativos (p.ej., para la enfermedad de Parkinson), agentes para la obesidad, agentes oftálmicos, agentes para la osteoporosis, parasimpatolíticos, parasimpatométicos, antianestésicos, prostaglandinas, agentes psicoterapéuticos, agentes respiratorios, sedantes, hipnóticos, agentes para la piel y membranas mucosas, anti-bacterianos, anti-fúngicos, antineoplásicos, agentes cardioprotectores, agentes cardiovasculares, anti-trombóticos, estimulantes del sistema nervioso central, inhibidores de colinesterasa, anticonceptivos, agonistas de receptores de dopamina, agentes para la disfunción eréctil, agentes para la fertilidad, agentes gastrointestinales, agentes para la gota, hormonas, inmunomoduladores, analgésicos funcionalizados de manera adecuada o anestésicos generales o locales, anti-convulsivos, agentes anti-diabéticos, agentes anti-fibróticos, anti-infecciosos, agentes anticinetósicos, relajantes musculares, agentes inmunosupresores, agentes para la migraña, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), agentes de cesación tabáquica, o simpatolíticos (véase Physicians' Desk Reference, 55ª ed., 2001, Medical Economics Company, Inc., Montvale, N.J., páginas 201-202).

Los agentes terapéuticos que se pueden unir a la presente nanopartícula incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes del ADN, inhibidores de topoisomerasas, agentes inductores de estrés en el retículo endoplásmico, un compuesto de platino, un antimetabolito, alcaloides de la vinca, taxanos, epotilonas, inhibidores de enzimas, antagonistas de receptores, anticuerpos terapéuticos, inhibidores de tirosina quinasa, radiosensibilizantes de boro (es decir, Velcade), y terapias de combinación quimioterápicas.

Los ejemplos no limitantes de agentes alquilantes del ADN son mostazas nitrogenadas, tales como Mecloretamina, Ciclofosfamida (Ifosfamida, Trofosfamida), Clorambucilo (Melfalano, Prednimustina), Bendamustina, Uramustina y Estramustina; nitrosoureas, tales como Carmustina (BCNU), Lomustina (Semustina), Fotemustina, Nimustina, Ranimustina y Estreptozocina; sulfonatos de alquilo, tales como Busulfano (Manosulfano, Treosulfano); Aziridinas, tales como Carbocuona, TioTEPA, Triazicuona, Trietilenmelamina; Hidrazinas (Procarbazina); Triazenos tales como Dacarbazina y Temozolomida; Altretamina y Mitobronitol.

Los ejemplos no limitantes de inhibidores de Topoisomerasa I incluyen derivados de Campotecina que incluyen CPT-11 (irinotecano), SN-38, APC, NPC, campotecina, topotecano, mesilato de exatecano, 9-nitrocamptotecina, 9-aminocamptotecina, lurtotecano, rubitecano, silatecano, gimatecano, diflomotecano, extatecano, BN-80927, DX-8951f, y MAG-CPT, tal como se describió en Pommier Y. (2006) Nat. Rev. Cancer 6(10):789-802 y la publicación de patente de EE.UU. nº 200510250854; Alcaloides de protoberberina y derivados de los mismos, que incluyen berberrubina y coralina, tal como se describió en Li et al. (2000) Biochemistry 39(24):7107-7116 y Gatto et al. (1996) Cancer Res. 15(12):2795-2800; Derivados de fenantrolina, que incluyen Benzo[i]fenantridina, Nitidina, y fagaronina, tal como se describió en Makhey et al. (2003) Bioorg. Med. Chem. 11 (8): 1809-1820; Terbencimidazol y derivados del mismo, tal como se describió en Xu (1998) Biochemistry 37(10):3558-3566; y derivados de Antraciclina, que incluyen Doxorrubicina, Daunorrubicina, y Mitoxantrona, tal como se describió en Foglesong et al. (1992) Cancer Chemother. Pharmacol. 30(2):123-125, Crow et al. (1994) J. Med. Chem. 37(19):31913194, y Crespi et al. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 136(2):521-8. Los inhibidores de topoisomerasa II incluyen, pero sin limitación, Etopósido y Tenipósido. Los inhibidores dobles de topoisomerasa I y II incluyen, pero sin limitación, Saintopina y otras Naftecenodionas, DACA y otras Acridin-4-Carboxamidas, Intoplicina y otros Benzopiridoindoles, TAS-I03 y otras 7H-indeno[2,1-c]Quinolin-7-onas, Pirazoloacridina, XR 11576 y otras Benzofenazinas, XR 5944 y otros compuestos diméricos, 7-oxo-7H-dibenz[f,ij]Isoquinolinas y 7-oxo-7H-benzo[e]Perimidinas, y Conjugados Antracenilo-aminoácido como se describió en Denny y Baguley (2003) Curr. Top. Med. Chem. 3(3):339-353. Algunos agentes inhiben la Topoisomerasa II y tienen actividad de intercalación en el ADN, tales como, pero sin limitación, Antraciclinas (Aclarrubicina, Daunorrubicina, Doxorrubicina, Epirrubicina, Idarrubicina, Amrubicina, Pirarrubicina, Valrubicina, Zorubicina) y Antracenodionas (Mitoxantrona y Pixantrona).

Los ejemplos de agentes inductores de estrés en el retículo endoplásmico incluyen, pero sin limitación, dimetil-celecoxib (DMC), nelfinavir, celecoxib, y radiosensibilizantes de boro (es decir, Velcade (Bortezomib)).

Los ejemplos no limitantes de compuestos basados en platino incluyen Carboplatino, Cisplatino, Nedaplatino, Oxaliplatino, tetranitrato de Triplatino, Satraplatino, Aroplatino, Lobaplatino, y JM-216. (véase McKeage et al. (1997) J. Clin. Oncol. 201:1232-1237 y, en general, CHEMOTHERAPY FOR GYNECOLOGICAL NEOPLASM, CURRENT THERAPY AND NOVEL APPROACHES, en la serie Basic and Clinical Oncology, Angioli et al. Eds., 2004).

Los ejemplos no limitantes de antimetabolitos incluyen los basados en ácido fólico, es decir, inhibidores de dihidrofolato reductasa, tales como Aminopterina, Metotrexato y Pemetrexed; inhibidores de timidilato sintasa, tales como Raltitrexed, Pemetrexed; los basados en purina, es decir, un inhibidor de adenosina desaminasa, tal como Pentostatina, una tiopurina, tal como Tioguanina y Mercaptopurina, un inhibidor halogenado de ribonucleótido reductasa, tal como Cladribina, Clofarabina, Fludarabina, o una tiopurina de guanina/guanosina, tal como Tioguanina; o basado en Pirimidina, es decir, un agente hipometilante de citosina/citidina, tal como Azacitidina y

Decitabina, un inhibidor de ADN polimerasa, tal como Citarabina, un inhibidor de ribonucleótido reductasa, tal como Gemcitabina, o un inhibidor de timina/timidina timidilato sintasa, tal como un Fluorouracilo (5-FU). Los equivalentes de 5-FU incluyen profármacos, análogos y derivados de los mismos tales como 5'-desoxi-5-fluorouridina (doxifluroidina), 1-tetrahidrofuranil-5-fluorouracilo (ftorafur), Capecitabina (Xeloda), S-I (MBMS-247616, que consiste en tegafur y dos moduladores, una 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina y oxonato potásico), raltitrexed (tomudex), nolatrexed (Thymitaq, AG337), LY231514 y ZD9331, como se describió, por ejemplo, en Papamicheal (1999) The Oncologist 4:478-487.

Los ejemplos de alcaloides de la vinca incluyen, pero sin limitación, Vinblastina, Vincristina, Vinflunina, Vindesina y Vinorelbina.

Los ejemplos de taxanos incluyen, pero sin limitación, Docetaxel, Larotaxel, Ortataxel, Paclitaxel y Tesetaxel. Un ejemplo de una epotilona es ixabepilona.

Los ejemplos de inhibidores de enzimas incluyen, pero sin limitación, inhibidores de farnesiltransferasa (Tipifamib); inhibidor de CDK (Alvocidib, Seliciclib); inhibidor de proteosoma (Bortezomib); inhibidor de fosfodiesterasa (Anagrelide; rolipram); inhibidor de IMP deshidrogenasa (Tiazofurina); e inhibidor de lipooxigenasa (Masoprocol). Los ejemplos de antagonistas de receptores incluyen, pero sin limitación, ERA (Atrasentan); receptor retinoide X (Bexaroteno); y un esteroide sexual (Testolactona).

Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos incluyen, pero sin limitación, anti-HER1/EGFR (Cetuximab, Panitumumab); Anti-receptor HER2/neu (erbB2) (Trastuzumab); Anti-EpCAM (Catumaxomab, Edrecolomab) Anti-VEGF-A (Bevacizumab); Anti-CD20 (Rituximab, Tositumomab, Ibritumomab); Anti-CD52 (Alemtuzumab); y Anti-CD33 (Gemtuzumab). Patentes de EE.UU. nºs 5.776.427 y 7.601.355.

Los ejemplos de inhibidores de tirosina quinasa incluyen, pero sin limitación, los inhibidores de ErbB: HER1/EGFR (Erlotinib, Gefitinib, Lapatinib, Vandetanib, Sunitinib, Neratinib); HER2/neu (Lapatinib, Neratinib); RTK de clase III: C-kit (Axitinib, Sunitinib, Sorafenib), FLT3 (Lestaurtinib), PDGFR (Axitinib, Sunitinib, Sorafenib); y VEGFR (Vandetanib, Semaxanib, Cediranib, Axitinib, Sorafenib); bcr-abl (Imatinib, Nilotinib, Dasatinib); Src (Bosutinib) y Janus quinasa 2 (Lestaurtinib).

Los agentes quimioterápicos que se pueden unir a la presente nanopartícula pueden incluir además amsacrina, Trabectedina, retinoides (Alitretinoína, Tretinoína), trióxido de arsénico, agentes de disminución de asparagina (Asparaginasa/Pegaspargasa), Celecoxib, Demecolcina, Elesclomol, Elsamitrucina, Etoglucid, Lonidamina, Lucantona, Mitoguazona, Mitotano, Oblimersen, Temsirolimus, y Vorinostat.

Los ejemplos de agentes terapéuticos específicos que se pueden unir, ligar, o asociar a las nanopartículas fluorescentes de la invención son flomoxef; fortimicina(s); gentamicina(s); glucosulfona solasulfona; gramicidina S; gramicidina(s); grepafloxacino; guameciclina; hetacilina; isepamicina; josamicina; kanamicina(s); flomoxef; fortimicina(s); gentamicina(s); glucosulfona solasulfona; gramicidina S; gramicidina(s); grepafloxacino; guameciclina; hetacilina; isepamicina; josamicina; kanamicina(s); bacitracina; bambermicina(s); biapenem; brodimoprim; butirosina; capreomicina; carbenicilina; carbomicina; carumonam; cefadroxil; cefamandol; cefatrizina; cefbuperazona; cefclidina; cefdinir; cefditoren; cefepima; cefetamet; cefixima; cefinenoxima; cefininox; cladribina; apalcilina; apiciclina; apramicina; arbekacina; aspoxicilina; azidamfenicol; aztreonam; cefodizima; cefonicid; cefoperazona; ceforamida; cefotaxima; cefotetán; cefotiam; cefozopran; cefpimizol; cefpiramida; cefpiroma; cefprozil; cefroxadina; cefteram; ceftibuteno; cefuzonam; cefalexin; cefaloglicina; cefalosporina C; cefradina; cloranfenicol; clortetraciclina; clinafloxacino; clindamicina; clomociclina; colistina; ciclacilina; dapsona; demeclociclina; diatimosulfona; dibekacina; dihidroestreptomicina; 6-mercaptopurina; tioguanina; capecitabina; docetaxel; etopósido; gemcitabina; topotecán; vinorelbina; vincristina; vinblastina; tenipósido; melfalano; metotrexato; 2-p-sulfanilanilinoetanol; 4,4'-sulfinildianilina; ácido 4-sulfanilamidosalicílico; butorfanol; nalbufina. estreptozocina; doxorrubicina; daunorrubicina; plicamicina; idarrubicina; mitomicina C; pentostatina; mitoxantrona; citarabina; fosfato de fludarabina; butorfanol; nalbufina. estreptozocina; doxorrubicina; daunorrubicina; plicamicina; idarrubicina; mitomicina C; pentostatina; mitoxantrona; citarabina; fosfato de fludarabina; acediasulfona; acetosulfona; amikacina; anfotericina B; ampicilina; atorvastatina; enalapril; ranitidina; ciprofloxacino; pravastatina; claritromicina; ciclosporina; famotidina; leuprolida; aciclovir; paclitaxel; azitromicina; lamivudina; budesonida; albuterol; indinavir; metformina; alendronato; nizatidina; zidovudina; carboplatino; metoprolol; amoxicilina; diclofenac; lisinopril; ceftriaxona; captopril; salmeterol; xinafoato; imipenem; cilastatina; benazepril; cefaclor; ceftazidima; morfina; dopamina; bialamicol; fluvastatina; fenamidina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazina; acriflavina; cloroazodina; arsfenamina; amicarbilida; aminoquinurida; quinapril; oximorfona; buprenorfina; floxuridina; diritromicina; doxiciclina; enoxacina; enviomicina; epicilina; eritromicina; leucomicina(s); lincomicina; lomefloxacino; lucensomicina; limeciclina; meclociclina; meropenem; metaciclina; micronomicina; midecamicina(s); minociclina; moxalactama; mupirocina; nadifloxacino; natamicina; neomicina; netilmicina; norfloxacino; oleandomicina; oxitetraciclina; p-sulfanililbencilamina; panipenem; paromomicina; pazufloxacino; penicilina N; pipaciclina; ácido pipemídico; polimixina; primicina; quinacilina; ribostamicina; rifamida; rifampina; rifamicina SV; rifapentina; rifaximina; ristocetina; ritipenem; rokitamicina; rolitetraciclina; rosaramicina; roxitromicina; salazosulfadimidina; sanciclina; sisomicina; esparfloxacino; espectinomicina; espiramicina; estreptomicina; succisulfona; sulfacrisoidina; ácido sulfalóxico; sulfamidocrisoidina; ácido sulfanílico; sulfoxona; teicoplanina; temafloxacino; temocilina; tetroxoprim; tianfenicol; tiazolsulfona; tiostreptona; ticarcilina; tigemonam;

tobramicina; tosufloxacino; trimetoprim; trospectomicina; trovafloxacino; tuberactinomicina; vancomicina; azaserina; candicidina(s); clorfenesina; dermostatina(s); filipina; fungicromina; mepartricina; nistatina; oligomicina(s); perimicina A; tubercidina; 6-azauridina; 6-diazo-5-oxo-L-norleucina; aclacinomicina(s); ancitabina; antramicina; azacitadina; azaserina; bleomicina(s); biscumacetato de etilo; etiliden dicumarol; iloprost; lamifiban; taprosteno; tioclomarol; tirofibán; amiprilosa; bucilamina; gusperimus; ácido gentísico; glucametacina; salicilato de glicol; ácido meclofenámico; ácido mefenámico; mesalamina; ácido niflúmico; olsalazina; oxaceprol; S-enosilmetionina; ácido salicílico; salsalato; sulfasalazina; ácido tolfenámico; carubicina; carzinofilina A; clorozotocina; cromomicina(s); denopterina; doxifluridina; edatrexato; eflornitina; eliptinio; enocitabina; epirrubicina; manomustina; menogaril; mitobronitol; mitolactol; mopidamol; ácido micofenólico; nogalamicina; olivomicina(s); peplomicina; pirarrubicina; piritrexim; prednimustina; procarbazina; pteropterina; puromicina; ranimustina; estreptonigrina; tiamiprina; ácido micofenólico; procodazol; romurtida; sirolimus (rapamicina); tacrolimus; butetamina; fenalcomina; hidroxitetracaína; naepaína; ortocaína; piridocaína; alcohol salicílico; ácido 3-amino-4-hidroxibutírico; aceclofenac; alminoprofeno; amfenac; bromfenac; bromosaligenina; bumadizona; carprofeno; diclofenac; diflunisal; ditazol; ácido enfenámico; etodolac; etofenamato; fendosal; fepradinol; ácido flufenámico; Tomudex® (ácido N-[[5-[[(1,4-dihidro-2-metil-4-oxo-6-quinazolinil)metil]metilamino]-2-tienil]carbonil]-L-glutámico), trimetrexato, tubercidina, ubenimex, vindesina, zorrubicina; argatroban; cumetarol o dicumarol.

Se pueden hallar listas de agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, en: Physicians' Desk Reference, 55ª ed., 2001, Medical Economics Company, Inc., Montvale, N.J.; USPN Dictionary of USAN and International Drug Names, 2000, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md.; y The Merck Index, 12ª ed., 1996, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, N.J.

El agente terapéutico también puede incluir radionúclidos cuando la presente nanopartícula se usa en la radioterapia selectiva. En una realización, se asocian radionúclidos emisores beta de baja energía, tales como construcciones con quelatos de ^{177}Lu, con la nanopartícula y se usan para tratar masas tumorales relativamente pequeñas o una enfermedad micrometastásica. En otra realización, se pueden usar emisores beta de mayor energía, tales como itrio-90 (^{90}Y), para tratar masas tumorales mayores. También se puede usar yodo-131 (^{131}I) para la radioterapia.

La superficie de la nanopartícula se puede modificar para que incorpore al menos un grupo funcional. El polímero orgánico (p.ej., PEG) unido a la nanopartícula se puede modificar para que incorpore al menos un grupo funcional. Por ejemplo, el grupo funcional puede ser una maleimida o éster de *N*-hidroxisuccinimida (NHS). La incorporación del grupo funcional hace posible unir diversos ligandos, agentes de contraste y/o agentes terapéuticos a la nanopartícula.

En una realización, se une un agente terapéutico a la nanopartícula (a la superficie o al revestimiento de polímero orgánico) por medio de un grupo funcional de éster de NHS. Por ejemplo, se puede acoplar un inhibidor de tirosina quinasa, tal como dasatinib (BMS), o un agente quimioterápico (p.ej., taxol), por medio de un enlace éster a la nanopartícula. Este enlace éster se puede escindir después en un medio ácido o enzimáticamente *in vivo*. Se puede usar esta aproximación para administrar un profármaco a un sujeto, en el que el fármaco se libera de la partícula *in vivo*.

Se ha ensayado la aproximación con profármaco acoplando el inhibidor de molécula pequeña dasatinib con las moléculas de PEG de la nanopartícula. Basándose en los resultados de la biodistribución y los cálculos de dosificación del fármaco en humanos, se ha descubierto que la nanopartícula tiene propiedades biológicas únicas, que incluyen un aclaramiento relativamente rápido de la sangre en comparación con los tumores, y la posterior acumulación en el tejido tumoral del agente terapéutico, lo que sugiere que es viable una aproximación con profármaco. La nanopartícula funcionalizada permite que los fármacos se dosifiquen múltiples veces, lo que asegura que la concentración de fármaco en el tumor sea mayor que la especificada por la CI-50 en el tejido tumoral, y todavía no sea limitante de la dosis para otros tejidos de órganos, tales como el corazón, hígado o riñón. El agente terapéutico y la nanopartícula se pueden radiomarcar o marcar ópticamente por separado, lo que permite la monitorización independiente del agente terapéutico y la nanopartícula. En una realización, se acopla dasatinib radiofluorado (es decir, ^{18}F) con restos de PEG-3400 unidos a la nanopartícula por medio de uniones éster de NHS. El radioflúor es crucial para poder monitorizar independientemente los cambios dependientes del tiempo en la distribución y la liberación del fármaco de la nanopartícula fluorescente (Cy5) radioyodada (^{124}I). De esta manera, se puede monitorizar por separado el profármaco (dasatinib) y la nanopartícula. Esto permite la optimización del diseño del profármaco en comparación con los métodos de la técnica anterior, en los que no se usa una aproximación de doble marcaje. En otra realización, las moléculas de yodo radioterapéuticas (es decir, I-131), u otros emisores gamma o alfa terapéuticos, se conjugan con PEG por medio de un grupo funcional maleimida, en el que el agente terapéutico no se puede disociar del PEG *in vivo*.

Para que la presente nanopartícula acomode fácilmente una gran variedad de ligandos, agentes de contraste o quelatos, se puede modificar la superficie de la nanopartícula para que incorpore un grupo funcional. La nanopartícula también se puede modificar con polímeros orgánicos (p.ej., PEGs) o quelatos que pueden incorporar un grupo funcional. Mientras tanto, el ligando, agente de contraste o agente terapéutico se modifica para que incorpore un grupo funcional que sea capaz de reaccionar con el grupo funcional sobre la nanopartícula, o sobre los PEGs o agentes quelantes unidos a la nanopartícula en condiciones adecuadas. Por lo tanto, cualquier ligando, agente de contraste o agente terapéutico que tenga el grupo funcional reactivo es capaz de conjugarse fácilmente a

la nanopartícula. Esta aproximación generalizable se denomina en la presente memoria "química click", que permitiría una gran versatilidad en la exploración de aplicaciones multimodales. Cualquier mecanismo de reacción adecuado en la presente invención se puede adaptar a la "química click", con tal de que se pueda conseguir una unión simple y controlada del ligando, agente de contraste o quelato a la nanopartícula. En una realización, se introduce un enlace triple libre en PEG, que ya está conjugado de manera covalente a la cubierta de la nanopartícula. Mientras tanto, se introduce un enlace azida en el ligando deseado (o agente de contraste, quelato). Cuando la nanopartícula PEGilada y el ligando (o agente de contraste, quelato) se mezclan en presencia de un catalizador de cobre, se dará la cicloadición de la azida al enlace triple, lo que da como resultado la conjugación del ligando a la nanopartícula. En una segunda realización, se puede introducir un grupo funcional de maleimida y un grupo tiol en la nanopartícula y el ligando deseado (o agente de contraste, quelato), en donde la nanopartícula tiene el grupo funcional de maleimida, y el ligando (o agente de contraste, quelato) tiene el grupo tiol, o viceversa. El enlace doble de maleimida reacciona fácilmente con el grupo tiol para formar un enlace carbono-azufre estable. En una tercera realización, se puede introducir un grupo funcional de éster activado, p.ej., un grupo éster de succinimidilo, y un grupo amina en la nanopartícula y el ligando deseado, agente de contraste o quelato. El grupo éster activado reacciona fácilmente con el grupo amina para formar un enlace amida estable carbono-nitrógeno.

Tras la administración de la presente nanopartícula a un sujeto, la semivida de la permanencia en la sangre de las nanopartículas puede oscilar de alrededor de 2 horas a alrededor de 25 horas, de alrededor de 3 horas a alrededor de 20 horas, de alrededor de 3 horas a alrededor de 15 horas, de alrededor de 4 horas a alrededor de 10 horas, o de alrededor de 5 horas a alrededor de 6 horas. Una semivida más larga de permanencia en la sangre significa una circulación más larga, que permite que se acumulen más nanopartículas en el sitio objetivo *in vivo*. La semivida de permanencia en la sangre se puede determinar como sigue. Las nanopartículas se administran primero a un sujeto (p.ej., un ratón, un minicerdo o un ser humano). En diversos momentos tras la administración, se toman muestras de sangre para medir las concentraciones de nanopartículas por medio de métodos adecuados.

Tras la administración de la presente nanopartícula a un sujeto, la semivida de permanencia en el tumor de las presentes nanopartículas puede oscilar de alrededor de 5 horas a alrededor de 5 días, de alrededor de 10 horas a alrededor de 4 días, de alrededor de 15 horas a alrededor de 3,5 días, de alrededor de 20 horas a alrededor de 3 días, de alrededor de 2,5 días a alrededor de 3,1 días, de alrededor de 1 día a 3 días, o alrededor de 73,5 horas.

La proporción de la semivida de permanencia en el tumor respecto de la semivida de permanencia en la sangre de la nanopartícula puede oscilar de alrededor de 2 a alrededor de 30, de alrededor de 3 a alrededor de 20, de alrededor de 4 a alrededor de 15, de alrededor de 4 a alrededor de 10, de alrededor de 10 a alrededor de 15, o alrededor de 13.

En una realización, para estimar los valores de semivida de permanencia (o aclaramiento) de las nanopartículas radiomarcadas ($T_{1/2}$) en la sangre, el tumor, y otros órganos/tejidos importantes, se mide el porcentaje de los valores de la dosis inyectada por gramo (%DI/g) sacrificando grupos de ratones en momentos especificados tras la administración de las nanopartículas. Se recogen la sangre, el tumor, y los órganos, se pesan, y se cuentan en un contador γ de centelleo. Los valores de %DI/g se corrigen respecto de la desintegración radiactiva en el momento de la inyección. Los datos de tiempo-concentración de actividad resultantes para cada tejido se ajustan a una función monoexponencial decreciente para estimar los valores de $T_{1/2}$ del tejido/órgano.

Tras la administración de la presente nanopartícula a un sujeto, el aclaramiento renal de las presentes nanopartículas puede oscilar de alrededor del 10% de DI (dosis inicial) a alrededor del 100% de DI en alrededor de 24 horas, de alrededor del 20% de DI a alrededor del 90% de DI en alrededor de 24 horas, de alrededor del 30% de DI a alrededor del 80% de DI en alrededor de 24 horas, de alrededor del 40% de DI a alrededor del 70% de DI en alrededor de 24 horas, de alrededor del 40% de DI a alrededor del 60% de DI en alrededor de 24 horas, de alrededor del 40% de DI a alrededor del 50% de DI en alrededor de 24 horas, o alrededor del 43% de DI en alrededor de 24 horas. El aclaramiento renal se puede determinar como sigue. Las nanopartículas se administran primero a un sujeto (p.ej., un ratón, un minicerdo o un ser humano). En diversos momentos tras la administración, se toman muestras de orina para medir las concentraciones de nanopartículas por medio de métodos adecuados.

En una realización, se ensaya el aclaramiento renal (p.ej., la fracción de nanopartículas excretadas en la orina a lo largo del tiempo) como sigue. A un sujeto se le administran las presentes nanopartículas, y se recogen muestras de orina a lo largo de un cierto periodo de tiempo (p.ej., 168 horas). Las concentraciones de partículas en cada punto de tiempo se determinan mediante el uso de análisis fluorimétricos, y se genera una curva de calibración de diluciones en serie a partir de medidas de señales de fluorescencia con corrección del fondo de las muestras de orina mezcladas con concentraciones conocidas de partículas (%DI). Los valores de concentración, junto con las estimaciones de los volúmenes medios diarios de orina de los ratones, se usan para calcular la %DI/g de orina acumulativa excretada. En otra realización, se ensaya el aclaramiento renal de las nanopartículas radiomarcadas midiendo las actividades en muestras de orina (cuentas por minuto) a lo largo de intervalos de tiempo similares mediante el uso, por ejemplo, de un contador γ, y tras la administración de las nanopartículas para calcular la excreción acumulativa en orina.

En una tercera realización, para determinar la excreción fecal acumulativa, se recogen las heces en jaulas metabólicas a lo largo de intervalos de tiempo similares tras la administración de las nanopartículas y se determinan

las actividades de las muestras mediante el uso de un contador γ.

Cuando las nanopartículas se administran a un sujeto en una cantidad de alrededor de 100 veces la dosis humana equivalente, no se observa sustancialmente anemia, pérdida de peso, agitación, respiración incrementada, alteración GI, comportamiento anormal, disfunción neurológica, anormalidades hematológicas, anormalidades bioquímicas, lesiones relacionadas con fármacos en la patología de órganos, mortalidad, o una combinación de las mismas, en alrededor de 10 a alrededor de 14 días.

Cuando la presente nanopartícula contiene al menos un ligando unido, el aumento de la multivalencia de la nanopartícula (p.ej., en comparación con el ligando solo) puede oscilar de alrededor de 1,5 veces a alrededor de 10 veces, de alrededor de 2 veces a alrededor de 8 veces, de alrededor de 2 veces a alrededor de 6 veces, de alrededor de 2 veces a alrededor de 4 veces, o alrededor de 2 veces.

Las nanopartículas de la presente invención muestran parámetros fisicoquímicos y biológicos *in vitro* e *in vivo* inesperados, a la vista de la técnica anterior. Por ejemplo, la semivida de permanencia en la sangre estimada para las nanopartículas unidas a ligando (p.ej., alrededor de 5,5 hrs para las nanopartículas unidas a cRGD) es sustancialmente más larga que la del ligando correspondiente (p.ej., alrededor de 13 minutos para cRGD). Montet et al. Multivalent effects of RGD peptides obtained by nanoparticle display. J Med Chem. 49, 6087-6093 (2006). Las semividas prolongadas de permanencia en la sangre pueden aumentar la biodisponibilidad de una sonda, facilitar la selección como objetivo de tumores, y proporcionar una mayor absorción en el tumor a lo largo de periodos de tiempo más largos. En una realización, la semivida de permanencia en el tumor para las nanopartículas selectivas (es decir, nanopartículas unidas a ligando) es alrededor de 13 veces mayor que la semivida de permanencia en la sangre, mientras la semivida de permanencia en el tumor para las nanopartículas no selectivas (es decir, las nanopartículas correspondientes sin unir a ligandos) es solamente alrededor de 5 veces mayor que la semivida de permanencia en la sangre. Esta diferencia sugiere una acumulación en el tejido tumoral sustancialmente mayor de las nanopartículas selectivas en comparación con las nanopartículas no selectivas. En ciertas realizaciones, dado el número de ligandos unidos a la nanopartícula, las presentes nanopartículas muestran una unión de afinidad elevada inesperada (p.ej., K_d 0,51 nM y CI_{50} 1,2 nM para la nanopartícula unida a cRGD), un aumento de la multivalencia (p.ej., un aumento de más de 2 veces para las nanopartículas unidas a cRGD en comparación con el péptido cRGD solo), una absorción tumoral diferencial significativa (p.ej., las nanopartículas con PEG unidas a cRGD muestran un incremento de alrededor de 3 a 4 veces en la absorción tumoral diferencial respecto de las nanopartículas revestidas con PEG a lo largo de 72 hrs tras la administración), y un contraste tumoral significativo respecto del músculo normal (p.ej., alrededor de 3 a 5 veces a lo largo de 72 hrs tras la administración) basándose en las proporciones de absorción en el tumor respecto del músculo.

En una realización, se descubrieron incrementos de la concentración de actividad del triple para las nanopartículas unidas a ligando en tumores que expresaban integrina respecto de los controles (p.ej., nanopartículas unidas a ligando en tumores que no expresaban integrina, o las nanopartículas correspondientes no unidas a ligandos en tumores que expresaban integrina) en el momento de la absorción tumoral máxima (alrededor de 4 hrs tras la inyección de las nanopartículas). Además, las proporciones de absorción en el tumor respecto del músculo para las nanopartículas selectivas (es decir, nanopartículas unidas a ligando) reveló un contraste del tejido tumoral incrementado respecto del músculo normal, en comparación con el contraste del tejido tumoral disminuido respecto del músculo normal para las nanopartículas no selectivas (es decir, las nanopartículas correspondientes no unidas a ligandos), lo que sugiere que las nanopartículas selectivas lo son hacia el tumor.

En otra realización, tanto las nanopartículas selectivas como las no selectivas muestran una excreción renal eficaz a lo largo del mismo periodo de tiempo. Prácticamente la mitad de la dosis inyectada se excreta a lo largo de las primeras 24 hrs tras la inyección, y alrededor del 72% en 96 hrs, lo que sugiere que la mayor parte de la excreción se dio en el primer día tras la inyección. En contraste, los perfiles de excreción fecal de las nanopartículas selectivas indican que, de media, se elimina un 7% y 15% de la dosis inyectada a lo largo de 24 y 96 hrs, respectivamente.

Los parámetros fisicoquímicos y biológicos de las nanopartículas atóxicas, junto con su capacidad de imagenología multimodal (p.ej., imagenología de PET y óptica), amplían el alcance de sus aplicaciones biomédicas potenciales. Las aplicaciones incluyen (a) la monitorización a largo plazo: el tiempo prolongado en la circulación sanguínea y la biodisponibilidad correspondiente de las nanopartículas resaltan su versatilidad para la monitorización temprana y a largo plazo de diversas etapas del tratamiento de enfermedades (tales como el cribado de diagnóstico, la evaluación antes del tratamiento, la intervención terapéutica, y la monitorización tras el tratamiento) sin las limitaciones impuestas por las consideraciones sobre la toxicidad; (b) una penetración tumoral mejorada: las propiedades de aclaramiento de las nanopartículas selectivas (p.ej., su aclaramiento renal es más lento que el de las sondas moleculares de la técnica anterior) serán útiles para diversos tipos de aplicaciones biológicas. Por ejemplo, las nanopartículas serían especialmente útiles en casos de tumores sólidos escasamente vascularizados y relativamente inaccesibles en los que la localización de los agentes en general es lenta tras la administración sistémica; (c) capacidad de imagenología multimodal: estas modalidades se pueden combinar en múltiples escalas (es decir, a nivel de cuerpo completo hasta nivel celular) para conseguir información biológica sensible a la profundidad y complementaria. Por ejemplo, en la cartografía de NLC, se pueden cartografiar los nódulos profundos mediante PET con respecto a su distribución y número, mientras se puede obtener una localización más precisa y detallada de los nódulos superficiales mediante la imagenología de fluorescencia; y (d) agentes terapéuticos

selectivos: se puede aprovechar el aclaramiento más largo de las nanopartículas selectivas del tumor en comparación con las de la sangre para aplicaciones diagnósticas/terapéuticas combinadas, en las que las nanopartículas pueden servir como vehículo de administración de agentes radioterapéuticos o fármacos.

También se describe una composición farmacéutica que comprende la presente nanopartícula. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de manera oral como una forma farmacéutica unitaria adecuada. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar en muchas formas, que incluyen los comprimidos, cápsulas de gelatina dura o blanda, soluciones acuosas, suspensiones, y liposomas y otras formulaciones de liberación lenta, tales como geles poliméricos moldeados.

Los modos adecuados de administración para la presente nanopartícula o composición incluyen, pero sin limitación, la administración oral, intravenosa, rectal, sublingual, mucosa, nasal, oftálmica, subcutánea, intramuscular, transdérmica, raquídea, intratecal, intraarticular, intraarterial, subaracnoidea, bronquial, y linfática, y otras formas farmacéuticas para la administración sistémica de ingredientes activos. La presente composición farmacéutica se puede administrar mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, sin limitación, la administración transdérmica (pasiva por medio de un parche, gel, crema, pomada o iontoforesis); intravenosa (inyección rápida, infusión); subcutánea (infusión, liberación lenta); transmucosa (bucal y sublingual, p.ej., comprimidos orodispersables, obleas, películas, y formulaciones efervescentes; conjuntiva (gotas oculares); rectal (supositorio, enema)); o intradérmica (inyección rápida, infusión, liberación lenta). La composición se puede administrar de manera tópica.

Las composiciones farmacéuticas líquidas orales pueden estar en forma, por ejemplo, de suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o se pueden presentar en forma de un producto seco para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales composiciones farmacéuticas líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), o conservantes.

Las composiciones farmacéuticas de nanopartículas se pueden formular también para la administración parenteral (p.ej., mediante inyección, por ejemplo, inyección rápida o infusión continua), y se pueden presentar en una forma farmacéutica unitaria en ampollas, jeringas prerrellenas, recipientes de infusión de pequeño volumen o recipientes multidosis con un conservante añadido. Las composiciones farmacéuticas pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. De manera alternativa, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en forma de polvo, obtenido mediante el aislamiento aséptico de un sólido estéril o mediante la liofilización de una disolución, para la reconstitución con un vehículo adecuado, p.ej., agua estéril, apirógena, antes del uso.

Para la administración tópica en la epidermis, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en forma de pomadas, cremas o lociones, o como el ingrediente activo de un parche transdérmico. Los sistemas adecuados de administración transdérmica se describen, por ejemplo, en A. Fisher et al. (pat. de EE.UU. nº 4.788.603), o R. Bawa et al. (pat. de EE.UU. nºs 4.931.279; 4.668.506; y 4.713.224). Las pomadas y las cremas se pueden formular, por ejemplo, con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Las lociones se pueden formular con una base acuosa u oleosa y, en general, también contendrán uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes de dispersión, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes colorantes. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar también por medio de ionoforesis, p.ej., como se describió en las pat. de EE.UU. nºs 4.140.122; 4.383.529; o 4.051.842.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen formas farmacéuticas unitarias tales como pastillas que comprenden una composición farmacéutica de la invención en una base con sabor, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden la composición farmacéutica en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; geles mucoadherentes, y colutorios que comprenden la composición farmacéutica en un vehículo líquido adecuado.

Para la administración tópica en el ojo, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en forma de gotas, geles (S. Chrai et al., pat. de EE.UU. nº 4.255.415), gomas (S. L. Lin et al., pat. de EE.UU. nº 4.136.177), o por medio de un inserto ocular de liberación prolongada (A. S. Michaels, pat. de EE.UU. nº 3.867.519 y H. M. Haddad et al., pat. de EE.UU. nº 3.870.791).

Cuando se desee, las composiciones farmacéuticas anteriormente descritas se pueden adaptar para proporcionar la liberación sostenida de un compuesto terapéutico empleado, p.ej., mediante la combinación con ciertas matrices de polímeros hidrófilos, p.ej., que comprenden geles naturales, geles de polímeros sintéticos o mezclas de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración rectal en las que el vehículo es un sólido se presentan más preferiblemente en forma de supositorios de dosis unitarias. Los vehículos adecuados incluyen manteca de cacao y otros materiales usados habitualmente en la técnica, y los supositorios se pueden formar de manera conveniente mezclando la composición farmacéutica con el/los vehículo(s) ablandado(s) o fundido(s), seguido de enfriamiento y moldeo.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración vaginal se pueden presentar en forma de óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o aerosoles que contienen, además de las nanopartículas y el agente terapéutico, vehículos que se conocen bien en la técnica.

Para la administración mediante inhalación, las composiciones farmacéuticas según la invención se administran de manera conveniente desde un insuflador, nebulizador o un envase presurizado u otro medio adecuado para administrar un aerosol. Los envases presurizados pueden comprender un propelente adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis se puede determinar proporcionando una válvula para liberar una cantidad medida.

De manera alternativa, para la administración mediante inhalación o insuflación, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden tomar la forma de una composición de polvos secos, por ejemplo, una mezcla de polvos de la composición farmacéutica y de una base adecuada en polvo, tal como lactosa o almidón. La composición de polvos se puede presentar en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en cápsulas o cartuchos o, p.ej., envases de gelatina o de tipo blíster desde los que se puede administrar el polvo con la ayuda de un inhalador o insuflador.

Para la administración intranasal, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar por medio de un aerosol líquido, tal como por medio de un atomizador de botella de plástico. Los típicos son Mistometer® (inhalador de isoproterenol - Wintrop) y el Medihaler® (inhalador de isoproterenol - Riker).

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener además otros adyuvantes, tales como aromatizantes, colorantes, agentes antimicrobianos, o conservantes.

Se apreciará además que la cantidad necesaria de las composiciones farmacéuticas para el uso en el tratamiento variará no solamente con el agente terapéutico seleccionado, sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección a tratar y la edad y estado del paciente, y finalmente estará bajo el criterio del médico o clínico que aplica el tratamiento. Para estudios de estos factores, véase J. F. Brien et al., Europ. J. Clin. Pharmacol., 14, 133 (1978); y Physicians' Desk Reference, Charles E. Baker, Jr., Pub., Medical Economics Co., Oradell, N.J. (41ª ed., 1987). En general, las dosis del agente terapéutico cuando se usa en combinación con las nanopartículas fluorescentes de la presente invención pueden ser inferiores a cuando el agente terapéutico se administra solo o en formas farmacéuticas convencionales. La elevada especificidad de la nanopartícula fluorescente hacia un sitio objetivo, tal como un receptor situado en la superficie de una célula, puede proporcionar una concentración relativamente muy localizada de un agente terapéutico, o, de manera alternativa, una liberación sostenida de un agente terapéutico a lo largo de un periodo de tiempo prolongado.

Las presentes nanopartículas o composiciones se pueden administrar a un sujeto. El sujeto puede ser un mamífero, preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales murinos, ratas, conejos, simios, bovinos, ovinos, cerdos, caninos, felinos, animales de granja, animales de competición, mascotas, equinos, y primates.

La presente invención proporciona además un método para detectar un componente de una célula que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la célula con una nanopartícula fluorescente basada en sílice que comprende un núcleo basado en sílice que comprende un compuesto fluorescente colocado dentro del núcleo basado en sílice; una cubierta de sílice que rodea al menos una porción del núcleo; un polímero orgánico unido a la nanopartícula; de alrededor de 1 a alrededor de 20 ligandos unidos a la nanopartícula; y un agente de contraste o un quelato unido a la nanopartícula; y (b) monitorizar la unión de la nanopartícula a la célula o a un componente celular (y/o su absorción intracelular potencial) mediante al menos una técnica de imagenología. La técnica de imagenología puede ser la imagenología de PET, SPECT, CT, MRI, óptica, bioluminiscencia o fluorescencia, y combinaciones de las mismas.

La localización del componente celular se puede detectar y determinar dentro de una célula completa metabólicamente activa, en un lisado de células completas, en una célula permeabilizada, en una célula fijada, o con un componente celular parcialmente purificado en un medio sin células. La cantidad y la duración de la puesta en contacto puede depender, por ejemplo, de los objetivos diagnósticos o terapéuticos del método de tratamiento, tal como la detección fluorescente de los intermedios de una ruta de señalización estimulada (es decir, Akt, NF-κB), estados patológicos o afecciones, la administración de un agente terapéutico, o ambos. La cantidad y la duración de la puesta en contacto también pueden depender de la concentración relativa de la nanopartícula fluorescente respecto del analito objetivo, y del estado de la célula para el tratamiento.

La presente invención proporciona además un método para la selección como objetivo de una célula tumoral que comprende administrar a un paciente de cáncer una cantidad eficaz de una nanopartícula fluorescente basada en sílice que comprende un núcleo basado en sílice que comprende un compuesto fluorescente colocado dentro del núcleo basado en sílice; una cubierta de sílice que rodea al menos una porción del núcleo; un polímero orgánico unido a la nanopartícula; un ligando unido a la nanopartícula y capaz de unirse a un marcador tumoral; y al menos un agente terapéutico. La nanopartícula puede estar radiomarcada. La nanopartícula se puede administrar al paciente, pero sin limitación, mediante las siguientes vías: oral, intravenosa, nasal, subcutánea, local, intramuscular o transdérmica.

En ciertas realizaciones, puede ser deseable usar una mezcla de dos o más tipos de nanopartículas fluorescentes que tengan propiedades diferentes, tales como compuestos fluorescentes diferentes, ligandos, revestimientos de polímeros orgánicos, agentes de contraste, o agentes terapéuticos para aprovechar los beneficios de seleccionar como objetivo diferentes componentes de una célula tumoral o diferentes poblaciones de las células tumorales, por ejemplo, de manera simultánea o secuencial.

Los métodos y composiciones de la invención se pueden usar para ayudar a un médico o cirujano a identificar y caracterizar áreas de enfermedad, tales como cánceres y procesos inflamatorios/infecciosos, que incluyen, pero sin limitación, cánceres de la piel (melanoma), cabeza y cuello, próstata, cerebro, e intestino, para distinguir el tejido enfermo y el normal, tal como para detectar los márgenes tumorales que son difíciles de detectar mediante el uso de un microscopio operatorio habitual, p.ej., en cirugía del cerebro, para ayudar a prescribir una intervención terapéutica o quirúrgica, p.ej., determinando si una lesión es cancerosa y si se debería eliminar o si no es cancerosa y se debería dejar, o en la estadificación quirúrgica de una enfermedad, p.ej., estadificación intraoperatoria de nódulos linfáticos, cartografía de nódulos linfáticos centinela (NLC), p.ej., procedimientos de conservación de nervios para preservar las estructuras neuronales vitales (nervios intraparotídeos).

Los métodos y composiciones de la invención se pueden usar en la detección de una enfermedad metastásica, monitorización de la respuesta a un tratamiento, cartografía/selección como objetivo de NLC, procedimientos de conservación de nervios, detección de una enfermedad residual, administración selectiva de agentes terapéuticos (plataforma diagnóstica/terapéutica combinada), administración local de nanopartículas no selectivas, que albergan fármacos (administración en catéter), agentes terapéuticos que atraviesan la barrera hematoencefálica, tratamiento de enfermedades inflamatorias/isquémicas (es decir, cerebro, corazón, tracto urinario, vejiga), tratamiento combinado y medición de una enfermedad (p.ej., medición ratiométrica del pH, medición de oxígeno), etc.

Los métodos y las composiciones de la invención también se pueden usar en la detección, caracterización y/o determinación de la localización de una enfermedad, especialmente una enfermedad precoz, la gravedad de una enfermedad o una afección asociada a la enfermedad, la estadificación de una enfermedad, y/o la monitorización de una enfermedad. La presencia, ausencia, o nivel de una señal emitida puede ser indicativa de un estado patológico. Los métodos y las composiciones de la invención también se pueden usar para monitorizar y/o guiar diversas intervenciones terapéuticas, tales como procedimientos quirúrgicos y basados en catéter, y en la monitorización de la terapia farmacológica, que incluye las terapias basadas en células. Los métodos de la invención también se pueden usar en el pronóstico de una enfermedad o afección. Las subpoblaciones celulares que se hallan dentro o en los márgenes de la localización de la enfermedad, tales como células similares a las células madre ("células madre cancerosas") y/o células inflamatorias/fagocíticas, se pueden identificar y caracterizar mediante el uso de los métodos y las composiciones de la invención. Con respecto a todo lo anterior, los ejemplos de tales enfermedades o afecciones que se pueden detectar o monitorizar (antes, durante o después de la terapia) incluyen el cáncer (por ejemplo, melanoma, cáncer tiroideo, colorrectal, ovárico, de pulmón, mama, próstata, cuello uterino, piel, cerebro, gastrointestinal, boca, riñón, esofágico, hueso), que se pueden usar para identificar los sujetos que tienen una susceptibilidad incrementada a desarrollar cáncer y/o neoplasias malignas, es decir, que están predispuestos a desarrollar cáncer y/o neoplasias malignas, inflamación (por ejemplo, afecciones inflamatorias inducidas por la presencia de lesiones cancerosas), enfermedad cardiovascular (por ejemplo, ateroesclerosis y afecciones inflamatorias de los vasos sanguíneos, isquemia, ictus, trombosis), enfermedad dermatológica (por ejemplo, sarcoma de Kaposi, psoriasis), enfermedad oftálmica (por ejemplo, degeneración macular, retinopatía diabética), enfermedad infecciosa (por ejemplo, infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias, que incluyen el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida), enfermedad inmunológica (por ejemplo, un trastorno autoinmunitario, linfoma, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes mellitus), enfermedad del sistema nervioso central (por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa, tal como enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer), enfermedades hereditarias, enfermedades metabólicas, enfermedades ambientales (por ejemplo, envenenamiento por plomo, mercurio y envenenamiento radiactivo, cáncer de piel), enfermedad relacionada con los huesos (por ejemplo, osteoporosis, tumores óseos primarios y metastásicos, osteoartritis) y una enfermedad neurodegenerativa.

Los métodos y composiciones de la invención, por lo tanto, se pueden usar, por ejemplo, para determinar la presencia y/o localización de un tumor y/o células similares a las células madre corresidentes ("células madre cancerosas"), la presencia y/o localización de células inflamatorias, que incluye la presencia de macrófagos activados, por ejemplo en las regiones peritumorales, la presencia y localización de una enfermedad vascular, que incluye áreas en riesgo de oclusión aguda (es decir, placas vulnerables) en las arterias coronarias y periféricas, regiones de aneurismas en expansión, placas inestables en arterias carótidas, y áreas isquémicas. Los métodos y composiciones de la invención también se pueden usar en la identificación y estudio de la muerte celular, lesión, apoptosis, necrosis, hipoxia y angiogénesis. Documento PCT/US2006/049222.

Los siguientes ejemplos se presentan con fines ilustrativos solamente, y no limitan la invención.

Ejemplo 1 Preparación y caracterización de nanopartículas revestidas de PEG

Se sintetizaron nanopartículas que contenían un colorante emisor en IRC (Cy-5) y se funcionalizaron mediante PEGilación según protocolos bien establecidos como se describió en el documento PCT/US2008/074894 y Stober et al. Controlled growth of monodispersed silica spheres in the micron size range. Colloid Interface Sci. 1968; 26:62-69.

Ohnishi et al. J. Mol. Imaging 2005, 4:172-181. Se hizo reaccionar Cy5-maleimida con un compuesto de organosilano co-reactivo, (3-Mercaptopropil)trometoxisilano para formar un precursor de sílice fluorescente. Este precursor de sílice fluorescente se co-condensó con ortosilicato de tetraetilo para formar un núcleo basado en sílice fluorescente. Se añadió un compuesto de PEG-silano, con cadenas de poli(etilen glicol) (PEG, ~0,5 kDa) terminadas en metoxi, Metoxi(Polietilenoxi)Propil]-Trimetoxisilano, al núcleo basado en sílice fluorescente para formar un revestimiento de PEG sobre el núcleo. Las nanopartículas revestidas de PEG se dializaron con solución salina fisiológica (NaCl 0,15 M en H_2O) a través de membranas de diálisis 3500 MWCO Snakeskin y se filtraron de manera estéril. Todas las muestras se hicieron coincidir en la densidad óptica a su longitud de onda de absorción máxima (640 nm) antes de la inyección. Se realizaron medidas del tamaño hidrodinámico mediante dispersión dinámica de luz (DLS) y espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS). Brevemente, las partículas dializadas con agua se midieron en un sistema Brookhaven Instruments Company 200SM Static/DLS mediante el uso de un láser de HeNe (λ = 632,8 nm). Debido al solapamiento de la absorción del colorante con la fuente de excitación, se usaron tiempos de integración de 15 min para conseguir proporciones aceptables señal-ruido. Para FCS, las partículas se dializaron con agua, se diluyeron en NaCl 0,15 M, y se midieron en un instrumento Zeiss LSM 510 Confocor 2 FCS (excitación con HeNe a 633 nm). El instrumento se calibró por tamaño antes de todas las medidas. La comparación del brillo relativo de las nanopartículas PEGiladas con el colorante libre se determinó a partir de curvas de FCS, medido como la proporción de cuentas por molécula/partícula.

Ejemplo 2 Aclaramiento renal de las nanopartículas revestidas de PEG

Se sintetizaron nanopartículas de sílice núcleo-cubierta fluorescentes, que tenían un radio hidrodinámico de alrededor de 3 nm. Se descubrió que estas nanopartículas estaban en el intervalo de 6-10 nm de diámetro, tal como se muestra mediante los resultados de dispersión dinámica de luz (DLS) (Figura 1a). La imagenología de fluorescencia en IRC de cuerpo completo *in vivo* de nanopartículas de sílice desnudas (sin revestimiento de PEG), del orden de 6 nm y 3,3 nm, en ratones atímicos mostró un aclaramiento renal considerable 45 min tras la inyección, con una acumulación significativa restante en el hígado (Figura 1b). La excreción final a la circulación enterohepática se dio durante las siguientes 24 h. Basándose en estos resultados, las partículas se revistieron de manera covalente con cadenas de poli(etilen glicol) (PEG, ~0,5 kDa) terminadas en metoxi, según los protocolos del documento PCT/US2008/074894, para prevenir la opsonización y aumentar adicionalmente el aclaramiento de las partículas mientras se mantiene un tamaño hidrodinámico pequeño. Este tratamiento disminuyó la retención en el hígado y dio como resultado una filtración renal incrementada en la vejiga 45 min tras la inyección mediante la imagenología de fluorescencia en IRC (Figura 1c), con una fluorescencia en la vejiga visible a las 24 h. Las sondas se toleraron bien, sin efectos adversos o muertes de animales observadas a lo largo del desarrollo del estudio. La imagenología de PET-CT co-registrada en serie 24 hr tras la inyección de nanopartículas revestidas de PEG marcadas con ^{124}I (Figura 1d, fila superior) demostró una pequeña cantidad de actividad residual en la vejiga, así como una actividad superpuesta en el hígado/tracto gastrointestinal (centro), flanqueada por barridos de microCT y microPET adquiridos independientemente. Las imágenes de microPET en serie confirmaron los hallazgos de la imagenología de fluorescencia en IRC. Se descubrió que la semivida de la permanencia en la sangre de las nanopartículas PEGiladas marcadas con ^{124}I basándose en los cambios dependientes del tiempo de la actividad en la sangre a lo largo de un periodo de 96 horas fue de 7,3 horas. Para las nanopartículas unidas a RGD, marcadas con ^{124}I, se descubrió que la semivida de permanencia en la sangre fue de 5,6 horas.

Basándose en estos datos *in vivo*, se emprendió un estudio más detallado sobre la biodistribución y el aclaramiento de las nanopartículas revestidas con los dos grupos de partículas PEGiladas que contenían Cy5 para analizar el efecto del tamaño de las sondas sobre la biodistribución. Se generaron nanopartículas con diámetros hidrodinámicos de 3,3 ± 0,06 y 6,0 ± 0,1 nm, tal como se midió mediante espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS), (Figura 2a). Antes de los estudios *in vivo*, se investigaron las propiedades fotofísicas de las partículas para establecer sus niveles de rendimiento frente al colorante libre. A pesar del tamaño de partícula extremadamente pequeño, las moléculas de colorante encapsuladas en sílice exhibieron mejoras fotofísicas respecto del colorante libre que aumentaron con el tamaño de las partículas, lo que incluye incrementos significativos del brillo, tal como se determinó mediante la espectroscopía de absorción y emisión (Figura 2b) y FCS (Figura 2c). En comparación con el colorante libre, las nanopartículas de 3,3 y 6,0 nm de diámetro exhibieron incrementos del doble y triple en la semivida de fotoblanqueo, respectivamente, cuando se irradiaron con un láser de 635 nm de alta energía (Figura 2d). Así, se descubrió que estas sondas de nanopartículas son brillantes y más fotoestables que sus homólogos de colorante libre.

Además de la determinación semicuantitativa del comportamiento de las nanopartículas *in vivo* a partir de la imagenología de cuerpo completo, se llevó a cabo el análisis *ex vivo* de homogeneizados de tejidos y fluidos mediante el uso de un lector de placas de fluorescencia, lo que permitió la cuantificación calibrada de las variaciones observadas en la imagenología de fluorescencia en IRC. Las muestras se agruparon como fuentes "retenidas" (homogeneizados de hígado, riñón, pulmón, bazo, y sangre) y "excretadas" (orina) de fluorescencia de partículas, se corrigieron los valores de fondo y se convirtieron en un porcentaje de la dosis inicial (% DI) por animal basándose en las curvas de calibración. El análisis del tejido mostró una retención mínima de partículas en los órganos principales, y la mayoría de la fluorescencia se atribuyó a la sangre circulante (Figura 3a). La retención neta de partículas, calculada como la suma de los componentes "retenidos", se ajustó con una curva de disminución exponencial para determinar la cinética de la excreción (Figura 3b). Las partículas mayores exhibieron una semivida más larga en el tejido ($t_{1/2}$(3,3 nm) =190 min, $t_{1/2}$(6,0 nm) =350 min) y una retención inicial mayor en los órganos. Después de 48 h, la

partícula de 6 nm exhibió una retención mínima en el cuerpo (R_{total}(6,0 nm) =2,4±0,6% DI). Se usaron las muestras de orina recogidas en el momento del sacrificio, junto con los datos de calibración de diluciones en serie, para estimar el aclaramiento renal total basándose en una estimación conservativa del volumen medio de orina excretado por unidad de tiempo. Mediante este método, se estimó el %DI excretado a lo largo del tiempo para ambos tamaños de partículas (Figura 3c).

Ejemplo 3 Nanopartículas de sílice fluorescentes conjugadas con péptido de selección de integrina $\alpha_v\beta_3$ (modelo de melanoma)

Para sintetizar una nanopartícula multimodal con una afinidad elevada hacia el marcador tumoral de integrina $\alpha_v\beta_3$, se conjugó el hexapéptido lineal RGD (CGGRGD) a la nanopartícula por medio de una unión Cys-maleimida. Se inyectaron de manera subcutánea células C6 de glioma de rata a ratones macho atímicos en los flancos. A los ~0,5 cm de diámetro, se inyectaron IV nanopartículas de sílice desnudas o nanopartículas PEGiladas con RGD (~500 nm/kg) a los ratones. La Figura 4 muestra la biodistribución *in vivo* en ratones que no albergan tumores y en ratones que albergan tumores.

Se investigaron las características de unión *in vitro* de nanopartículas selectivas (unidas a RGD) y no selectivas (revestidas de PEG) hacia líneas celulares humanas de melanoma positivas para integrina-$\alpha_v\beta_3$ (células M21) y negativas para integrina (células M21L) mediante el uso de citometría de flujo (Figuras 5a, 5b).

Ejemplo 4 Nanopartículas de sílice fluorescentes conjugadas con péptido de selección de integrina $\alpha_v\beta_3$ y cartografía de nódulos (modelo de melanoma)

Se utilizó un material biocompatible, sílice, que tiene una arquitectura que se podría ajustar exactamente a tamaños de partícula optimizados para el aclaramiento renal. Se unieron péptidos pequeños de selección del objetivo y un marcador radiactivo a la superficie de las partículas para las medidas de imagenología de PET en serie en un modelo de melanoma humano *in vivo* bien caracterizado, y se cartografiaron los nódulos linfáticos de drenaje y los canales linfáticos mediante el uso de un colorante del infrarrojo cercano (IRC) encapsulado y métodos de imagenología óptica de fluorescencia multi-escala. Ballou et al., Sentinel lymph node imaging using quantum dots in mouse tumor models. Bioconjugate Chem. 18, 389-396 (2007). Kim et al., Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. Nat. Biotechnol. 22, 93-97 (2003). Tanaka et al, Image-guided oncologic surgery using invisible light: completed pre-clinical development for sentinel lymph node mapping. J Surg Oncol. 13, 1671-1681 (2006). También se llevó a cabo un ensayo de toxicidad y se obtuvieron las dosis de radiación en órganos normales en humanos. De manera específica, se sintetizaron nanopartículas de sílice núcleo-cubierta con encapsulación de colorante del infrarrojo cercano (IRC) de ~7 nm de diámetro, revestidas con cadenas de PEG y funcionalizadas en la superficie con un pequeño número (~6-7) de péptidos de selección del objetivo y radiomarcadores.

Se demuestra que estas sondas son simultáneamente atóxicas, exhiben una unión con elevada afinidad/avidez, una excreción eficaz, y una absorción diferencial significativa, y un contraste entre los tejidos tumorales y normales mediante el uso de aproximaciones de imagenología molecular multimodal. La detección, localización, y análisis sensible de los nódulos linfáticos y canales linfáticos, posibilitada por la fluorescencia del colorante del IRC, destaca la ventaja potencial distintiva de esta plataforma multimodal para la detección y estadificación de una enfermedad metastásica en el ámbito clínico, a la vez que se amplía el intervalo inferior de los tamaños de nódulos que se pueden detectar.

Materiales y métodos

Síntesis de nanopartículas de cRGDY-PEG y nanopartículas de PEG

Se prepararon las partículas mediante una condensación de sílice de tipo Stöber modificada como se describió previamente. Wiesner et al., Peg-coated Core-shell Silica Nanoparticles and Mathods of Manufactire and Use, documento PCT/US2008/74894. Larson, et al., Silica nanoparticle architecture determines radiative properties of encapsulated chromophores. Chem. Mater. 20, 2677-2684 (2008). Bogush, et al., Preparation of Monodisperse Silica Particles: Control of Size and Mass Fraction. J. Non-Cryst. Solids, 104, 95-106 (1988). Sadasivan, et al., Alcoholic Solvent Effect on Silica Synthesis-NMR and DLS Investigation. J. Sol-Gel Sci.Technol. 12, 5-14 (1998). Herz, et al., Large Stokes-Shift Fluorescent Silica Nanoparticles with Enhanced Emission over Free Dye for Single Excitation Multiplexing. Macromol Rapid Commun. 30, 1907-1910 (2009). Se conjugaron residuos de tirosina a las cadenas de PEG para la unión de restos de radioyodo o yodo estable. Hermanson, Bioconjugate Techniques, (Academic Press, London, ed. 2, 2008). Todas las muestras se hicieron coincidir por densidad óptica a su longitud de onda de absorción máxima (640 nm) antes del radiomarcaje. Los péptidos cRGD se unieron a las cadenas de PEG funcionalizado por medio de una unión cisteína-maleimida, y se estimó el número de péptidos cRGD unidos a la partícula mediante el uso de medidas basadas en FCS de las concentraciones de partículas absolutas y la concentración inicial de los reactivos para el péptido cRGD.

Medidas comparativas del tamaño hidrodinámico y del brillo relativo mediante espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)

Las partículas dializadas con agua se diluyeron en solución salina fisiológica (NaCl 0,15 M en H_2O) y se midieron en un instrumento Zeiss LSM 510 Confocor 2 FCS mediante el uso de excitación con HeNe a 633 nm. El instrumento se calibró por tamaño antes de todas las medidas. Las diferencias en el tiempo de difusión se usaron para determinar las variaciones en los tamaños hidrodinámicos del colorante y las especies de partículas. Las comparaciones del brillo relativo del colorante libre y de las nanopartículas de PEG y de RGDY-PEG se llevaron a cabo mediante el uso de las proporciones de cuentas por molécula/partícula.

Radiomarcaje de conjugados de puntos C

El radiomarcaje de las nanopartículas de cRGDY-PEG y PEG se llevó a cabo mediante el uso del método IODOGEN (Pierce, Rockford, IL). Piatyszek, et al., Iodo-gen mediated radioiodination of nucleic acids. J. Anal. Biochem. 172, 356-359 (1988). Las actividades se midieron mediante un contador gamma (γ) y la fluorescencia se midió mediante el uso de un fluorímetro Varian (excitación a 650 nm/emisión a 680 nm).

Células y cultivo celular

Se mantuvieron líneas celulares de melanoma humano M21 y una variante de M21 (M21-L, α_v negativa) en medio RPMI 1640/10% de BSA fetal, L-glutamina 2 mM, penicilina y estreptomicina (Instalación Central de Preparación de Medios, Centro del Cáncer Memorial Sloan-Kettering, Nueva York). Se cultivaron células endoteliales venosas de cordón umbilical humano (HUVECs) en medio M199/10% de suero bovino fetal, 20 µg/ml de factor de crecimiento de células endoteliales, 50 µg/ml de heparina, penicilina y estreptomicina.

Unión a células *in vitro* y especificidad molecular de las nanopartículas de ^{124}I-cRGD-PEG

Para ensayar la unión y especificidad de las partículas hacia las células M21, se revistieron placas de 24 pocillos con 10 µg/ml de colágeno tipo I (BD Biosciences, Bedford, MA) en solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se incubaron (37 °C, 30 min). Las células M21 (3,0 - 4,0 x10^5 células/pocillo) se cultivaron hasta la confluencia y se lavaron con medio RPMI 1640/0,5% de albúmina de suero bovino (BSA). Se añadieron nanopartículas de ^{124}I-cRGD-PEG (0 - 4,0 ng/ml) a los pocillos, y las células se incubaron (25 °C, 4 horas), se lavaron con medio RPMI 1640/0,5% de BSA, y se disolvieron en NaOH 0,2 M. Se analizó la radiactividad mediante el uso de un contador gamma automático 1480 (Perkin Elmer) calibrado para yodo-124. Se determinó la unión inespecífica en presencia de un exceso de 1000 veces de cRGD (Peptides International, Louisville, KY). Se generaron representaciones de Scatchard de los datos de unión y se analizaron mediante el uso de análisis de regresión lineal (Microsoft Excel 2007) para obtener los parámetros de unión al receptor (Kd, Bmax, CI50).

Estudios de unión celular *in vitro* mediante el uso de métodos de detección óptica

Se determinó la unión diferencial máxima de las nanopartículas de cRGDY-PEG y las nanopartículas de PEG a las células M21 durante una diversidad de tiempos de incubación y concentraciones de partículas mediante el uso de citometría de flujo, y los valores óptimos se usaron en los estudios de unión competitiva y especificidad. Se lavaron las células (3,0 x 10^5 células/pocillo) con medio RPMI 1640/0,5% de BSA, se desprendieron mediante el uso de un 0,25% de tripsina/EDTA, y se sedimentaron en un tubo de microcentrífuga (5 min a 1400 rpm, 25 °C). Los sedimentos se resuspendieron en disolución BD FACSFlow (BD Biosciences, San Jose, CA) y se analizaron en el canal de Cy5 para determinar el porcentaje de partícula-sonda unida (FACSCalibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA). Además se llevaron a cabo estudios de unión competitiva tras la incubación de nanopartículas de cRGDY-PEG (2,5 ng/ml) con células M21, M21L, y HUVEC en presencia de cRGD en exceso y/o anticuerpo monoclonal de ratón anti-integrina $\alpha_v\beta_3$ humana conjugado a fluoresceína (Millipore, Temecula, CA) y se analizaron mediante citometría de flujo. Para estudiar la potencia de las nanopartículas de RGDY-PEG respecto del péptido cRGD, se llevaron a cabo ensayos anti-adhesión. Se revistieron placas de microtitulación de noventa y seis pocillos con vitronectina en PBS (5 µg/ml), seguido de 200 µl de RPMI/0,5% de BSA (1 h, 37 °C). Las células (3x10^4/100 µl/pocillo) se incubaron por cuadruplicado (30 min, 25 °C) con diversas concentraciones de nanopartículas de cRGDY-PEG o péptido cRGD en RPMI/0,1% de BSA, y se añadieron a las placas revestidas de vitronectina (30 min, 37 °C). Los pocillos se lavaron suavemente con RPMI/0,1% de BSA para eliminar las células no adherentes; las células adherentes se fijaron con un 4% de PFA (20 min, 25 °C) y se tiñeron con azul de metileno (1 h, 37 °C) para la determinación de las densidades ópticas, medidas con el uso de un lector de placas Tecan Safire (λex = 650 nm, λem = 680 nm, anchura de banda de 12 nm). El factor de aumento multivalente se calculó como la proporción de los valores de CI50 con péptido cRGD respecto del punto de cRGDY-PEG. Montet, et al., Multivalent effects of RGD peptides obtained by nanoparticle display. J Med Chem. 49, 6087-6093 (2006).

Modelos Animales e Inoculación de Tumores

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales del Centro del Cáncer Memorial Sloan-Kettering, y siguieron las directrices de los Institutos Nacionales de la Salud sobre el bienestar animal. Se proporcionó a ratones macho nu/nu atímicos (6-8 semanas de edad, Taconic Farms Inc, Hudson, NY) una disolución de yoduro potásico que contenía agua para bloquear la absorción en la glándula tiroides del radioyodo libre *in vivo*, y se mantuvieron con una dieta Harlan Teklad Global Diet 2016, a voluntad, como se detalla en otra parte. Para generar xenoinjertos de M21 o M21L, se co-inyectaron de manera subcutánea volúmenes iguales de células (~5x10^6/100 µl) y matrigel en la pata

posterior en ratones diferentes. Los tamaños de los tumores se midieron con regularidad con un calibre, y se produjeron volúmenes tumorales medios de 200 mm^3.

Medidas farmacocinéticas y de la semivida de permanencia ($T_{1/2}$) *in vivo*

Se midieron las concentraciones de actividad dependiente del tiempo (%DI/g), corrigiendo la desintegración radiactiva con respecto al tiempo de inyección, sacrificando grupos de ratones en momentos especificados tras la inyección i.v. de nanopartículas de ^{124}I-cRGDY-PEG o nanopartículas de ^{124}I-PEG (~20 µCi/ratón) y recogiendo, pesando, y analizando la sangre, el tumor, y los órganos en un contador γ de centelleo calibrado para ^{124}I. Los datos resultantes de concentración de actividad-tiempo para cada tejido se ajustaron a una función monoexponencial decreciente para determinar los valores de $T_{1/2}$ y A, el semiperiodo de permanencia en tejidos/órganos y la intersección a tiempo cero, respectivamente, de la función.

Se estimó la fracción de partículas excretadas en la orina a lo largo del tiempo mediante el uso de métodos descritos previamente. Burns, et al., Fluorescent Silica Nanoparticles with Efficient Urinary Excretion for Nanomedicine, Nano Letters 9, 442-8 (2009). Brevemente, se inyectaron i.v. a ratones 200 µl de nanopartículas de cRGDY-PEG o nanopartículas de PEG sin marcar, y se recogieron muestras de orina a lo largo de un periodo de 168 hr (n=3 ratones por punto de tiempo). Las concentraciones de partículas en cada punto de tiempo se determinaron mediante el uso de análisis fluorimétricos, y se generó una curva de calibración de diluciones en serie a partir de medidas de señales de fluorescencia con corrección del fondo de las muestras de orina mezcladas con concentraciones conocidas de partículas (%DI). Los valores de concentración, junto con las estimaciones de los volúmenes medios diarios de orina de los ratones, se usaron para calcular la %DI/g de orina acumulativa excretada a lo largo del tiempo. Para determinar la excreción fecal acumulativa, se usaron jaulas metabólicas para recoger las heces a lo largo de un intervalo de tiempo similar tras la inyección i.v. de 200 µl de nanopartículas de ^{124}I-cRGDY-PEG (n=4 ratones por punto de tiempo). Se midieron las actividades de las muestras mediante el uso de un contador γ calibrado para ^{124}I.

Dosimetría

Las funciones de actividad-tiempo obtenidas para cada tejido se integraron analíticamente (con la inclusión del efecto de la desintegración radiactiva) para proporcionar la actividad acumulativa correspondiente (es decir, el número total de desintegraciones radiactivas). Después se calcularon las dosis absorbidas de ^{124}I en los órganos de los ratones multiplicando la actividad acumulativa por la constante de dosis en equilibrio de ^{124}I para las radiaciones no penetrantes (positrones), suponiendo una absorción local completa de tales radiaciones e ignorando la contribución de las radiaciones penetrantes (es decir, rayos γ). Eckerman, et al., Radionuclide Data and Decay Schemes, 2ª ed. Reston, VA: Society of Nuclear Medicine; 1989. Las actividades acumuladas en los órganos normales de los ratones se convirtieron en actividades acumuladas en los órganos normales humanos mediante el ajuste de las diferencias de masas corporales totales y de los órganos entre los ratones y los seres humanos (hombre medio de 70 kg). Cristy, et al., Specific absorbed fractions of energy at various ages from internal photon sources (I-VII). Oak Ridge National Laboratory Report ORNL/TM-8381/V1-7. Springfield, VA: Servicio Nacional de Información Técnica, Dep. de Comercio; 1987. Las actividades acumuladas en órganos normales humanos calculadas se introdujeron en el programa informático de dosimetría OLINDA para calcular, mediante el uso del formalismo del Comité de Dosimetría Interna Médica (MIRD) de la Sociedad de Medicina Nuclear, las dosis absorbidas por los órganos de un hombre medio. Loevinger, et al., MIRD Primer for Absorbed Dose Calculations (Sociedad de Medicina Nuclear, Nueva York, 1991). Stabin, et al., OLINDA/EXM: the second-generation personal computer software for internal dose assessment in nuclear medicine. J. Nucl Med. 46, 1023-1027 (2005).

Estudios de toxicidad aguda e histopatología

Los ensayos de toxicidad aguda se llevaron a cabo con seis grupos de ratones B6D2F1 macho y hembra (7 semanas de edad, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). El grupo de tratamiento (n=6 machos, n=6 hembras) recibió la sonda selectiva sin marcar (nanopartículas de ^{127}I-RGDY-PEG), y el grupo de control (n=6 machos, n=6 hembras) nanopartículas de PEG yodadas sin marcar (vehículo, nanopartículas de ^{127}I-RGDY-PEG) en una única inyección i.v. (200 µl). Además se ensayaron controles sin tratar (n=2 machos, n=2 hembras). Los ratones se observaron diariamente a lo largo de 14 días p.i. en busca de signos de morbilidad/mortalidad y cambios de peso, y se llevó a cabo una necropsia macroscópica, histopatología, y toma de muestras de sangre para hematología y determinaciones bioquímicas en suero a los 7 y 14 días p.i (Fig. 10 y Tabla 3).

Imagenología de PET en serie de la selección específica de tumores

Se llevó a cabo la imagenología mediante el uso de un escáner de PET para animales pequeños (Focus 120 microPET; Concorde Microsystems, Nashville, TN). Se mantuvo a ratones que albergaban tumores M21 o M21L en las patas traseras con anestesia del 2% de isoflurano en oxígeno a 2 L/min durante todo el periodo de escaneo. Se iniciaron adquisiciones de una hora en modo lista en el momento de la inyección i.v. de 200 µCi de nanopartículas de ^{124}I-cRGDY-PEG o nanopartículas de ^{124}I-PEG en todos los ratones, seguido de imágenes estáticas cada 30 min en serie a lo largo de un intervalo de 96 horas. Los datos de imágenes se corrigieron con respecto a la falta de uniformidad de la respuesta del escáner, pérdidas de cuentas en tiempos muertos, cuentas aleatorias, y la

desintegración física en el momento de la inyección. Las tasas de cuentas de vóxeles en las imágenes reconstruidas se convirtieron en concentraciones de actividad (%DI/g) mediante el uso de un factor de calibración del sistema medido. El análisis de la región de interés (ROI) tridimensional de las imágenes reconstruidas se llevó a cabo mediante el uso del programa informático ASIPro (Concorde Microsystems, Nashville, TN) para determinar la media, el máximo, y la DE de la absorción de la sonda en los tumores. Las proporciones de concentraciones de actividad tumor-músculo se obtuvieron dividiendo los valores de %DI/g del tumor obtenidos de las imágenes por los valores de %DI/g de músculo con el contador γ.

Cartografía de nódulos mediante el uso combinado de la imagenología y microscopía de fluorescencia en IRC

A ratones atímicos que albergaban tumores en las patas traseras se les inyectaron mediante una administración peritumoral, en 4 cuadrantes, volúmenes iguales de una muestra de puntos de cRGDY-PEG de 50 µl, y se les dejó deambular libremente. Tras un intervalo de 30 min a 1 hr, los ratones se anestesiaron con una mezcla de un 2% de isoflurano/98% de oxígeno, y se hizo verticalmente una incisión superficial en la línea paramediana a lo largo de la cara ventral del ratón para exponer quirúrgicamente la región desde el miembro posterior hasta la axila ipsilateral al tumor. La imagenología óptica *in situ* de nódulos locorregionales (es decir, inguinales, axilares) y los conductos linfáticos de drenaje (que incluyen la región axilar) se llevó a cabo mediante el uso de un microscopio de fluorescencia macroscópico equipado con filtros de paso de banda ancha de 650±20 nm de excitación en IRC y de 710 nm de emisión. Además se adquirieron imágenes ópticas de cuerpo completo (instrumento de imagenología Maestro de Cambridge Research Instruments) y se sometieron a deconvolución espectral como se informó previamente. Burns, et al., Fluorescent Silica Nanoparticles with Efficient Urinary Excretion for Nanomedicine, Nano Letters 9, 442-8 (2009).

Análisis Estadístico

Se llevaron a cabo análisis estadísticos que compararon grupos de ratones con tumores que recibieron sondas selectivas/no selectivas o que albergaron tumores M21/M21L, mediante el uso de una prueba U de Mann-Whitney unilateral, y $P<0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Para los estudios de biodistribución, se compararon los valores de %DI/g medios específicos de tejido de nanopartículas de ^{124}I-cRGDY-PEG (n=7 ratones) y de ^{124}I-PEG (control, n=5 ratones) en cada punto de tiempo, y se observaron diferencias estadísticamente significativas en las actividades del marcador en la sangre, los tumores, y los órganos principales a las 4 y 96 hrs p.i., así como a las 24 hrs p.i. para los tumores y otros tejidos (Tabla 1). Para los estudios de selección como objetivo de tumores, se descubrió que las diferencias de los valores medios de %DI/g entre los ratones con tumores M21 (n=7) y M21L (n=5), así como los ratones que recibieron sondas de control (n=5), fueron máximos a las 4 hrs p.i. (p=0,0015 para ambos controles), y permanecieron significativamente elevados a las 24 hrs (p=0,0015 y p=0,004, respectivamente), 48 hrs (p=0,001 y p=0,003, respectivamente), 72 hrs (p=0,015 y 0,005, respectivamente), y 96 hrs (p=0,005 para M21-M21L). Se descubrió que las proporciones tumor-músculo para las nanopartículas de ^{124}I-cRGDY-PEG (n=7) frente a las nanopartículas de ^{124}I-PEG (n=5) fueron estadísticamente significativas a las 24 hrs p.i. (p=0,001) y 72 hrs p.i. (p=0,006), pero no a las 4 hrs p.i. (p=0,35). Se determinó la calidad de los valores de ajuste (R2), junto con sus valores de p asociados, para la curva de calibración de orina (R2=0,973, p=0,01), así como para las curvas de excreción de %DI acumulativa urinaria (R2 > 0,95, p=0,047) y fecal (R2> 0,995, p<0,002) mediante el uso de un análisis de regresión no lineal (SigmaPlot, Systat, v. 11.0).

Resultados

Diseño y Caracterización de Nanopartículas

Se prepararon nanopartículas de sílice núcleo-cubierta que encapsulaban el colorante Cy5 (máximo de emisión >650 nm), revestidas con cadenas de polietilen glicol (PEG) terminadas en metoxi (PEG ~0,5 kDa), según los protocolos publicados previamente. Burns, et al., Fluorescent Silica Nanoparticles with Efficient Urinary Excretion for Nanomedicine, Nano Letters, 9, 442-8 (2009). Ow, et al., Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles. Nano Lett. 5, 113-117 (2005). El revestimiento de PEG neutro previno la absorción inespecífica por parte del sistema reticuloendotelial (opsonización). El uso de PEGs bifuncionales posibilitó la unión de un pequeño número (~6-7 por partícula) de ligandos peptídicos de arginina-glicina-ácido aspártico cíclicos (cRGDY) selectivos de integrina $\alpha_v\beta_3$ para mantener un tamaño hidrodinámico pequeño, lo que facilitó un aclaramiento renal eficaz. Los ligandos peptídicos se marcaron además con ^{124}I por medio del uso de un ligador de tirosina para proporcionar una señal con la que se pudiesen formar imágenes cuantitativamente en tres dimensiones mediante PET (puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG, Fig. 6A); una ventaja práctica importante del ^{124}I de vida relativamente larga (periodo de semidesintegración físico: 4,2 d) es que sigue habiendo una señal suficiente durante un tiempo suficiente para permitir la radiodetección durante al menos varios días tras la administración, cuando la actividad de fondo se ha eliminado en gran medida y se maximiza el contraste tumor-fondo. La pureza de la nanopartícula selectiva radiomarcada fue >95% mediante radiocromatografía en capa fina. La estabilidad de la nanopartícula selectiva sin radiomarcar es de alrededor de 1 año mediante medidas de FCS. La partícula se excreta intacta en la orina mediante análisis FCS. Tal como se usa en la presente memoria, "punto" y "nanopartícula" se usan de manera intercambiable. Una partícula revestida con PEG que contenía un residuo de tirosina para el marcaje con ^{124}I sirvió como sonda de control (puntos de ^{124}I-PEG). La purificación de las muestras radiomarcadas mediante cromatografía de exclusión por tamaños (Fig. 7) dio como resultado rendimientos radioquímicos >95%. Se midieron diámetros hidrodinámicos de ~7 nm de d.i. para los puntos

de cRGDY-PEG no radiactivos y para los puntos de PEG mediante espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) (Fig. 6B y 6C). Se determinó que el brillo relativo de los puntos de cRGDY-PEG, de media, fue un 200% mayor que el del colorante libre (Fig. 6C), de manera coherente con los resultados anteriores. Burns, et al., Fluorescent Silica Nanoparticles with Efficient Urinary Excretion for Nanomedicine, Nano Letters, 9, 442-8 (2009). Larson, et al., Silica nanoparticle architecture determines radiative properties of encapsulated chromophores. Chem. Mater. 20, 2677-2684 (2008). Basándose en estas propiedades fisicoquímicas, se tuvo previsto alcanzar un equilibrio favorable entre la absorción selectiva en el tumor y la retención frente al aclaramiento renal de la partícula selectiva, por lo que se maximizaría la localización en el tejido objetivo mientras se minimizaría la toxicidad en los tejidos normales y las dosis de radiación.

Estudios de Ensayo de Unión a Receptor *in vitro*

Para examinar la afinidad y especificidad de unión *in vitro* de los puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG y los puntos de ^{124}I-PEG a tumores y a las superficies endoteliales vasculares, se usaron líneas de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) y de células de melanoma que sobreexpresaban integrina $\alpha_v\beta_3$ (M21) y que no la expresaban (M21L). Se observó una unión lineal y saturable sumamente específica de los puntos de cRGDY-PEG a lo largo de un intervalo de concentraciones de partículas (0 a 8 ng/ml) y tiempos de incubación (hasta 5 hrs), con una unión diferencial máxima a las 4 hr y una concentración de partículas de ~2,0 ng/ml (datos no mostrados) mediante el uso de citometría de flujo. Se ensayó la especificidad de unión a receptor de los puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG mediante el uso de métodos de análisis con contador γ después de incubar inicialmente las células M21 con cRGD en exceso sin radiomarcar y después de añadir diversas concentraciones de la sonda selectiva radiomarcada (Fig. 8A). El análisis de Scatchard de los datos de unión proporcionó una constante de equilibrio de disociación, Kd, de 0,51 nM (Fig. 8A, recuadro) y una concentración del receptor, Bmax, de 2,5 pM. Basándose en el valor de Bmax, se estimó que la densidad de receptores de integrina $\alpha_v\beta_3$ fue $1{,}0\times10^4$ por célula M21, razonablemente de acuerdo con la estimación previamente publicada de $5{,}6 \times 10^4$ para esta línea celular. Cressman, et al., Binding and uptake of RGD-containing ligands to cellular $\alpha_v\beta_3$ integrins. Int J Pept Res Ther. 15, 49-59 (2009). También se observaron incrementos graduales de la absorción celular de M21 específica de integrina a lo largo de un intervalo de temperaturas de 4 a 37 °C, lo que sugiere que la interiorización celular mediada por receptores contribuyó a la absorción total (datos no mostrados). Los estudios adicionales de unión competitiva mediante el uso de la sonda selectiva mostraron un bloqueo completo de la unión mediada por receptor con un anticuerpo anti-integrina $\alpha_v\beta_3$ (Fig. 8B) mediante citometría de flujo. No se observó una reducción significativa de la magnitud de unión al receptor (~10% de M21) con células M21L (Fig. 8C) mediante el uso de un exceso de cRGDY o anticuerpo anti-integrina $\alpha_v\beta_3$. Estos resultados se confirmaron mediante estudios adicionales con contador γ, y se determinó una concentración de inhibición de la unión del 50%, CI50, de 1,2 nM para el punto de ^{124}I-cRGDY-PEG. Se halló un factor de aumento multivalente asociado de más de 2,0 para el punto de cRGDY-PEG respecto del péptido cRGD monomérico mediante el uso de un ensayo anti-adhesión y células M21 (datos no mostrados). Montet, et al., Multivalent effects of RGD peptides obtained by nanoparticle display. J Med Chem. 49, 6087-6093 (2006). Li, et al., 64Cu-labeled tetrameric and octomeric RGD peptides for small-animal PET of tumor $\alpha_v\beta_3$ integrin expression. J. Nucl Med. 48, 1162-1171 (2007). De forma similar a las células M21, el anticuerpo en exceso bloqueó de manera eficaz la unión a receptores de los puntos de cRGDY-PEG a células HUVEC mediante citometría de flujo (Fig. 8D).

Estudios de Biodistribución y Aclaramiento

Se estudió la biodistribución dependiente del tiempo, así como el aclaramiento renal y hepatobiliar, administrando de manera intravenosa dosis de marcador (~0,2 nanomoles) de puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG y puntos de ^{124}I-PEG a modelos en ratón de xenoinjertos de tumores M21 (Fig. 9). Aunque las concentraciones de actividad tisular (porcentaje de la dosis inyectada por gramo (%DI/g)) para la sonda selectiva se midieron a lo largo de un intervalo de tiempo 196 hr tras la inyección (p.i.), la comparación de los marcadores de puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG (Fig. 9A) y de puntos de ^{124}I-PEG (Fig. 9B) se limitó a una ventana de 96 hr, ya que no se adquirieron datos para estos últimos en 1 semana. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0{,}05$) en las actividades del marcador para la sangre, el tumor, y los órganos principales a las 4 y 96 hrs p.i., así como a las 24 hrs p.i. para el tumor y otros diversos tejidos (Tabla 1). La sonda selectiva se eliminó casi completamente del cuerpo 1 semana p.i (~3% DI). Los semiperiodos de permanencia ($T_{1/2}$) para la sangre, el tumor, y los órganos principales para estos marcadores se muestran en la Tabla 2 (columnas 2 y 5). Se muestra un conjunto de datos representativos (permanencia en la sangre) en el recuadro de la Fig. 9A. Se determinó un valor $T_{1/2}$ en la sangre relativamente grande de 7,3 ± 1,2 hrs para el punto de ^{124}I-PEG. Tras la unión del péptido cRGDY para sintetizar el punto de ^{124}I-cRGDY-PEG, el valor de $T_{1/2}$ disminuyó ligeramente hasta 5,6 ± 0,15 hrs, pero fue acompañado por una mayor biodisponibilidad de la sonda (Tabla 2, columna 3). Se descubrió que el valor de $T_{1/2}$ en el tumor para el punto de ^{124}I-cRGDY-PEG fue alrededor de 13 veces mayor que el de la sangre, frente a solamente una diferencia de 5 veces para el punto de ^{124}I-PEG (Tabla 2, columnas 2 y 5).

Tabla 1

Valores p del estudio de biodistribución que compara los puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG y ^{124}I-PEG†

Tejido	Tiempos tras la inyección (horas)		
	4	24	96
Sangre	0,001	0,113	0,010
Tumor	0,045	0,012	0,001
Corazón	0,019	0,231	0,001
Pulmones	--	0,039	0,006
Hígado	0,001	0,033	0,028
Bazo	0,001	0,208	0,001
Intestino Delgado	0,001	0,046	0,002
Intestino Grueso	0,001	0,137	0,003
Riñones	--	0,356	0,001
Músculo	0,001	0,007	0,001
Cerebro	0,001	0,074	0,001

Tabla 2

Órgano Objetivo	Ratón						Ser humano†		
	^{124}I-RGDY-PEG			^{124}I-PEG			^{124}I-RGDY-PEG		^{124}I-PEG
	$T_{1/2}$ (h)	A (%DI/g)	Dosis Absorbida (rad/mCi)	$T_{1/2}$ (h)	A (%DI/g)	Dosis Absorbida (rad/mCi)	Dosis Absorbida (rad/mCi)		
Sangre	5,9	18,8	626	7,3	4,7	189	*(véase la médula ósea roja, más adelante)*		
Corazón	6,8	7,0	266	34,1	0,8	120	0,307	(Pared)	0,087
Pulmones	8,5	5,7	267	37,7	3,0	498	0,298		0,263
Hígado	65,9	3,9	935	52,5	1,4	294	0,486		0,234
Bazo	42,3	45,6	1071	27,4	45,7	410	3,20		0,254
	195			286					
Intestino Delgado	30,3	1,8	251	13,2	0,9	61	0,304		0,115
Intestino Grueso	23,9	2,0	228	49,2	0,5	99	0,427	(S)	0,209

							0,724	(I)	0,416
Riñones	66,0	3,0	712	33,0	2,0	388	2,50		0,320
Músculo	27,7	0,8	105	47,1	0,2	38	0,227		0,060
Cerebro	13,9	0,4	29	8,5	0,2	8	0,187		0,149
[§]Tumor	73,5	1,5	380	37,0	0,9	146	n/a		n/a
[ζ]Hueso							*(véanse las células osteogénicas)*		
Glándulas Suprarrenales							0,400		0,083
Mamas							0,141		0,042
Pared de la Vesícula Biliar							0,289		0,097
Pared del Estómago							0,265		0,065
Ovarios							0,303		0,124
Páncreas							0,389		0,081
Médula Ósea Roja							1,07		0,084
Células Osteogénicas							0,203		0,127
Piel							0,158		0,038
Testículos							0,186		0,073
Timo							0,173		0,052
Tiroides							0,188		0,043
Pared de la Vejiga Urinaria							2,01		1,65
Útero							0,333		0,171
Cuerpo Total							0,034		0,075
Equivalente de la Dosis Efectiva (rem/mCi)							0,863		0,256
Dosis Efectiva (rem/mCi)							0,599		0,232

[†]Hombre medio de 70 kg, S (superior), I (inferior), [§]modelo de melanoma en ratón, [ζ]actividad ósea muy inferior a otros tejidos (no informado)

Mediante una traducción adecuada ajustada por la masa de los datos de biodistribución anteriores al hombre, se obtuvieron las dosis de radiación en órganos normales humanos y se descubrió que eran comparables a las de otros radiomarcadores de diagnóstico usados habitualmente (Tabla 2, columnas 8, 9). Junto con el hallazgo de que la sonda selectiva fue atóxica y no dio como resultado efectos patológicos específicos de tejidos (es decir, sin toxicidad aguda) (Fig. 10 y Tabla 3), se plantean aplicaciones de imagenología molecular selectiva y no selectiva por primera vez en seres humanos con estos agentes.

Tabla 3

Histopatología de órganos para puntos de ^{127}I-RGDY-PEG frente a puntos de ^{127}I-PEG										
Tratamiento	SIN TRATAR		Puntos de ^{127}I-PEG				Puntos de ^{127}I-RGDY-PEG			
Sexo	M	H	M	M	H	H	M	M	H	H
Corazón	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Timo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Tráquea	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Pulmones	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Riñones	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Hígado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Agrupamientos celulares aleatorios					1					
Vesícula biliar	NP	N	N	N	N	NP	N	NP	N	N
Páncreas	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Linf. crónico				2F			N	N	N	N
Bazo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Glándula salival	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Esófago	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Estómago	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Intestino delgado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Hiperplasia linf. folic.						1				
						MF				
Intestino grueso	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Nódulo linfático mesentérico	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NP
Nódulo linfático submandibular	NP	NP	N	NP	N	N	N	N	N	N
Glándulas suprarrenales	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Tiroides	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Testículos	N	U	N	N	U	U	N	N	U	U
Epidídimo	N	U	N	N	U	U	N	N	U	U
Vesículas seminales	N	U	N	N	U	U	N	N	U	U
Glándulas coagulantes	N	U	N	N	U	U	N	N	U	U
Próstata	N	U	N	N	U	U	N	N	U	U

Ovario	U	N	U	U	N	N	U	U	N	N
Útero	U	N	U	U	N	N	U	U	N	N
Cuello de útero	U	N	U	U	N	N	U	U	N	N
Glándula mamaria	NP	NP	N	NP	N	N	NP	NP	N	NP
Vejiga urinaria	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Huesos, articulación	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Médula ósea	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Médula espinal	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cerebro	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Hipófisis	N	NP	N	N	N	N	N	N	N	N
Piel	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Inflamación subcut.		1								
Músculo esquelético	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Nervios periféricos	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: normal, U: no disponible, NP: no presente, 1: mínimo, 2: leve, F: focal, MF: multifocal

En otro estudio para confirmar que los puntos de ^{127}I-RGD-PEG son atóxicos tras la administración intravenosa en ratones, se llevó a cabo un ensayo de toxicidad de dosis única formal a lo largo de 2 semanas mediante el uso de puntos de ^{127}I-RGD-PEG a alrededor de 100 veces de la dosis humana equivalente. Los puntos de ^{127}I-PEG sirvieron como partícula de control. En resumen, el procedimiento fue como sigue. Se usaron veintiocho ratones B6D2F1 de 8 semanas de edad en el estudio de toxicidad aguda, y se dividieron en un grupo de tratamiento y uno de control. El grupo de tratamiento (n= 6 machos + 6 hembras) recibió una dosis de nanopartículas de sílice de ^{127}I-RGD-PEG a una dosis de $1x10^{-9}$ moles/ratón de manera intravenosa, y el grupo de control (n= 6 machos + 6 hembras) recibió la misma cantidad de vehículo. Se sacrificaron dos ratones/grupo (un macho y una hembra/grupo) en el día 7 tras la dosis, y se realizaron análisis de bioquímica clínica, hematología e histopatología específica de tejido en la autopsia. Todos los animales restantes (n= 5 machos + 5 hembras/grupo) se observaron durante 14 días tras el tratamiento. Se usaron cuatro ratones sin tratar (dos machos y dos hembras) como referencia. La conclusión de los estudios fue que no se observaron eventos adversos durante la dosificación o el siguiente periodo de observación de 14 días. No se observó mortalidad o morbilidad. Las observaciones clínicas incluyeron la ausencia de lo siguiente: anemia, pérdida de peso, agitación, respiración incrementada, alteración GI, comportamiento anormal, disfunción neurológica, anormalidades en la hematología, anormalidades en la bioquímica clínica, o lesiones relacionadas con fármacos desde el punto de vista de la patología de órganos. Así, una única inyección de nanopartículas de sílice ^{127}I-RGD-PEG a $1x10^{-9}$ moles/ratón, una dosis equivalente a un exceso de 100 veces la dosis de nanopartículas de sílice de RGD-PEG necesaria para los estudios de imagenología de Fase 0, es segura y atóxica en ratones B6D2F1.

Se halló una excreción renal eficaz para las sondas selectivas y no selectivas de ~7 nm de diámetro a lo largo de un periodo de tiempo de 168 hr mediante análisis fluorimétricos de muestras de orina. Las señales de fluorescencia se corrigieron con respecto al fondo y se convirtieron en concentraciones de partículas (%DI/µl) basándose en un esquema de calibración de diluciones en serie (Fig. 9C, recuadro; Tabla 4, columna 2). Burns, et al., Fluorescent Silica Nanoparticles with Efficient Urinary Excretion for Nanomedicine, Nano Letters, 9, 442-8 (2009). Los valores de concentración, junto con las estimaciones conservativas dependientes de la edad de la velocidad media de excreción en orina, permitieron calcular la %DI acumulativa excretada (Tabla 4, columna 4). Drickamer, Rates of urine excretion by house mouse (mus domesticus): differences by age, sex, social status, and reproductive condition. J. Chem. Ecol. 21, 1481-1493 (1995). Se observó que prácticamente la mitad de la dosis inyectada (alrededor del 43 %DI) se excretó a lo largo de las primeras 24 hrs p.i., y un ~72% DI en 96 hrs (Fig. 9C), lo que sugiere que la mayor parte de la excreción se ha dado en el primer día p.i. No se pudo detectar una fluorescencia significativa de partículas en la orina 168 hrs p.i. Los perfiles de excreción fecal del punto de ^{124}I-cRGDY-PEG indicaron que, de media, se eliminó un 7% DI y 15% DI de la dosis inyectada a lo largo de 24 y 96 hrs, respectivamente (Fig. 9D). El análisis mediante FCS de las muestras de orina obtenidas en múltiples momentos tras la inyección de la sonda selectiva reveló que la partícula se excretó intacta y sin liberación del colorante encapsulado (datos no mostrados).

Tabla 4

Datos de Concentración en Orina y Excreción Acumulativa

	Tiempo (hr)	Concentración (%DI/µl)	Volumen Med. de Orina (µl)	%DI Acumulativa Calculada Excretada
Punto de RGDY-PEG de 7,0 nm	0	0,0	0,0	0
	1	0,292	41,6	6,07
	4	0,026	166,7	26,1
	24	0,016	1000	43,4
	96	0,004	3974	72,2

Estudios de PET de Cuerpo Completo en Serie

Se llevó a cabo la imagenología de PET de la expresión de integrina en modelos en ratón de xenoinjerto subcutáneo de M21 y M21L en las patas traseras en múltiples momentos p.i. tras la inyección i.v. de puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG o puntos de ^{124}I-PEG (control). Las imágenes de microPET frontales de cuerpo completo representativas a las 4 hrs (izquierda: tumor M21; medio: tumor M21L) y 24 hrs (derecha: tumor M21) p.i. se muestran en la Fig. 11A. La selección específica del tumor M21 que sobreexpresa la integrina $\alpha_v\beta_3$ es claramente visible a partir de estas imágenes. Se muestran los valores de %DI/g de tumores medios y las desviaciones estándar para los grupos de tumores M21 (n=7) y M21L (control) (n=5) que recibieron los puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG selectivos, así como para los ratones con tumores M21 (n=5) que recibieron el marcador de puntos de ^{124}I-PEG no selectivos (Fig. 11B). En el momento de absorción tumoral máxima (~4 hrs p.i.), se observaron incrementos de la concentración de actividad del triple (en %DI/g) en los tumores M21 respecto de los controles. Las diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los momentos p.i. ($p<0,05$) excepto en 1 hr ($p=0,27$).

Las proporciones de absorción tumor-músculo (%DI/g) obtenidas de las imágenes para los puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG revelaron un contraste tumoral incrementado en momentos posteriores (~24-72 hrs p.i.), mientras el de los puntos de ^{124}I-PEG disminuyó (Fig. 11C). Este hallazgo sugirió que los puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG fueron, de hecho, selectivos hacia los tumores, lo cual se hizo más evidente a medida que la actividad en la sangre se aclaró durante el periodo inicial de 24 hr (compárese la Fig. 11C con el recuadro de la Fig. 9A). Se halló una correlación estadísticamente significativa entre los valores de %DI/g del tejido tumoral obtenidos mediante PET para los puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG y los puntos de ^{124}I-PEG, y los valores de %DI/g de los tumores obtenidos mediante un contador y *ex vivo* correspondientes (coeficiente de correlación $r = 0,94$, $P<0,0016$; Fig. 11D), lo que confirma la exactitud de PET para obtener de manera no invasiva datos cuantitativos de biodistribución.

Microscopía e imagenología de Fluorescencia en IRC *In Vivo*

Se llevaron a cabo estudios de imagenología de fluorescencia *in vivo* mediante el uso de las pequeñas nanopartículas selectivas para cartografiar nódulos locales/regionales y canales linfáticos, así como para superar las limitaciones anteriores. De manera importante, se puede aprovechar la naturaleza multimodal y el pequeño tamaño de la sonda de partículas selectivas para visualizar un intervalo de tamaños de nódulos y ramas linfáticas en el modelo de melanoma tras una administración peritumoral, en 4 cuadrantes, simulando procedimientos intraoperatorios de cartografía de nódulos linfáticos centinela humanos. Inicialmente, se llevó a cabo una microscopía de fluorescencia en IRC en serie en ratones intactos a lo largo de un periodo de tiempo de 4 hr mediante el uso de las sondas de partículas selectivas o no selectivas. La administración peritumoral de la sonda selectiva reveló el drenaje y la visualización persistente de los nódulos inguinales y poplíteos adyacentes a lo largo de este intervalo, y los nódulos linfáticos más pequeños y/o más distantes fueron más difíciles de visualizar. En contraste, la sonda no selectiva proporcionó una visualización a más corto plazo (~1 hr) de los nódulos locales, y se observó una señal de fluorescencia progresivamente más débil (datos no mostrados). Tras la exposición quirúrgica, se descubrió que esta observación fue el resultado una difusión de partículas más rápida desde la localización del tumor, en comparación con la retención prolongada observada con la sonda selectiva.

A continuación se llevó a cabo una cartografía de nódulos linfáticos representativos en múltiples escalas espaciales mediante el uso de la imagenología óptica de cuerpo completo de animales vivos (Fig. 12A) y técnicas de microscopía de fluorescencia en IRC (Fig. 12B) para visualizar el drenaje linfático de la región peritumoral en los nódulos inguinales y axilares en animales vivos expuestos quirúrgicamente. Además, las imágenes de fluorescencia de mayor resolución (Fig. 12B, fila inferior) permitieron visualizar una arquitectura intranodular más detallada, lo que incluye vénulas de endotelio alto, que facilitan el paso de los linfocitos circulantes indiferenciados al nódulo, y que pueden tener implicaciones importantes para la estadificación nodular y la capacidad de detectar micrometástasis en etapas más tempranas de la enfermedad. También se visualizaron las ramas linfáticas más pequeñas y menos

intensas mediante microscopía de fluorescencia en la región axilar (datos no mostrados). Así, el pequeño tamaño de la sonda selectiva no solamente permite visualizar el primer nódulo de drenaje (o nódulo centinela), en posición proximal al tumor, sino que también posibilita la visualización de nódulos más distantes y del patrón de drenaje linfático.

Discusión

Se informa de nanopartículas de sílice atóxicas, de afinidad elevada, y eliminadas de manera eficaz para la selección específica de tumores y para la cartografía de nódulos, con las que se han abordado con éxito varios de los desafíos actuales asociados a otras tecnologías de partículas. Esta es la primera nanopartícula selectiva que, basándose en sus propiedades favorables, se puede decir que es clínicamente traducible como una sonda óptica-PET combinada. La naturaleza complementaria de esta sonda multimodal, unida a su pequeño tamaño (~7 nm de diámetro), puede facilitar el estudio clínico posibilitando la integración continua de los datos de imagenología adquiridos a diferentes escalas espaciales, temporales, y de sensibilidad, lo que potencialmente proporciona nuevas percepciones en los procesos moleculares fundamentales que controlan la biología de los tumores.

Los resultados *in vitro* muestran una especificidad de unión a receptores de la sonda de partículas selectivas de ~7 nm a células M21 y HUVEC. Se ha informado de hallazgos similares con ensayos de unión a receptores mediante el uso de los mismos tipos celulares, pero con la forma monovalente del péptido. Cressman, et al., Binding and uptake of RGD-containing ligands to cellular $\alpha_v\beta_3$ integrins. Int J Pept Res Ther. 15, 49-59 (2009). De manera importante, el aumento de la multivalencia de la sonda de partículas unidas a cRGDY, junto con los valores de $T_{1/2}$ de tiempo prolongado de permanencia en la sangre y en los tumores, son propiedades clave asociadas a la plataforma de partículas que no se hallan con la forma monovalente del péptido.

El valor relativamente largo de $T_{1/2}$ en la sangre de 7,3 ± 1,2 hrs estimado para el marcador de puntos de ^{124}I-PEG puede estar relacionado con la superficie revestida de PEG químicamente neutra, que hace que la sonda sea biológicamente inerte y significativamente menos susceptible a la fagocitosis por parte del sistema reticuloendotelial. El hecho de que se descubriera una reducción del valor de $T_{1/2}$ hasta 5,6 ± 0,15 hrs para el marcador de puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG es muy probablemente el resultado del reconocimiento por parte de las integrinas objetivo y/o una mayor actividad de los macrófagos. Sin embargo, es sustancialmente más largo que los valores publicados de $T_{1/2}$ en la sangre de los marcadores con péptidos cRGDY existentes (~13 minutos), y da como resultado una mayor biodisponibilidad de la sonda, lo que facilita la selección como objetivo de tumores y produce mayores absorciones en los tumores a lo largo de periodos de tiempo más largos. Montet, et al., Multivalent effects of RGD peptides obtained by nanoparticle display. J Med Chem. 49, 6087-6093 (2006). Además, el valor de $T_{1/2}$ en los tumores para el punto de ^{124}I-cRGDY-PEG fue alrededor de 13 veces mayor que para la sangre, frente a solamente una diferencia de cinco veces para el punto de ^{124}I-PEG, lo que sugiere una localización en el tejido objetivo sustancialmente mayor para el primero que para el segundo. Tales interpretaciones mecanísticas de los datos *in vivo* se pueden aprovechar para perfeccionar los protocolos de diagnóstico clínico, de planificación del tratamiento, y de monitorización del tratamiento.

Los resultados de este estudio subrayan las claras ventajas ofrecidas por PET, una herramienta de imagenología potente, cuantitativa, y muy sensible para extraer de manera no invasiva información molecular relacionada con los niveles de expresión de receptores, la afinidad de unión, y la especificidad. La mayor acumulación y el aclaramiento más lento desde los tumores M21, respecto de las estructuras circundantes normales, permite la discriminación de los mecanismos de absorción tumorales específicos de los mecanismos inespecíficos (es decir, perfusión tisular, pérdidas) en los tejidos normales. Un pequeño componente de la absorción en tumores M21, sin embargo, se puede atribuir presumiblemente a las alteraciones de la permeabilidad vascular (es decir, efectos de la permeabilidad y retención incrementadas). Seymour, Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 9, 135-187 (1992). Este modo de absorción inespecífica refleja una porción relativamente pequeña de la absorción tumoral total en momentos p.i. más tempranos, basándose en los incrementos observados de %DI/g en ratones que recibieron el marcador de control (puntos de ^{124}I-PEG, Fig. 11B). 1 hr p.i., no se observaron incrementos significativos de %DI/g en los tumores M21 respecto de los controles. Esta observación puede reflejar el efecto de la perfusión diferencial en la primera hora, y la acumulación y retención en el tumor se observa principalmente en momentos posteriores p.i. (es decir, 24 hrs). Además, en comparación con el marcador peptídico clínicamente aprobado, ^{18}F-galacto RGD, se halló una absorción mayor de prácticamente el doble en los tumores M21 para los puntos 34 de ^{124}I-cRGDY-PEG, y además ofrecieron las ventajas de unión multivalente, tiempos prolongados de circulación en la sangre, y un mayor aclaramiento renal.

Una ventaja de una sonda óptica-PET combinada es la capacidad de analizar estructuras anatómicas que tienen tamaños en o por debajo del límite de resolución del escáner PET (es decir, el denominado efecto de volumen parcial), que puede dificultar la detección y cuantificación de la actividad en las lesiones. Por ejemplo, en modelos de animales pequeños, el estudio de la enfermedad metastásica en nódulos locales/regionales pequeños, importante clínicamente para la estadificación y tratamiento de melanomas, puede no resolverse de manera adecuada mediante la imagenología de PET, dado que el tamaño de los nódulos observados es en general del orden de la resolución espacial del sistema (1-2 mm). Mediante la utilización de una segunda modalidad de imagenología complementaria y sensible, la imagenología de fluorescencia en el infrarrojo cercano (IRC), se pueden obtener mapas funcionales que revelan los patrones de enfermedad nodular y drenaje linfático. Ballou et al., Sentinel lymph node imaging using

quantum dots in mouse tumor models. Bioconjugate Chem. 18, 389-396 (2007). Aunque son necesarios estudios adicionales que investiguen la distribución intranodular de la fluorescencia de puntos de cRGDY-PEG con respecto a los focos metastásicos para determinar si se puede conseguir la localización sensible de tales focos, estos resultados demuestran claramente las ventajas de trabajar con tal sonda óptica-PET combinada.

En la clínica, no se pueden destacar suficientemente los beneficios de tal plataforma combinada para la estadificación y el tratamiento de tumores. El tiempo prolongado en la circulación sanguínea y la biodisponibilidad resultante de esta nanosonda resalta su uso como herramienta versátil para la monitorización temprana y a largo plazo de las diversas etapas de tratamiento de enfermedades (el cribado de diagnóstico, la evaluación antes del tratamiento, la intervención terapéutica, y la monitorización tras el tratamiento) sin las limitaciones impuestas por las consideraciones sobre la toxicidad. Una ventaja adicional importante es que, aunque las sondas rápidamente eliminadas pueden ser útiles para ciertas aplicaciones en las que la localización en el tejido objetivo es rápida por sí misma, la localización de muchos agentes en tumores sólidos, a menudo escasamente vascularizados y por otra parte relativamente inaccesibles, probablemente será lenta tras la administración sistémica. Así, la actual plataforma de nanopartículas amplía la diversidad de aplicaciones de tales agentes, debido a que la cinética de la localización en el tejido objetivo ya no es limitante. Además, se pueden cartografiar los nódulos profundos mediante PET con respecto a su distribución y número, mientras se puede obtener una localización más precisa y detallada de los nódulos superficiales mediante la imagenología de fluorescencia en IRC. Finalmente, se puede aprovechar la permanencia relativamente prolongada de la sonda selectiva en el tumor respecto de la permanencia en la sangre, además del aumento de la multivalencia, para futuras aplicaciones teranósticas, como vehículo de administración de compuestos radioterápicos o fármacos.

Ejemplo 5 Nanopartículas de sílice fluorescentes conjugadas con péptido de selección de integrina $\alpha_v\beta_3$ y/o péptido de selección de uMUC1 (modelos de cáncer de tiroides y carcinoma de células escamosas (SCC))

Se unirá un péptido cRGD (Peptides International), que tiene una funcionalidad terminal de cisteína, a la nanopartícula PEGilada por medio de una unión tiol-maleimida. Las nanopartículas opcionalmente se pueden funcionalizar adicionalmente mediante un ligando peptídico sintético, EPPT1. Las nanopartículas se caracterizarán basándose en el tamaño de las partículas, la distribución de tamaños, y el fotoblanqueo.

Caracterización de los conjugados nanopartícula-péptido

Para analizar las propiedades fotofísicas por partícula, se usará la espectrofotometría, espectrofluorimetría, y espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) multifotónica para determinar el tamaño de las partículas, el brillo, y la distribución de tamaños. Los datos de tamaños se corroborarán mediante medidas de microscopía electrónica de barrido y dispersión dinámica de luz (DLS). Ow et al. Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles. Nano Letters 2005; 5, 113. El número medio de péptidos RGD por nanopartícula y la eficacia de acoplamiento de RGD a los grupos PEG funcionalizados se estudiará colorimétricamente en condiciones alcalinas y con métodos espectrofotométricos de Biuret (λ=450 nm, absorbancia máxima).

Los conjugados de nanopartículas se yodarán por medio de ligadores de tirosina para crear una forma radiomarcada (^{124}I) ($T_{1/2}$ ~4 d) y estable (^{127}I) mediante el uso de Iodogen51 (Pierce, Rockford, IL). El producto final se purificará mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño.

Estudio de la especificidad de selección del objetivo *in vitro* y patrones de biodistribución de las nanopartículas de RGD y RGD-EPPT.

Se estudiarán los patrones de expresión de integrina $\alpha_v\beta_3$ y uMUC1 en líneas celulares de carcinoma de tiroides y de células escamosas (SCC) respecto de controles conocidos negativos para integrina $\alpha_v\beta_3$ y positivos para integrina $\alpha_v\beta_3$ (líneas celulares de melanoma humano M21-L y M21, respectivamente) y negativos para uMUC1 y positivos para uMUC1 (líneas celulares U87[28], H-29, respectivamente) mediante el uso de anticuerpos anti-integrina y anti-uMUC1. Se seleccionarán las líneas celulares que expresan niveles altos de integrina-$\alpha_v\beta_3$ y/o MUC1 para los estudios de unión diferencial con nanopartículas de RGD y RGD-EPPT, así como para la imagenología *in vivo*.

Los ensayos cuantitativos de unión celular analizarán la eficacia del marcaje de las células tumorales, y se llevarán a cabo estudios de biodistribución que ensayen la absorción en el tumor, los órganos, y los fluidos mediante el uso de conjugados de nanopartículas radioyodadas (nanopartículas de ^{124}I-RGD, nanopartículas de ^{124}I-RGD-EPPT). Para comparar los datos de absorción con PET de los conjugados de nanopartículas con los observados inicialmente mediante el uso de imagenología óptica de FIRC, cada conjugado de nanopartículas también se yodará para crear una forma radiomarcada (^{124}I) y estable (^{127}I).

Microscopía de fluorescencia con puntos de RGD y RGD-EPPT-C. La unión diferencial de nanopartículas de RGD y nanopartículas de RGD-EPPT a líneas celulares de carcinoma de tiroides/SCC que expresan niveles elevados de integrina $\alpha_v\beta_3$ y/o MUC1, frente a las líneas de control, se visualizará mediante microscopía de fluorescencia.

Modelos animales. Todos los experimentos con animales se realizarán de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales, y siguiendo las directrices del NIH para el bienestar animal.

Biodistribución *in vivo*: Se inyectarán de manera subcutánea (s.c.) a ratones atímicos (6-8 semanas de edad, n=5 por tumor) en ambos flancos tumores negativos/positivos para integrina o negativos/positivos para uMUC1/ de diferentes orígenes tisulares (n=3/cada tumor). A un diámetro de 0,5 cm (d.i.), se inyectarán de manera intravenosa (IV) a los ratones conjugados de nanopartículas marcadas con ^{124}I (~500 nm/kg). Los animales se sacrifican 0,5, 1, y 24 hrs más tarde, y se extraen los tumores, órganos, y fluidos para pesarlos y analizarlos (contador gamma). Los resultados de la biodistribución se expresarán como el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido.

Ensayo Cuantitativo de Unión Celular. La eficacia de marcaje se estudiará incubando un número fijado de células de carcinoma que expresan niveles elevados de integrina $\alpha_v\beta_3$ y/o MUC1 con concentraciones preseleccionadas de conjugados de nanopartículas marcadas con ^{124}I durante 1 hr en una atmósfera humidificada con CO_2 a 37 °C. Las células se lavan exhaustivamente, se lisan con un 0,1% de Triton X, y los lisados celulares se analizan en un contador gamma.

Estudio de las diferencias relativas en la selección específica de tumores mediante el uso de imagenología multimodal (PET-FIRC) *in vivo*.

Como herramienta de cribado de diagnóstico de alto rendimiento, se puede usar la imagenología óptica de FIRC para determinar las diferencias relativas en la biodistribución de conjugados de nanopartículas progresivamente funcionalizadas *in vivo* con una sensibilidad y resolución temporal incrementadas. También se pueden obtener datos semicuantitativos sobre la selección específica de tumores. Estos estudios preliminares facilitan la selección de líneas celulares que expresan intensamente marcadores de interés para la cuantificación detallada adicional de la biodistribución y selección específica de tumores mediante el uso de PET.

Se llevará a cabo la imagenología óptica de FIRC y microPET™ de cuerpo completo a lo largo de un periodo de 1 semana para analizar la absorción diferencial en tumores en los flancos. Los resultados de estos estudios se validarán con microscopía de fluorescencia de tumores *ex vivo*.

Imagenología de FIRC en Serie *In Vivo*. Se inyectarán a los ratones de manera bilateral células negativas para integrina $\alpha_v\beta_3$ y positivas para integrina $\alpha_v\beta_3$, o células negativas para uMUC1 y positivas para uMUC1 (n=5/tumor). Después de que los tumores alcancen ~0,5 cm de d.i., se inyectarán IV conjugados de nanopartículas yodados y no yodados estables (RGD, ^{127}I-RGD, RDG-EPPT, ^{127}I-RGD-EPPT). Se llevará a cabo la imagenología en serie mediante el uso del sistema de imagenología de fluorescencia Maestro™ *In Vivo* (CRI, Woburn, MA) a 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, y 24 hrs. A las 24 h, se sacrifican los ratones, y se diseccionan los tejidos/órganos principales, se pesan, y se colocan en placas de 6 pocillos para la imagenología *ex vivo*. La emisión de fluorescencia se analizará mediante el uso de las regiones de interés (ROIs) en los tumores, tejidos seleccionados, e inyectados de referencia, mediante el empleo de algoritmos de desmezclado espectral para eliminar la autofluorescencia. La división de las intensidades medias de fluorescencia de los tejidos por los valores de los inyectados permitirá hacer comparaciones entre los diversos tejidos/órganos para cada conjugado de nanopartículas inyectado.

Adquisición de Imágenes y Análisis con MicroPET Dinámica. Se inyectarán a dos grupos de ratones que albergan tumores (n=5/tumor) conjugados de nanopartículas radiomarcadas con ^{124}I (radiomarcadores), y se llevará a cabo la imagenología de PET dinámica durante 1 hr mediante el uso de un instrumento Focus 120 microPET™ (Concorde Microsystems, TN). Se inician adquisiciones de una hora en modo lista en el momento de la inyección IV de radiomarcadores de ~25,9 MBq (700 µCi). Los datos en modo de lista resultantes se reconstruyen en una matriz de 128x128x96 mediante retroproyección filtrada. El análisis de ROI de las imágenes reconstruidas se lleva a cabo mediante el uso del programa informático ASIPro™ (Concorde Microsystems, TN) para determinar la media y DE de la absorción de radiomarcador (%DI/g) en los tumores, otros órganos/tejidos, y el ventrículo izquierdo (VI). Se obtendrán datos adicionales a partir de imágenes estáticas en los puntos de tiempo de 24, 48, y 72 hr tras la inyección. Se usará un modelo cinético de tres compartimentos y cuatro parámetros para caracterizar el comportamiento del marcador *in vivo.* Para este análisis, se mide la entrada arterial mediante el uso de una ROI colocada sobre el VI.

Ejemplo 6 Cartografía de nódulos en minicerdos

El barrido intraoperatorio en tiempo real del lecho nodular no se puede conseguir en la práctica actualmente, ya que estos sistemas generalmente son demasiado engorrosos y caros para el uso en el quirófano, o pueden ser incapaces de proporcionar el campo de visión necesario o contraste de tejidos. Además, no hay agentes que contengan fluoróforos bioestables, clínicamente prometedores, que ofrezcan características fotofísicas mejoradas y duraciones más largas en la circulación respecto de los colorantes originales, disponibles para aumentar el contraste de tejidos para procedimientos ampliados de cartografía/extirpación nodular. Con este estudio en animales, se mostrará que los avances en las sondas de partículas multimodales y en las tecnologías de dispositivos de imagenología molecular en tiempo real se pueden traducir fácilmente en una diversidad de futuros ensayos clínicos en humanos. Tales tecnologías transformativas pueden tener un impacto significativo en la asistencia habitual intraoperatoria del cáncer proporcionando herramientas punteras de visualización selectiva para facilitar la detección de NLC metastásicos y posibilitando el trazado exacto de nódulo(s) de la anatomía adyacente para minimizar el riesgo de lesiones en estructuras cruciales. Los beneficios incluyen la cartografía intraoperatoria *in vivo* en tiempo real ampliada de la diseminación de una enfermedad nodular y de la extensión del tumor en la cabeza y el cuello. Se

pueden cartografiar nódulos profundos mediante PET, mientras se puede obtener una localización precisa y detallada de los nódulos superficiales mediante imagenología de fluorescencia en IRC. El pequeño tamaño de la sonda de partículas también puede ampliar el límite inferior de los tamaños nodulares que se pueden detectar de manera sensible. El efecto neto de la plataforma multimodal atóxica propuesta, junto con la aplicación de procedimientos combinados de diagnóstico/tratamiento, tiene implicaciones importantes para la estadificación, pronóstico, y resultado clínico para esta enfermedad tan letal.

Enfermedad Objetivo. Además de melanoma, otros diversos tumores (es decir, mama, pulmón, y cerebro) sobreexpresan receptores de integrina $\alpha_v\beta_3$, y podrían servir como enfermedades objetivo.

El melanoma metastásico tiene un pronóstico muy pobre, con una supervivencia mediana de menos de 1 año11. El tratamiento eficaz se basa en la identificación precoz, con una extirpación quirúrgica adecuada del cáncer. La eliminación quirúrgica de la enfermedad primaria, el cribado, y el tratamiento de la diseminación a los nódulos linfáticos regionales es el tratamiento de referencia en los EE.UU. para estadificar la enfermedad con exactitud y ajustar el tratamiento. Las directrices de estadificación recientemente revisadas reconocen la presencia de metástasis nodulares microscópicas como una marca distintiva de la enfermedad en estadio avanzado, que conduce a una supervivencia drásticamente reducida. El conocimiento del estado patológico nodular es crítico para la estratificación precoz del riesgo, predicciones mejoradas del resultado, y selección de subgrupos de pacientes que probablemente se beneficiarían de un tratamiento adyuvante (disección nodular terapéutica, quimioterapia) o ensayos clínicos.

Cartografía de Nódulos Linfáticos Centinela (NLC). Las técnicas de cartografía de NLC, usadas de manera rutinaria en la estadificación de melanomas, identifican el/los nódulo(s) específico(s) que tienen un riesgo más alto de metástasis tumoral. Este procedimiento identifica a los pacientes que albergan una enfermedad metastásica para el tratamiento adicional. Las técnicas que son el tratamiento de referencia se basan en la inyección de un colorante coloidal de azufre con tecnecio radiactivo (^{99m}Tc) alrededor del tumor primario para la localización de NLC, seguido del uso intraoperatorio de una sonda gamma para medir la radiactividad en las estructuras linfáticas dentro de un lecho nodular expuesto. El colorante azul inyectado alrededor del tumor primario puede ayudar a trazar el/los NLC(s) pequeños del tejido adyacente, pero la técnica es poco fiable y susceptible de complicaciones. La cartografía de NLC y las técnicas de biopsia actuales tienen limitaciones, y representan tasas mayores de ausencia de localización de NLC(s) en la cabeza y cuello en comparación con otras localizaciones anatómicas. La región de la cabeza y cuello es muy conocida por sus patrones impredecibles de enfermedad metastásica. La estrecha proximidad de la enfermedad primaria a las metástasis nodulares en esta región hace que el uso intraoperatorio de la sonda gamma sea difícil debido a la interferencia del sitio de inyección. De manera importante, la tecnología actual no permite que el cirujano visualice el nódulo centinela y lo diferencie de manera fiable de la grasa adyacente o de otros tejidos, poniendo en riesgo de lesión estructuras vitales (es decir, nervios) durante la disección para identificar y recoger este nódulo. El pequeño tamaño de los nódulos y la amplia variación de los patrones de drenaje proporciona exposiciones adicionales, que dan como resultado una tasa de ausencia de localización de alrededor del 10%.

Nanopartículas. La mayoría de los estudios preclínicos han usado radiomarcadores con péptido RGD o conjugado peptídico como ligandos de selección del objetivo para la imagenología de la expresión de integrina $\alpha_v\beta_3$. ^{18}F-galacto-RGD y ^{99m}Tc-NC100692 son marcadores peptídicos que se han usado con éxito en pacientes para diagnosticar una enfermedad. Los marcadores peptídicos se eliminan rápidamente, lo que puede dar como resultado una unión reducida a receptores y una señal de fondo incrementada por la dispersión tisular inespecífica. Estas propiedades limitan el potencial de los marcadores peptídicos para la monitorización a más largo plazo. En contraste, las sondas de nanopartículas (~10-100 nm), que también se han usado para la imagenología de la expresión de integrina en la neovasculatura tumoral, tienen semividas prolongadas en la circulación para llevar a cabo una monitorización a más largo plazo (es decir, días). Las nanopartículas en general son mayores que los anticuerpos y agentes radiofarmacéuticos (<10 kDa), y están asociadas a un transporte transmembrana más lento, una absorción incrementada en el SRE, y una absorción inespecífica incrementada debido a la permeabilidad vascular tumoral alterada. Las nanopartículas selectivas de 7 nm de diámetro usadas para este estudio de cartografía de NLC son aproximadamente comparables con el diámetro medio de una molécula de albúmina y 2-3 veces más pequeñas que el diámetro medio de un anticuerpo típico. Respecto de los marcadores peptídicos, la sonda de partículas selectivas es menos susceptible a la extravasación, y está asociada a una semivida prolongada en la circulación, lo que aumenta la selección como objetivo de los tumores. De manera importante, los puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG demuestran propiedades clave *in vitro* e *in vivo* en tumores M21, necesarias para la traducción clínica.

Materiales y Métodos.

A minicerdos Sinclair con melanoma espontáneo (10-12 kg, Sinclair Research Center, MO) se les inyectaron de manera intravenosa 5 mCi de ^{18}F-fluoro-desoxiglucosa (^{18}F-FDG) para el cribado de cuerpo completo de metástasis nodulares y/o de órganos. Se sometió a los minicerdos a un barrido de PET dinámica de cuerpo completo con ^{18}F-FDG de 1 hr mediante el uso de un escáner PET clínico 40 minutos tras la inyección para el cribado de la enfermedad metastásica, seguido de adquisición de un barrido CT para la localización anatómica. Después se inyectó a los minicerdos de manera subdérmica en un patrón de 4 cuadrantes alrededor de la localización del tumor (localizaciones de cabeza y cuello, preferentemente) puntos de ^{124}I-RGD-PEG multimodales 48 hrs tras la PET con

^{18}F-FDG, y se llevó a cabo un segundo barrido PET-CT dinámico para analizar otras metástasis nodulares.

Los minicerdos se llevaron al quirófano para la identificación de los nódulos. Se llevó a cabo la imagenología óptica de fluorescencia mediante el uso de un sistema de cámara de fluorescencia en el infrarrojo cercano de gran campo de visión, un endoscopio modificado de campo de visión más pequeño, y un estereomicroscopio modificado para obtener imágenes de fluorescencia de mayor resolución dentro del lecho quirúrgico expuesto.

La validación de la señal fluorescente se llevó a cabo de manera intraoperatoria mediante un análisis con contador gamma con un dispositivo de PET manual clínicamente aprobado dentro del lecho operatorio para localizar puntos selectivos de manera transdérmica, adquiridos intraoperatoriamente de piel y de los nódulos del interior y del lecho nodular.

Se extirpó la lesión cutánea primaria de melanoma, y se hizo una incisión para permitir el acceso a el/los nódulo(s) centinela. Se confirmó la identidad nodular mediante el uso de sistemas de imagenología de PET manual y óptica multi-escala, y se extirparon los nódulos en cuestión. Se enviaron muestras para el análisis histológico en busca de metástasis, y microscopía confocal óptica para confirmar la presencia de neoplasia maligna y fluorescencia de nanopartículas.

Tras la recogida de los nódulos centinela, se extirpó todo lecho del nódulo linfático y se analizó adicionalmente mediante el uso de métodos histológicos (con marcadores inmunohistoquímicos para melanoma, según fuera necesario), microscopía de fluorescencia, y la sonda de PET manual para fines correlativos. Esta etapa ayudó a identificar otros nódulos malignos dentro del lecho nodular, y el número de puntos de ^{124}I-RGD-PEG presentes en los nódulos adyacentes por su aspecto tras la imagenología.

Se administraron puntos de ^{124}I-RGD-PEG de manera subcutánea en las extremidades del animal secuencialmente. El tránsito de los puntos de ^{124}I-RGD-PEG a los nódulos inguinales/axilares se siguió mediante el uso del sistema de imagenología óptica y las sondas de PET manual para confirmar la duración del tránsito a lo largo de las vías linfáticas. Se expusieron quirúrgicamente los lechos nodulares de drenaje, y se observó el patrón de drenaje de los nódulos linfáticos. El nódulo linfático centinela se recogió de cada localización para confirmar la naturaleza linfática del tejido. Los animales se sacrificaron, y se extirpó cualquier lesión adicional observada tras la imagenología en la sala de necropsias de la instalación animal.

Discusión.

Un barrido mediante PET-CT con ^{18}F-fluorodesoxiglucosa (^{18}F-FDG) de cuerpo completo reveló una lesión melanomatosa primaria adyacente a la columna vertebral en la parte superior del lomo, así como un único nódulo en el cuello, en posición posterior del lado derecho del animal, y ambos mostraron avidez hacia FDG, y fueron sospechosos de enfermedad metastásica. Este hallazgo se confirmó tras la inyección subdérmica, en 4 cuadrantes, de puntos de ^{124}I-RGD-PEG alrededor de la localización del tumor, que además identificó dos nódulos hipermetabólicos más, así como los vasos linfáticos de drenaje. La interpretación final de los barridos indicaron 3 nódulos metastásicos potenciales. La extirpación quirúrgica de la lesión primaria, los nódulos hipermetabólicos, y el tejido de otros lechos nodulares del cuello de manera bilateral se llevó a cabo después de que las sondas de PET manual identificasen y confirmasen tasas de cuentas elevadas en la localización de el/los nódulo(s) centinela. La señal de fluorescencia irregular medida en el tejido de nódulos centinela posteriores derechos extirpados se correlacionó con las localizaciones de metástasis de melanoma mediante el análisis histológico. Todas las muestras nodulares hipermetabólicas se pigmentaron de color negro, y se descubrió que se correlacionaban con la presencia de diferentes agrupamientos de células de melanoma. Así, los resultados del tejido extirpado quirúrgicamente se enviaron al laboratorio de patología para la tinción con hematoxilina y eosina, y la tinción con otros marcadores de melanoma conocidos confirmó los hallazgos de la imagenología multimodal.

La Figura 13a muestra el sistema experimental del uso del modelo de melanoma espontáneo en minicerdos para la cartografía de lechos de nódulos linfáticos y los vasos linfáticos regionales que drenan la localización de un tumor de melanoma primario conocido. Este modelo en minicerdos de tamaño intermedio es necesario para simular la aplicación de los procedimientos de biopsia de nódulos linfáticos centinela (NLC) en seres humanos, y sintetiza con más exactitud la enfermedad humana. La Figura 13b muestra la imagen de PET de campo de visión pequeño 5 minutos tras la inyección subdérmica de partículas multimodales (puntos de ^{124}I-RGD-PEG) alrededor de la localización del tumor. La región del tumor, los nódulos linfáticos, y los vasos linfáticos que drenan la localización del tumor se observan como áreas de actividad incrementada (negro).

La Figura 14 muestra un barrido de PET dinámica de cuerpo completo con ^{18}F-fluorodesoxiglucosa (^{18}F-FDG) (Figura 14a) y barridos fusionados de PET-CT con ^{18}F-FDG (Figura 14b) que muestran imágenes longitudinales, frontales, y axiales a través de la localización de la enfermedad nodular en el cuello. El barrido de PET con ^{18}F-FDG se llevó a cabo para cartografiar las localizaciones de la enfermedad metastásica tras la administración intravenosa y antes de la administración de la sonda de nanopartículas radiomarcadas. Se observa un único nódulo hipermetabólico en el cuello en posición posterior en el lado derecho del animal (flechas, imágenes axiales, paneles superiores/inferiores), también identificado en la imagen del minicerdo de cuerpo completo (Figura 14c).

La Figura 15 muestra los mismos grupos de imágenes de la Figura 14, pero a nivel de la lesión de melanoma

primario, adyacente a la columna vertebral en la parte superior del lomo. Se identifica la lesión ávida de PET (flechas, imágenes axiales, paneles superiores/inferiores), así como en la imagen del minicerdo de cuerpo completo (Figura 15c).

La Figura 16 muestra una PET dinámica de alta resolución (Figura 16a) e imágenes de PET-CT fusionadas (Figura 16b) tras la inyección subdérmica, en 4 cuadrantes, de puntos de ^{124}I-RGD-PEG alrededor de la localización del tumor, que simula el protocolo clínico, a lo largo de un periodo de tiempo de 1 hora. Se hallaron tres nódulos linfáticos hipermetabólicos (flechas) en el cuello, lo que parece indicar la enfermedad metastásica. Se extirpó el NLC posterior derecho y se llevó a cabo una imagenología de fluorescencia en el infrarrojo cercano (IRC) de cuerpo completo. La señal de fluorescencia de Cy5 fue detectable dentro del nódulo extirpado (Figura 16c, superior, imagenología con Cy5) en la imagenología óptica de cuerpo completo. El análisis patológico de este nódulo pigmentado en negro (flecha, NLC) mostró agrupamientos de células de melanoma invasoras en vistas transversales de bajo aumento (flechas) y alto aumento del nódulo mediante tinción con hematoxilina y eosina (dos imágenes inferiores), y se espera que la especificidad hacia el melanoma se confirme adicionalmente mediante el uso de tinciones especiales (Melan A, HMB45, PNL2, y "antígeno asociado a melanoma", clon de BioGenex NKI/C3). Se espera además la colocalización de la partícula con estos agrupamientos metastásicos de células en la microscopía confocal de fluorescencia y autorradiografía digital de alta resolución, lo que confirmaría la detección de la enfermedad metastásica.

Ejemplo 7 Nanopartículas de sílice fluorescentes conjugadas con el péptido de selección del objetivo MC1R (modelo de melanoma)

Para los experimentos de imagenología (PET-FIRC) multimodal, se intercambiará el péptido de selección del objetivo y el radiomarcador de la superficie de las nanopartículas para determinar la especificidad hacia el objetivo, la afinidad de unión/avidez, y la sensibilidad de detección. Las nanopartículas se sintetizarán mediante el uso de radiomarcadores terapéuticos (lutecio-177, ^{177}Lu, $t^{1/2}$ = 6,65 d) para la destrucción selectiva de células de melanoma que expresan MC1R. Los hallazgos de imagenología de PET cuantitativa y óptica combinadas se correlacionarán con la autorradiografía y la imagenología óptica del tejido tumoral en escalas espaciales. Para la microscopía celular, se usará un escáner confocal de fluorescencia *in vivo* para la imagenología de reflectancia y de fluorescencia combinadas.

Ejemplo 8 Nanopartículas fluorescentes para radioterapia selectiva

Se llevarán a cabo estudios de aumento de la dosis con nanopartículas de ^{131}I-RGD y se monitorizará la respuesta al tratamiento semanalmente, a lo largo de seis semanas, mediante el uso de ^{18}F-FDG PET. Se llevarán a cabo ensayos de absorción tumoral dependiente del tiempo y dosimetría de la plataforma de nanopartículas mediante el uso de la imagenología con cámara gamma planar. Los datos de imagenología *in vivo* se correlacionarán con el análisis con contador gamma de las muestras tumorales extirpadas.

Se usarán ratones atímicos macho (6-8 semanas, Charles River Labs, MA) para generar modelos de xenoinjertos en las patas posteriores tras la inyección de células de melanoma M21 humanas ($5x10^5$ en PBS). Los tumores se dejarán crecer 10-14 días hasta un tamaño de 0,5-0,9 cm^3.

Estudios de radioterapia selectiva basada en ^{131}I. Se usará el radionúclido terapéutico ^{131}I como radiomarcador para la radioterapia selectiva. Para estimar la dosis de ^{131}I más alta posible que no da como resultado muertes de animales y una pérdida de peso menor del 20% (MTD), se llevará a cabo un estudio de aumento de la dosis en ratones atímicos que albergan tumores. Para una dosis de 200 rad en la sangre54, es necesaria una actividad administrada de 10 MBq, que administraría una dosis de 270 rad al tumor. Se administrarán 4 dosis de 10 MBq cada una para alcanzar una dosis en el tumor mayor de 1000 rad con un fraccionamiento de la dosis diseñado para permitir la reparación y conservación de la médula ósea. ^{131}I permite la imagenología con cámara gamma planar mediante el uso de un colimador de orificio para medir la absorción tumoral dependiente del tiempo y la dosimetría de las nanopartículas. La PET con ^{18}F-FDG permite la monitorización cuantitativa de la respuesta tumoral, lo que proporciona información complementaria.

Basándose en estos datos, y los datos *in vivo* sobre el efecto de las nanopartículas cargadas con paclitaxel, se llevará a cabo un estudio de terapia con el conjugado de nanopartículas de ^{131}I-RGD. Dos grupos de ratones que albergan tumores (n = 10 por grupo) recibirán cuatro actividades de 10,4 MBq una vez por semana durante 4 semanas, de conjugados de nanopartículas de ^{131}I-RGD administradas i.v. o vehículo de solución salina (control, n=10), y se monitorizarán a lo largo de un periodo de 6 semanas. Se cuantificará la respuesta al tratamiento/progresión basándose en el volumen tumoral (medido con un calibre). Todos los ratones de los grupos de tratamiento también se someterán a la imagenología una vez por semana (sesiones de ~1 hr) mediante imagenología de SPECT (Gamma Medica) a lo largo de un periodo de 6 semanas.

Adquisición y Análisis de la Imagenología de PET con ^{18}F-FDG. Dos grupos de ratones que albergan tumores (n=10/grupo) se someterán a un barrido de PET inicial antes, y después semanalmente, tras el tratamiento a lo largo de un intervalo de 6 semanas. Se inyectarán de manera intravenosa (i.v.) a los ratones 500 µCi de ^{18}F-FDG, y se adquirirán imágenes de PET de 10 minutos estáticas mediante el uso de un instrumento de microPET™ Focus 120

(Concorde Microsystems, TN) antes y tras el tratamiento. Los datos adquiridos se reconstruirán en una matriz de 128x128x96 mediante retroproyección filtrada. Se llevarán a cabo análisis de la región de interés (ROI) de las imágenes reconstruidas mediante el uso del programa informático ASIPro™ (Concorde Microsystems, TN) para determinar la media y DE de la absorción de radiomarcador (%DI/g) en los tumores. Los animales se sacrificarán al final del estudio, y los tumores se extirparán para el análisis con contador gamma.

Ejemplo 9 Nanopartículas fluorescentes conjugadas con quelato de radionúclido y péptido de selección MC1R

Las nanopartículas PEGiladas se conjugarán con péptidos de selección del objetivo y quelatos macrocíclicos unidos a radiomarcadores de elevada actividad específica.

Se unirán PEGs de pureza elevada de dos brazos activados, comercialmente disponibles, derivatizados con ésteres de NHS o maleimida, a la cubierta de sílice de la nanopartícula mediante el uso de procedimientos habituales. Uno de los dos grupos de PEG funcionalizados (ésteres de NHS o maleimida) estarán disponibles para la conjugación adicional con los agentes quelantes ligadores de construcción péptido-quelato, péptido cíclico Re-[Cys3,4,10,D-Phe7]α-MSH3-13 (ReCCMSH(Arg11)), o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-*N*,*N'*,*N''*,*N'''*-tetraacético (DOTA). La unión covalente de los PEGs derivatizados a la superficie de las nanopartículas se llevará a cabo de tal manera que se expongan los diferentes grupos funcionales para unir DOTA y las construcciones péptido-quelato, como se discute más adelante.

Síntesis y caracterización fisicoquímica de las nanopartículas funcionalizadas.

Se sintetizarán nanopartículas funcionalizadas estableciendo uniones covalentes de los siguientes restos con los grupos derivatizados de PEG:

(A) Quelatos DOTA para el radiomarcaje posterior de actividad específica elevada con radiometales emisores de positrones (es decir, ^{64}Cu) para permitir la detección diagnóstica con la imagenología de PET. DOTA se conjugará con los PEGs funcionalizados mediante el uso de la química Fmoc estándar, y se llevará a cabo la purificación de las nanopartículas queladas mediante cromatografía. Se unirán ^{64}Cu y ^{177}Lu a DOTA mediante la incubación de la mezcla de reacción a 60° C durante 30 min, seguido de filtración en gel o purificación mediante cromatografía líquida a alta presión. De manera alternativa, se pueden conjugar núclidos de PET, tales como ^{124}I, ^{86}Y, ^{68}Ga y ^{89}Zr, a la nanopartícula, por medio del PEG funcionalizado con DOTA (radiometales) o del PEG funcionalizado con tirosina (^{124}I). El emisor monofotónico, ^{177}Lu, obtenido en forma de $^{177}LuCl_3$, se complejará con DOTA para la radioterapia.

(B) El análogo de péptido de selección como objetivo de melanomas αMSH (ReCCMSH(Arg11)) se cicla con renio. Es necesario confirmar la proporción de quelatos de DOTA respecto de los restos ReCCMSH(Arg11) en la superficie de las nanopartículas PEGiladas.

La caracterización de las preparaciones de nanopartículas funcionalizadas se llevará a cabo como sigue:

(A) Se determinará el número medio de quelatos de DOTA por nanopartícula mediante ensayos de dilución isotópica estándar con ^{64}Cu. Brevemente, se añadirá ^{64}Cu a disoluciones que contienen una cantidad conocida de nanopartículas de ReCCMSH(Arg11). Las disoluciones incubadas se depositarán en puntos sobre placas de vidrio revestidas de gel de sílice, se desarrollarán en 1:1 de acetato de amonio del 10%-metanol (con EDTA), y se analizarán mediante radio-CCF. Mientras las nanopartículas de ReCCMSH(Arg11) marcadas con ^{64}Cu permanecerán en el origen, el ^{64}Cu unido a EDTA migrará. La eficacia del marcaje en porcentaje se representará frente a los nanomoles totales de ^{64}Cu añadidos a la mezcla de reacción. El número de quelatos unidos por nanopartícula se puede determinar a partir del punto de inflexión de esta curva.

(B) Se analizará el número medio de péptidos ReCCMSH(Arg11) por nanopartícula y la eficacia de acoplamiento de ReCCMSH(Arg11) a los grupos de PEG funcionalizados mediante el uso de métodos espectrofotométricos (λ=435 nm, absorbancia máxima) y del coeficiente de extinción conocido de ReCCMSH(Arg11). La incorporación de renio ofrece la ventaja de que se pueden hacer medidas de absorbancia muy sensibles de las concentraciones de renio en una pequeña muestra de producto.

Imagenología óptica-PET *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas multifuncionales en modelos de melanoma para estudiar la selección específica de tumores y la respuesta al tratamiento.

Las nanopartículas de ^{64}Cu-DOTA-ReCCMSH(Arg11) se compararán con la construcción nativa de ^{64}Cu-DOTA-ReCCMSH(Arg11) para ensayar la capacidad de selección del objetivo de las nanopartículas.

Ensayos de unión competitiva. Se usarán las líneas de melanoma murino B16/F1 positivas para el receptor MC1R. Se determinarán los valores de CI_{50} del péptido ReCCMSH(Arg11), la concentración de péptido necesaria para inhibir un 50% la unión del radioligando, mediante el uso de ^{125}I-(Tyr2)-NDP7, un análogo de α-MSH radioyodado con una afinidad picomolar hacia MC1R. Se incubarán pocillos individuales a 25 °C durante 3 h con aproximadamente 50.000 cpm de ^{125}I-(Tyr2)-NDP en 0,5 ml de medio de unión con 25 mmol/L de ácido N-(2-hidroxietil)-piperazin-N-(2-etanosulfónico), 0,2% de BSA y 0,3 mmol/L de 1,10-fenantrolina, con concentraciones de (Arg11)CCMSH que oscilarán de 10-13 a 10-5 mol/L. Se recogerá por separado la radiactividad en las células y los

medios y se medirá, y los datos se procesarán para calcular el valor de CI_{50} del péptido Re(Arg11)CCMSH con el paquete informático Kell (Biosoft, MO).

Ensayo de Cuantificación de Receptores. Se añadirán alícuotas de $5x10^5$ células B16/F1 a los pocillos, se cultivarán en 200 µL de medio RPMI, y se incubarán a 37 °C durante 1,5 h en presencia de concentraciones crecientes de ^{125}I-(Tyr2)-NDP (de 2,5 a 100 nCi) en 0,5 mL de medio de unión (MEM con HEPES 25 mM, pH 7,4). Las células se lavarán con 0,5 mL de 0,2% de BSA/PBS 0,01 M helado, de pH 7,4, dos veces, y el nivel de actividad asociado a la fracción celular se medirá en un contador γ. La unión inespecífica se determinará incubando las células y ^{125}I-(Tyr2)-NDP con NDP no radiactivo a una concentración final de 10 µM. Se obtendrán las representaciones de Scatchard representando la proporción de unión específica a ^{125}I-(Tyr2)-NDP libre frente a la concentración de unión específica (fmol/millones de células); *B*max, el número máximo de sitios de unión, es la intersección en *X* de la recta de regresión lineal.

Se inyectarán de manera subcutánea líneas de melanoma murino B16/F1 ($5×10^5$ en PBS) en las patas traseras de ratones atímicos macho (6-8 semanas de edad). Los tumores se dejarán crecer 10-14 días hasta un tamaño de 0,5-0,9 cm^3.

Biodistribución: Se inyectará de manera intravenosa una pequeña cantidad del conjugado de nanopartículas de ^{64}Cu-DOTA-ReCCMSH(Arg11) (~10 µCi, 0,20 µg) en cada uno de los ratones que albergan tumores B16/F1 palpables. Los animales se sacrificarán en momentos seleccionados tras la inyección (2, 4, 24, 48, 72 horas; n = 4-5/punto de tiempo) y los tejidos deseados se extraerán, se pesarán, y se contará la radiactividad acumulada. Los ratones adicionales (n=5) a los que se les inyectará la construcción radiomarcada nativa, ^{64}Cu-DOTA-ReCCMSH(Arg11) (~10 µCi, 0,20 µg), servirán como grupo de control, y se analizarán 1 h tras la inyección. Para examinar la especificidad de absorción *in vivo*, se pre-inyectarán a un grupo adicional de ratones (punto de tiempo de 2 h) 20 µg de NDP para que actúe como bloqueador de receptores inmediatamente antes de la inyección del conjugado de nanopartículas de ^{64}Cu-DOTA-ReCCMSH(Arg11). Se pesarán los órganos y tejidos principales y se analizarán con un contador gamma, y se determinará la dosis inyectada en porcentaje por gramo (%DI/g).

Imagenología de FIRC en Serie *In Vivo*. En paralelo con los estudios de PET siguientes, se llevará a cabo una FIRC (imagenología de tomografía de fluorescencia, FMT 225, Visen, Woburn, MA) mediante el uso de un haz láser en IRC de barrido de 680 nm ajustable y CCD antes y después de la inyección i.v. en animales que albergan tumores (n=10). Los ratones se mantendrán bajo anestesia continua con isoflurano, y se colocarán en un casete de imagenología multimodal portátil (compatible con microPET FMT 2500 y Focus 120) para el barrido de FMT antes y después de la inyección (1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 y 72 horas). La imagen de fluorescencia en IRC, medida a lo largo de un periodo de 1-10 minutos, se reconstruirá mediante el uso del programa informático patentado Visen y se superpondrá sobre una fotografía normal del ratón. Los datos de la imagenología son cuantitativos, ya que la intensidad medida está directamente relacionada con la concentración de fluoróforo de IRC, lo que permite generar mapas paramétricos de las concentraciones absolutas de fluoróforo para el co-registro con los datos de imagenología de PET adquiridos.

Adquisición de Imágenes y Análisis con PET Dinámica. Se colocarán dos grupos de ratones que albergan tumores (n=5/grupo) en el casete de imagenología para co-registrar estudios de PET-ópticos secuenciales. A los ratones se les inyectarán de manera intravenosa (i.v.); a uno, conjugados de nanopartículas de ^{64}Cu-DOTA-ReCCMSH(Arg11) radiomarcadas, y al segundo, construcciones nativas de ^{64}Cu-DOTA-ReCCMSH(Arg11). Tras la inyección, se adquirirán imágenes de PET dinámicas durante 1 hr mediante el uso de un instrumento microPET™ Focus 120 (Concorde Microsystems, TN). Se inician adquisiciones en modo lista de una hora en el momento de la inyección IV de la sonda radiomarcada (~1 mCi). Los datos en modo de lista resultantes se reconstruirán en una matriz de 128x128x96 mediante retroproyección filtrada. Los análisis de la región de interés (ROI) de las imágenes reconstruidas se llevan a cabo mediante el uso del programa informático ASIPro™ (Concorde Microsystems, TN) para determinar la media y DE de la absorción de radiomarcador (%DI/g) en los tumores, otros órganos/tejidos, y el ventrículo izquierdo (VI). La modelización de los datos de la cinética del marcador permitirá la estimación de los parámetros farmacocinéticos, que incluyen la administración, el aclaramiento, y el volumen de distribución. Como se indicó, la entrada de sangre arterial se mide mediante el uso de una ROI colocada sobre el VI (como medida de la actividad en la sangre). Se obtendrán datos adicionales a partir de imágenes estáticas en los puntos de tiempo de 24 hr, 48 hr, y 72 hr tras la inyección.

Microscopía de fluorescencia y autorradiografía de tejidos. Se utilizará una combinación de tecnologías de imagenología óptica que exhiba escalas espaciales progresivamente más pequeñas (es decir, imagenología de fluorescencia de cuerpo completo, microscopía de fluorescencia, y microscopía de barrido láser confocal de fluorescencia *in vivo*) para la imagenología de tumores en animales vivos e intactos 72 h tras la inyección. Los ratones se mantendrán bajo anestesia continua con isofluorano, por lo que se posibilitará la detección y localización de la señal de fluorescencia desde el nivel de animal completo/órgano hasta el nivel celular a lo largo de un intervalo de aumentos. Se llevará a cabo la imagenología de un animal completo/macroscópica con un estereomicroscopio de fluorescencia (Visen; Nikon SMZ1500) equipado con filtros de fluorescencia de Cy5 y cámaras CCD. Se desarrollará la capacidad de la microscopía de barrido láser confocal de fluorescencia. Los ratones se sacrificarán posteriormente para realizar la autorradiografía para cartografiar las biodistribuciones del marcador a alta resolución en todo el volumen del tumor. Los tumores se extirparán, se congelarán súbitamente, se cortarán en serie (cortes de 10 µm) y

se montarán en un portaobjetos, con cortes alternantes colocados en contacto con una placa de fósforo en un casete opaco (hasta 1 semana). La tinción con hematoxilina y eosina se llevará a cabo en los cortes consecutivos restantes. Los hallazgos autorradiográficos se correlacionarán con los datos de la imagenología de PET y los resultados histológicos.

Se pueden usar de manera alternativa los radionúclidos terapéuticos ^{177}Lu o ^{90}Y para la radioterapia selectiva. Para estimar la dosis de ^{177}Lu más alta posible que no da como resultado muertes de animales y una pérdida de peso menor del 20% (MTD), se llevará a cabo un estudio de aumento de la dosis en ratones atímicos que albergan tumores. Se estudiarán las dosis de compuestos radiofarmacéuticos que se sospecha que están en (o cerca de) la MTD basándose en los valores de la bibliografía para ^{177}Lu.

Ejemplo 10 Nanopartículas fluorescentes funcionalizadas para conjugarlas con un ligando y un agente de contraste por medio de la "química click"

Síntesis de nanopartículas que contienen grupos funcionales versátiles para la conjugación posterior del ligando (p.ej., péptidos) y el agente de contraste (p.ej., radionúclidos).

Para sintetizar una matriz de construcciones de nanopartícula-péptido-quelato adecuadas para el radiomarcaje de actividad específica elevada, se puede usar una aproximación de "química click" para funcionalizar la superficie de la nanopartícula (Figura 17). Este método se basa en la cicloadición catalizada por cobre de una azida a un triple enlace. Tal aproximación permitiría una gran versatilidad para explorar las aplicaciones multimodales.

Síntesis y caracterización de nanopartículas. Los grupos de PEG que se unirán de manera covalente se producirán siguiendo el esquema de la Figura 14. Se unirá PEG de manera covalente a la nanopartícula por medio del grupo silano. Se usarán rutas químicas estándar para la producción del PEG funcionalizado con triples enlaces.

Funcionalización de nanopartículas con triples enlaces. Para sintetizar los PEGs bifuncionalizados, la primera etapa empleará la reacción muy estudiada de éster carboxílico activado con amina alifática (Figura 18). De manera alternativa, se puede usar otra amina adecuada que alberga un triple enlace, por ejemplo, p-aminofenilacetileno. La segunda etapa de la síntesis también se basa en una reacción de conjugación muy conocida.

Síntesis y caracterización fisicoquímica de nanopartículas funcionalizadas conjugadas con péptidos modelo y quelatos.

La nanopartícula funcionalizada contiene (A) desferrioxamina B (DFO) para el radiomarcaje posterior de actividad específica elevada con el emisor de positrones zirconio 89 (^{89}Zr) y (B) el péptido de selección del objetivo SSTR, octreotato.

Síntesis de DFO con un enlace azida. Se producirá DFO con un grupo azida mediante la reacción de DFO-B con ácido *p*-azido benzoico) (Figura 19) y se purificará. La reacción de "química click" es una cicloadición 1,3-dipolar a temperatura ambiente, y las condiciones se denominan a menudo "Condiciones de Huisgen". Aunque las reacciones se pueden completar en general a temperatura ambiente en etanol, puede ser adecuado calentar la reacción. El catalizador a menudo es Cu(I)Br, pero las alternativas incluyen Cu(I)I o Cu(II)SO_4 (con un reductor). Knor et al. Synthesis of novel 1,4,7,10-tetraazacyclodecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) derivatives for chemoselective attachment to unprotected polyfunctionalized compounds. Chemistry, 2007;13:6082-90. Las reacciones de química click también se pueden llevar a cabo en ausencia de catalizador. De manera alternativa, el grupo NH^{3+} de DFO-B se puede convertir directamente en un grupo azida.

Síntesis de Tyr3-octreotato con una azida. La síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) de Tyr3-octreotato (Figura 20A) se llevará a cabo en un sintetizador de péptidos. Brevemente, la síntesis implicará el método Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) como se describió previamente para este péptido. Brevemente, el protocolo del instrumento requiere 25 µmol de aminoácidos protegidos con Fmoc posteriores activados mediante una combinación de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU). Los aminoácidos protegidos con Fmoc se adquirirán comercialmente, a menos que se indique de otra manera; los aminoácidos pre-envasados se obtendrán de Perkin-Elmer (Norwalk, CT), mientras los que no estén disponibles en forma pre-envasada, tales como los D-aminoácidos y Fmoc-Cys(Acm), los suministrará BACHEM Bioscience, Inc. (King of Prussia, PA) o Novabiochem (San Diego, CA). El grupo azida (para la química "click") se introducirá en el esqueleto peptídico por medio del acoplamiento de un ácido que contiene azida en el extremo N-terminal del péptido, mientras el péptido todavía está protegido y unido a la resina (Figura 20B).

Síntesis de nanopartículas funcionalizadas. La siguiente etapa será conjugar el DFO que tiene un enlace azida y el Tyr3-octreotato que tiene un enlace azida (Figuras 21A y B) a la nanopartícula. La "química click" es muy selectiva, cuantitativa y se puede llevar a cabo muy rápido y mediante el uso de condiciones suaves. El número de grupos azida combinados de DFO y Tyr3-octreotato se controlará para no superar nunca el número de triples enlaces disponibles; los triples enlaces estarán siempre en un exceso <5%.

Caracterización de las nanopartículas funcionalizadas. Se determinará el número medio de péptidos con quelatos DFO por nanopartícula llevando a cabo un ensayo de dilución isotópica estándar con ^{89}Zr (o ^{68}Ga). Se producirá ^{89}Zr

en un ciclotrón y se purificará. Brevemente, se añadirán 10 concentraciones de oxalato de ^{89}Zr a disoluciones que contienen una cantidad conocida de nanopartículas derivatizadas con DFO. Después de una incubación a temperatura ambiente de 30 min., las disoluciones se depositarán en puntos sobre placas de vidrio revestidas de gel de sílice, se desarrollarán en 1:1 de acetato de amonio del 10%-metanol (con EDTA) y se analizarán mediante radio-CCF. Mientras las nanopartículas derivatizadas con ^{89}Zr-DFO permanecerán en el origen, el ^{89}Zr unido de manera inespecífica a EDTA migrará. La eficacia de marcaje en porcentaje se representará como una función de los nanomoles totales de ^{89}Zr añadidos a la mezcla de reacción. El número de quelatos unidos a la nanopartícula se puede determinar entonces a partir del punto de inflexión de esta curva.

El número medio de péptido Tyr3-octreotato por nanopartícula se determinará ensayando el puente disulfuro de Tyr3-octreotato. Brevemente, los enlaces disulfuro del Tyr3-octreotato se pueden escindir cuantitativamente mediante sulfito sódico en exceso a pH 9,5 y temperatura ambiente. Se puede usar DTNB o reactivo de Elman para cuantificar tioles en proteínas mediante medidas de absorción. Forma fácilmente un disulfuro mixto con los tioles, lo que libera el cromóforo de ácido 5-mercapto-2-nitrobenzoico (máximo de absorción 410 nm). Solamente se modifican los tioles proteicos que son accesibles a este reactivo hidrosoluble. De manera alternativa, se puede usar el kit de ensayo Measure-iT™ Thiol de Invitrogen.

Ensayo *in vivo* en modelos adecuados de tumores.

Se generarán modelos de xenoinjerto subcutáneo mediante el uso de ratones SCID hembra que albergan tumores AR42J. Brevemente, se inyectarán de manera subcutánea células AR42J ($1X10^7$) en los flancos de ratones SCID hembra. Los tumores se dejarán crecer 10-12 días hasta un tamaño de 0,5-0,9 cm.

Se espera que el radiomarcaje de la nanopartícula de DFO con ^{89}Zr se desarrolle en <15 min. a temperatura ambiente. El ^{89}Zr unido de manera inespecífica se eliminará mediante la adición de EDTA, seguida de una etapa de filtración en gel.

Ensayos de unión a receptores. Los ensayos de unión a receptores se llevarán a cabo mediante el uso de nanopartículas de ^{89}Zr-DFO en membranas obtenidas de tumores AR42J. Los ligandos competitivos, las nanopartículas de natZr-DFO y natZr-DFO-octreotato se prepararán mediante la reacción de oxalato de circonio natural de pureza elevada con DFO-octreotato y nanopartículas de DFO, respectivamente. La pureza de los productos finales se confirmará mediante HPLC. Los valores de CI50 se determinarán según métodos publicados previamente, mediante el uso del sistema de ensayo MultiScreen de Millipore (Bedford, MA). El análisis de los datos se llevará a cabo mediante el uso de los programas GraFit (Erithacus Software, R.U.), LIGAND (NIH, Bethesda, MD), y GraphPad PRISM™ (San Diego, CA).

Ensayos *in vitro*. Las células AR42J se recogerán de monocapas con disolución de disociación celular (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y se resuspenderán en medio DMEM nuevo a una concentración de 2×10^6 células/mL. Se añadirá una alícuota de alrededor de 0,3 pmol de nanopartículas de ^{89}Zr-DFO a 10 mL de células, y se incubará a 37 °C con agitación continua. Tras 1, 5, 15, 30, 45, 60 y 120 min se extraerán alícuotas de 200 µL por triplicado y se colocarán en hielo. Las células se aislarán inmediatamente mediante centrifugación, y se calculará el % de absorción del compuesto en las células.

Biodistribución. Se inyectará de manera intravenosa una pequeña cantidad de las nanopartículas de ^{89}Zr-DFO (~10 µCi, 0,20 µg) a cada uno de los ratones que albergan tumores palpables AR42J positivos. Los animales se sacrificarán en momentos seleccionados tras la inyección (1, 4, 24, 48, 72 horas; n = 4-5) y los tejidos deseados se extraerán, se pesarán, y se contará la acumulación de radiactividad. Se estudiarán dos grupos de control adicionales 1 h tras las inyecciones: (A) ratones con inyección del péptido radiomarcado nativo ^{89}Zr-DFO-octreotato (~10 µCi, 0,20 µg), y (B) ratones con preinyección de un bloqueo de Tyr3-octreotato (150 µg) para demostrar la acumulación mediada por receptor de las nanopartículas de ^{89}Zr-DFO. Se analizarán con un contador los tejidos, que incluyen sangre, pulmón, hígado, bazo, riñón, glándulas suprarrenales (positivas para STTR), músculo, piel, grasa, corazón, cerebro, hueso, páncreas (positivo para STTR), intestino delgado, intestino grueso, y tumor AR42J. Se calculará el porcentaje de dosis inyectada por gramo (%DI/g) y el porcentaje de dosis inyectada por órgano (%DI/órgano) mediante la comparación con una disolución patrón pesada y contada.

Imagenología de FIRC *in vivo*. Se llevará a cabo la imagenología en serie mediante el uso del sistema de imagenología de fluorescencia Maestro™ *In Vivo* (CRI, Woburn, MA) a 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 y 72 hrs. A las 72 hr, se sacrificarán los ratones, y se diseccionarán los tejidos/órganos principales, se pesarán, y se colocarán en placas de 6 pocillos para la imagenología *ex vivo*. La emisión de fluorescencia se analizará mediante el uso de las regiones de interés (ROIs) en los tumores, tejidos seleccionados, e inyectados de referencia, mediante el empleo de algoritmos de desmezclado espectral para eliminar la autofluorescencia. Se realizarán las medias de las intensidades de fluorescencia y las desviaciones estándar (DE) para grupos de 5 animales. La división de las intensidades medias de fluorescencia de los tejidos por los valores de los inyectados permitirá hacer comparaciones entre los diversos tejidos/órganos para cada conjugado de nanopartículas inyectado.

Imagenología de PET de animales pequeños *in vivo*. Se llevará a cabo la imagenología de PET de animales pequeños en un sistema microPET®-FOCUS™ (Concorde Microsystems Inc, Knoxville TN). Se anestesiarán ratones

que albergan los tumores AR42J (n = 5 por grupo) con 1-2% de isoflurano, se colocarán en posición de decúbito supino, y se inmovilizarán en un soporte preparado a medida. Los ratones recibirán 200 µCi del complejo de nanopartículas de ^{89}Zr-DFO-octreotato por medio de la vena de la cola, y se someterán a la formación de imágenes uno al lado del otro. Los animales se someterán inicialmente a la imagenología adquiriendo múltiples barridos sucesivos de 10 minutos continuamente desde el momento de la inyección a lo largo de un periodo de tiempo de 1 hr, seguido de adquisiciones de datos estáticas de 10 min a las 2, 4, 24, 48 y 72 hrs tras la inyección. Se generarán los valores de absorción estándar (SUVs) de las regiones de interés (ROIs) dibujadas sobre el tumor y otros órganos de interés. El co-registro de las imágenes de PET se realizará en combinación con una cámara microCAT-II (Imtek Inc., Knoxville, TN), lo que proporciona imágenes anatómicas de rayos X y CT de alta resolución. El registro de imágenes entre las imágenes de microCT y PET se llevará a cabo mediante el uso de una técnica de registro de puntos de referencia y el programa informático de visualización de imágenes AMIRA (AMIRA, TGS Inc, San Diego, CA). El método de registro se desarrolla mediante la transformación rigurosa de las imágenes de microCT de los puntos de referencia proporcionados por los marcadores de referencia unidos directamente al lecho del animal.

Medidas farmacocinéticas. Los datos de biodistribución y PET dinámica proporcionarán la concentración temporal de nanopartícula de ^{89}Zr-DFO-octreotato en el tejido, lo que permitirá la caracterización de los parámetros farmacocinéticos del agente.

Microscopía de fluorescencia y autorradiografía de tejidos *ex vivo.* Se llevará a cabo la localización de los conjugados de nanopartículas en los tejidos en cortes congelados. La imagenología de microPET permitirá analizar completamente la distribución global en los tumores y otros tejidos no seleccionados como objetivo. Tras la etapa aguda del ensayo de imagenología, también se llevará a cabo una autorradiografía en los tumores, y estos datos se correlacionarán con la imagenología de PET y los resultados histológicos. Se tomarán cortes consecutivos (~10 µm), alternando los cortes para la autorradiografía y para el análisis histológico. Estos cortes también se analizarán mediante microscopía de fluorescencia multicanal en el canal del IRC.

Ejemplo 11 Estudios de interiorización de partículas

El objetivo de este estudio es determinar la unión e interiorización de las presentes nanopartículas para estudiar su localización en los orgánulos subcelulares y la exocitosis. Esto ayudará a estudiar el destino de las partículas funcionalizadas con diferentes restos selectivos y agentes terapéuticos unidos. Por ejemplo, nanopartículas de diagnóstico (p.ej., nanopartículas revestidas de PEG no selectivas frente a las revestidas de cRGD-PEG) y nanopartículas terapéuticas (p.ej., nanopartículas de cRGD-PEG unidas a yodo para la radioterapia, unidas a inhibidores de tirosina quinasa, o unidas a fármacos quimioterápicos tales como Taxol).

Materiales y Métodos.

Estudios de interiorización/absorción. Se llevaron a cabo ensayos de interiorización y estudios de colocalización para identificar rutas de absorción específicas.

Se colocaron en placas células de melanoma, que incluyen células M21 humanas y B16 de ratón (~2x10^5 células/pocillo), en portaobjetos con cámaras de 8 pocillos (1,7 cm^2/pocillo) o placas de 24 pocillos (1,9 cm^2/pocillo) con un cubreobjetos de vidrio redondo de 12 mm y se incubaron a 37 °C durante la noche. Para monitorizar la interiorización selectiva de nanopartículas, las células se incubaron con puntos de cRGD-PEG (0,075 mg/ml) durante 3 hrs a 37 °C. Para eliminar las partículas sin unir del medio, se lavaron las células dos veces con PBS. Se llevó a cabo microscopía confocal en un microscopio confocal invertido Leica (Leica TCS SP2 AOBS) equipado con un objetivo HCX PL APO: 63x 1.2NA Water DICD para estudiar la colocalización de puntos de cRGD-PEG con anticuerpos o tinciones específicas de orgánulos. Las imágenes se analizaron mediante el uso del programa informático ImageJ, versión 1.37 (NIH Image; http://rsbweb.nih.gov/ij/).

Ensayos de colocalización/marcadores unidos a colorante. Para identificar las vesículas endocíticas implicadas en la interiorización de puntos C, se llevaron a cabo ensayos de colocalización en células vivas mediante el uso de marcadores unidos a colorante. Las células se coincubaron con diferentes nanopartículas y colorantes. Los colorantes incluyen: Lysotracker Red 100 nM durante 30 min para marcar orgánulos ácidos a lo largo de la ruta endosómica; 2 µg/mL de conjugado transferrina-Alexa 488 para marcar los endosomas de reciclado y clasificación (ruta dependiente de clatrina); 1 mg/mL de conjugado de dextrano de 70 kDa-FITC a 37 °C durante 30 min para marcar los macropinosomas.

Anticuerpos de colocalización/específicos de orgánulo. Se llevará a cabo una inmunocitoquímica con marcadores conocidos para el aparato de Golgi y los lisosomas. Para el aparato de Golgi, se usará *Giantina* (Abcam, policlonal de conejo, 1:2000) para las células humanas; se usará GM-130 (BD Pharmingen, 1 µg/ml) para las células de ratón. Para los lisosomas, se usará *LC3B* (Cell Signaling, policlonal de conejo, 0,5 µg/ml).

Para la tinción con Giantina o LC3B, las células se bloquearán durante 30 minutos en un 10% de suero de cabra normal/0,2% de BSA en PBS. La incubación con el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal anti-Giantina de conejo (catálogo de Abcam, nº ab24586, dilución 1:2000) o LC3B (Cell Signaling, cat. nº 2775, 0,5 µg/ml) se realizará durante 3 horas, seguida de una incubación de 60 minutos con anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo biotinilado (Vector labs, cat. nº PK6101) en una dilución 1:200. La detección se llevará a cabo con un bloqueante de anticuerpo

secundario, bloqueante D, estreptavidina-HRP D (Ventana Medical Systems) y el kit de detección DAB (Ventana Medical Systems) según las instrucciones del fabricante.

Para la tinción con GM-130, las células se bloquearán durante 30 min en reactivo de bloqueo de IgG de ratón (Vector Labs, cat. nº: MKB-2213) en PBS. La incubación con anticuerpo primario (anti-GM130 monoclonal, de BD Pharmingen; cat. nº 610822, concentración 1 µg/mL) será realizará durante 3 horas, seguida de una incubación de 60 minutos con anticuerpo secundario de ratón biotinilado (Vector Labs, MOM Kit BMK-2202), en una dilución 1:200. La detección se llevará a cabo con un bloqueante de anticuerpo secundario, bloqueante D, estreptavidina-HRP D (Ventana Medical Systems) y el kit de detección DAB (Ventana Medical Systems) según las instrucciones del fabricante.

Para los estudios dependientes de la temperatura, las nanopartículas se incubarán con nanopartículas de cRGD-PEG a 4 °C, 25 °C, y 37 °C para analizar la fracción de partículas unidas a la superficie frente a las interiorizadas.

Para los estudios de exocitosis, se incubarán las nanopartículas (0,075 mg/ml) durante 4 horas y los portaobjetos con cámaras se lavarán con PBS, seguido de la adición de medios nuevos. A intervalos de tiempo de 0,5, 1,0, 1,5, 2,5, 4,5, 8,0 hrs, se lavarán las células, se tripsinizarán, y se medirá la señal de fluorescencia de las células y los medios mediante fluorimetría. En los estudios de dosis-respuesta, las células se incubarán a lo largo de un intervalo de concentraciones y tiempos de incubación, y se ensayarán mediante el uso de citometría de flujo. En los estudios de viabilidad, se medirá la viabilidad de las células mediante el uso de un ensayo de exclusión de azul tripán antes y después de la incubación para analizar la toxicidad. En los estudios de periodo de tiempo, se investigará el mecanismo de interiorización de las nanopartículas en células vivas después de incubar las células con conjugados de nanopartículas a diferentes temperaturas de incubación (4 °C, 25 °C, y 37 °C) mediante el uso de un microscopio confocal invertido a lo largo de un periodo de 12 hr a intervalos de 20 min.

Discusión.

Se descubrió que los puntos de cRGD-PEG y los puntos de PEG se colocalizan con Lysotracker Red en las células M21 y B16, lo que sugiere la absorción en la ruta endosómica (Figura 22). Los datos mostraron que estas partículas se colocalizan claramente con transferrina y dextrano. Independientemente de la funcionalidad de la superficie y de la carga total, las nanopartículas (6-7 nm de diámetro hidrodinámico) estudiadas parecen seguir la misma vía. La imagenología en un periodo de tiempo en ambos tipos celulares demostró la interiorización de las nanopartículas funcionalizadas dentro de una pequeña fracción de las células colocadas en las placas. Las partículas se transportaron finalmente a las estructuras vesiculares de la región perinuclear. No se espera que los ensayos de colocalización con Giantina (o GM-130) muestren una señal fluorescente de nanopartículas en el aparato de Golgi.

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula fluorescente basada en sílice que comprende:

un núcleo basado en sílice que comprende un compuesto fluorescente colocado dentro del núcleo basado en sílice;

una cubierta de sílice que rodea al menos una porción del núcleo;

un polímero orgánico unido a la nanopartícula;

una molécula de ligando unida a la nanopartícula; y

un agente de contraste o un quelato unido a la nanopartícula;

en la que hay unidas de alrededor de 1 a alrededor de 20 moléculas de ligando a la nanopartícula.

2. La nanopartícula de la reivindicación 1, en la que la nanopartícula tiene un diámetro de entre alrededor de 1 nm y alrededor de 25 nm, preferiblemente entre alrededor de 1 nm y alrededor de 8 nm.

3. La nanopartícula de la reivindicación 1, en la que el número de moléculas de ligando unidas a la nanopartícula oscila de alrededor de 1 a alrededor de 10.

4. La nanopartícula de la reivindicación 1, en la que el número de moléculas de ligando unidas a la nanopartícula oscila de alrededor de 10 a alrededor de 20.

5. La nanopartícula de la reivindicación 1, en la que el polímero orgánico se selecciona del grupo que consiste en poli(etilen glicol) (PEG), polilactato, poli(ácidos lácticos), carbohidratos, lípidos, poli(ácido glutámico) (PGA), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(acetato de vinilo) (PVA), y las combinaciones de los mismos.

6. La nanopartícula de la reivindicación 1, en la que el ligando es capaz de unirse a al menos un componente celular, que es preferiblemente un marcador tumoral.

7. La nanopartícula de la reivindicación 1, en la que el ligando se selecciona del grupo que consiste en un péptido, proteína, biopolímero, polímero sintético, antígeno, anticuerpo, microorganismo, virus, receptor, hapteno, enzima, hormona, compuesto químico, patógeno, toxina, modificador superficial, y combinaciones de los mismos, en el que el péptido se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en tripéptido RGD, péptido cíclico cRGD, octreotato, EPPT1 y análogos peptídicos de alfa-MSH.

8. La nanopartícula de la reivindicación 1, en la que un agente de contraste está unido a la nanopartícula, en la que el agente de contraste es preferiblemente un radionúclido, que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en ^{89}Zr, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{124}I y ^{177}Lu.

9. La nanopartícula de la reivindicación 1, en la que un quelato está unido a la nanopartícula, en la que el quelato está adaptado preferiblemente para unir un radionúclido, o se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en DFO, DOTA, TETA y DTPA.

10. La nanopartícula de la reivindicación 8, en la que la nanopartícula es detectable mediante imagenología de PET, SPECT, CT, MRI, óptica, que es preferiblemente la imagenología de fluorescencia, imagenología de bioluminiscencia, o combinaciones de las mismas.

11. La nanopartícula de la reivindicación 1, en la que un agente terapéutico está unido a la nanopartícula, en la que el agente terapéutico se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en antibióticos, agentes antimicrobianos, antiproliferativos, antineoplásicos, antioxidantes, factores de crecimiento de células endoteliales, inhibidores de trombina, inmunosupresores, agentes anti-agregación plaquetaria, inhibidores de la síntesis de colágeno, anticuerpos terapéuticos, donantes de óxido nítrico, oligonucleótidos inversos, agentes de cicatrización de heridas, construcciones de transferencia de genes terapéuticos, componentes de la matriz extracelular, vasodilatadores, trombolíticos, antimetabolitos, agonistas de factores de crecimiento, antimitóticos, estatinas, esteroides, agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, inhibidores de la enzima conversora de angiotensina (ACE), depuradores de radicales libres, agonistas de PPAR-gamma, ARN pequeño de interferencia (siARN), microARN, y agentes quimioterápicos antineoplásicos.

12. La nanopartícula de la reivindicación 11, en la que el agente terapéutico está radiomarcado, preferiblemente unido a radioflúor ^{18}F, o en la que el agente terapéutico es un radionúclido, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en ^{90}Y, ^{131}I y ^{177}Lu.

13. Un método para detectar *in vitro* un componente de una célula que comprende las etapas de:

- poner en contacto la célula con una nanopartícula fluorescente basada en sílice que comprende:

un núcleo basado en sílice que comprende un compuesto fluorescente colocado dentro del núcleo basado en sílice;

una cubierta de sílice que rodea al menos una porción del núcleo;

un polímero orgánico unido a la nanopartícula;

una molécula de ligando unida a la nanopartícula; y

un agente de contraste o un quelato unido a la nanopartícula;

en la que hay unidas de alrededor de 1 a alrededor de 20 moléculas de ligando a la nanopartícula.

y

- monitorizar la unión de la nanopartícula a la célula o a un componente celular mediante al menos una técnica de imagenología.

14. Una nanopartícula fluorescente basada en sílice para el uso en la imagenología médica o biológica *in vivo*, en la que la nanopartícula comprende:

- un núcleo basado en sílice que comprende un compuesto fluorescente colocado dentro del núcleo basado en sílice;

- una cubierta de sílice que rodea al menos una porción del núcleo;

- un polímero orgánico unido a la nanopartícula;

- una molécula de ligando unida a la nanopartícula; y

- un agente de contraste o un quelato unido a la nanopartícula;

en la que hay unidas de alrededor de 1 a alrededor de 20 moléculas de ligando a la nanopartícula.

15. Una nanopartícula fluorescente basada en sílice, que preferiblemente está radiomarcada, para el uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente, en la que la nanopartícula comprende:

un núcleo basado en sílice que comprende un compuesto fluorescente colocado dentro del núcleo basado en sílice;

una cubierta de sílice que rodea al menos una porción del núcleo;

un polímero orgánico unido a la nanopartícula;

una molécula de ligando unida a la nanopartícula y capaz de unirse a un marcador tumoral; y

al menos un agente terapéutico,

en la que hay unidas de alrededor de 1 a alrededor de 20 moléculas de ligando a la nanopartícula.

16. La nanopartícula fluorescente basada en sílice, para el uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente según la reivindicación 15, en la que la nanopartícula se administrará de manera oral, intravenosa, nasal, subcutánea, intramuscular o transdérmica.

FIGURA 1

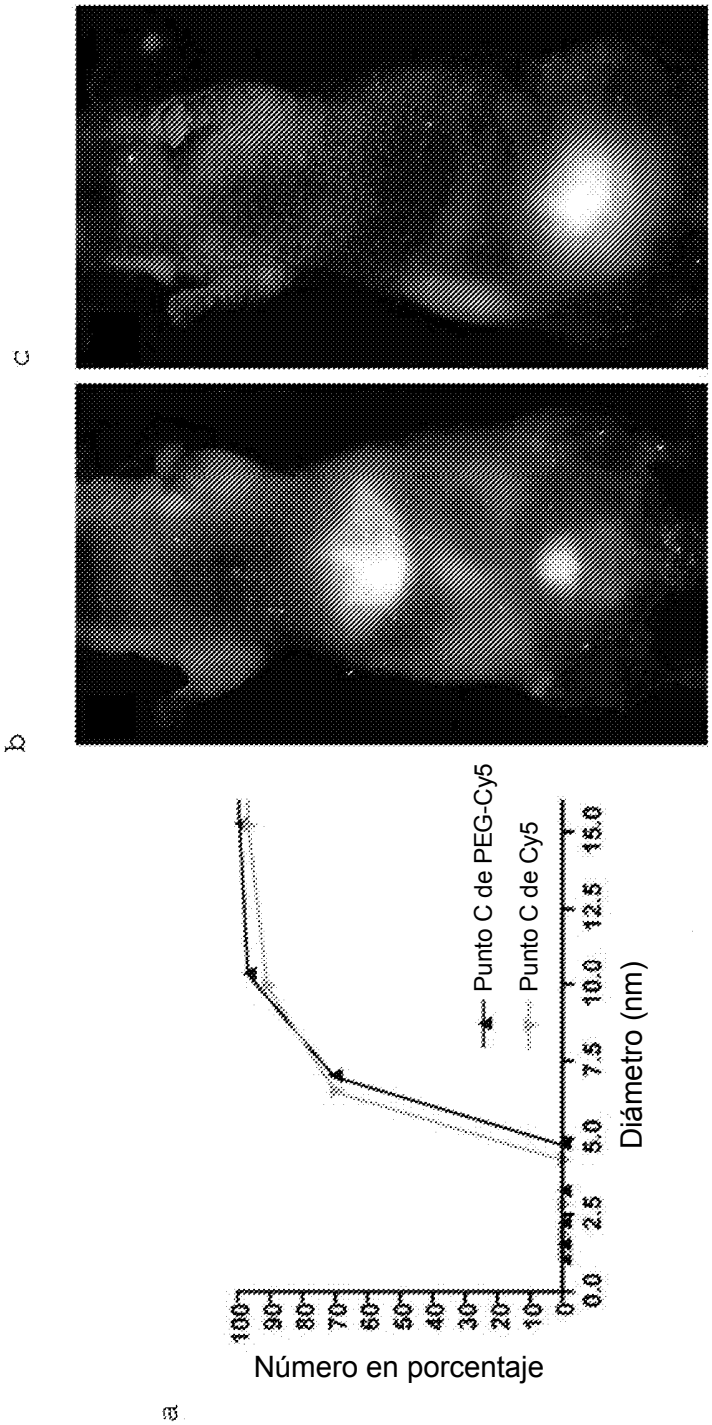

c
b
a
Punto C de PEG-Cy5
Punto C de Cy5
Diámetro (nm)
Número en porcentaje
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

FIGURA 1

d

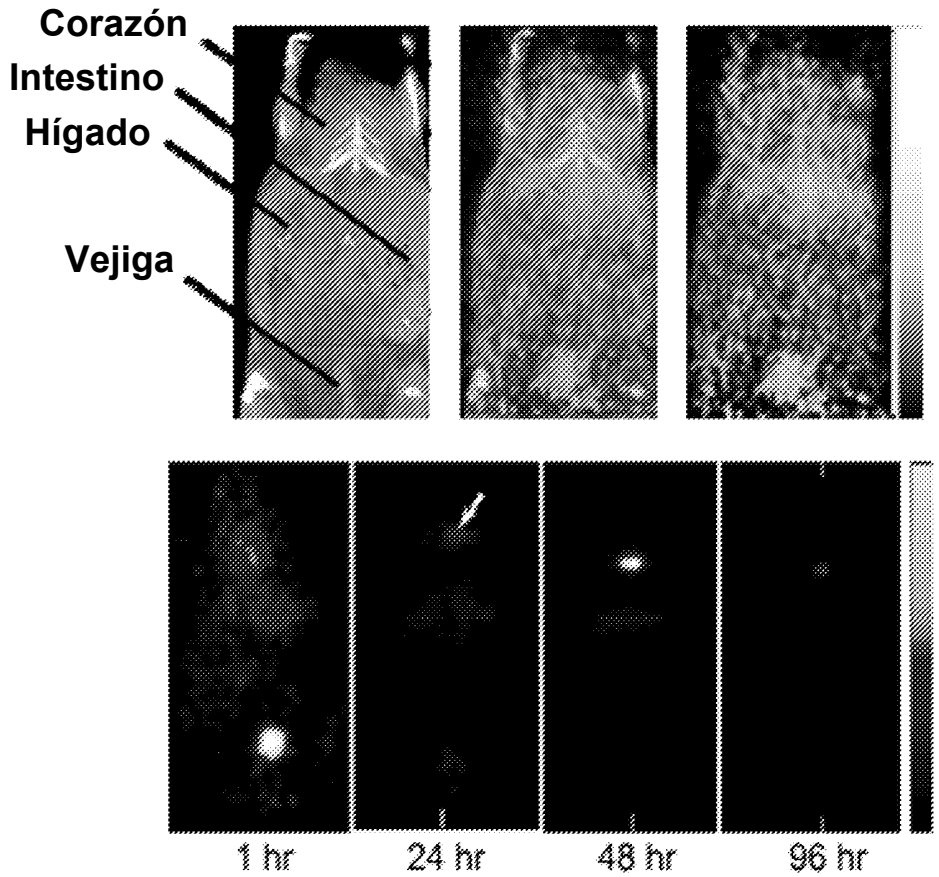


FIGURA 2

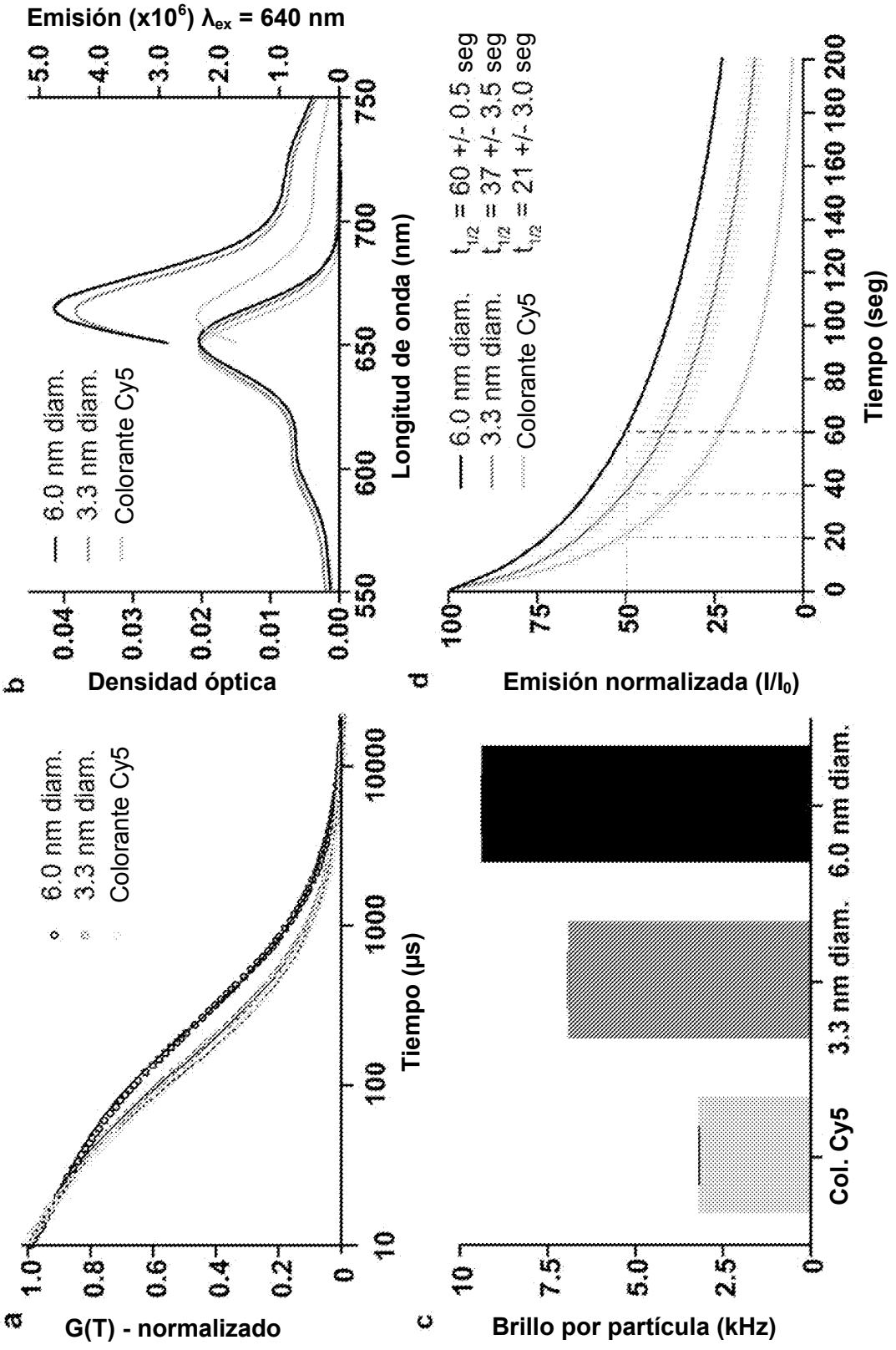
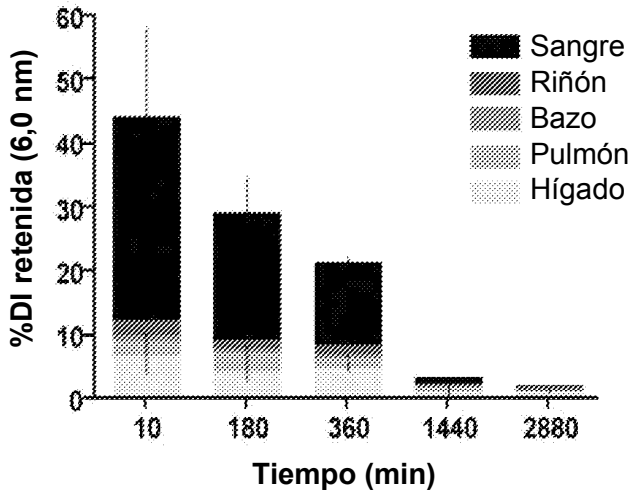
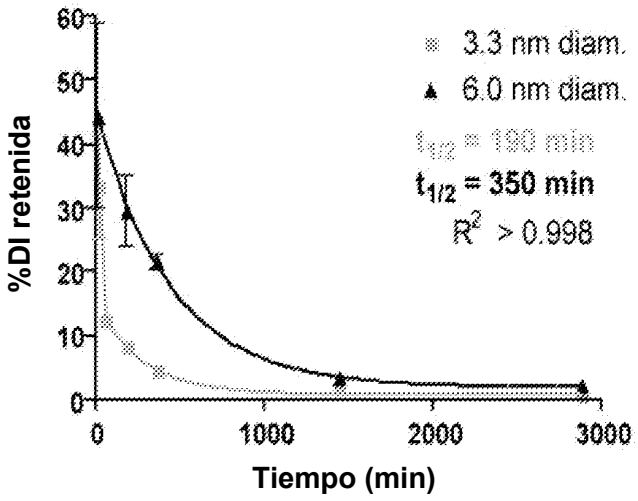

a
G(T) - normalizado
Tiempo (µs)
6.0 nm diam.
3.3 nm diam.
Colorante Cy5
b
Densidad óptica
Longitud de onda (nm)
Emisión (x10^6) λex = 640 nm
c
Brillo por partícula (kHz)
Col. Cy5
3.3 nm diam.
6.0 nm diam.
d
Emisión normalizada (I/I0)
Tiempo (seg)
t1/2 = 60 +/- 0.5 seg
t1/2 = 37 +/- 3.5 seg
t1/2 = 21 +/- 3.0 seg

FIGURA 3

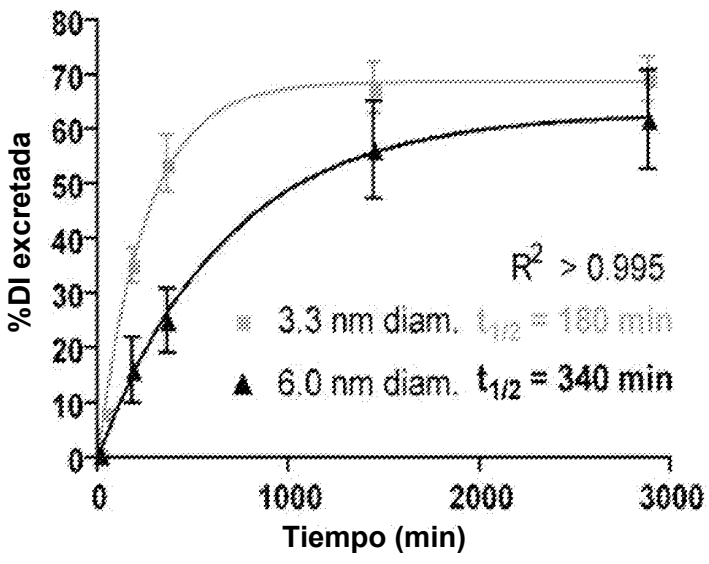
a


%DI retenida (6,0 nm)
60
50
40
30
20
10
0
10
180
360
1440
2880
Tiempo (min)
Sangre
Riñón
Bazo
Pulmón
Hígado

b


%DI retenida
60
50
40
30
20
10
0
0
1000
2000
3000
Tiempo (min)
3.3 nm diam.
6.0 nm diam.
t1/2 = 190 min
t1/2 = 350 min
R2 > 0.998

c


%DI excretada
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1000
2000
3000
Tiempo (min)
R2 > 0.995
3.3 nm diam. t1/2 = 180 min
6.0 nm diam. t1/2 = 340 min

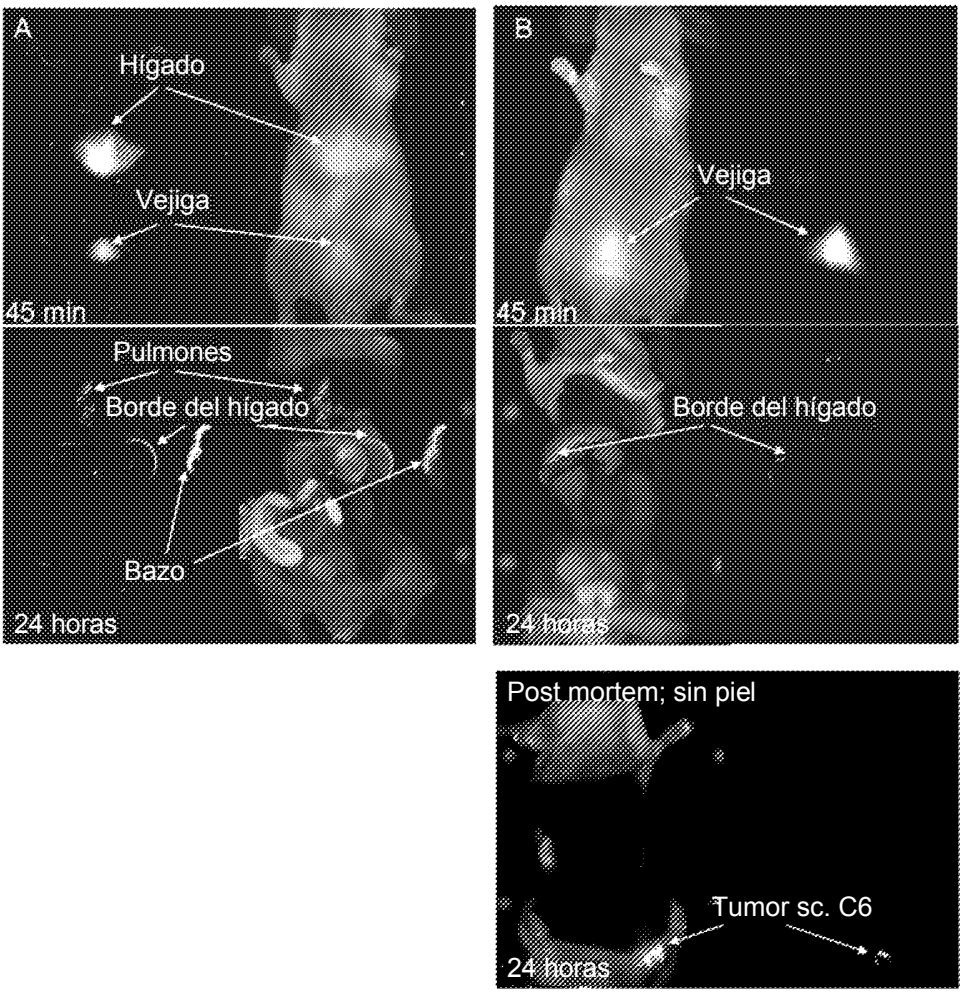

A
Hígado
Vejiga
45 min
B
Vejiga
45 min
Pulmones
Borde del hígado
Bazo
24 horas
Borde del hígado
24 horas
Post mortem; sin piel
Tumor sc. C6
24 horas

Figura 4

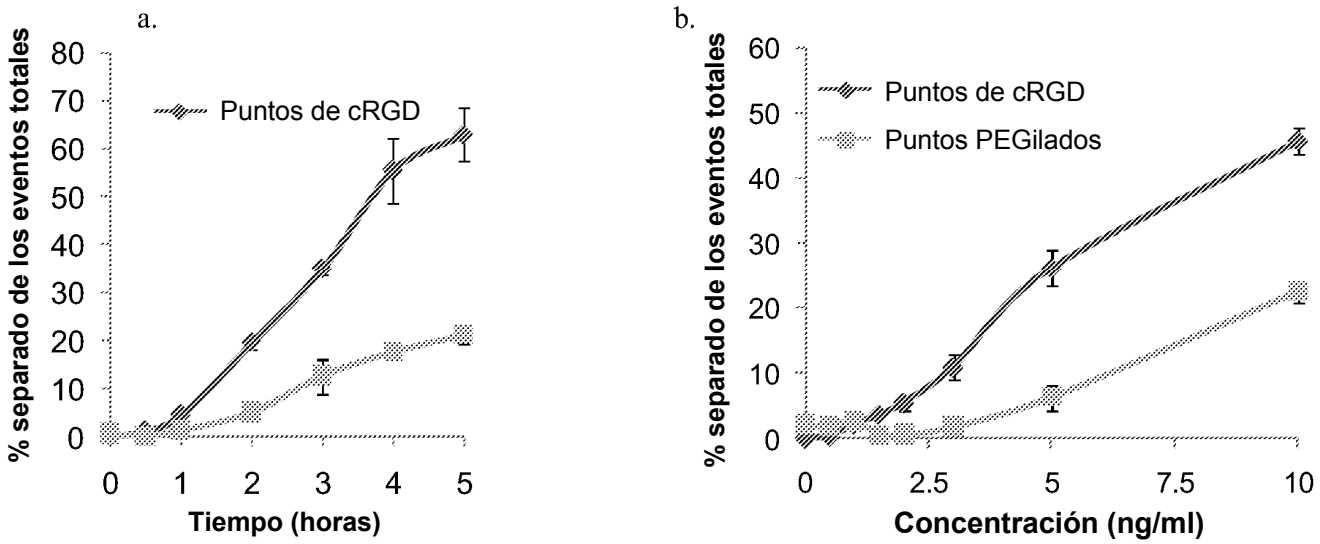

a.
% separado de los eventos totales
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Puntos de cRGD
0
1
2
3
4
5
Tiempo (horas)
b.
% separado de los eventos totales
60
50
40
30
20
10
0
Puntos de cRGD
Puntos PEGilados
0
2.5
5
7.5
10
Concentración (ng/ml)

Figura 5

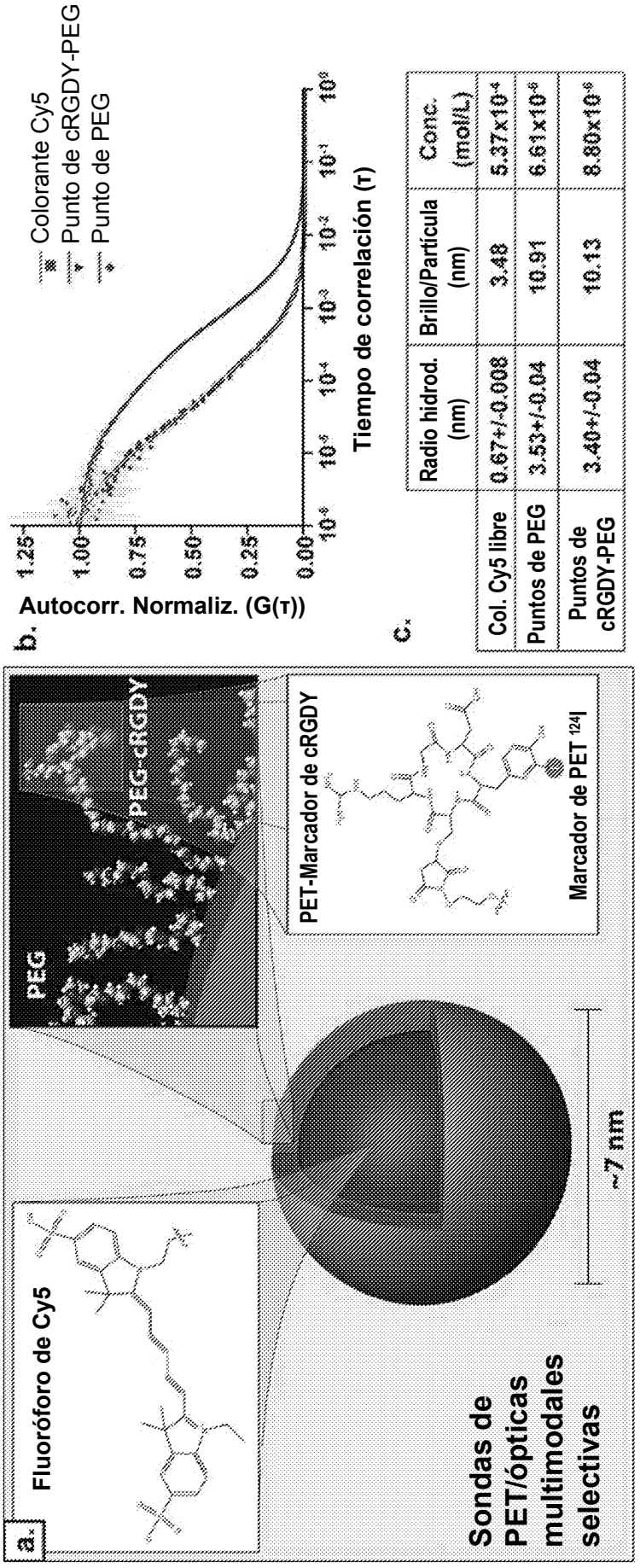

a.
Fluoróforo de Cy5
Sondas de PET/ópticas multimodales selectivas
~7 nm
PEG
PEG-cRGDY
PET-Marcador de cRGDY
Marcador de PET 124I
b.
Colorante Cy5
Punto de cRGDY-PEG
Punto de PEG
Autocorr. Normaliz. (G(τ))
Tiempo de correlación (τ)
c.
Col. Cy5 libre | 0.67+/-0.008 | 3.48 | 5.37x10-4
Puntos de PEG | 3.53+/-0.04 | 10.91 | 6.61x10-5
Puntos de cRGDY-PEG | 3.40+/-0.04 | 10.13 | 8.80x10-5

Figura 6

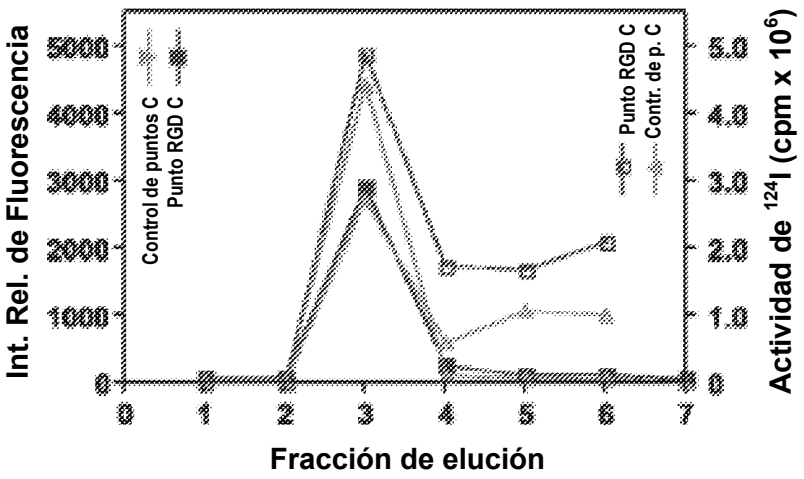

Int. Rel. de Fluorescencia
5000
4000
3000
2000
1000
0
Control de puntos C
Punto RGD C
Punto RGD C
Contr. de p. C
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0
Actividad de ^{124}I (cpm x 10^6)
0
1
2
3
4
5
6
7
Fracción de elución

Figura 7

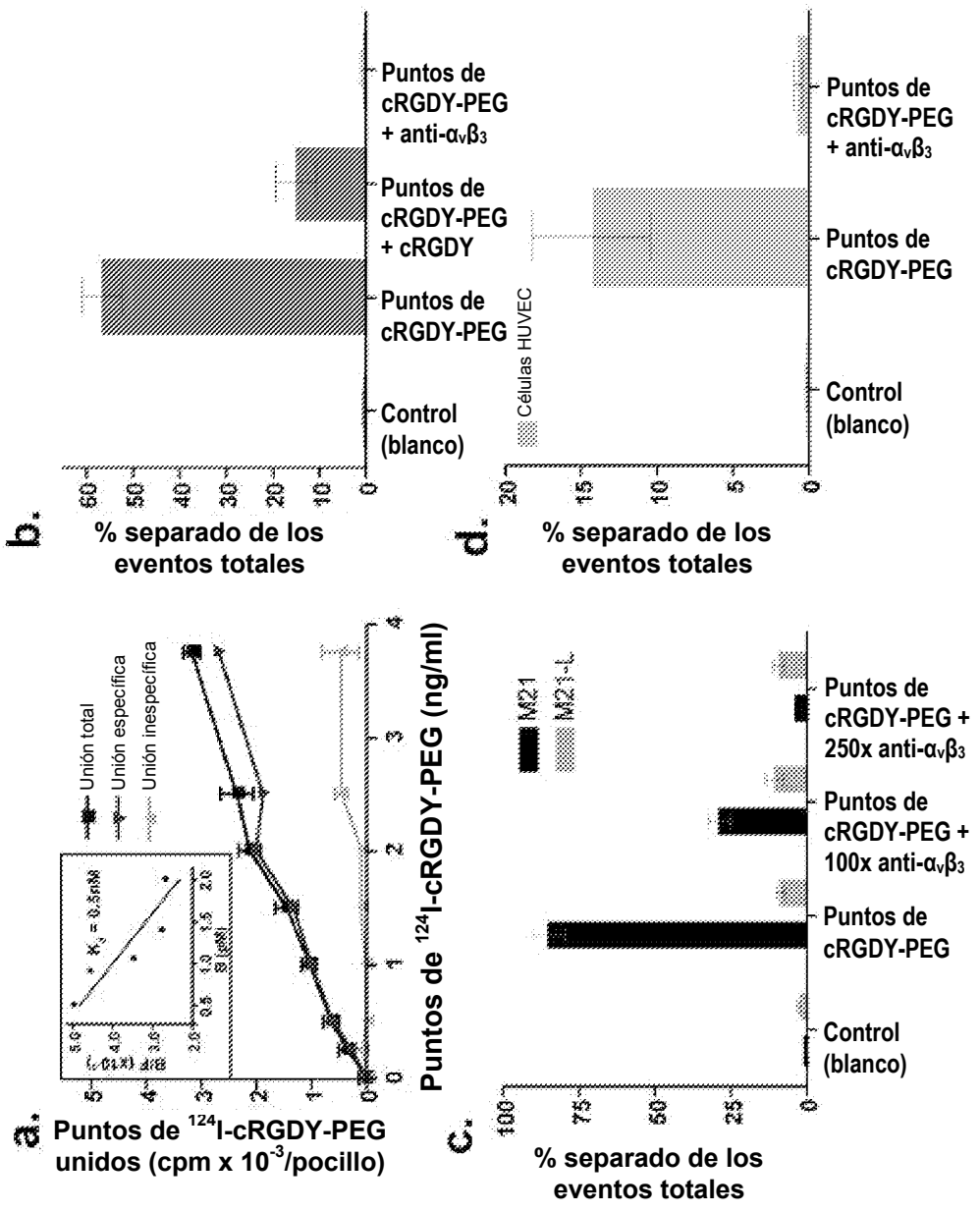

a.
Puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG unidos (cpm x 10^{-3}/pocillo)
Unión total
Unión específica
Unión inespecífica
Puntos de ^{124}I-cRGDY-PEG (ng/ml)
b.
% separado de los eventos totales
Puntos de cRGDY-PEG + anti-$\alpha_v\beta_3$
Puntos de cRGDY-PEG + cRGDY
Puntos de cRGDY-PEG
Control (blanco)
c.
% separado de los eventos totales
M21
M21-L
Puntos de cRGDY-PEG + 250x anti-$\alpha_v\beta_3$
Puntos de cRGDY-PEG + 100x anti-$\alpha_v\beta_3$
Puntos de cRGDY-PEG
Control (blanco)
d.
% separado de los eventos totales
Células HUVEC
Puntos de cRGDY-PEG + anti-$\alpha_v\beta_3$
Puntos de cRGDY-PEG
Control (blanco)

Figura 8

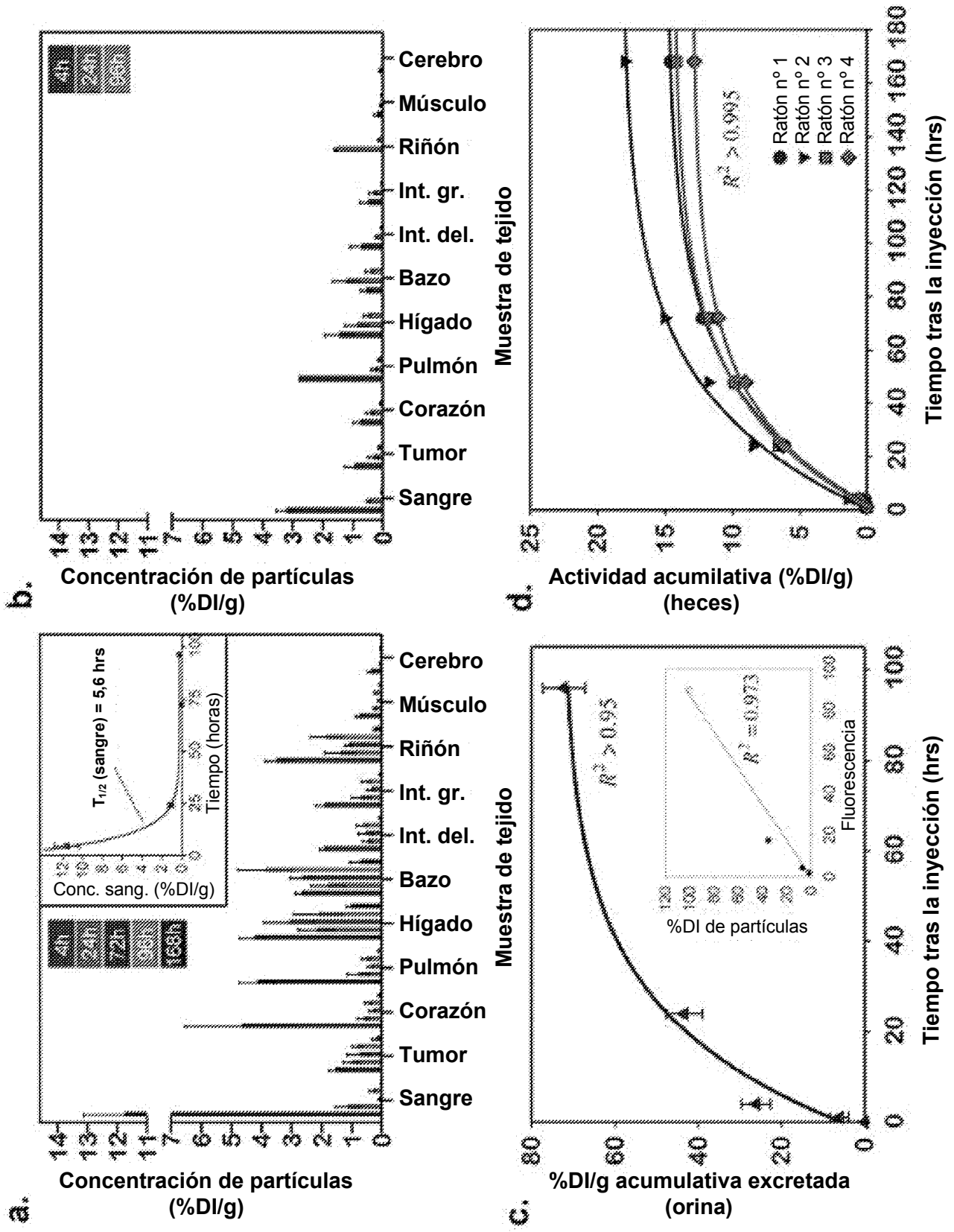
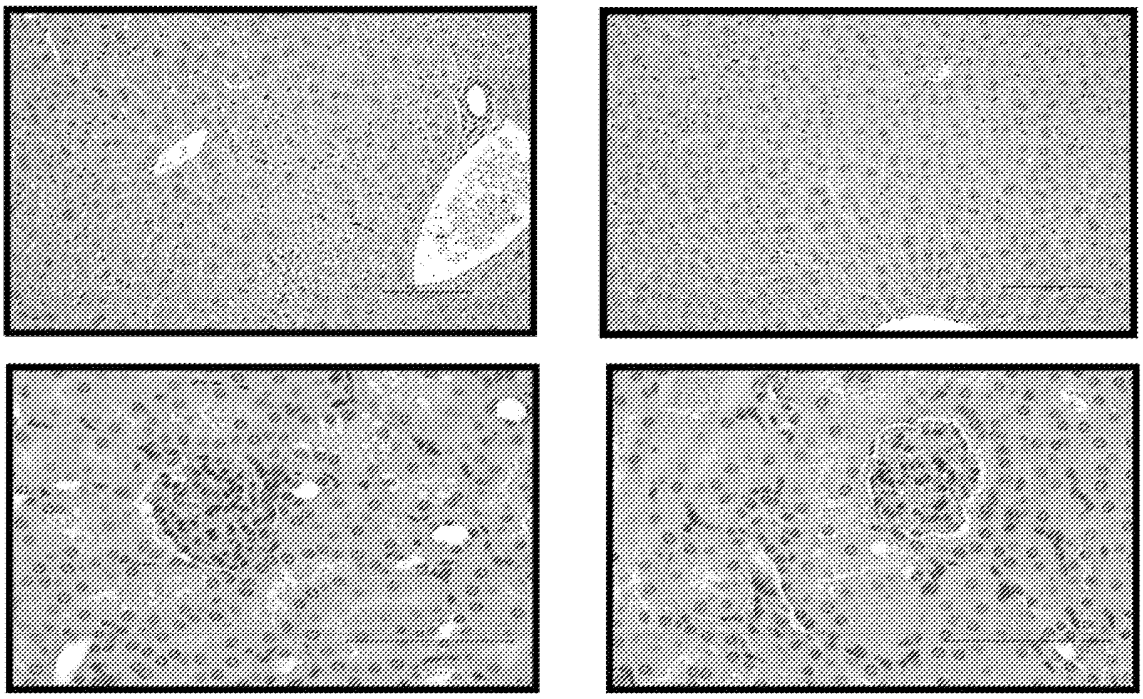

a.
Concentración de partículas (%DI/g)
Cerebro
Músculo
Riñón
Int. gr.
Int. del.
Bazo
Hígado
Pulmón
Corazón
Tumor
Sangre
4h
24h
72h
96h
168h
T1/2 (sangre) = 5,6 hrs
Tiempo (horas)
Conc. sang. (%DI/g)
b.
Concentración de partículas (%DI/g)
c.
%DI/g acumulativa excretada (orina)
Muestra de tejido
Tiempo tras la inyección (hrs)
R² > 0,95
R² = 0,973
%DI de partículas
Fluorescencia
d.
Actividad acumilativa (%DI/g) (heces)
Ratón nº 1
Ratón nº 2
Ratón nº 3
Ratón nº 4
R² > 0,995

Figura 9

a.



Control de vehículo

Puntos de ^{127}I-RGDY-PEG

b.

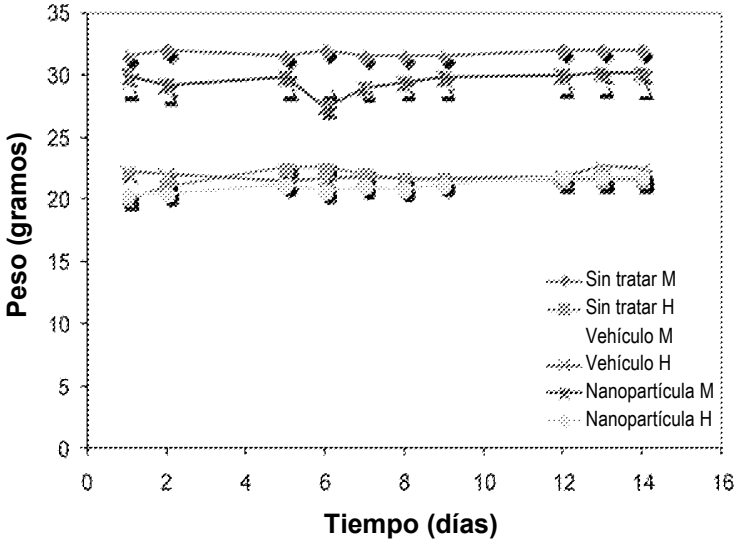


Figura 10

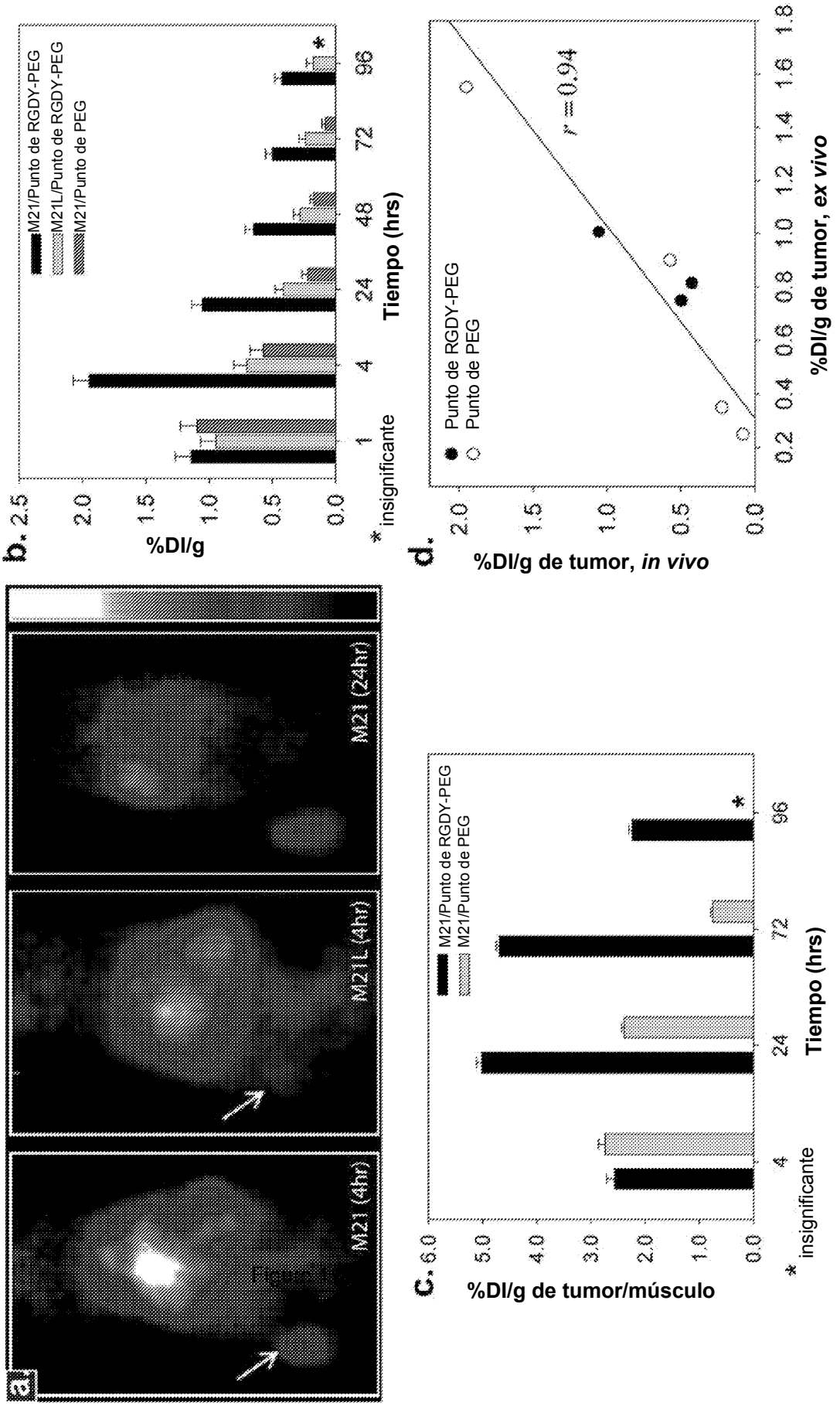

a.
M21 (4hr)
M21L (4hr)
M21 (24hr)
b.
M21/Punto de RGDY-PEG
M21L/Punto de RGDY-PEG
M21/Punto de PEG
%DI/g
Tiempo (hrs)
* insignificante
c.
M21/Punto de RGDY-PEG
M21/Punto de PEG
%DI/g de tumor/músculo
Tiempo (hrs)
* insignificante
d.
Punto de RGDY-PEG
Punto de PEG
r = 0.94
%DI/g de tumor, in vivo
%DI/g de tumor, ex vivo

FIGURA 11

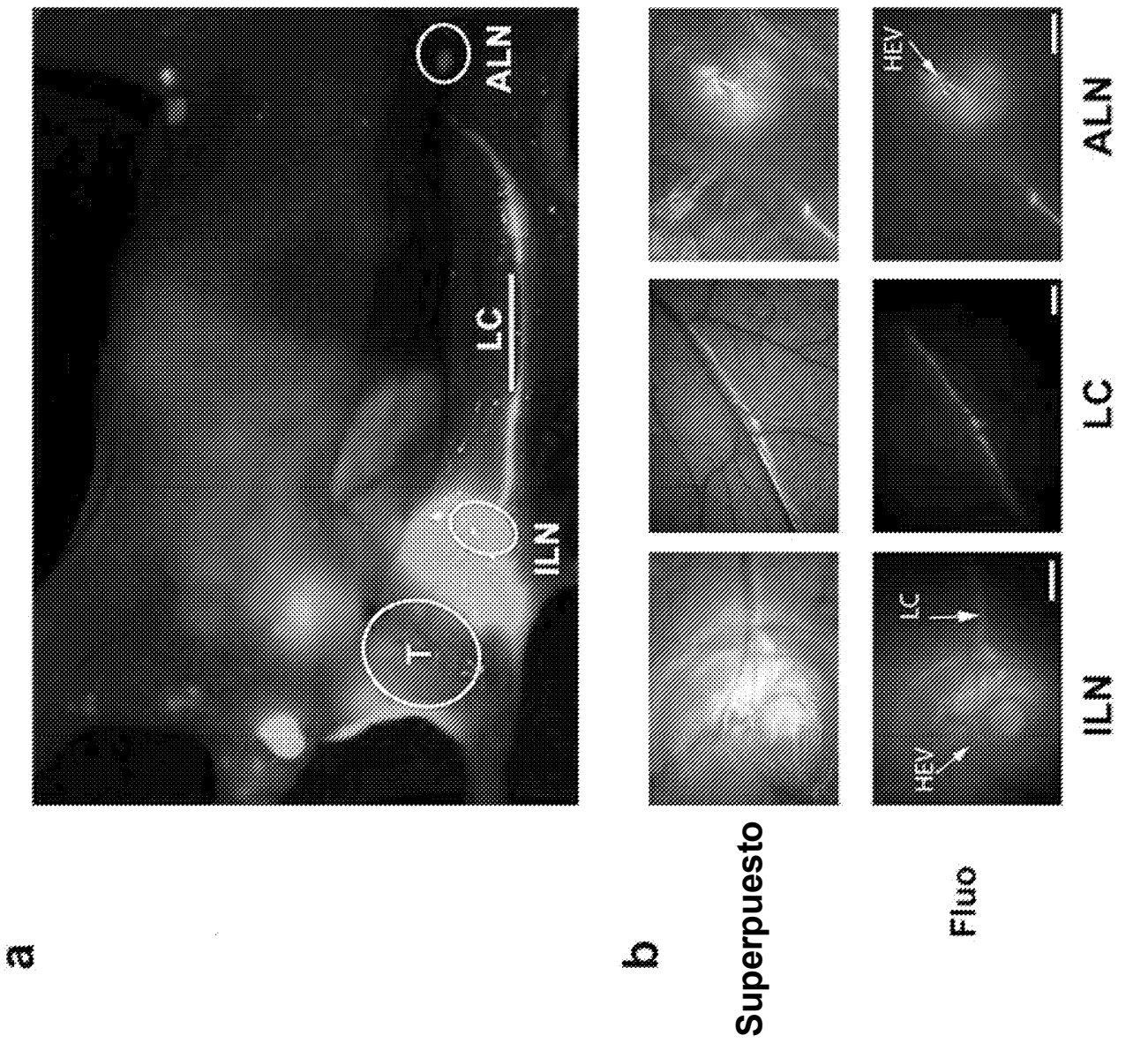
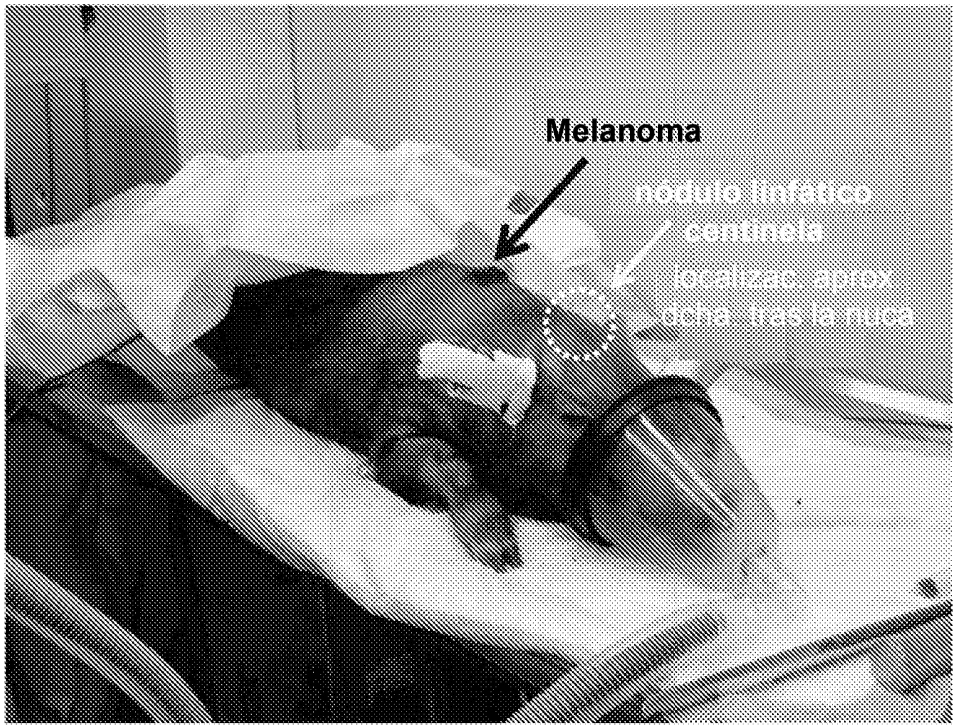
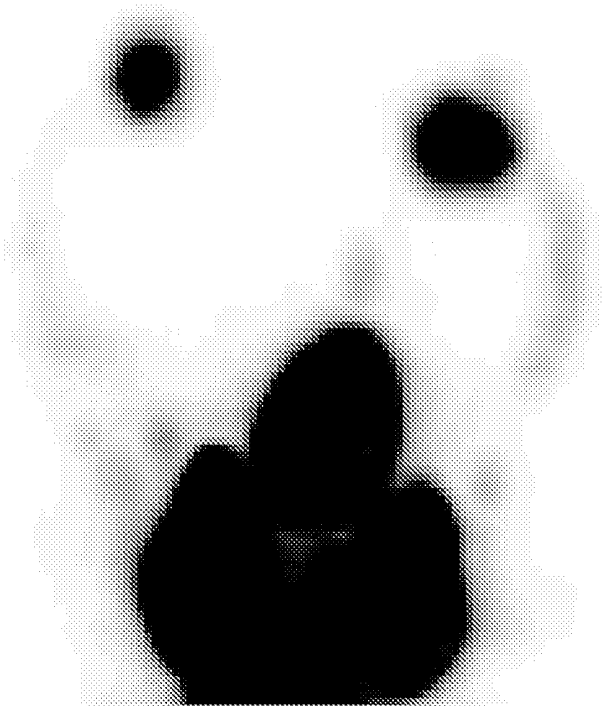


FIGURA 12

Modelo de Melanoma Espontáneo en Minicerdos



A.



B.

Modelo de animal de tamaño intermedio para simular con exactitud la aplicación de los procedimientos de biopsia de NLC en seres humanos

Figura 13

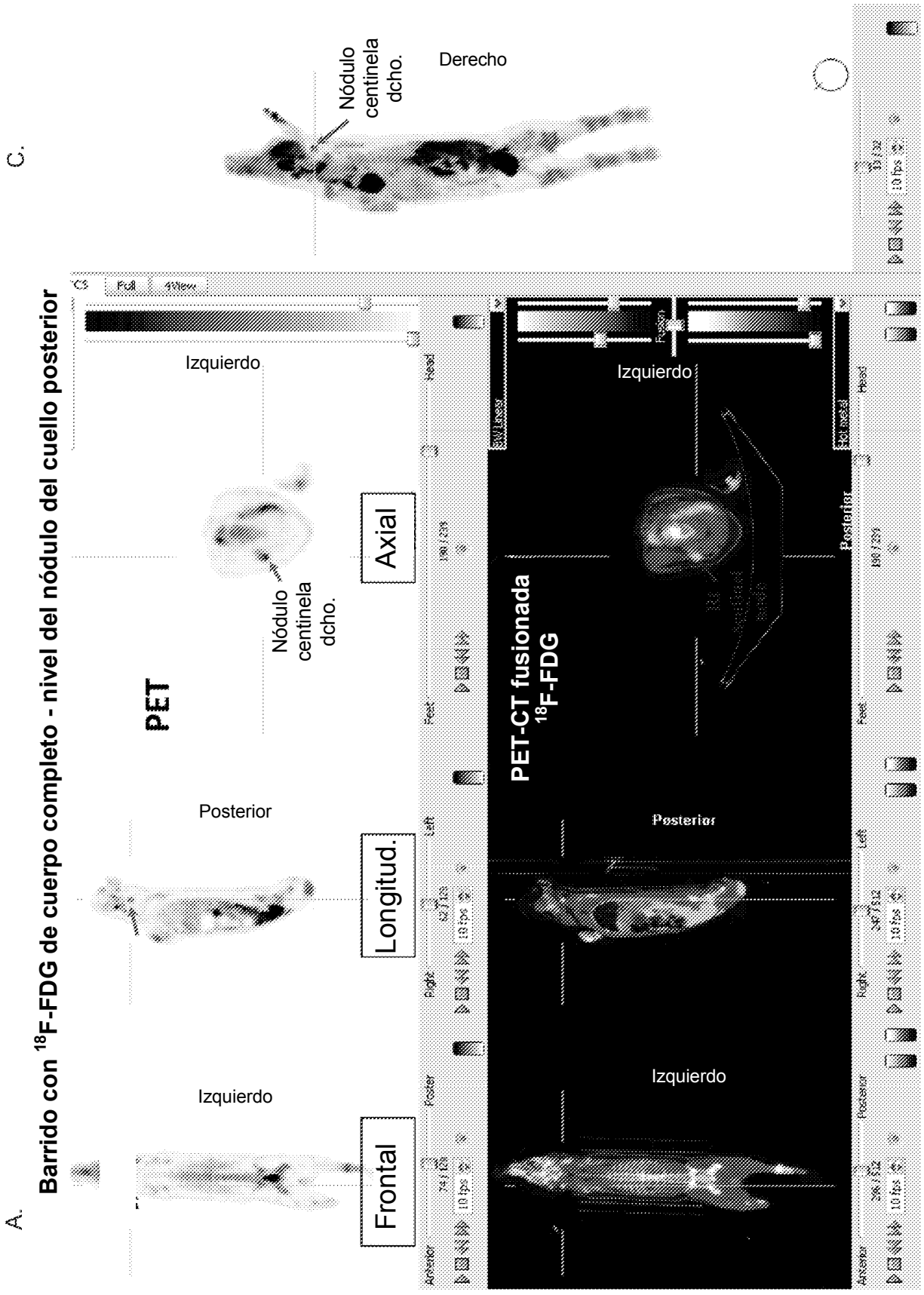

A.
Barrido con ^{18}F-FDG de cuerpo completo - nivel del nódulo del cuello posterior
PET
Izquierdo
Nódulo centinela dcho.
Axial
Posterior
Longitud.
Izquierdo
Frontal
B.
PET-CT fusionada ^{18}F-FDG
Izquierdo
Posterior
Izquierdo
C.
Nódulo centinela dcho.
Derecho

Figura 14

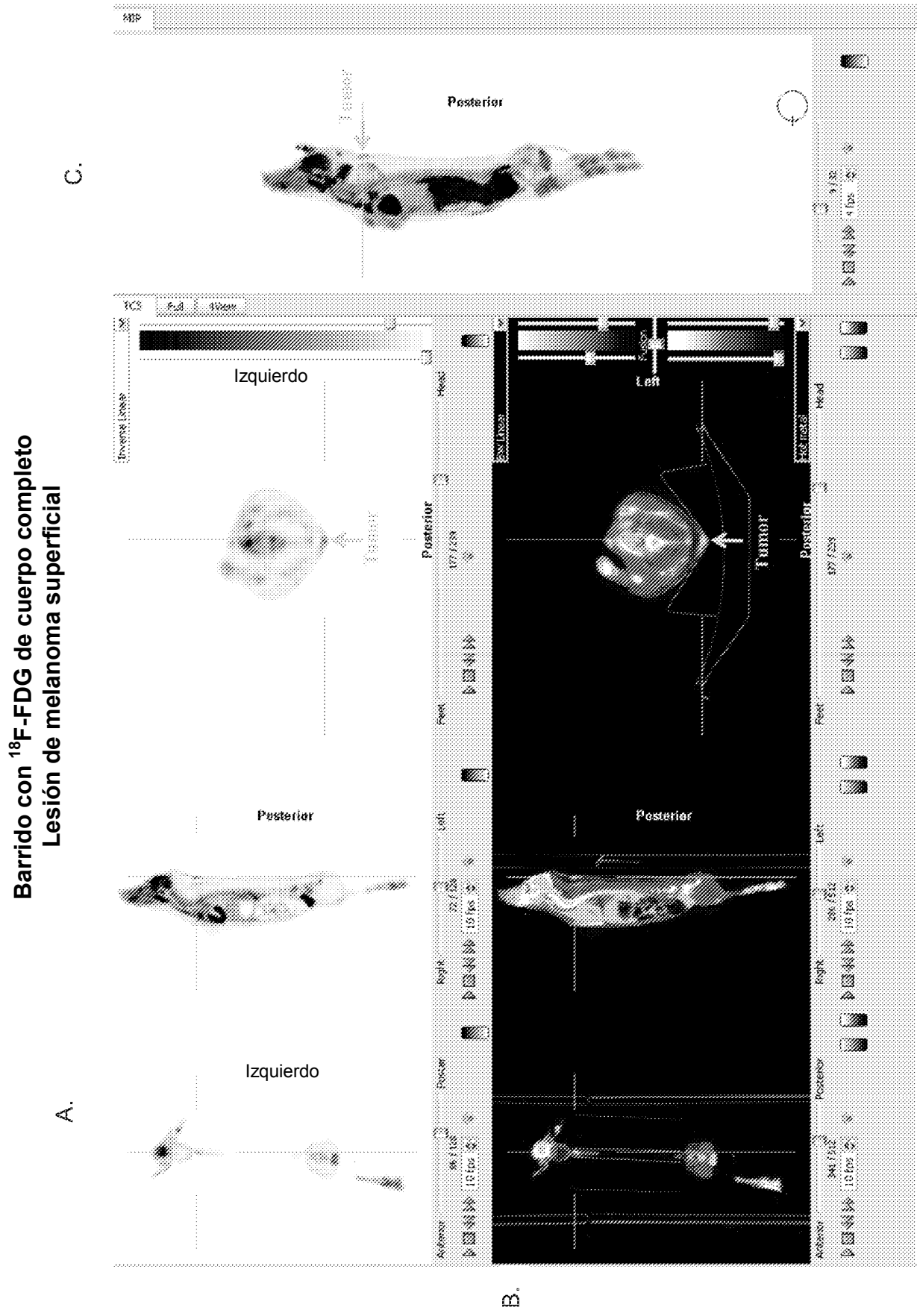

Barrido con ^{18}F-FDG de cuerpo completo
Lesión de melanoma superficial
A.
B.
C.
Izquierdo
Posterior
Tumor
Left
Right
Head
Feet

Figura 15

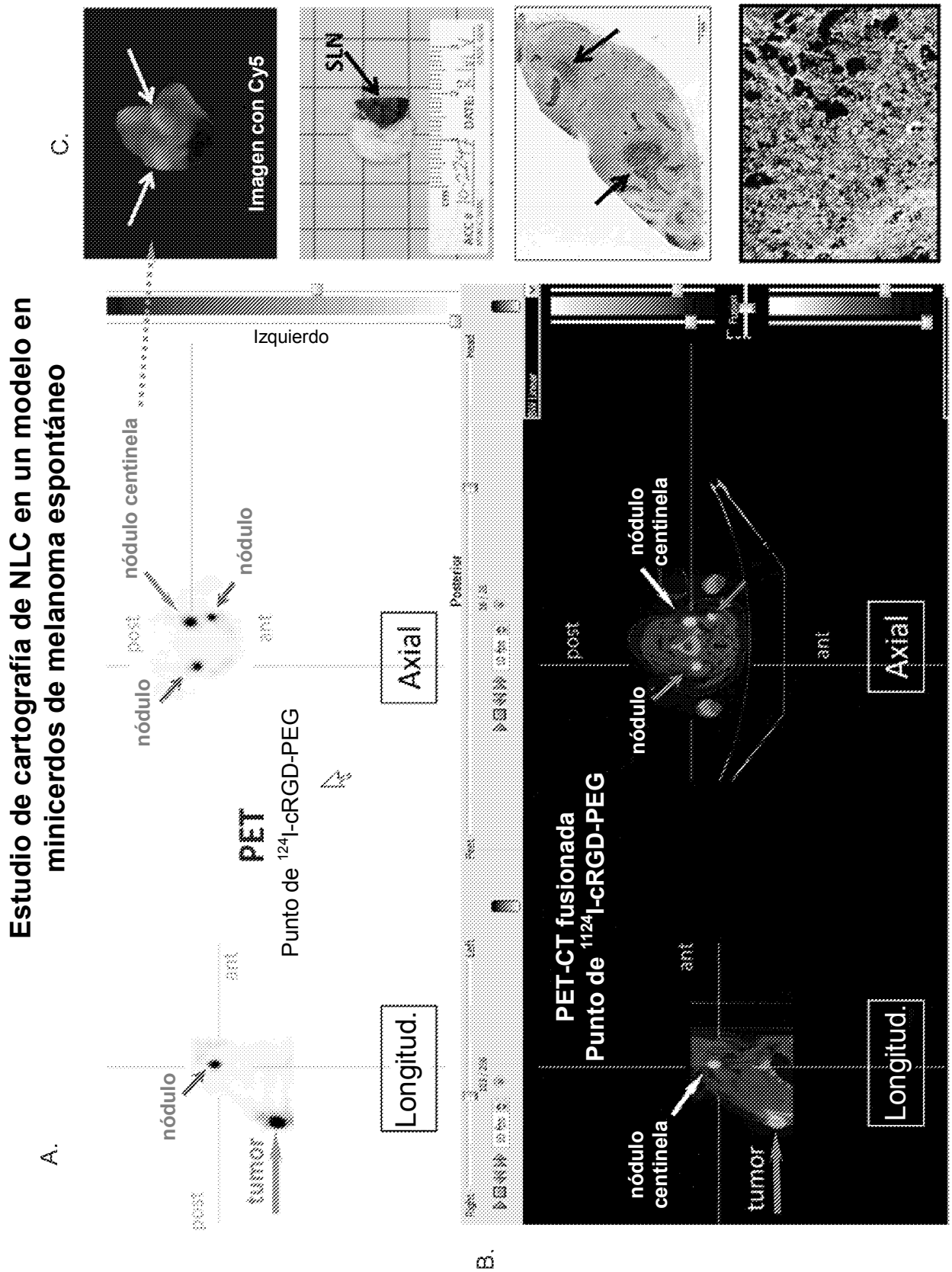

Estudio de cartografía de NLC en un modelo en minicerdos de melanoma espontáneo
A.
B.
C.
PET
Punto de ^{124}I-cRGD-PEG
PET-CT fusionada
Punto de ^{1124}I-cRGD-PEG
Imagen con Cy5
SLN
nódulo centinela
nódulo
tumor
Izquierdo
Axial
Longitud.
post
ant

Figura 16

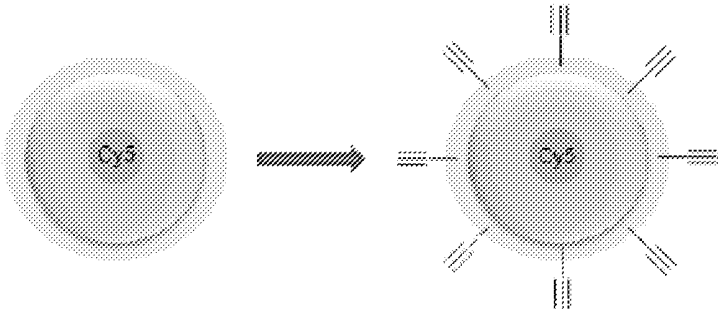


Figura 17

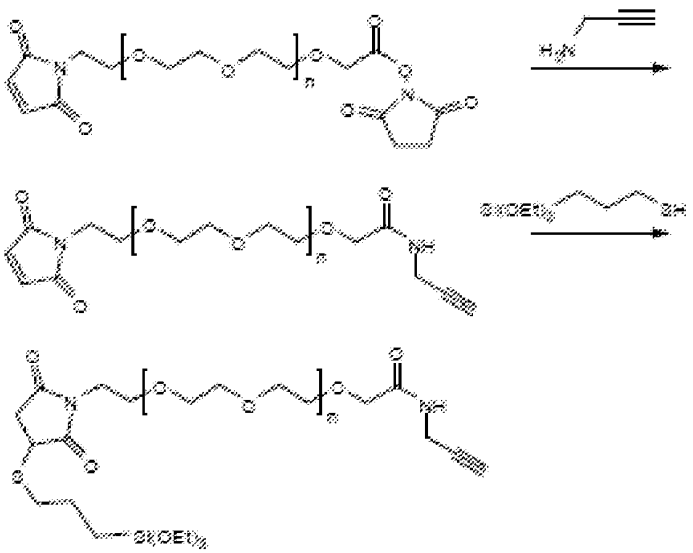
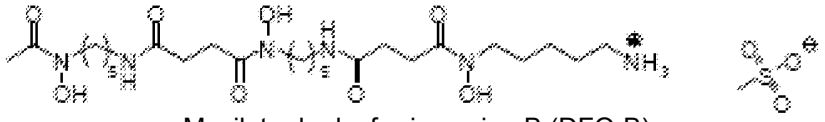
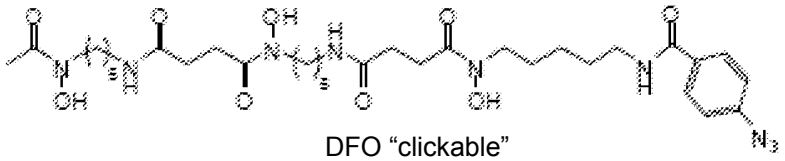


Figura 18

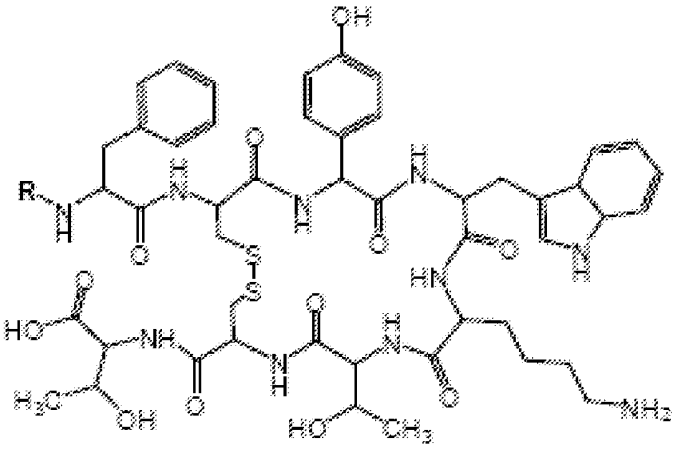


Mesilato de desferrioxamina B (DFO-B)



DFO “clickable”

Figura 19



Tyr^3-octreotato = DPhe-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH

Tyr^3-octreotato “clickable”: R = grupo que contiene N_3

Tyr^3-octreotato: R = H

Figura 20a

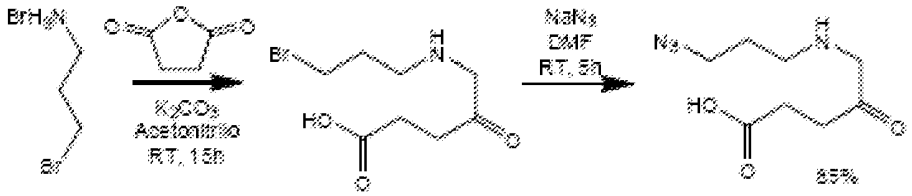


Figura 20b

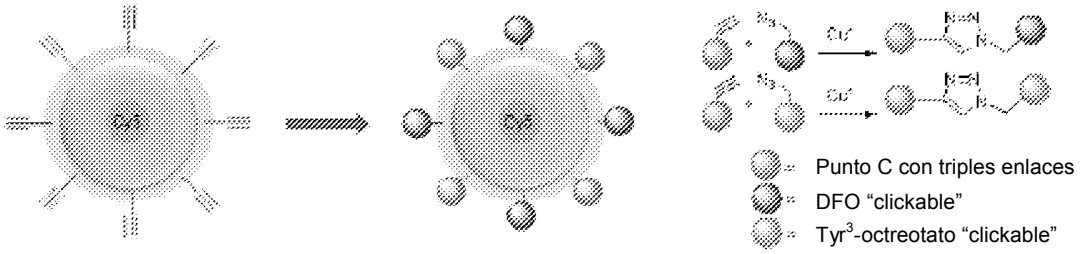


Figura 21a

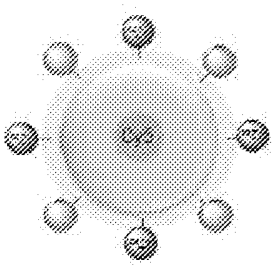
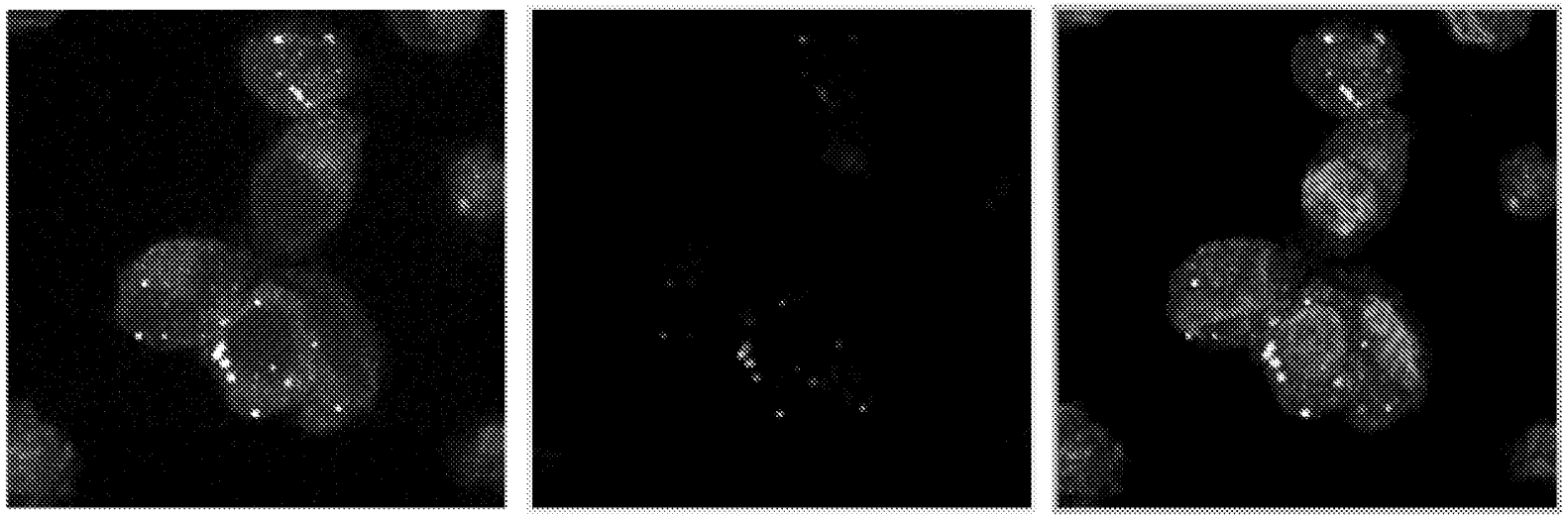


Figura 21b

Estudios de interiorización celular con células de melanoma

Colocalización entre punto de cRGD-PEG y Lysotracker Red (canal verde)



Lysotracker Red | **Puntos de cRGD-PEG** | **Tinción de contraste Hoechst 33258 fusionada**

Incubación: 0,075 mg/ml de puntos x 3 hrs
Lysotracker Red (100 nM) x 30 min
Microscopio confocal: Leica TCS SP2 AOBS
Objetivo: Leica HCX PL APO: 63x 1.2NA Water DIC D

Figura 22