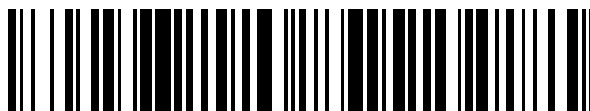


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 462 090**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)
A61K 47/34 (2007.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
C08G 63/668 (2006.01)
C08G 63/672 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2009 PCT/US2009/047515**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2010 WO10005723**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2009 E 09794915 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **15.03.2017 EP 2309990**

54 Título: **Nanopartículas poliméricas cargadas de fármaco y procedimientos de fabricación y uso de las mismas**

30 Prioridad:

15.04.2009 US 169519 P 29.05.2009 US 182300 P
16.06.2008 US 61704 P 15.04.2009 US 169541 P
04.05.2009 US 175219 P 16.06.2008 US 61760 P
04.05.2009 US 175226 P 20.10.2008 US 106777 P
16.10.2008 US 105916 P 04.05.2009 US 175209 P
12.08.2008 US 88159 P 29.04.2009 US 173784 P
16.06.2008 US 61697 P 15.04.2009 US 169514 P
29.04.2009 US 173790 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
12.07.2017

73 Titular/es:

PFIZER INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US

72 Inventor/es:

TROIANO, GREG;
FIGA, MICHAEL y
SABNIS, ABHIMANYU

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas poliméricas cargadas de fármaco y procedimientos de fabricación y uso de las mismas

Solicitudes relacionadas**Antecedentes**

5 Se ha reconocido como beneficiosos los sistemas que entregan ciertos fármacos a un paciente (por ejemplo, dirigidos a un tipo particular de tejido o célula, o dirigidos a un tejido enfermo específico pero no al tejido normal), o que controlan la liberación de fármacos. El documento WO 2003/086369 desvela nanoesferas biodegradables poliméricas furtivas y usuarios de las mismas.

10 Por ejemplo, los productos terapéuticos que contienen un principio activo y que están dirigidos, por ejemplo, a un tipo particular de tejido o célula, o dirigidos a un tejido enfermo específico, pero no al tejido normal, pueden reducir la cantidad de fármaco en los tejidos corporales a los que no se dirigen. Esto es particularmente importante en el tratamiento de una afección tal como el cáncer, donde es deseable la entrega de una dosis citotóxica del fármaco a las células cancerosas sin destruir el tejido circundante no canceroso. El direccionamiento de fármacos eficaz puede disminuir los efectos secundarios indeseables y a veces mortales, habituales en la terapia antineoplásica. Además, dichos productos terapéuticos pueden permitir que los fármacos lleguen a ciertos tejidos que de lo contrario serían incapaces de alcanzar.

15 Los productos terapéuticos que ofrecen liberación controlada y/o terapia dirigida también deben ser capaces de entregar una cantidad eficaz de fármaco, que es una limitación conocida en otros sistemas de entrega de nanopartículas. Por ejemplo, puede ser un desafío preparar sistemas de nanopartículas que tengan una cantidad apropiada de fármaco asociada a cada nanopartícula, manteniendo al mismo tiempo el tamaño de las nanopartículas lo suficientemente pequeño para que tengan propiedades de entrega ventajosas. Sin embargo, si bien es deseable cargar una nanopartícula con una alta cantidad de un agente terapéutico, las preparaciones de nanopartículas que usan una carga de fármaco que es demasiado alta darán como resultado nanopartículas que son demasiado grandes para el uso terapéutico práctico.

20 En consecuencia, existe la necesidad de productos terapéuticos en nanopartículas y procedimientos de fabricación de dichas nanopartículas, que sean capaces de entregar niveles terapéuticos de fármacos para tratar enfermedades tales como el cáncer, reduciendo al mismo tiempo los efectos secundarios en el paciente.

Sumario

30 La invención proporciona un procedimiento de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas, que comprende:

35 combinar un agente terapéutico, un primer polímero y opcionalmente un segundo polímero, con un disolvente orgánico para formar una primera fase orgánica que tenga del 5 al 50 % de sólidos; combinar la primera fase orgánica con una primera solución acuosa para formar una segunda fase; emulsionar la segunda fase para formar una fase en emulsión; enfriamiento de la fase en emulsión para formar una fase enfriada; donde el enfriamiento se realiza al menos parcialmente a una temperatura de 5 °C o menos; añadir un solubilizante de fármacos a la fase enfriada para formar una fase solubilizada de un agente terapéutico no encapsulado; y filtrar la fase solubilizada para recuperar las nanopartículas furtivas específicas para la diana, formando así una suspensión de nanopartículas terapéuticas con un diámetro de 80 nm a 150 nm.

40 En el presente documento también se desvela una nanopartícula terapéutica que se prepara mediante:

45 la emulsión de una primera fase orgánica que comprende un primer polímero y un agente terapéutico y una segunda fase que forma una fase en emulsión; en la que la fase en emulsión se enfría después a una temperatura de entre 0 °C y 5 °C formando una fase enfriada; y la filtración de la fase enfriada a una primera temperatura de entre -5 °C y 10 °C; y la filtración de la fase enfriada a una segunda temperatura de 25 °C; formando de este modo nanopartículas terapéuticas que son estables durante al menos 5 días a 25 °C.

La presente invención proporciona nanopartículas terapéuticas que incluyen un principio activo o agente terapéutico, por ejemplo, taxano y uno, dos o tres polímeros biocompatibles. Por ejemplo, en el presente documento se desvela una nanopartícula terapéutica que comprende de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 35 por ciento en peso de un agente terapéutico; de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 99 por ciento en peso de copolímero ácido poli(láctico)-*bloque*-poli(etileno)glicol o copolímero ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-bloque-poli(etileno)glicol; y de aproximadamente el 0 a aproximadamente el 50 por ciento en peso de ácido poli(láctico) o ácido poli(láctico)-co-ácido poli(glicólico). Los agentes terapéuticos de ejemplos incluyen agentes antineoplásicos tales como taxanos, por ejemplo, docetaxel y pueden incluir de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 30 por ciento en peso de un agente terapéutico, por ejemplo, un taxano.

En el presente documento se proporciona, en parte, un procedimiento de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas desveladas, que comprende combinar un agente terapéutico, un primer polímero y opcionalmente un segundo polímero, con un disolvente orgánico (por ejemplo, un disolvente elegido entre: acetato de etilo, alcohol bencílico, cloruro de metileno, dimetilformamida, Tween 80 y Span 80 y las combinaciones de dos o más de éstos) para formar una primera fase orgánica que contenga del 5 al 50 % de sólidos; combinar la primera fase orgánica con una primera solución acuosa (que puede, en algunas realizaciones, incluir un reactivo elegido entre: colato de sodio, acetato de etilo, alcohol bencílico o sus combinaciones) para formar una segunda fase; emulsionar la segunda fase para formar una fase en emulsión; enfriar la fase en emulsión para formar una fase enfriada; añadir un solubilizante de fármacos a la fase enfriada para formar una fase solubilizada de un agente terapéutico no encapsulado; y filtrar la fase solubilizada para recuperar las nanopartículas específicas para la diana, formando de este modo una suspensión de nanopartículas terapéuticas con un diámetro de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 150 nm. En algunas realizaciones, emulsionar la segunda fase puede implicar emulsionar la segunda fase para formar una emulsión gruesa y emulsionar la emulsión gruesa para formar una fase en emulsión fina. La emulsión de la segunda fase se puede realizar, por ejemplo, utilizando un homogeneizador de rotor y estator, una sonda de ultrasonidos, una barra de agitación o un mezclador de alta presión. La emulsión de la emulsión gruesa se puede realizar utilizando, por ejemplo, un homogeneizador de alta presión que puede tener múltiples cámaras de interacción (2, 3, 4 o más) y con, por ejemplo, una presión de alimentación de aproximadamente 2000 a aproximadamente 8000, por ejemplo, de aproximadamente 2000 a aproximadamente 6000, por cámara de interacción.

En algunas realizaciones, el enfriamiento se puede realizar al menos parcialmente a una temperatura de aproximadamente 5 °C o menos, por ejemplo, de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C. Una relación de enfriamiento:emulsión puede ser de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 5:1, o de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 40:1.

Los solubilizantes de fármacos de ejemplos para su uso en los procedimientos desvelados pueden incluir Tween 80, Tween 20, polivinilpirrolidona, ciclodextrano, dodecilsulfato de sodio o colato de sodio. En algunas realizaciones, un solubilizante de fármacos se selecciona entre el grupo que consiste en dietilnitrosamina, acetato de sodio, urea, glicerina, propilenglicol, glicofurool, poli(etilenglicol), bis(polioxi(etilenglicol)dodecil)éter, benzoato de sodio y salicilato de sodio. La relación entre solubilizante de fármacos y agente terapéutico puede ser de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 10:1.

En una realización, un procedimiento puede incluir filtrar la fase solubilizada que contiene nanopartículas usando por ejemplo un sistema de filtración de flujo tangencial. La filtración se puede realizar, por ejemplo, a una primera temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C y después a una segunda temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C. Como alternativa, la filtración se puede realizar, por ejemplo, a una primera temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C y después a una segunda temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C. En algunas realizaciones, la filtración comprende procesar de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 diavolumenes a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C y procesar al menos un diavolumen a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, por ejemplo, la filtración puede implicar procesar de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 diavolumenes a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C y procesar de aproximadamente 1 diavolumen a aproximadamente 15 diavolumenes a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C. En una realización, la filtración puede implicar procesar diferentes diavolumenes a diferentes temperaturas definidas. La fase solubilizada se puede purificar antes de dicha filtración para eliminar sustancialmente dicho disolvente orgánico, agente terapéutico no encapsulado y/o solubilizante de fármacos.

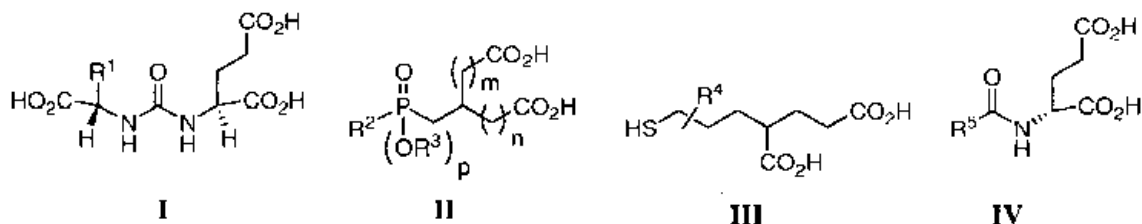
Los procedimientos desvelados pueden comprender la filtración esterilizante de la suspensión de nanopartículas terapéuticas utilizando un tren de filtración a una velocidad controlada. Por ejemplo, se puede usar un tren de filtración que comprenda un filtro de profundidad y un filtro esterilizante.

También se desvela en el presente documento un procedimiento de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas que comprende combinar un agente terapéutico, un primer polímero y opcionalmente un segundo polímero, con un disolvente orgánico para formar una primera fase orgánica, combinar la primera fase orgánica con una primera solución acuosa para formar una segunda fase; emulsionar la segunda fase para formar una fase en emulsión; enfriar la fase en emulsión para formar una fase enfriada; añadir un solubilizante de fármacos a la fase enfriada para formar una fase solubilizada de agente terapéutico no encapsulado; y filtrar la fase solubilizada utilizando filtración de flujo tangencial con diafiltración de volumen constante en la que al menos un diavolumen se expone a aproximadamente 25 °C después de haber expuesto un diavolumen diferente a una temperatura de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 10 °C. Por ejemplo, filtrar puede implicar procesar de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 diavolumenes a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C y después procesar al menos un diavolumen a 25 °C durante al menos un período de tiempo.

En el presente documento se proporcionan procedimientos de formación de nanopartículas terapéuticas que pueden ser estables durante al menos 2 días a 25 °C a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml. Las nanopartículas terapéuticas formadas utilizando los procedimientos desvelados pueden liberar menos del 10 % en peso de agente terapéutico en al menos 5 días a 25 °C. En algunas realizaciones, una nanopartícula terapéutica

formada utilizando un procedimiento desvelado puede, por ejemplo, encapsular de aproximadamente el 2 a aproximadamente el 30 % del agente terapéutico.

En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas desveladas que comprenden combinar un agente terapéutico, un primer polímero (por ejemplo, copolímero en dibloque PLGA-PEG o dibloque PLA-PEG), un segundo polímero opcional (por ejemplo, homopolímero PLA) y opcionalmente un tercer polímero (por ejemplo, PLA) en los que el primer polímero o el segundo polímero pueden estar unidos opcionalmente a un ligando con un peso molecular menor de aproximadamente 1000 g/mol, por ejemplo, un ligando de bajo peso molecular, por ejemplo, un ligando de PSMA. Dicho ligando de PSMA de bajo peso molecular se puede seleccionar entre el grupo que consiste en los compuestos I, II, III y IV:



y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos; en los que

m y n cada uno, independientemente, es 0, 1, 2 o 3;

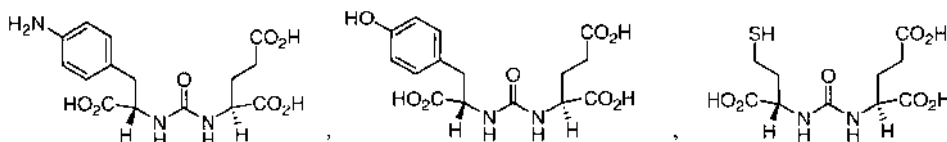
p es 0 o 1;

R¹, R², R⁴ y R⁵ cada uno, independientemente, se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir y cualquier combinación de los mismos; y

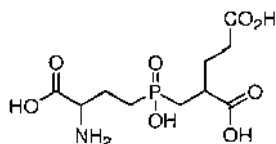
R³ es H o CH₃;

en los que R¹, R², R⁴ o R⁵ comprenden un punto de unión covalente a la nanopartícula. Por ejemplo, R¹, R², R⁴ y R⁵ pueden ser cada uno, independientemente, alquilo C₁₋₆ o fenilo, o cualquier combinación de alquilo C₁₋₆ o fenilo, que están independientemente sustituidos una o más veces con OH, SH, NH₂ o CO₂H y en los que el grupo alquilo puede estar interrumpido por N(H), S u O. En otra realización, por ejemplo, R¹, R², R⁴ y R⁵ cada uno, independientemente, es CH₂-Ph, (CH₂)₂-SH, CH₂-SH, (CH₂)₂C(H)(NH₂)CO₂H, CH₂C(H)(NH₂)CO₂H,

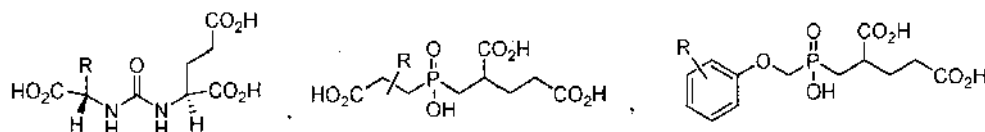
CH(NH₂)CH₂CO₂H, (CH₂)₂C(H)(SH)CO₂H, CH₂-N(H)-Ph, O-CH₂-Ph o O-(CH₂)₂-Ph, en los que cada Ph puede estar independientemente sustituido una o más veces con OH, NH₂, CO₂H o SH. El ligando de PSMA de bajo peso molecular de ejemplo se puede seleccionar entre el grupo que consiste en



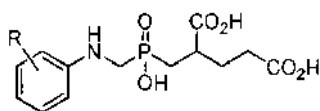
y



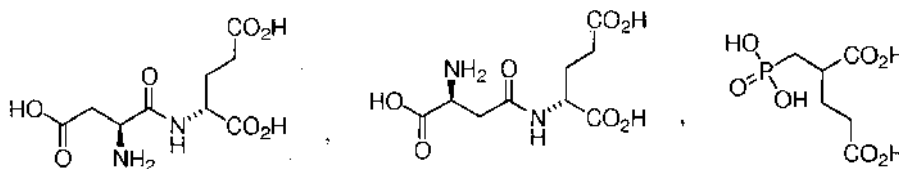
y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos; y en los que los grupos NH₂, OH o SH sirven como el punto de unión covalente a la primera partícula, o se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en



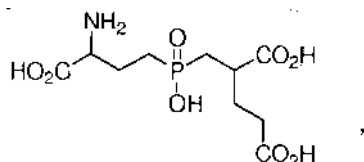
y



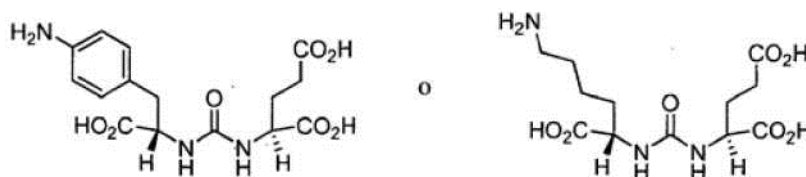
- 5 y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos; en los que R se elige independientemente entre el grupo que consiste en NH₂, SH, OH, CO₂H, alquilo C₁₋₆ que está sustituido con NH₂, SH, OH o CO₂H y fenilo que está sustituido con NH₂, SH, OH o CO₂H, y en los que R sirve como el punto de unión covalente al primer polímero. Los ligandos de ejemplo incluyen



y



- 10 y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos; cualquiera de los cuales puede estar sustituido además con NH₂, SH, OH, CO₂H, alquilo C₁₋₆ que está sustituido con NH₂, SH, OH o CO₂H, o fenilo que está sustituido con NH₂, SH, OH o CO₂H, en los que estos grupos funcionales sirven como el punto de unión covalente al primer polímero, por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular puede ser



- 15 y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos; en los que los grupos NH₂ sirven como el punto de unión covalente al primer polímero.

En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas desveladas que comprenden combinar un agente terapéutico, un primer polímero (por ejemplo, PLGA-PEG o PLA-PEG) y opcionalmente un segundo polímero (por ejemplo PLA, PLGA o PEG, o sus copolímeros) y un tercer polímero opcional (por ejemplo PLA o PLGA no unido a un ligando). En algunas realizaciones, el agente terapéutico es docetaxel. En otras realizaciones, el agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en antineoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), mitoxantrona, gemcitabina (gemzar), daunorubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleucina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, camptotecina, 10-hidroxi-7-etilcamptotecina (SN38), dacarbazina, S-1 capecitabina, ftorafur, 5'desoxiflouridina, eniluracilo, desoxicitidina, 5-azacitosina, 5-azadesoxicitosina, alopurinol, 2-cloroadenosina, trimetrexato, aminopterina, metileno-10-deazaaminopterina (MDAM), oxaplatino, picoplatino, tetraplatino, satraplatino, platino-DACH, ormaplatino y sus análogos, epirubicina, fosfato de etopósido, 9-aminocamptotecina, 10,11-metilenodioxycamptotecina, karenitecina, 9-nitrocamptotecina, vindesina, mostaza de L-fenilalanina, ifosfamidamefosfamida, perfosfamida, trofosfamida, carmustina, semustina, eptilones A-E, tomudex, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, amsacrina, fosfato de etopósido, karenitecina, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir, amantadina, rimantadina, lamivudina, zidovudina, bevacizumab, trastuzumab, rituximab y 5-fluorouracilo, metotrexato, budesonida, sirolimus, vincristina y sus combinaciones, o el agente terapéutico puede ser un ARNip.

35 También se proporcionan en el presente documento procedimientos para tratar el cáncer de próstata en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de la nanopartícula preparada por los procedimientos desvelados.

En una realización, también se proporciona en el presente documento una nanopartícula terapéutica preparada mediante: la emulsión de una primera fase orgánica que comprende un primer polímero y un agente terapéutico y una segunda fase que forma una fase en emulsión; en la que la fase en emulsión se enfría después a una

temperatura de 0 °C a 5 °C formando una fase enfriada; y la filtración de la fase enfriada a una primera temperatura de - 5°C a 10 °C; y la filtración de la fase enfriada a una segunda temperatura de 25 °C; formando de este modo nanopartículas terapéuticas que son estables durante al menos 5 días a 25 °C.

- 5 También se proporciona en una realización, un procedimiento de estabilización de nanopartículas terapéuticas que tienen un agente terapéutico que comprende: proporcionar una suspensión que contenga un agente terapéutico encapsulado por nanopartículas y un solubilizante de fármacos; filtrar la suspensión a una primera temperatura de - 5 °C a 10 °C; filtrar la suspensión a una segunda temperatura de 25 °C.

Breve descripción de las figuras

- 10 La figura 1 describe una representación gráfica de una realización de una nanopartícula desvelada.
 La figura 2 describe un esquema de síntesis de ejemplo para una nanopartícula desvelada.
 La figura 3 es un diagrama de flujo para un procedimiento de emulsión para formar la nanopartícula desvelada.
 La figura 4 es un diagrama de flujo para un procedimiento de emulsión desvelado.
 La figura 5 describe el efecto de la preparación de la emulsión gruesa sobre el tamaño de la partícula enfriada.
 15 Se usó placebo orgánico con el 30 % de sólidos, emulsionado a 5:1 W:O usando fase acuosa convencional (colato de sodio al 1 %, alcohol bencílico al 2 %, acetato de etilo al 4 %).
 La figura 6 describe el efecto de la presión de alimentación sobre el tamaño de partícula resultante.
 La figura 7 describe la dependencia del tamaño de partícula con la escala.
 La figura 8 describe el efecto de la concentración de sólidos sobre el tamaño de partícula.
 La figura 9 describe el efecto de la concentración de sólidos sobre la carga de fármaco.
 20 La figura 10 describe el efecto del homopolímero PLA con PLGA-PEG o PLA-PEG sobre la carga de DTXL (docetaxel).
 La figura 11 describe el efecto del homopolímero PLA como parte de una nanopartícula sobre la velocidad de liberación del fármaco desde una nanopartícula.
 La figura 12 describe el efecto del alcohol cetílico sobre la velocidad inicial de liberación del fármaco desde una
 25 nanopartícula.
 La figura 13 describe la liberación in vitro de docetaxel desde las nanopartículas desveladas en comparación con docetaxel convencional.
 La figura 14 describe el efecto de la concentración de sólidos y el homopolímero poli(láctico) sobre el porcentaje de carga de sirolimus (rapamicina).
 30 La figura 15 describe la liberación in vitro de sirolimus en el tiempo para las nanopartículas desveladas.
 La figura 16 describe los efectos del homopolímero poli(láctico) sobre el porcentaje de carga de temsirolimus.
 La figura 17 describe el efecto de la concentración de sólidos sobre el tamaño de las partículas que contienen temsirolimus.
 La figura 18 describe la liberación in vitro de temsirolimus en el tiempo para las nanopartículas desveladas.
 35 La figura 19 describe las propiedades de liberación in vitro de una nanopartícula desvelada de ejemplo que incluye vinorelbina.
 La figura 20 describe las propiedades de liberación in vitro de las nanopartículas desveladas que incluyen vincristina o docetaxel.
 La figura 21 describe la farmacocinética de vincristina y vincristina PTNP en ratas.
 40 La figura 22 describe el volumen promedio del tumor después de la administración de las nanopartículas desveladas que incluyen docetaxel en un modelo de xenoinjerto MX-1 de cáncer de mama en ratón.
 La figura 23 describe la concentración de docetaxel en tumores de ratón en un modelo de xenoinjerto MX-1 de cáncer de mama en ratón, 24 horas después de una dosis intravenosa de las nanopartículas desveladas que incluyen docetaxel.
 45 La figura 24 describe la distribución en el tumor de próstata de las nanopartículas desveladas que tienen docetaxel, después de la administración a ratones inoculados con células LNCaP de cáncer de próstata humano.
 La figura 25 muestra la supresión del crecimiento tumoral en ratones inoculados con células LNCaP de cáncer de próstata humano después de la administración de las nanopartículas desveladas con docetaxel.

Descripción detallada

- 50 La presente divulgación se refiere en general a nanopartículas poliméricas que incluyen un agente activo o terapéutico o fármaco y a procedimientos de fabricación y de uso de dichas nanopartículas terapéuticas. En general, una "nanopartícula" se refiere a cualquier partícula que tenga un diámetro menor de 1000 nm, por ejemplo, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 200 nm. Las nanopartículas terapéuticas desveladas pueden incluir nanopartículas que tengan un diámetro de aproximadamente 60 a aproximadamente 120 nm, o de
 55 aproximadamente 70 a aproximadamente 130 nm, o de aproximadamente 60 a aproximadamente 140 nm.

- Las nanopartículas desveladas pueden incluir de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 35 % en peso, de aproximadamente el 3 a aproximadamente el 40 % en peso, de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 30 % en peso, de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 30 % en peso, de aproximadamente el 15 y 25 % en peso, o incluso de aproximadamente el 4 a aproximadamente el 25 % en peso de un agente activo, tal como un
 60 agente antineoplásico, por ejemplo un agente taxano (por ejemplo docetaxel).

Las nanopartículas desveladas en el presente documento incluyen uno, dos, tres o más polímeros biocompatibles y/o biodegradables. Por ejemplo, una nanopartícula contemplada puede incluir de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 99 por ciento en peso de uno o más copolímeros en bloque que incluyan un polímero biodegradable y polietilenglicol y de aproximadamente el 0 a aproximadamente el 50 % en peso de un homopolímero biodegradable.

En una realización, las nanopartículas terapéuticas desveladas pueden incluir un ligando para administración dirigida, por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular eficaz para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno, tal como el cáncer de próstata, en un sujeto que lo necesita. En ciertas realizaciones, el ligando de bajo peso molecular se conjuga con un polímero y la nanopartícula comprende una cierta relación de polímero conjugado con ligando (por ejemplo, PLA-PEG-Ligando) a polímero no funcionalizado (por ejemplo PLA-PEG o PLGA-PEG). La nanopartícula puede tener una relación optimizada de estos dos polímeros de manera que una cantidad eficaz de ligando se asocie a la nanopartícula para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno, tal como el cáncer. Por ejemplo, una mayor densidad de ligando puede aumentar la unión a la diana (unión a la célula/absorción por la diana) haciendo que la partícula sea "específica para la diana". Como alternativa, una cierta concentración de polímero no funcionalizado (por ejemplo, copolímero PLGA-PEG no funcionalizado) en la nanopartícula puede controlar la inflamación y/o la inmunogenia (es decir, la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria) y permitir que la nanopartícula tenga una vida media de circulación que sea adecuada para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno (por ejemplo, cáncer de próstata). Además, el polímero no funcionalizado puede, en algunas realizaciones, reducir la velocidad de aclaramiento del sistema circulatorio a través del sistema reticuloendotelial (RES). Por tanto, el polímero no funcionalizado puede proporcionar la nanopartícula con características que pueden permitir a la partícula desplazarse a través del organismo después de su administración. En algunas realizaciones, un polímero no funcionalizado puede equilibrar la concentración de ligando, de lo contrario elevada, que de otra manera puede acelerar el aclaramiento por el sujeto, dando como resultado una menor entrega a las células que son la diana.

Por ejemplo, en el presente documento se desvelan nanopartículas que pueden incluir polímeros funcionalizados conjugados con un ligando que constituye aproximadamente el 0,1 - 30, por ejemplo, el 0,1 - 20, por ejemplo, el 0,1 - 10 por ciento en moles de toda la composición polimérica de la nanopartícula (es decir, polímero funcionalizado + no funcionalizado). También se desvelan en el presente documento, en otra realización, nanopartículas que incluyen un polímero conjugado (por ejemplo, covalentemente con (es decir a través de un engarce (por ejemplo un engarce alquileo) o un enlace) con uno o más ligandos de bajo peso molecular, en las que el porcentaje en peso de ligando de bajo peso molecular con respecto al polímero total es de entre aproximadamente el 0,001 y el 5, por ejemplo, entre aproximadamente el 0,001 y el 2, por ejemplo, entre aproximadamente el 0,001 y el 1.

También se proporcionan en el presente documento nanopartículas poliméricas que incluyen de aproximadamente el 2 a aproximadamente el 20 por ciento en peso de agente activo. Por ejemplo, una composición que comprende dichas nanopartículas puede ser capaz de administrar una cantidad eficaz por ejemplo la zona corporal diana de un paciente.

Por ejemplo, las partículas desveladas pueden ser capaces de unirse eficientemente o asociarse de otra manera a una entidad biológica, por ejemplo, un componente de membrana particular o un receptor de superficie celular. El direccionamiento de un agente terapéutico (por ejemplo, a un tipo de tejido o célula particular, a un tejido enfermo específico pero no al tejido normal, etc.) es deseable para el tratamiento de enfermedades tisulares específicas tales como cánceres de tumor sólido (por ejemplo, cáncer de próstata). Por ejemplo, en contraste con la administración sistémica de un anticancerígeno citotóxico, las nanopartículas desveladas en el presente documento pueden evitar en gran medida que el agente provoque la muerte de células sanas. Además, las nanopartículas desveladas pueden permitir la administración de una dosis menor del agente (en comparación con una cantidad eficaz de un agente administrado sin las nanopartículas o formulaciones desveladas) lo que puede reducir los efectos secundarios indeseables habitualmente asociados a la quimioterapia tradicional.

Polímeros

En algunas realizaciones, las nanopartículas de la invención comprenden una matriz de polímeros y un agente terapéutico. En algunas realizaciones, un agente terapéutico y/o un resto de direccionamiento (es decir un ligando de PSMA de bajo peso molecular) se pueden asociar al menos a parte de la matriz polimérica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un resto de direccionamiento (por ejemplo un ligando) se puede asociar covalentemente a la superficie de una matriz polimérica. En algunas realizaciones, la asociación covalente está mediada por un engarce. El agente terapéutico puede asociarse a la superficie de, ser encapsulado dentro de, ser rodeado por y/o dispersarse en toda, la matriz polimérica.

Se conoce una amplia diversidad de polímeros y procedimientos para formar partículas a partir de ellos en la técnica de la entrega de fármacos. En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a nanopartículas con al menos dos macromoléculas, en las que la primera macromolécula comprende un primer polímero unido a un ligando de bajo peso molecular (por ejemplo, un resto de direccionamiento); y la segunda macromolécula comprende un segundo polímero que no está unido a un resto de direccionamiento. La nanopartícula puede incluir opcionalmente uno o más polímeros no funcionalizados adicionales.

Se puede usar cualquier polímero de acuerdo con la presente invención. Los polímeros pueden ser naturales o no naturales (sintéticos). Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros que comprenden dos o más monómeros. En términos de secuencia, los copolímeros pueden ser aleatorios, en bloque o comprender una combinación de secuencias aleatorias y en bloque. Normalmente, los polímeros de acuerdo con la presente invención son polímeros orgánicos.

Al término "polímero", como se usa en el presente documento, se le da su significado habitual como se usa en la técnica, es decir, una estructura molecular que comprende una o más unidades de repetición (monómeros) conectadas por enlaces covalentes. Las unidades de repetición pueden ser todas idénticas, o en algunos casos, puede haber presente más de un tipo de unidades de repetición dentro del polímero. En algunos casos, el polímero puede ser un derivado biológico, es decir, un biopolímero. Los ejemplos no limitantes incluyen péptidos o proteínas. En algunos casos, también pueden estar presentes en el polímero restos adicionales, por ejemplo, restos biológicos tales como los que se describen a continuación. Si está presente más de un tipo de unidades de repetición dentro del polímero, entonces se dice que el polímero es un "copolímero". Se debe entender que en cualquier realización que emplee un polímero, el polímero que se emplee puede ser, en algunos casos, un copolímero. Las unidades de repetición que forman el copolímero pueden estar dispuestas de cualquier manera. Por ejemplo, las unidades de repetición se pueden disponer en un orden aleatorio, en un orden alternante, o como un copolímero en bloque, es decir, que comprende una o más regiones, cada una de las cuales contiene una primera unidad de repetición (por ejemplo, un primer bloque) y una o más regiones que cada una contiene una segunda unidad de repetición (por ejemplo un segundo bloque), etc. Los copolímeros en bloque pueden tener dos (copolímero en dibloque), tres (copolímero en tribloque) o un mayor número de bloques diferentes.

Las partículas desveladas pueden incluir copolímeros, los que, en algunas realizaciones, describen dos o más polímeros (tales como los que se describen en el presente documento) que se han asociado entre sí, por lo general mediante unión covalente de los dos o más polímeros. Por tanto, un copolímero puede comprender un primer polímero y un segundo polímero, que se han conjugado para formar un copolímero en bloque en el que el primer polímero puede ser un primer bloque del copolímero en bloque y el segundo polímero puede ser un segundo bloque del copolímero en bloque. Por supuesto, los expertos en la materia entenderán que un copolímero en bloque puede, en algunos casos, contener múltiples bloques de polímero y que un "copolímero en bloque", como se usa en el presente documento, no está limitado solo a copolímeros en bloque que tengan únicamente un único primer bloque y un único segundo bloque. Por ejemplo, un copolímero en bloque puede comprender un primer bloque que comprenda un primer polímero, un segundo bloque que comprenda un segundo polímero y un tercer bloque que comprenda un tercer polímero o el primer polímero, etc. En algunos casos, los copolímeros en bloque pueden contener cualquier cantidad de primeros bloques de un primer polímero y segundos bloques de un segundo polímero (y en ciertos casos, terceros bloques, cuartos bloques, etc.). Además, se debe destacar que los copolímeros en bloque también se pueden formar, en algunos casos, a partir de otros copolímeros en bloque. Por ejemplo, un primer copolímero en bloque se puede conjugar con otro polímero (que puede ser un homopolímero, un biopolímero, otro copolímero en bloque, etc.), para formar un nuevo copolímero en bloque que contenga múltiples tipos de bloques y/o con otros restos (por ejemplo, con restos no poliméricos).

En algunas realizaciones, el polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero en bloque) puede ser anfifílico, es decir tener una porción hidrófila y una porción hidrófoba, o una porción relativamente hidrófila y una porción relativamente hidrófoba. Un polímero hidrófilo puede ser uno que generalmente atrae agua y un polímero hidrófobo puede ser uno que generalmente repele el agua. Se puede identificar un polímero hidrófilo o un polímero hidrófobo, por ejemplo, preparando una muestra del polímero y midiendo su ángulo de contacto con el agua (normalmente, el polímero hidrófilo tendrá un ángulo de contacto menor de 60°, en tanto el polímero hidrófobo tendrá un ángulo de contacto mayor de aproximadamente 60°). En algunos casos, la hidrofilia de dos o más polímeros se puede medir en uno con respecto al otro, es decir, un primer polímero puede ser más hidrófilo que un segundo polímero. Por ejemplo, el primer polímero puede tener un ángulo de contacto menor que el segundo polímero.

En un conjunto de realizaciones, un polímero (por ejemplo copolímero, por ejemplo copolímero en bloque) contemplado en el presente documento incluye un polímero biocompatible, es decir, el polímero que normalmente no induce una respuesta adversa cuando se lo introduce o inyecta en un sujeto vivo, por ejemplo, sin una inflamación significativa y/o un rechazo agudo del polímero por el sistema inmunitario, por ejemplo, a través de la respuesta de los linfocitos T. En consecuencia, las partículas terapéuticas contempladas en el presente documento pueden ser no inmunógenas. La expresión no inmunógeno como se usa en el presente documento se refiere al factor de crecimiento endógeno en su estado nativo que normalmente no produce, o produce solo niveles mínimos de, anticuerpos circulantes, linfocitos T o células inmunorreactivas y que normalmente no produce en el individuo una respuesta contra sí mismo.

Biocompatibilidad se refiere normalmente al rechazo agudo de un material por al menos una porción del sistema inmunitario, es decir, un material no biocompatible implantado en un sujeto provoca una respuesta inmunitaria en el sujeto que puede ser lo suficientemente grave para que el rechazo del material por el sistema inmunitario no pueda ser controlado adecuadamente y con frecuencia es de tal magnitud que el material debe ser retirado del sujeto. Una prueba simple para determinar la biocompatibilidad puede ser exponer un polímero a las células in vitro; los polímeros biocompatibles son polímeros que generalmente no producen una muerte celular significativa a concentraciones moderadas, por ejemplo, a concentraciones de 50 microgramos/10⁶ células. Por ejemplo, un

polímero biocompatible puede provocar menos de aproximadamente el 20 % de muerte celular cuando se expone a células tales como fibroblastos o células epiteliales, incluso si es fagocitado o absorbido de otra manera por dichas células. Los ejemplos no limitantes de polímeros biocompatibles que pueden ser útiles en diversas realizaciones de la presente invención incluyen polidioxanona (PDO), polihidroxialcanoato, polihidroxibutirato, poli(sebacato de glicerol), poliglicólido, poliláctido, PLGA, policaprolactona o copolímeros o derivados que incluyen éstos y otros polímeros.

En ciertas realizaciones, los polímeros biocompatibles contemplados pueden ser biodegradables, es decir el polímero es capaz de degradarse, química y/o biológicamente en un ambiente fisiológico, tal como dentro del organismo. Como se usa en el presente documento, polímeros "biodegradables" son los que, cuando se introducen en las células, son escindidos por la maquinaria celular (biólogicamente degradables) y/o por un proceso químico, tal como la hidrólisis, (químicamente degradables) en componentes que las células pueden reutilizar o desechar sin un efecto tóxico significativo sobre las células. En una realización, el polímero biodegradable y sus subproductos de degradación pueden ser biocompatibles.

Por ejemplo, un polímero contemplado puede ser uno que se hidrolice espontáneamente tras la exposición al agua (por ejemplo, dentro de un sujeto), el polímero se puede degradar al exponerse al calor (por ejemplo, a temperaturas de aproximadamente 37 °C). La degradación de un polímero puede ocurrir a diversas velocidades, dependiendo del polímero o copolímero utilizado. Por ejemplo, la vida media del polímero (el tiempo al cual el 50 % del polímero se puede degradar en monómeros y/u otros restos no poliméricos) puede ser del orden de días, semanas, meses o años, dependiendo del polímero. Los polímeros pueden ser degradados biológicamente, es decir mediante actividad enzimática o la maquinaria celular, en algunos casos, por ejemplo, a través de la exposición a una lisozima (por ejemplo, que tiene un pH relativamente bajo). En algunos casos, los polímeros se pueden escindir en monómeros y/u otros restos no poliméricos que las células pueden reutilizar o desechar sin efecto tóxico significativo sobre las células (por ejemplo, el poliláctido se puede hidrolizar para formar ácido láctico, el poliglicólido se puede hidrolizar para formar ácido glicólico, etc.).

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

En algunas realizaciones, un polímero puede ser PLGA. PLGA es un copolímero biocompatible y biodegradable de ácido láctico y ácido glicólico y diversas formas de PLGA se pueden caracterizar mediante la relación ácido láctico:ácido glicólico. El ácido láctico puede ser ácido L-láctico, ácido D-láctico, o ácido D,L-láctico. La velocidad de degradación de PLGA se puede ajustar alterando la relación ácido láctico-ácido glicólico. En algunas realizaciones, el PLGA que se va a usar de acuerdo con la presente invención se puede caracterizar por una relación ácido láctico:ácido glicólico de aproximadamente 85:15, aproximadamente 75:25, aproximadamente 60:40, aproximadamente 50:50, aproximadamente 40:60, aproximadamente 25:75 o aproximadamente 15:85. En algunas realizaciones, la relación entre los monómeros de ácido láctico y ácido glicólico en el polímero de la partícula (por ejemplo, el copolímero en bloque PLGA o copolímero en bloque PLGA-PEG), se puede seleccionar para optimizar diversos parámetros tales como la absorción de agua; se pueden optimizar la liberación del agente terapéutico y/o la cinética de degradación del polímero.

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

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser polímeros catiónicos. En general, los polímeros catiónicos son capaces de condensar y/o proteger cadenas de ácidos nucleicos cargadas negativamente (por ejemplo, ADN, ARN o sus derivados). Se contemplan polímeros que contienen amina tale como poli(lisina), polietileno imina (PEI) y dendrímeros poli(amidoamina) para su uso, en algunas realizaciones, en una partícula desvelada.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres degradables que tienen cadenas laterales catiónicas. Los ejemplos de estos poliésteres incluyen poli(L-láctido-co-L-lisina), poli(éster serina), poli(éster 4-hidroxi-L-prolina).

Las partículas desveladas en el presente documento pueden, o no, contener PEG. Además, ciertas realizaciones pueden referirse a copolímeros que contienen poli(éster-éter), por ejemplo, polímeros que tienen unidades de repetición unidas por enlaces éster (por ejemplo, enlaces R-C(O)-O-R') y enlaces éter (por ejemplo, enlaces R-OR'). En algunas realizaciones de la invención, un polímero biodegradable, tal como un polímero hidrolizable que contiene grupos ácido carboxílico, se puede conjugar con unidades de repetición de poli(etilenglicol) para formar un poli(éster-éter). Un polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero en bloque) que contiene unidades de repetición poli(etilenglicol) también se puede denominar un polímero "PEGilado".

Se contempla que PEG puede incluir un grupo en el extremo terminal, por ejemplo, cuando PEG no está conjugado con un ligando. Por ejemplo, PEG puede terminar en un hidroxilo, un metoxi u otro grupo alcoxilo, un grupo metilo u otro grupo alquilo, un grupo arilo, un ácido carboxílico, una amina, una amida, un grupo acetilo, un grupo guanidino o un imidazol. Otros grupos terminales contemplados incluyen grupos azida, alquino, maleimida, aldehído, hidrazida, hidroxilamina, alcoxiamina o tiol.

Los expertos en la materia conocerán procedimientos y técnicas para PEGilar un polímero, por ejemplo, utilizando EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y NHS (N-hidroxisuccinimida) para hacer reaccionar un polímero con un grupo PEG que termina en una amina, mediante técnicas de polimerización de apertura del anillo (ROMP, por sus siglas en inglés), o análogas.

En una realización, el peso molecular de los polímeros se puede optimizar para un tratamiento eficaz como el desvelado en el presente documento. Por ejemplo, el peso molecular de un polímero puede influir en la velocidad de degradación de la partícula (tal como cuando el peso molecular de un polímero biodegradable se puede ajustar), la solubilidad, la absorción de agua y la cinética de liberación del fármaco. Por ejemplo, el peso molecular del polímero se puede ajustar de modo que la partícula se biodegrade en el sujeto en tratamiento en un período razonable de tiempo (que varíe de unas pocas horas a 1-2 semanas, 3-4 semanas, 5-6 semanas, 7-8 semanas, etc.). Una partícula desvelada puede, por ejemplo, comprender un copolímero en dibloque de PEG y PL(G)A, en el que por ejemplo, la porción PEG puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 1.000-20.000, por ejemplo, de aproximadamente 2.000-20.000, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10.000 y la porción PL(G)A puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000, o de aproximadamente 5.000 y 100.000, por ejemplo, de aproximadamente 20.000 y 70.000, por ejemplo, de aproximadamente 15.000 y 50.000.

Por ejemplo, en el presente documento se desvela una nanopartícula terapéutica de ejemplo que incluye de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 99 por ciento en peso de copolímero ácido poli(láctico)-bloque-poli(etilenglicol) o copolímero ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-bloque-poli(etilenglicol), o de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 80 por ciento en peso, de aproximadamente el 40 a aproximadamente el 80 por ciento en peso, o de aproximadamente el 30 y alrededor 50 por ciento en peso, o de aproximadamente el 70 a aproximadamente el 90 por ciento en peso de copolímero ácido poli(láctico)-poli(etilenglicol) o copolímero ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-poli(etilenglicol). Los copolímeros de ácido poli(láctico)-poli(etilenglicol) de ejemplo pueden incluir un peso molecular promedio en número de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 kDa, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 kDa de ácido poli(láctico) y un peso molecular promedio en número de aproximadamente 4 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 10 kDa de poli(etilenglicol).

Las nanopartículas desveladas pueden incluir opcionalmente de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 50 por ciento en peso de ácido poli(láctico) o ácido poli(láctico)-co-ácido poli(glicólico) (que no incluya PEG), o pueden opcionalmente incluir de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 50 por ciento en peso, o de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 50 por ciento en peso o de aproximadamente el 30 a aproximadamente el 50 por ciento en peso de ácido poli(láctico) o ácido poli(láctico)-co-ácido poli(glicólico). Por ejemplo, el ácido poli(láctico) o el ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico) puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 kDa, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 kDa. El PLA de ejemplo puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 kDa. El PLGA de ejemplo puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 8 a aproximadamente 12 kDa.

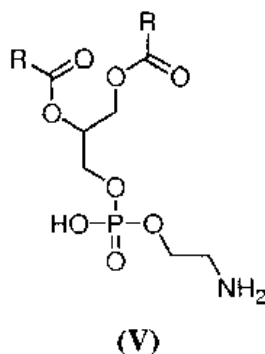
En ciertas realizaciones, los polímeros de las nanopartículas pueden estar conjugados con un lípido. El polímero puede ser, por ejemplo, PEG terminado en lípido. Como se ha descrito anteriormente, la porción lipídica del polímero se puede usar para el autoensamblaje con otro polímero, facilitando la formación de una nanopartícula. Por ejemplo, se podría conjugar un polímero hidrófilo con un lípido que se autoensamblará con un polímero hidrófobo.

En algunas realizaciones, los lípidos son aceites. En general, cualquier aceite conocido en la técnica se puede conjugar con los polímeros utilizados en la invención. En algunas realizaciones, un aceite puede comprender uno o más grupos ácido graso o sales de los mismos. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede comprender, hidrocarburos digeribles de cadena larga (por ejemplo, C₈-C₅₀), sustituidos o sin sustituir. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser un ácido graso C₁₀-C₂₀ o una sal del mismo. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede ser un ácido graso C₁₅-C₂₀ o una sal del mismo. En algunas realizaciones, un ácido graso puede estar insaturado. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede estar monoinsaturado. En algunas realizaciones, un grupo ácido graso puede estar poliinsaturado. En algunas realizaciones, un doble enlace de un

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

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

En una realización particular, el lípido tiene la fórmula V:



y sales de la misma, en la que cada R es, independientemente, alquilo C₁₋₃₀. En una realización de fórmula V, el lípido es 1,2 diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) y sales de la misma, por ejemplo, la sal de sodio.

En una realización, los restos de direccionamiento de molécula pequeña opcionales están unidos, por ejemplo, unidos covalentemente, al componente lipídico de la nanopartícula. Por ejemplo, en el presente documento se proporciona una nanopartícula que comprende un agente terapéutico, una matriz polimérica que comprende polímeros funcionalizados y no funcionalizados y lípido y un ligando de direccionamiento de PSMA de bajo peso molecular, en los que el ligando de direccionamiento está unido, por ejemplo, unido covalentemente, al componente lipídico de la nanopartícula. En una realización, el componente lipídico que está unido al resto de direccionamiento de bajo peso molecular tiene la fórmula V. En otra realización, la invención proporciona una nanopartícula específica para la diana que comprende un agente terapéutico, una matriz polimérica, DSPE y un ligando de direccionamiento de PSMA de bajo peso molecular, en la que el ligando está unido, por ejemplo, unido covalentemente, a DSPE. Por ejemplo, la nanopartícula de la invención puede comprender una matriz polimérica constituida por PLGA-DSPE-PEG-Ligando.

Una nanopartícula contemplada puede incluir una relación entre polímero unido a ligando y polímero no funcionalizado eficaz para el tratamiento del cáncer de próstata, en la que el polímero hidrófilo unido al ligando, se conjuga con un lípido que se autoensamblará con el polímero hidrófobo, de modo que los polímeros hidrófobo e hidrófilo que constituyen la nanopartícula no estén unidos covalentemente. "Autoensamblaje" se refiere a un procedimiento de ensamblaje espontáneo de una estructura de orden superior que depende de la atracción natural de los componentes de la estructura de orden superior (por ejemplo, moléculas) entre sí. Se produce normalmente a través de movimientos aleatorios de las moléculas y la formación de enlaces basándose en el tamaño, la forma, la composición o las propiedades químicas. Por ejemplo, un procedimiento de este tipo consiste en proporcionar un primer polímero que se hace reaccionar con un lípido para formar un conjugado polímero/lípido. El conjugado polímero/lípido se hace reaccionar después con el ligando de bajo peso molecular para preparar un conjugado polímero unido a ligando/lípido; y se mezcla el conjugado polímero unido a ligando/lípido con un segundo polímero no funcionalizado y el agente terapéutico; de modo que se forme la nanopartícula. En ciertas realizaciones, el primer polímero es PEG, de modo que se forma un PEG terminado en lípido. En una realización, el lípido tiene la fórmula V, por ejemplo, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) y sales de la misma, por ejemplo, la sal de sodio. Después el PEG terminado en lípido se puede, por ejemplo, mezclar con PLGA para formar una nanopartícula.

Restos de direccionamiento

En el presente documento se proporcionan nanopartículas que pueden incluir un resto de direccionamiento opcional, es decir un resto capaz de unirse o asociarse de otra manera a una entidad biológica, por ejemplo, un componente de membrana, un receptor de superficie celular, un antígeno prostático específico de membrana o similares. Un resto de direccionamiento presente en la superficie de la partícula puede permitir que la partícula se localice en un sitio particular que es la diana, por ejemplo, un tumor, un sitio de enfermedad, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. como tal, la nanopartícula puede ser entonces "específica para la diana". El fármaco, o carga útil, puede después, en algunos casos, ser liberado de la partícula y habilitado a interactuar localmente con el sitio particular que es la diana.

En una realización, una nanopartícula desvelada incluye un resto de direccionamiento que es un ligando de bajo peso molecular, por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular. El término "unirse" o "que se une", como

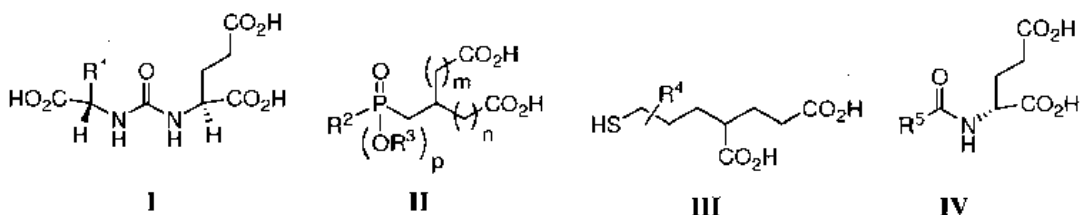
se usa en el presente documento, se refiere a la interacción entre un par correspondiente de moléculas o sus porciones que tienen afinidad mutua o capacidad de unión, normalmente debido a una unión o interacción específica o no específica, incluidas, pero no exclusivamente, las interacciones bioquímicas, fisiológicas y/o químicas. "Unión biológica" define un tipo de interacción que se produce entre pares de moléculas que incluyen proteínas, ácidos nucleicos, glucoproteínas, hidratos de carbono, hormonas o similares. La expresión "compañero de unión" se refiere a una molécula que puede unirse a otra molécula particular. "Unión específica" se refiere a moléculas, como polinucleótidos, que son capaces de unirse o reconocer a un compañero de unión (o a un número limitado de compañeros de unión) en mayor medida que a otras entidades biológicas similares. En un conjunto de realizaciones, el resto de direccionamiento tiene una afinidad (medida a través de la constante de disociación) menor de aproximadamente 1 micromolar, al menos de aproximadamente 10 micromolar, o al menos de aproximadamente 100 micromolar.

Por ejemplo, una porción de direccionamiento puede hacer que las partículas se localicen en un tumor (por ejemplo un tumor sólido), un sitio de enfermedad, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. en el organismo de un sujeto, dependiendo del resto de direccionamiento utilizado. Por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular se puede localizar en un tumor sólido, por ejemplo, tumores de mama o próstata, o células cancerosas. El sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano. Los ejemplos de sujetos incluyen, pero no exclusivamente, un mamífero tal como un perro, un gato, un caballo, un burro, un conejo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, una rata, un ratón, una cobaya, un hámster, un primate, un ser humano o similares.

Los restos de direccionamiento contemplados incluyen moléculas pequeñas. En ciertas realizaciones, la expresión "molécula pequeña" se refiere a compuestos orgánicos, ya sean naturales o creados artificialmente (por ejemplo, por síntesis química) que tienen un peso molecular relativamente bajo y que no son proteínas, polipéptidos ni ácidos nucleicos. Las moléculas pequeñas tienen normalmente múltiples enlaces carbono-carbono. En ciertas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen menos de aproximadamente 2000 g/mol de tamaño. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen menos de aproximadamente 1500 gramos/mol o menos de aproximadamente 1000 g/mol. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas tienen menos de aproximadamente 800 g/mol o menos de aproximadamente 500 g/mol, por ejemplo de aproximadamente 100 g/mol a aproximadamente 600 g/mol, o de aproximadamente 200 g/mol a aproximadamente 500 g/mol.

Por ejemplo un resto de direccionamiento puede dirigirse a tumores de cáncer prostático, por ejemplo un resto de direccionamiento puede ser el inhibidor de la PSMA peptidasa. Estos restos también se denominan en el presente documento "ligandos de PSMA de bajo peso molecular". Cuando se compara con la expresión en tejidos normales, la expresión del antígeno prostático específico de membrana (PSMA, de inglés *prostate specific membrane antigen*) está al menos sobreexpresada 10 veces en el tumor de próstata con respecto al tejido normal y el nivel de expresión de PSMA aumenta aún más a medida que la enfermedad progresa a las fases metastásicas (Silver y col. 1997, *Clin. Cancer Res.*, 3:81).

En algunas realizaciones, el ligando de PSMA de bajo peso molecular tiene las fórmulas I, II, III o IV:



y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos;

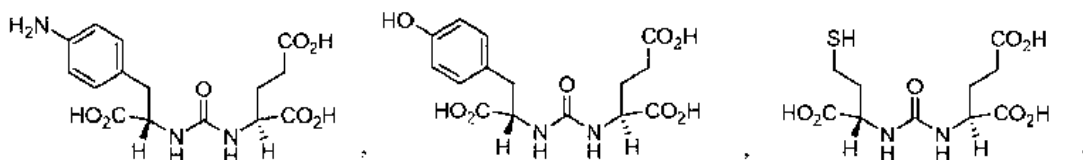
en los que m y n cada uno, independientemente, es 0, 1, 2 o 3; p es 0 o 1; R¹, R², R⁴ y R⁵, cada uno, independientemente, se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo sustituido o sin sustituir (por ejemplo, C₁₋₁₀-alquilo, alquilo C₁₋₆ o alquilo C₁₋₄), arilo sustituido o sin sustituir (por ejemplo, fenilo o piridinilo) y cualquier combinación de los mismos; y R³ es H o alquilo C₁₋₆ (por ejemplo, CH₃).

Para los compuestos de fórmulas I, II, III y IV, R¹, R², R⁴ o R⁵ comprenden puntos de unión a la nanopartícula, por ejemplo, un punto de unión a un polímero que forma parte de una nanopartícula desvelada, por ejemplo, PEG. El punto de unión puede estar formado por un enlace covalente, un enlace iónico, un enlace de hidrógeno, un enlace formado por adsorción incluidas la adsorción química y la adsorción física, un enlace formado a partir de enlaces de van der Waals, o fuerzas de dispersión. Por ejemplo, si R¹, R², R⁴ o R⁵ se definen como una anilina o un grupo C₁₋₆-alquil-NH₂, podría eliminarse cualquier hidrógeno (por ejemplo, un hidrógeno de amino) de estos grupos funcionales de forma que el ligando de PSMA de bajo peso molecular se una covalentemente a la matriz polimérica (por ejemplo, el bloque PEG de la matriz polimérica) de la nanopartícula. Como se usa en el presente documento, la expresión "enlace covalente" se refiere a un enlace entre dos átomos formado compartiendo al menos un par de electrones.

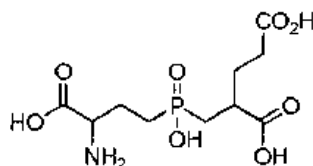
En realizaciones particulares de las fórmulas I, II, III o IV, R¹, R², R⁴ y R⁵ cada uno, independientemente, es alquilo

- 5 C₁₋₆ o fenilo, o cualquier combinación de alquilo C₁₋₆ o fenilo, que están independientemente sustituidos una o más veces con OH, SH, NH₂ o CO₂H, y en las que el grupo alquilo puede estar interrumpido por N(H), S o O. En otra realización, por ejemplo, R¹, R², R⁴ y R⁵ cada uno, independientemente, es CH₂-Ph, (CH₂)₂-SH, CH₂-SH, (CH₂)₂C(H)(NH₂)CO₂H, CH₂C(H)(NH₂)CO₂H, CH(NH₂)CH₂CO₂H, (CH₂)₂C(H)(SH)CO₂H, CH₂-N(H)-Ph, O-CH₂-Ph o O-(CH₂)₂-Ph, en los que cada Ph puede estar independientemente sustituido una o más veces con OH, NH₂, CO₂H o SH. Para estas fórmulas, los grupos NH₂, OH o SH sirven como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por ejemplo, -N(H)-PEG, -O-PEG o -S-PEG).

En otra realización más, el ligando de PSMA de bajo peso molecular se selecciona entre el grupo que consiste en

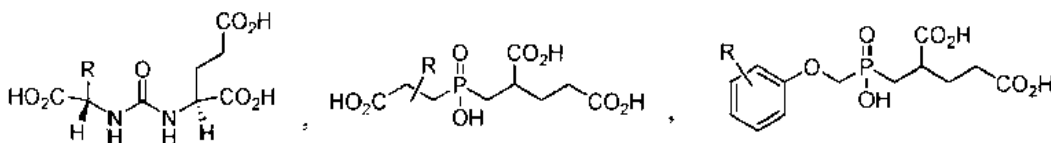


- 10 y

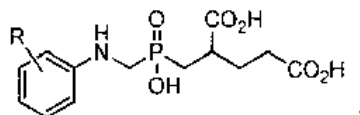


y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos y en los que los grupos NH₂, OH o SH sirven como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por ejemplo, -N(H)-PEG, -O-PEG o -S-PEG).

- 15 En otra realización, el ligando de PSMA de bajo peso molecular se selecciona entre el grupo que consiste en

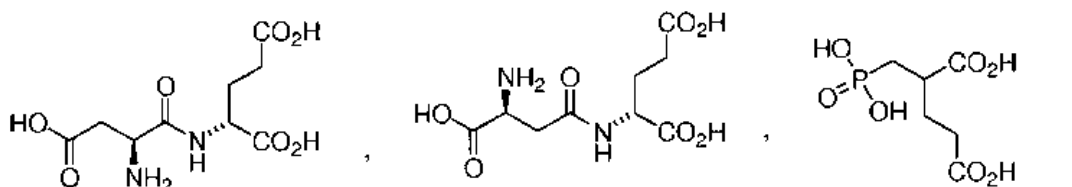


y

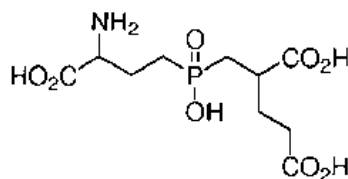


- 20 y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos; en los que R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en NH₂, SH, OH, CO₂H, alquilo C₁₋₆ que está sustituido con NH₂, SH, OH o CO₂H y fenilo que está sustituido con NH₂, SH, OH o CO₂H y en los que R sirve como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por ejemplo, -N(H)-PEG, -S-PEG, -O-PEG o CO₂-PEG).

En otra realización, el ligando de PSMA de bajo peso molecular se selecciona entre el grupo que consiste en

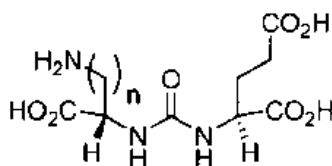


- 25 y



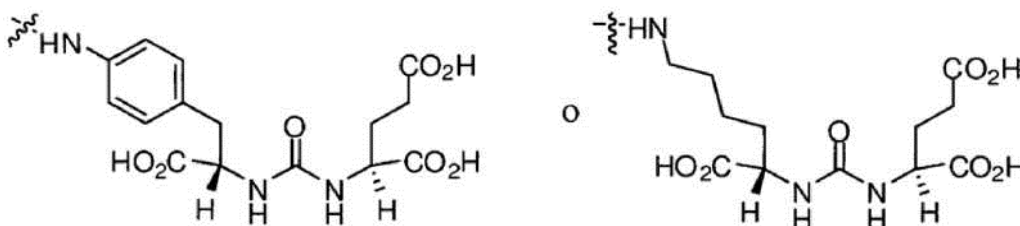
5 y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos y en los que los grupos NH_2 o CO_2H sirven como el punto de unión covalente a la nanopartícula (por ejemplo, $-\text{N}(\text{H})\text{-PEG}$ o $\text{CO}_2\text{-PEG}$). Estos compuestos se pueden sustituir adicionalmente con NH_2 , SH , OH , CO_2H , alquilo C_{1-6} que está sustituido con NH_2 , SH , OH o CO_2H , o fenilo que está sustituido con NH_2 , SH , OH o CO_2H , en los que estos grupos funcionales pueden también servir como el punto de unión covalente a la nanopartícula.

En otra realización, el ligando de PSMA de bajo peso molecular es



10 y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos y en los que n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Para este ligando, el grupo NH_2 sirve como punto de unión covalente a la nanopartícula (por ejemplo, $-\text{N}(\text{H})\text{-PEG}$).

En otra realización más, el ligando de PSMA de bajo peso molecular es



15 y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos. En particular, el compuesto butilamina tiene la ventaja de una síntesis fácil, especialmente debido a la falta de un anillo benceno. Además, sin desear quedar ligado a teoría alguna, el compuesto de butilamina se escindirá probablemente en las moléculas de origen natural (es decir, lisina y ácido glutámico) minimizando de este modo los problemas de toxicidad.

20 En algunas realizaciones, los restos de direccionamiento de molécula pequeña que se pueden usar para dirigirse a células asociadas a tumores sólidos tales como los tumores del cáncer de próstata o mama incluyen inhibidores de la PSMA peptidasa tal como 2-PMPA, GPI5232, VA-033, fenilalquilfosfonamidatos y/o sus análogos y derivados. En algunas realizaciones, los restos de direccionamiento de molécula pequeña que se pueden usar para tratar células asociadas a tumores de cáncer prostático incluyen derivados de tiol e indol tiol, tales como 2-MPPA y derivados del ácido 3-(2-mercaptoetil)-1H-indol-2-carboxílico. En algunas realizaciones, los restos de direccionamiento de molécula pequeña que se pueden usar para dirigirse a células asociadas a tumores de cáncer prostático incluyen derivados de hidroxamato. En algunas realizaciones, los restos de direccionamiento de molécula pequeña que se pueden usar para dirigirse a células asociadas a tumores de cáncer prostático incluyen inhibidores a base de urea y PBDA, tales como ZJ 43, ZJ 11, ZJ 17, ZJ 38 y/o análogos y derivados de los mismos, agentes dirigidos a receptores de andrógenos (ARTA), poliaminas, tales como putrescina, espermina y espermidina e inhibidores de la enzima glutamato carboxilasa II (GCPII), también conocida como peptidasa NAAG o NAALADasa.

30 En otra realización de la invención actual, el resto de direccionamiento puede ser un ligando dirigido a Her2, EGFR o receptores toll.

35 Por ejemplo, los restos de direccionamiento contemplados pueden incluir un ácido nucleico, un polipéptido, una glucoproteína, un hidrato de carbono o un lípido. Por ejemplo, un resto de direccionamiento puede ser un resto de direccionamiento ácido nucleico (por ejemplo, un aptámero, por ejemplo, el aptámero A10) que se une a un marcador específico de un tipo de células. En general, un aptámero es un oligonucleótido (por ejemplo, AdN, ARN o un análogo o derivado de los mismos) que se une a una diana particular, tal como un polipéptido. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento puede ser un ligando natural o sintético para un receptor de la superficie celular, por ejemplo, un factor de crecimiento, una hormona, LDL, transferrina, etc. Un resto de direccionamiento puede ser un anticuerpo, término que pretende incluir fragmentos de anticuerpo, porciones características de

40

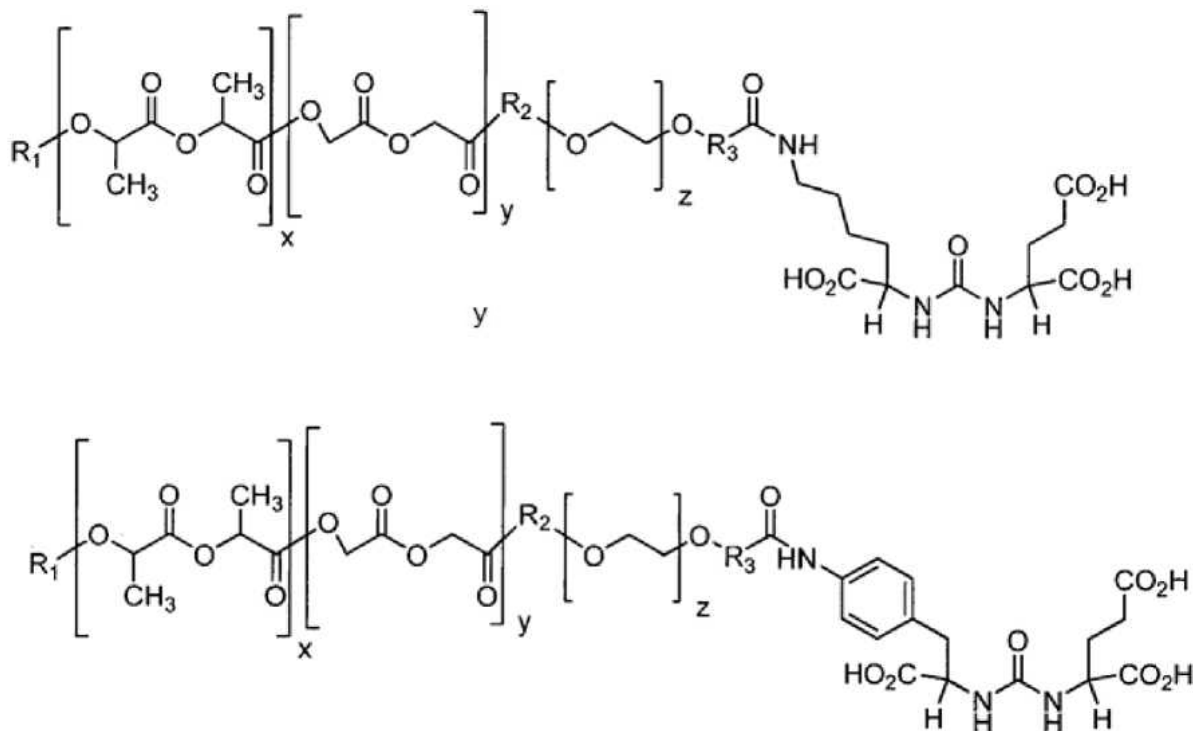
anticuerpos, los restos de direccionamiento de una sola cadena se pueden identificar, por ejemplo, usando procedimientos tales como presentación en fago.

Los restos de direccionamiento que pueden ser un péptido de direccionamiento o peptidomimético de direccionamiento que tenga una longitud de hasta aproximadamente 50 restos. Por ejemplo, un resto de direccionamiento puede incluir la secuencia de aminoácidos AKERC, CREKA, ARYLQKLN o AXYLZZLN, en los que X y Z son aminoácidos variables, o variantes conservadoras o peptidomiméticos de los mismos. En realizaciones particulares, el resto de direccionamiento es un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos AKERC, CREKA, ARYLQKLN o AXYLZZLN, en los que X y Z son aminoácidos variables y tiene una longitud de menos de 20, 50 o 100 restos. El péptido CREKA (Cys Arg Glu Lys Ala) o un péptidomimético del mismo o el octapéptido AXYLZZLN también se contemplan como restos de direccionamiento, así como los péptidos, o variantes conservadoras o peptidomiméticos de los mismos, que se unen o forman un complejo con colágeno IV, o la membrana basal de los tejidos diana (por ejemplo, la membrana basal de un vaso sanguíneo), se puede usar como un resto de direccionamiento. Los restos de direccionamiento de ejemplo incluyen péptidos que se dirigen a ICAM (molécula de adhesión intercelular, por ejemplo ICAM-1).

Los restos de direccionamiento desvelados en el presente documento se conjugan normalmente con un polímero o copolímero desvelado (por ejemplo PLA-PEG) y dicho conjugado polimérico puede formar parte de una nanopartícula desvelada. Por ejemplo, una nanopartícula terapéutica desvelada puede incluir opcionalmente de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 10 por ciento en peso de un PLA-PEG o PLGA-PEG, en los que el PEG está funcionalizado con un ligando de direccionamiento (por ejemplo PLA-PEG-Ligando). Las nanopartículas terapéuticas contempladas pueden incluir, por ejemplo, de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 10 por ciento en moles de PLA-PEG-GL2 o ácido poli(láctico)-co-ácido poli(glicólico)-PEG-GL2. Por ejemplo, PLA-PEG-GL2 puede incluir un peso molecular promedio en número de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 20 kDa y un peso molecular promedio en número de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 8.000.

Un ligando de direccionamiento de este tipo puede estar, en algunas realizaciones, unido covalentemente al PEG, por ejemplo, unido al PEG a través de un engarce alquileo, por ejemplo PLA-PEG-alquileo-GL2. Por ejemplo, una nanopartícula desvelada puede incluir de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 10 por ciento en moles de pLA-PEG-GL2 o ácido poli(láctico)-co-ácido poli(glicólico)-PEG-GL2. Se debe entender que la referencia a PLA-PEG-GL2 o PLGA-PEG-GL2 se refiere a grupos que pueden incluir un engarce alquileo (por ejemplo C1-C20, por ejemplo, (CH₂)_s) que una un PLA-PEG o PLGA-PEG a GL2.

Los ejemplos de conjugados poliméricos incluyen:



en los que R₁ se selecciona entre el grupo que consiste en H y un grupo alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido con uno, dos, tres o más halógenos;

R₂ es un enlace, una unión éster o una unión amida;

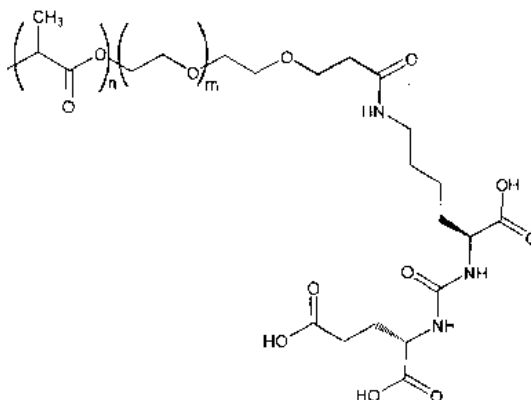
R₃ es un alquileo C₁-C₁₀ o un enlace;

35

x es de 50 a aproximadamente 1500, o de aproximadamente 60 a aproximadamente 1000;
 y es 0 a aproximadamente 50; y
 z es de aproximadamente 30 a aproximadamente 200, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 180.

5 En una realización diferente, x representa de 0 a aproximadamente 1 fracción molar; e y puede representar de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,5 fracción molar. En una realización de ejemplo, x+y puede ser de aproximadamente 20 a aproximadamente 1720 y/o z puede ser de aproximadamente 25 a aproximadamente 455.

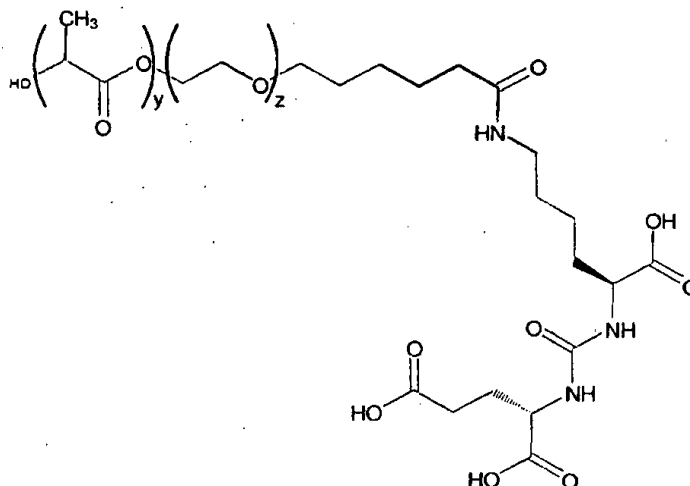
Por ejemplo, una nanopartícula desvelada puede incluir un grupo de direccionamiento polimérico representado por la fórmula VI:



10 en la que n es de aproximadamente 200 a aproximadamente 300, por ejemplo, aproximadamente 222 y m es de aproximadamente 80 a aproximadamente 130, por ejemplo aproximadamente 114. Las nanopartículas desveladas, en ciertas realizaciones, pueden incluir de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 4 % en peso de, por ejemplo, un conjugado polimérico de fórmula VI, o de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 2 % o de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 1 %, o de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 0,8 %
 15 en peso de, por ejemplo, un conjugado polimérico de fórmula VI.

En una realización de ejemplo, una nanopartícula desvelada comprende una nanopartícula que tiene un conjugado PLA-PEG-alkileno-GL2, en el que, por ejemplo, PLA tiene un peso molecular promedio en número de aproximadamente 16.000 Da, PEG tiene un peso molecular promedio en número de aproximadamente 5.000 Da y por ejemplo, el engarce alquileo es un alquileo C₁-C₂₀, por ejemplo (CH₂)₅.

20 Por ejemplo, una nanopartícula desvelada puede incluir un conjugado representado por:



en el que y es aproximadamente 222 y z es aproximadamente 114.

25 Un conjugado polimérico desvelado se puede formar usando cualquier técnica de conjugación adecuada. Por ejemplo, dos compuestos tales como un resto de direccionamiento y un polímero biocompatible, un polímero biocompatible y un poli(etilenglicol), etc., se pueden conjugar entre sí usando técnicas tales como química de EDC-NHS (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida) o una reacción que implique una maleimida o un ácido carboxílico, que se pueden conjugar con un extremo de un tiol, una amina o un poliéter similarmente funcionalizado. La conjugación de dichos polímeros, por ejemplo, la conjugación de un poli(éster) y un

poli(éter) para formar un poli(éster-éter), se puede realizar en un disolvente orgánico, tal como, pero no limitado a, diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida, tetrahidrofurano, acetona o similares. Las condiciones de reacción específicas pueden ser determinadas por los expertos en la materia utilizando simplemente la experimentación habitual.

5 En otro conjunto de realizaciones, se puede realizar una reacción de conjugación haciendo reaccionar un polímero que comprende un grupo funcional ácido carboxílico (por ejemplo, un compuesto poli(éster-éter)) con un polímero u otro resto (tal como un resto de direccionamiento) que comprenda una amina. Por ejemplo, un resto de direccionamiento, tal como un ligando de PSMA de bajo peso molecular, se puede hacer reaccionar con una amina para formar un resto que contenga amina, que después se puede conjugar con el ácido carboxílico del polímero.
 10 Una reacción de este tipo se puede producir como una reacción de un solo paso, es decir, la conjugación se realiza sin utilizar productos intermedios tales como N-hidroxisuccinimida o una maleimida. La reacción de conjugación entre el resto que contiene amina y el polímero terminado en ácido carboxílico (tal como un compuesto poli(éster-éter)) se puede lograr, en un conjunto de realizaciones, añadiendo el resto que contiene amina solubilizado en un disolvente orgánico tal como (pero no limitado a) diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, tetrahidrofurano, acetona,
 15 formamida, dimetilformamida, piridinas, dioxano o dimetilsulfóxido, a una solución que contiene el polímero terminado en ácido carboxílico. El polímero terminado en ácido carboxílico puede estar contenido en un disolvente orgánico tal como, pero no limitado a, diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida, tetrahidrofurano o acetona. La reacción entre el resto que contiene amina y el polímero terminado en ácido carboxílico puede, en algunos casos, producirse espontáneamente. Los reactivos no conjugados se pueden retirar por lavado después de
 20 dichas reacciones y el polímero se puede precipitar en disolventes tales como, por ejemplo, éter etílico, hexano, metanol o etanol.

Como ejemplo específico, un ligando de PSMA de bajo peso molecular se puede preparar como un resto de direccionamiento en una partícula de la manera siguiente. Se puede conjugar poli(láctido-co-glicólido) (PLGA-COOH) modificado con ácido carboxílico con un poli(etilenglicol) (NH₂-PEG-COOH) heterobifuncional modificado con
 25 amina para formar un copolímero PLGA-PEG-COOH. Utilizando un ligando de PSMA de bajo peso molecular modificado con amina (NH₂-Lig), se puede formar un polímero en tribloque de PLGA-PEG-Lig conjugando el extremo ácido carboxílico del PEG con el grupo funcional amina del ligando. El polímero multibloque después se puede usar, por ejemplo, como se trató antes, por ejemplo, para aplicaciones terapéuticas.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" comprende grupos alifáticos saturados, incluidos grupos alquilo de cadena lineal (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, etc.), grupos alquilo de cadena ramificada (isopropilo, terc-butilo, isobutilo, etc.), grupos cicloalquilo (alíclicos) (ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo.

El término "arilo" comprende grupos, incluidos grupos aromáticos de un solo anillo de 5 y 6 miembros que pueden tener de cero a cuatro heteroátomos, por ejemplo, fenilo, pirrol, furano, tiofeno, tiazol, isotiazol, imidazol, triazol, tetrazol, pirazol, oxazol, isoxazol, piridina, pirazina, piridazina, pirimidina y análogos. Además, el término "arilo" incluye grupos arilo multicíclicos, por ejemplo, tricíclicos, bicíclicos, como naftaleno, benzoxazol, benzodioxazol, benzotiazol, bencimidazol, benzotiofeno, metilendioxifenilo, quinolina, isoquinolina, antrilo, fenantrilo, naftridina, indol, benzofurano, purina, benzofurano, deazapurina o indolizina. Los grupos arilo que tienen heteroátomos en la estructura del anillo también se pueden denominar "aril heterociclos", "heterociclos", "heteroarilos" o "heteroaromáticos". El anillo aromático puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo con sustituyentes tales como los descritos anteriormente, por ejemplo, alquilo, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, alcocarboniloxi, ariloxicarboniloxi, carboxilato, alquilcarbonilo, alquilaminocarbonilo, aralquilaminocarbonilo, alquenilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, aralquilcarbonilo, alquenilcarbonilo, alcocarbonilo, aminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluidos alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), aclamino (incluidos alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfinito, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo, o un resto aromático o heteroaromático. Los grupos arilo también se pueden condensar o unir por puentes anillos alíclicos o heterocíclicos que no sean aromáticos para formar un policiclo (por ejemplo, tetralina).

Los restos de direccionamiento pueden estar, por ejemplo, sustituidos adicionalmente con un grupo funcional que se puede hacer reaccionar con un polímero de la invención (por ejemplo, PEG) para producir un polímero conjugado con un resto de direccionamiento. Los grupos funcionales incluyen cualquier resto que se pueda usar para crear un enlace covalente con un polímero (por ejemplo, PEG), tal como amino, hidroxilo y tio. En una realización particular, las moléculas pequeñas pueden estar sustituidas con NH₂, SH u OH, los cuales están unidos directamente a la molécula pequeña, o unidos a la molécula pequeña a través de un grupo adicional, por ejemplo, alquilo o fenilo. En un ejemplo no limitante, las moléculas pequeñas desveladas en las patentes, solicitudes de patentes y la bibliografía no de patentes citada en el presente documento, se pueden unir a anilina, alquil-NH₂ (por ejemplo, (CH₂)₁₋₆NH₂), o alquil-SH (por ejemplo, (CH₂)₁₋₆NH₂), en los que los grupos NH₂ y SH se pueden hacer reaccionar con un polímero (por ejemplo, PEG), para formar un enlace covalente con ese polímero, es decir, formar un conjugado polimérico.

Por ejemplo, en el presente documento se desvela una nanopartícula que tiene un agente terapéutico; y una primera

macromolécula que comprende un copolímero PLGA-PEG o un copolímero PLA-PEG conjugado con un ligando que tiene un peso molecular de aproximadamente 100 g/mol y 500 g/mol en la que el copolímero PLGA-PEG o el copolímero PLA-PEG que está conjugado con el ligando, representa de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 30 por ciento en moles del contenido total de polímero, o de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 20 por ciento en moles, o de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10 por ciento en moles o de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 5 por ciento en moles del contenido total de polímero de una nanopartícula. Una nanopartícula de este tipo puede incluir además una segunda macromolécula que comprenda un copolímero PLGA-PEG o un copolímero PLA-PEG, en los que el copolímero no está unido a un resto de direccionamiento; y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el primer copolímero puede tener de aproximadamente el 0,001 al 5 por ciento en peso del ligando con respecto al contenido total de polímero.

Las nanopartículas de ejemplo pueden incluir un agente terapéutico; y una composición polimérica, en las que la composición polimérica comprende: una primera macromolécula que comprende un primer polímero unido a un ligando; y una segunda macromolécula que comprende un segundo polímero no unido a un resto de direccionamiento; en las que la composición polimérica comprende de aproximadamente el 0,001 a aproximadamente el 5,0 por ciento en peso de dicho ligando. Dichos ligandos pueden tener un peso molecular de aproximadamente 100 g/mol a aproximadamente 6000 g/mol, o menos de aproximadamente 1000 g/mol, por ejemplo de aproximadamente 100 g/mol a aproximadamente 500 g/mol. En otra realización, se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica, que comprende una pluralidad de nanopartículas poliméricas específicas para la diana comprendiendo cada una un agente terapéutico; y una composición polimérica, en la que la composición polimérica contiene de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 30 por ciento en moles, o de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 20 por ciento en moles, o de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10 por ciento en moles de una primera macromolécula que comprende un primer polímero unido a un ligando; y una segunda macromolécula que comprende un segundo polímero no unido a un resto de direccionamiento; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 Nanopartículas

Las nanopartículas desveladas pueden tener una configuración sustancialmente esférica (es decir las partículas parecen en general ser esféricas), o no esférica. Por ejemplo, las partículas, después de hincharse o encogerse, pueden adoptar una configuración no esférica. En algunos casos, las partículas pueden incluir mezclas poliméricas. Por ejemplo, se puede formar una mezcla polimérica de modo que incluya un primer polímero que comprenda un resto de direccionamiento (es decir, un ligando de PSMA de bajo peso molecular) y un polímero biocompatible y un segundo polímero que comprenda un polímero biocompatible pero no comprenda el resto de direccionamiento. Controlando la relación entre el primer y segundo polímeros en el polímero final, la concentración y la ubicación del resto de direccionamiento en el polímero final pueden controlarse fácilmente en cierto grado.

Las nanopartículas desveladas pueden tener una dimensión característica de menos de aproximadamente 1 micrómetro, en las que la dimensión característica de la partícula es el diámetro de una esfera perfecta que tiene el mismo volumen que una partícula. Por ejemplo, la partícula puede tener una dimensión característica de partícula que puede ser inferior a aproximadamente 300 nm, inferior a aproximadamente 200 nm, inferior a aproximadamente 150 nm, inferior a aproximadamente 100 nm, inferior a aproximadamente 50 nm, inferior a aproximadamente 30 nm, inferior a aproximadamente 10 nm, inferior a aproximadamente 3 nm o inferior a aproximadamente 1 nm en algunos casos. En realizaciones particulares, la nanopartícula de la presente invención tiene un diámetro de aproximadamente 80 nm y 200 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 150 nm o de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 200 nm.

En un conjunto de realizaciones, las partículas pueden tener un interior y una superficie, en las que la superficie tiene una composición diferente del interior, es decir, puede haber al menos un compuesto presente en el interior que no está presente en la superficie (o vice versa) y/o al menos un compuesto está presente en el interior y en la superficie a concentraciones diferentes. Por ejemplo, en una realización, un compuesto, tal como un resto de direccionamiento (es decir, un ligando de bajo peso molecular) de un conjugado polimérico de la presente divulgación, puede estar presente tanto en el interior como en la superficie de la partícula, pero a una concentración mayor en la superficie que en el interior de la partícula, aunque en algunos casos, la concentración en el interior de la partícula puede ser esencialmente distinta de cero, es decir, existe una cantidad detectable del compuesto presente en el interior de la partícula.

En algunos casos, el interior de la partícula es más hidrófobo que la superficie de la partícula. Por ejemplo, el interior de la partícula puede ser relativamente hidrófobo con respecto a la superficie de la partícula, y un fármaco, u otra carga útil, puede ser hidrófobo y asociarse fácilmente al centro relativamente hidrófobo de la partícula. El fármaco, u otra carga útil, puede entonces estar contenido en el interior de la partícula, que lo puede resguardar del entorno externo que rodea la partícula (o vice versa). Por ejemplo, un fármaco, u otra carga útil, contenido en la partícula administrada a un sujeto estará protegido del organismo del sujeto y el sujeto también estará aislado del fármaco. Otro aspecto de la invención se refiere a partículas poliméricas que tienen más de un polímero o una macromolécula presente y bibliotecas que implican dichos polímeros o macromoléculas. Por ejemplo, en un conjunto de realizaciones, las partículas pueden contener más de un polímero distinguible (por ejemplo, copolímeros como copolímeros en bloque) y las relaciones entre los dos (o más) polímeros pueden controlarse independientemente, lo

que permite controlar las propiedades de la partícula. Por ejemplo, un primer polímero puede ser un conjugado polimérico que comprenda un resto de direccionamiento y una porción biocompatible y un segundo polímero puede comprender una porción biocompatible, pero no contener el resto de direccionamiento, o el segundo polímero puede contener una porción biocompatible distinguible del primer polímero. El control de las cantidades de estos polímeros dentro de la partícula polimérica se puede usar entonces para controlar diversas propiedades físicas, biológicas o químicas de la partícula, por ejemplo, el tamaño de la partícula (por ejemplo, variando los pesos moleculares de uno o ambos polímeros), la carga superficial (por ejemplo, controlando las relaciones entre los polímeros si los polímeros tienen cargas o grupos terminales diferentes), la hidrofilia superficial (por ejemplo, si los polímeros tienen pesos moleculares y/o hidrofiliías diferentes), la densidad superficial del resto de direccionamiento (por ejemplo, controlando las relaciones entre los dos o más polímeros), etc.

Como ejemplo específico, una partícula puede comprender un primer polímero en dibloque que comprenda un poli(etilenglicol) y un resto de direccionamiento conjugado con el poli(etilenglicol) y un segundo polímero que comprenda el poli(etilenglicol) pero no el resto de direccionamiento, o comprender tanto el poli(etilenglicol) como el resto de direccionamiento, en los que el poli(etilenglicol) del segundo polímero tiene una longitud diferente (o número de unidades de repetición) que el poli(etilenglicol) del primer polímero. Como otro ejemplo, una partícula puede comprender un primer polímero que comprenda una primera porción biocompatible y un resto de direccionamiento y un segundo polímero que comprenda una segunda porción biocompatible diferente de la primera porción biocompatible (por ejemplo, que tenga una composición diferente, un número sustancialmente diferente de unidades de repetición, etc.) y el resto de direccionamiento. Como otro ejemplo más, un primer polímero puede comprender una porción biocompatible y un primer resto de direccionamiento y un segundo polímero puede comprender una porción biocompatible y un segundo resto de direccionamiento diferente del primer resto de direccionamiento.

Por ejemplo, en el presente documento se desvela una nanopartícula polimérica terapéutica capaz de unirse a una diana, que comprende un primer polímero no funcionalizado; un segundo polímero no funcionalizado opcional; un polímero funcionalizado que comprende un resto de direccionamiento; y un agente terapéutico; en el que dicha nanopartícula comprende de aproximadamente 15 a aproximadamente 300 moléculas de polímero funcionalizado, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 moléculas, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 moléculas de polímero funcionalizado.

En una realización particular, el polímero de las macromoléculas primera o segunda de la nanopartícula de la invención es PLA, PLGA o PEG, o copolímeros de los mismos. En una realización específica, el polímero de la primera macromolécula es un copolímero PLGA-PEG y la segunda macromolécula es un copolímero PLGA-PEG o un copolímero PLA-PEG. Por ejemplo, una nanopartícula de ejemplo puede tener una corona de PEG con una densidad de aproximadamente $0,065 \text{ g/cm}^3$, o de aproximadamente $0,01$ a aproximadamente $0,10 \text{ g/cm}^3$.

Las nanopartículas desveladas pueden ser estables (por ejemplo conservar sustancialmente todo el agente activo) por ejemplo en una solución que puede contener un sacárido, durante al menos 3 días, aproximadamente 4 días o al menos aproximadamente 5 días a temperatura ambiente, o a 25°C .

En algunas realizaciones, las nanopartículas desveladas también pueden incluir un alcohol graso, que puede aumentar la velocidad de liberación del fármaco. Por ejemplo, las nanopartículas desveladas pueden incluir un alcohol $\text{C}_8\text{-C}_{30}$ tal como alcohol cetílico, octanol, alcohol estearílico, alcohol araquidílico, docosonal u octosonal.

Las nanopartículas pueden tener propiedades de liberación controlada, por ejemplo, pueden ser capaces de administrar una cantidad de agente activo a un paciente, por ejemplo, a un sitio específico del paciente, durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo durante 1 día, 1 semana, o más. En algunas realizaciones, las nanopartículas desveladas liberan sustancialmente inmediatamente (por ejemplo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos) menos de aproximadamente el 2 %, menos de aproximadamente el 5 % o menos de aproximadamente el 10 % de un agente activo (por ejemplo un taxano), por ejemplo, por ejemplo cuando están colocados en una solución tampón de fosfato a temperatura ambiente y/o a 37°C .

Por ejemplo, las nanopartículas desveladas que incluyen un agente terapéutico, pueden, en algunas realizaciones, liberar el agente terapéutico cuando están colocadas en una solución acuosa, por ejemplo a 25°C con una velocidad que corresponde sustancialmente a: a) de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 20 % del agente terapéutico total se libera después de aproximadamente 1 hora; b) de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 60 % del agente terapéutico se libera después de aproximadamente 8 horas; c) de aproximadamente el 30 a aproximadamente el 80 % del agente terapéutico total se libera después de aproximadamente 12 horas; y d) no menos de aproximadamente el 75 % del total se libera después de aproximadamente 24 horas.

En algunas realizaciones, después de la administración a un sujeto o paciente de una nanopartícula desvelada o una composición que incluye una nanopartícula desvelada, la concentración plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$) del agente terapéutico en el paciente es sustancialmente mayor en comparación con la $C_{\text{máx}}$ del agente terapéutico si se administra solo (por ejemplo, no como parte de una nanopartícula).

En otra realización, una nanopartícula desvelada que incluye un agente terapéutico, cuando se administra a un sujeto, puede tener un $t_{\text{máx}}$ del agente terapéutico sustancialmente más prolongado en comparación con el $t_{\text{máx}}$ del

agente terapéutico administrado solo.

También se pueden formar bibliotecas de dichas partículas. Por ejemplo, variando las relaciones entre los dos (o más) polímeros en la partícula, estas bibliotecas pueden ser útiles para pruebas de cribado, ensayos de alto rendimiento o similares. Las entidades de la biblioteca pueden variar en propiedades tales como las que se han descrito anteriormente y en algunos casos, más de una propiedad de las partículas puede variar dentro de la biblioteca. En consecuencia, una realización de la invención se refiere a una biblioteca de nanopartículas que tienen diferentes relaciones entre polímeros con propiedades distintas. La biblioteca puede incluir cualquier relación o relaciones adecuadas entre los polímeros.

La figura 1 ilustra que se pueden producir bibliotecas usando polímeros tales como los que se han descrito anteriormente. Por ejemplo, en la figura 1, se pueden usar partículas poliméricas que comprenden una primera macromolécula que comprende un polímero hidrófobo biocompatible, un polímero hidrófilo biocompatible y un ligando de PSMA de bajo peso molecular y una segunda macromolécula que comprende un polímero hidrófobo biocompatible y un polímero hidrófilo biocompatible para crear una biblioteca de partículas con diferentes relaciones entre la primera y la segunda macromoléculas.

Una biblioteca de este tipo puede ser útil para lograr partículas que tengan cualquier número de propiedades deseables, por ejemplo, propiedades tales como funcionalidad superficial, carga superficial, tamaño, potencial zeta (ξ), hidrofobia, capacidad para controlar la inmunogenia, o similares.

Como ejemplos específicos, en algunas realizaciones de la presente invención, la biblioteca incluye partículas que comprenden conjugados poliméricos de un polímero biocompatible y un ligando de bajo peso molecular, como se trató en el presente documento. En referencia ahora a la figura 1, se muestra una de dichas partículas como un ejemplo no limitante. En esta figura, un conjugado polimérico de la divulgación se usa para formar una partícula 10. El polímero que forma la partícula 10 incluye un ligando de bajo peso molecular 15, presente en la superficie de la partícula y una porción biocompatible 17. En algunos casos, como se muestra en el presente documento, el resto de direccionamiento 15 se puede conjugar con la porción biocompatible 17. Sin embargo, no toda la porción biocompatible 17 se muestra conjugada con el resto de direccionamiento 15. Por ejemplo, en algunos casos, las partículas tales como la partícula 10 se pueden formar usando un primer polímero que comprenda una porción biocompatible 17 y un ligando de bajo peso molecular 15 y un segundo polímero que comprenda la porción biocompatible 17 pero no el resto de direccionamiento 15. Controlando la relación entre el primer y el segundo polímeros, se pueden formar partículas con propiedades diferentes y en algunos casos, se pueden formar bibliotecas de dichas partículas. Además, contenido en el centro de la partícula 10 se encuentra el fármaco 12. En algunos casos, el fármaco 12 puede estar contenido dentro de la partícula debido a efectos hidrófobos. Por ejemplo, el interior de la partícula puede ser relativamente hidrófobo con respecto a la superficie de la partícula y el fármaco puede ser un fármaco hidrófobo, que se asocia al centro relativamente hidrófobo de la partícula. En una realización, el agente terapéutico se asocia a la superficie de, se encapsula dentro de, es rodeado por, o está dispersado en toda, la nanopartícula. En otra realización, el agente terapéutico está encapsulado dentro del centro hidrófobo de la nanopartícula.

Como ejemplo específico, la partícula 10 puede contener polímeros que incluyen un polímero biocompatible relativamente hidrófobo y un resto de direccionamiento relativamente hidrófilo 15, de manera que, durante la formación de la partícula, una mayor concentración del resto de direccionamiento hidrófilo se expone en la superficie y una mayor concentración del polímero biocompatible hidrófobo está presente en el interior de la partícula.

En algunas realizaciones, el polímero biocompatible es un polímero hidrófobo. Los ejemplos no limitantes de polímeros biocompatibles incluyen poliláctido, poliglicólido y/o poli(láctido-co-glicólido).

En una realización diferente, la presente divulgación proporciona una nanopartícula que comprende 1) una matriz polimérica; 2) opcionalmente, un compuesto, o capa, anfífilo que rodea o está disperso dentro de la matriz polimérica formando una coraza continua o discontinua para la partícula; 3) un polímero no funcionalizado que puede formar parte de la matriz polimérica y 4) un ligando de PSMA de bajo peso molecular unido covalentemente a un polímero que puede formar parte de la matriz polimérica. Por ejemplo, una capa anfífilica puede reducir la penetración de agua en la nanopartícula, aumentando la eficiencia de encapsulación del fármaco y retardando la liberación del mismo.

Como se usa en el presente documento, el término "anfífilo" se refiere a una propiedad en la que la molécula tiene tanto una porción polar como una porción no polar. Con frecuencia, un compuesto anfífilo tiene una cabeza polar unida a una cola hidrófoba larga. En algunas realizaciones, la porción polar es soluble en agua en tanto la no polar es insoluble en agua. Además, la porción polar puede tener una carga positiva formal o una carga negativa formal. Como alternativa, la porción polar puede tener tanto una carga positiva formal como una carga negativa formal y ser un zwitterion o sal interna. A los efectos de la invención, el compuesto anfífilo puede ser, pero no limitarse a, uno o una pluralidad de los siguientes: lípidos derivados naturalmente, tensioactivos o compuestos sintetizados con grupos tanto hidrófilos como hidrófobos.

Los ejemplos específicos de compuestos anfífilos incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos, como 1,2 diestearoil-

sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), diaraquidoilfosfatidilcolina (DAPC), dibehenoilfosfatidilcolina (DBPC), ditricosanoilfosfatidilcolina (DTPC) y dilignoceroilfosfatidilcolina (DLPC), incorporado en una relación entre 0,01 y 60 (peso de lípido/peso de polímero), más preferentemente entre 0,1 y 30 (peso de lípido/peso de polímero). Los fosfolípidos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, ácidos fosfatídicos, fosfatidilcolinas tanto con lípidos saturados como insaturados, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilgliceroles, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, derivados lisofosfatidilo, cardiopina y β -acil-y-alquil fosfolípidos. Los ejemplos de fosfolípidos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilcolinas como dioleoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipentadecanoilfosfatidilcolina, dilauoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), diaraquidoilfosfatidilcolina (DAPC), dibehenoilfosfatidilcolina (DBPC), ditricosanoilfosfatidilcolina (DTPC), dilignoceroilfosfatidilcolina (DLPC); y fosfatidiletanolaminas como dioleoilfosfatidiletanolamina o 1-hexadecil-2-palmitoilglicerofosfoetanolamina. También se pueden utilizar fosfolípidos sintéticos con cadenas de acilo asimétricas (por ejemplo, con una cadena de acilo de 6 carbonos y otra cadena acilo de 12 carbonos).

En una realización particular, un componente anfifílico que se puede usar para formar una capa anfifílica es lecitina y en particular, fosfatidilcolina. La lecitina es un lípido anfifílico y como tal, forma una bicapa fosfolipídica que tiene las cabezas hidrófilas (polares) enfrentando sus alrededores, que la mayor parte de las veces son acuosos y las colas hidrófobas enfrentándose entre sí. La lecitina tiene la ventaja de ser un lípido natural que se encuentra, por ejemplo, en la soja y que ya tiene la aprobación de la FDA para su uso en otros dispositivos de administración. Además, una mezcla de lípidos como lecitina es más ventajosa que un único lípido puro.

En ciertas realizaciones una nanopartícula desvelada tiene una monocapa anfifílica, lo que significa que la capa no es una bicapa fosfolipídica, sino que existe como una única capa continua o discontinua alrededor, o dentro, de la nanopartícula. La capa anfifílica está "asociada a" la nanopartícula de la invención, lo que significa que está ubicada en la proximidad de la matriz polimérica, como rodeando el exterior de la carcasa polimérica o dispersa en los polímeros que constituyen la nanopartícula.

25 Preparación de las nanopartículas

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a sistemas y procedimientos para elaborar las nanopartículas desveladas. En algunas realizaciones, utilizando dos o más polímeros diferentes (por ejemplo, copolímeros, por ejemplo, copolímeros en bloque) en diferentes proporciones y produciendo partículas a partir de los polímeros (por ejemplo, copolímeros, por ejemplo, copolímeros en bloque), se pueden controlar las propiedades de las partículas. Por ejemplo, un polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímeros en bloque) puede, o no, incluir un ligando de PSMA de bajo peso molecular, aunque se puede elegir otro polímero opcional (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero en bloque) por su biocompatibilidad y/o su capacidad para controlar la inmunogenia de la partícula resultante.

En un conjunto de realizaciones, las partículas se forman proporcionando una solución que contiene uno más polímeros y poniendo en contacto la solución con un polímero no disolvente para producir la partícula. La solución puede ser miscible o inmisible con el polímero no disolvente. Por ejemplo, un líquido miscible con agua tal como acetonitrilo puede contener los polímeros y las partículas se forman a medida que el acetonitrilo se pone en contacto con agua, un polímero no disolvente, por ejemplo, vertiendo el acetonitrilo en el agua a una velocidad controlada. El polímero contenido en la solución, después del contacto con el polímero no disolvente, se puede entonces precipitar para formar partículas tales como las nanopartículas. Se dice que dos líquidos son "inmiscibles" o no miscibles, entre sí cuando uno no es soluble en el otro en una medida de hasta al menos el 10 % en peso a presión y temperatura ambientes. Normalmente, una solución orgánica (por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, tetrahidrofurano, acetona, formamida, dimetilformamida, piridinas, dioxano, dimetilsulfóxido, etc.) y un líquido acuoso (por ejemplo, agua o agua que contenga sales disueltas u otras especies, medios celulares o biológicos, etanol, etc.) son inmiscibles entre sí. Por ejemplo, la primera solución se puede verter en la segunda solución (a una velocidad adecuada). En algunos casos, se pueden formar partículas tales como nanopartículas a medida que la primera solución se pone en contacto con el segundo líquido inmisible, por ejemplo, la precipitación del polímero después del contacto causa que el polímero forme nanopartículas mientras la primera solución se vierte en el segundo líquido y en algunos casos, por ejemplo, cuando la velocidad de introducción es cuidadosamente controlada y mantenida a una velocidad relativamente lenta, se pueden formar nanopartículas. El control de dicha formación de partículas puede ser fácilmente optimizada por un experto en la materia usando simplemente la experimentación de rutina.

Propiedades tales como funcionalidad superficial, carga superficial, tamaño, potencial zeta (ξ), hidrofobia, capacidad para controlar la inmunogenia y similares; pueden ser altamente controladas usando un procedimiento desvelado. Por ejemplo, se puede sintetizar una biblioteca de partículas y cribar para identificar las partículas que tienen una relación particular entre los polímeros que permita que las partículas tengan una densidad específica de restos (por ejemplo, ligandos de PSMA de bajo peso molecular) presentes en la superficie de la partícula. Esto permite preparar partículas que tengan una o más propiedades específicas, por ejemplo, un tamaño específico y una densidad superficial específica de restos, sin un esfuerzo indebido. En consecuencia, ciertas realizaciones de la invención apuntan a técnicas de cribado utilizando dichas bibliotecas, así como a todas las partículas identificadas utilizando dichas bibliotecas. Además, la identificación se puede realizar mediante cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, la identificación puede ser directa o indirecta, o proceder cuantitativa o cualitativamente.

En algunas realizaciones, se funcionalizan nanopartículas ya formadas con un resto de direccionamiento utilizando procedimientos análogos a los descritos para producir conjugados ligando-polímero funcionalizado. Por ejemplo, se mezcla un primer copolímero (PLGA-PEG, poli(láctido-co-glicólido) y poli(etilenglicol)) con un agente terapéutico para formar partículas. Después las partículas se asocian a un ligando de bajo peso molecular para formar nanopartículas que se puedan usar para el tratamiento del cáncer. Las partículas se pueden asociar a diversas cantidades de ligando de bajo peso molecular para controlar la densidad superficial de ligando de la nanopartícula, alterando de ese modo las características terapéuticas de dicha nanopartícula. Además, por ejemplo, controlando parámetros tales como el peso molecular, el peso molecular de PEG y la carga superficial de la nanopartícula, se pueden obtener partículas controladas muy precisamente.

En otra realización, se proporciona un procedimiento de nanoemulsión, que está representado en las figuras 3 y 4. Por ejemplo, un agente terapéutico, un primer polímero (por ejemplo, un copolímero en dibloque tal como PLA-PEG o PLGA-PEG, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente unido a un ligando, por ejemplo, GL2) y un segundo polímero opcional (por ejemplo (PL(G)A-PEG o PLA), con una solución orgánica para formar una primera fase orgánica. Dicha primera fase puede incluir de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 50 % de sólidos en peso, de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 40 % de sólidos o de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 30 % de sólidos. La primera fase orgánica se puede combinar con una primera solución acuosa para formar una segunda fase. La solución orgánica puede incluir, por ejemplo, tolueno, metil etil cetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetato de etilo, alcohol isopropílico, acetato de isopropilo, dimetilformamida, cloruro de metileno, diclorometano, cloroformo, acetona, alcohol bencílico, Tween 80, Span 80, o similares y combinaciones. En una realización, la fase orgánica puede incluir alcohol bencílico, acetato de etilo y combinaciones de los mismos. La segunda fase puede tener entre aproximadamente el 1 y el 50 % en peso, por ejemplo, aproximadamente el 5-40 % en peso de sólidos. La solución acuosa puede ser agua, opcionalmente en combinación con uno o más de entre colato de sodio, acetato de etilo, acetato de polivinilo y alcohol bencílico.

Por ejemplo, la fase oleosa u orgánica puede utilizar disolvente que sea solo parcialmente miscible con el no disolvente (agua). Por consiguiente, cuando se mezcla en proporciones suficientemente bajas y/o cuando se usa agua presaturada con los disolventes orgánicos, la fase oleosa permanece líquida. La fase oleosa se puede emulsionar en una solución acuosa y, como gotitas líquidas, cizallar en nanopartículas utilizando, por ejemplo, sistemas de dispersión de alta energía, tales como homogeneizadores o sondas de ultrasonido. La porción acuosa de la emulsión, conocida también como "fase acuosa", puede ser una solución tensioactiva consistente en colato de sodio y presaturada con acetato de etilo y alcohol bencílico.

La emulsión de la segunda fase para formar una fase en emulsión se puede realizar en uno o dos pasos de emulsión. Por ejemplo, se puede preparar una emulsión primaria y después emulsionar para formar una emulsión fina. La emulsión primaria se puede formar, por ejemplo, utilizando mezcla simple, un homogeneizador de alta presión, una sonda de ultrasonido, una barra de agitación o un homogeneizador de rotor y estator. La emulsión primaria se puede convertir en una emulsión fina a través del uso, por ejemplo, de una sonda de ultrasonido o un homogeneizador de alta presión, por ejemplo, usando 1, 2, 3 o más pases a través de un homogeneizador. Por ejemplo, cuando se usa un homogeneizador de alta presión, la presión puede ser de aproximadamente 1000 psi (6,89 MPa) a aproximadamente 8000 psi (55,14 MPa), de aproximadamente 2000 psi (13,79 MPa) a aproximadamente 4000 psi (27,57 MPa), de aproximadamente 4000 psi (27,57 MPa) a aproximadamente 8000 psi (55,14 MPa), o de aproximadamente 4000 psi (27,57 MPa) a aproximadamente 5000 psi (34,46 MPa), por ejemplo, de aproximadamente 2000 psi (13,79 MPa), 2500 (17,23 MPa), 4000 psi (27,57 MPa) o 5000 psi (34,46 MPa).

Puede ser necesaria la evaporación del disolvente o la dilución para completar la extracción del disolvente y solidificar las partículas. Para un mayor control de la cinética de extracción y un procedimiento más escalable, se puede usar una dilución del disolvente a través de medio de enfriamiento acuoso. Por ejemplo, la emulsión se puede diluir en agua fría hasta una concentración suficiente para disolver todo el disolvente orgánico para formar una fase enfriada. El enfriamiento se puede realizar al menos parcialmente a una temperatura de aproximadamente 5 °C o menos. Por ejemplo, el agua utilizada en el enfriamiento puede estar a una temperatura menor que la temperatura ambiente (por ejemplo, de aproximadamente 0 a aproximadamente 10 °C, o de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 °C).

En algunas realizaciones, no todo el agente terapéutico (por ejemplo, docetaxel) se encapsula en las partículas en esta etapa y se agrega un solubilizante de fármacos a la fase enfriada para formar una fase solubilizada. El solubilizante de fármacos puede ser, por ejemplo, Tween 80, Tween 20, polivinilpirrolidona, ciclodextrano, dodecilsulfato de sodio o colato de sodio. Por ejemplo, se puede añadir Tween 80 a la suspensión de nanopartículas enfriada para solubilizar el fármaco libre y evitar la formación de cristales de fármaco. En algunas realizaciones, una relación entre solubilizante de fármaco y agente terapéutico (por ejemplo docetaxel) es de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 10:1.

La fase solubilizada se puede filtrar para recuperar las nanopartículas. Por ejemplo, se pueden utilizar membranas de ultrafiltración para concentrar la suspensión de nanopartículas y eliminar sustancialmente el disolvente orgánico, el fármaco libre y otros adyuvantes del procedimiento (tensioactivos). Un ejemplo de filtración se puede realizar usando un sistema de filtración de flujo tangencial. Por ejemplo, utilizando una membrana con un tamaño de poro adecuado para retener nanopartículas mientras se permite pasar solutos, micelas y disolvente orgánico, las

nanopartículas se pueden separar selectivamente. Se pueden usar membranas de ejemplo con pesos moleculares de corte de aproximadamente 300-500 kDa (~5-25 nm).

5 Se puede realizar una diafiltración usando un enfoque de volumen constante, lo que significa que el diafiltrado (agua desionizada fría, por ejemplo de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 °C, o entre 0 a aproximadamente 10 °C) se puede añadir a la suspensión de alimentación a la misma velocidad que se retira el filtrado de la suspensión. En algunas realizaciones, el filtrado puede incluir una primera filtración utilizando una primera temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 °C, o entre 0 a aproximadamente 10 °C y una segunda temperatura de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 °C, o entre 15 a aproximadamente 35 °C. Por ejemplo, el filtrado puede incluir procesar de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 diavolumenes a una temperatura de aproximadamente 10 a aproximadamente 5 °C y procesar al menos un diavolumen (por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 o de aproximadamente 1 y 2 diavolumenes) a una temperatura de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 °C.

Después de purificar y concentrar la suspensión de nanopartículas, las partículas se pueden pasar a través de uno, dos o más filtros esterilizantes y/o de profundidad, por ejemplo, usando un prefiltro de profundidad de ~0,2 µm.

15 En otra realización de preparación de nanopartículas, se forma una fase orgánica compuesta por una mezcla de un agente terapéutico, por ejemplo docetaxel y un polímero (homopolímero, copolímero y copolímero con ligando). La fase orgánica se mezcla con una fase acuosa a una relación de aproximadamente 1:5 (fase oleosa:fase acuosa, (O:W)) en la que la fase acuosa está compuesta por un tensioactivo y algo de disolvente disuelto. La emulsión primaria se forma combinando las dos fases por mezcla simple o mediante el uso de un homogeneizador de rotor y estator. La emulsión primaria se convierte después en una emulsión fina mediante el uso de un homogeneizador de alta presión. La emulsión fina se enfría después añadiendo agua desionizada mientras se mezcla. La relación medio de enfriamiento:emulsión (Q:E) es aproximadamente 8,5:1. Después se agrega una solución de Tween (por ejemplo, Tween 80) al medio de enfriamiento para conseguir aproximadamente el 2 % de Tween total. Esto sirve para disolver el fármaco libre no encapsulado. Después las nanopartículas se aíslan por centrifugación o ultrafiltración/diafiltración.

Se apreciará que las cantidades de polímero y agente terapéutico o agente activo que se usan en la preparación de la formulación pueden diferir de una formulación final. Por ejemplo, algo de agente activo puede no quedar completamente incorporado en una nanopartícula y dicho agente terapéutico libre puede, por ejemplo, retirarse por filtración. Por ejemplo, en una realización, se puede usar aproximadamente el 20 % de agente activo (por ejemplo docetaxel) a aproximadamente el 80 % de polímero (por ejemplo el polímero puede incluir aproximadamente el 2,5 por ciento en moles de PLA-PEG-GL2 y aproximadamente el 97,5 por ciento en moles de PLA-PEG), en la preparación de una formulación que da como resultado una nanopartícula final que comprende aproximadamente el 10 por ciento en peso del agente activo (por ejemplo docetaxel) a aproximadamente el 90 por ciento en peso de polímero (en la que el polímero puede incluir aproximadamente el 1,25 por ciento en moles de PLA-PEG-GL2 a aproximadamente el 98,75 por ciento en moles de PLA-PEG). Dichos procedimientos pueden proporcionar nanopartículas finales adecuadas para la administración a un paciente que contengan de aproximadamente el 2 a aproximadamente el 20 por ciento en peso de agente terapéutico, por ejemplo, aproximadamente el 5, aproximadamente el 8, aproximadamente el 10, aproximadamente el 15 por ciento en peso de agente terapéutico.

Agentes terapéuticos

40 De acuerdo con la presente invención, todos los agentes, incluidos, por ejemplo, agentes terapéuticos (por ejemplo antineoplásicos), agentes de diagnóstico (por ejemplo agentes de contraste; radionúclidos y grupos fluorescentes, luminiscentes y magnéticos), agentes profilácticos (por ejemplo vacunas) y/o agentes nutracéuticos (por ejemplo vitaminas, minerales, etc.) se pueden administrar mediante las nanopartículas desveladas. Los agentes de ejemplo que se pueden administrar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas (por ejemplo citotóxicos), ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNip, ARNi y micro ARN), proteínas (por ejemplo anticuerpos), péptidos, lípidos, hidratos de carbono, hormonas, metales, elementos y compuestos radiactivos, fármacos, vacunas, agentes inmunológicos, etc. y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agente que se va administrar es un agente útil en el tratamiento del cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata).

50 Por ejemplo, un resto de direccionamiento, si se usa, se puede dirigir a, o hacer que la partícula se localice en, porciones específicas dentro de un sujeto y la carga útil puede entregarse a esas porciones. En una realización particular, el fármaco, u otra carga útil, se libera de manera controlada desde una partícula y se permite que interactúe localmente con el sitio particular que es la diana (por ejemplo, un tumor). La expresión "liberación controlada" (y las variantes de ese término) como se usa en el presente documento (por ejemplo, en el contexto de "sistema de liberación controlada") pretende abarcar en general la liberación de una sustancia (por ejemplo, un fármaco) en un sitio seleccionado, o de lo contrario controlable en la velocidad, el intervalo y/o la cantidad. La liberación controlada abarca, pero no está necesariamente limitada a, sustancialmente la administración continua, la entrega según un patrón (por ejemplo, administración intermitente en un período de tiempo que es interrumpida a intervalos regulares o irregulares) y la administración de un bolo de una sustancia seleccionada (por ejemplo, como una cantidad discreta, predeterminada, si es una sustancia durante un período de tiempo relativamente corto (por ejemplo, unos pocos segundos o minutos)).

El agente activo o fármaco puede ser un agente terapéutico tal como un antineoplásico tal como los inhibidores de mTor (por ejemplo, sirolimus, temsirolimus, o everolimus), alcaloides de la vinca tales como vincristina, un derivado diterpénico o un taxano tal como paclitaxel (o sus derivados tales como DHA-paclitaxel o PG-paclitaxel) o docetaxel.

- 5 En un conjunto de realizaciones, la carga útil es un fármaco o una combinación de más de un fármaco. Dichas partículas pueden ser útiles, por ejemplo, en realizaciones en las que un resto de direccionamiento se puede usar para dirigir una partícula que contenga un fármaco a una ubicación localizada particular dentro de un sujeto, por ejemplo, para permitir que se produzca la entrega localizada del fármaco. Los agentes terapéuticos de ejemplo incluyen antineoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), gemcitabina (gemzar), daunorrubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, vinorelbina, 5-fluorouracilo (5-FU), alcaloides de la vinca como vinblastina o vincristina; bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleucina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, camptotecina, 10-hidroxi-7-etilcamptotecina (SN38), dacarbazina, S-I capecitabina, florafur, 5-desoxiflurouridina, eniluracilo, desoxicitidina, 5-azacitosina, 5-azadesoxicitosina, alopurinol, 2-cloroadenosina, trimetrexato, aminopterina, metileno-10-deazaaminopterina (MDAM), oxaplatino, picoplatino, tetraplatino, satraplatino, platino-DACH, ormaplatino y análogos del mismo, epirubicina, fosfato de etopósido, 9-aminocamptotecina, 10,11-metilenodioxycamptotecina, karenitecina, 9-nitrocampotecina, vindesina, mostaza de L-fenilalanina, ifosfamidamefosfamida, perfosfamida, trofosfamida, carmustina, semustina, epotilones A-E, tomudex, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, amsacrina, fosfato de etopósido, karenitecina, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir, amantadina, rimantadina, lamivudina, zidovudina, bevacizumab, trastuzumab, rituximab, 5-fluorouracilo y combinaciones de los mismos.
- 10
- 15
- 20 Los ejemplos no limitantes de fármacos potencialmente adecuados incluyen antineoplásicos, incluyendo, por ejemplo, docetaxel, mitoxantrona y clorhidrato de mitoxantrona. En otra realización, la carga útil puede ser un anticancerígeno tal como 20-epi-1, 25 dihidroxivitamina D3, 4-ipomeanol, 5-etiniluracilo, 9-dihidrotaxol, abiraterona, acivicina, aclarrubicina, clorhidrato de acodazol, acronina, acifililveno, adecipenol, adozelesina, aldesleucina, todos los antagonistas de tk, altretamina, ambamustina, ambomicina, acetato de ametantrona, amidox, amifostina, aminoglutetimida, ácido aminolevulínico, amrubicina, amsacrina, anagrelida, anastrozol, andrografolida, inhibidores de la angiogénesis, antagonista D, antagonista G, antarelix, antramincina, proteína morfogenética-1 anti-dorsalización, antiestrógeno, antineoplastón, oligonucleótidos antisentido, glicinato de afidicolina, moduladores del gen de la apoptosis, reguladores de la apoptosis, ácido apurínico, ARA-CDP-DL-PTBA, arginina desaminasa, asparaginasa, asperlina, asulacrina, atamestano, atrimustina, axinastatina 1, axinastatina 2, axinastatina 3, azacitidina, azasetrón, azatocina, azatirosina, azetepa, azotomicina, derivados de la bacatina III, balanol, batimastat, benzoclorinas, benzodepa, benzoilestaurosporina, derivados de la beta lactama, beta-aletina, betaclamincina B, ácido betulínico, inhibidor de BFGF, bicalutamida, bisantreno, clorhidrato de bisantreno, bisazudinilespermina, bisnafida, dimesilato de bisnafida, bistrateno A, bizelesina, bleomicina, sulfato de bleomicina, antagonistas de BRC/ABL, breflato, brequinar sódico, bropirimina, budotitano, busulfán, butionina sulfoximina, cactinomicina, calcipotriol, calfofostina C, calusterona, derivados de camptotecina, canaripox IL-2, capecitabina, caraceraide, carbetimero, carboplatino, carboxamida-amino-triazol, carboxiamidotriazol, carest M3, carmustina, earn 700, inhibidor derivado del cartílago, clorhidrato de carrubicina, carzelesina, inhibidores de la caseína cinasa, castanoespermina, cecropina B, cedefingol, cetorelix, clorambucilo, clorinas, cloroquinoxalina sulfonamida, cicaprost, cirolemicina, cisplatino, cisporfirina, cladribina, análogos de clomifeno, clotrimazol, colismicina A, colismicina B, combretastatina A4, análogos de combretastatina, conagenina, crambescidina 816, crisnatol, mesilato de crisnatol, criptoficina 8, derivados de criptoficina A, curacina A, ciclopentaantraquinonas, ciclofosfamida, cicloplatam, cipemicina, citarabina, ocfosfato de citarabina, factor citolítico, citostatina, dacarbazina, dacliximab, dactinomicina, clorhidrato de daunorrubicina, decitabina, deshiodridemina B, deslorelinea, dexifosfamida, dexormaplatino, dexrazoxano, dexverapamilo, dezaguanina, mesilato de dezaguanina, diaziquna, didemina B, didox, dietihorspermina, dihidro-5-azacitidina, dioxamicina, difenil espiromustina, docetaxel, docosanol, dolasetrón, doxifluridina, doxorubicina, clorhidrato de doxorubicina, droloxifeno, citrato de droloxifeno, propionato de dromostanolona, dronabinol, duazomicina, duocanicina SA, ebseleno, ecomustina, edatrexato, edelfosina, edrecolomab, eflomitina, clorhidrato de eflomitina, elemeno, elsamitrucina, emitefur, enloplatino, enpromato, epipropidina, epirubicina, clorhidrato de epirubicina, epristerida, erbulozol, sistema vector de terapia génica de eritrocitos, clorhidrato de esorubicina, estramustina, análogos de estramustina, fosfato sódico de estramustina, agonistas de estrógenos, antagonistas de estrógenos, etanidazol, etopósido, fosfato de etopósido, etoprina, exemestano, fadrozol, clorhidrato de fadrozol, fazarabina, fenretinida, filgrastim, finasterida, flavopiridol, flezelastina, floxuridina, fluasterona, fludarabina, fosfato de fludarabina, clorhidrato de fluorodaunorrubicina, fluorouracilo, flurocitabina, forfenimex, formestano, fosquidona, fostriecina, fostriecina sódica, fotemustina, texafirina de gadolinio, nitrato de galio, galocitabina, ganirelix, inhibidores de la gelatinasa, gemcitabina, clorhidrato de gemcitabina, inhibidores del glutatión, hepsulfam, heregulina, bisacetamida de hexametileno, hidroxurea, hipericina, ácido ibandrónico, idarrubicina, clorhidrato de idarrubicina, idoxifeno, idramantona, ifosfamida, ihnofosina, ilomastat, imidazoacridonas, imiquimod, péptidos inmunestimulantes, inhibidor del receptor de factor de crecimiento-1 similar a la insulina, agonistas del interferón, interferón alfa-2A, interferón alfa-2B, interferón alfa-N1, interferón alfa-N3, interferón beta-1A, interferón gamma-1B, interferones, interleucinas, iobengano yododoxorrubicina, iproplam, irinotecán, clorhidrato de irinotecán, iroplact, irsogladina, isobengazol, isohomohalcondrina B, itasetrón, jasplakinolida, kahalalida F, triacetato de lamelarina-N, lanreotida, acetato de lanreotida, leinamicina, lenograstim, sulfato de lentinano, leptolestatina, letrozol, factor de inhibición de la leucemia, interferón alfa de leucocito, acetato de leuprolida, leuprolida/estrógeno/progesterona, leuprorelina, levamisol, liarozol, clorhidrato de liarozol, análogos lineales de poliamina, péptido disacárido lipófilo, compuestos de platino lipófilos,
- 55
- 60

lisoclinamida, lobaplatino, lombricina, lometrexol, lometrexol sódico, lomustina, lonidamina, losoxantrona, clorhidrato de losoxantrona, lovastatina, loxoribina, lurtotecán, texafirina de lutecio, lisofilina, péptidos líticos, maitansina, manostatina A, marimastat, masoprocol, maspina, inhibidores de matrilisina, inhibidores de metaloproteínasa de matriz, maitansina, clorhidrato de mecloretamina, acetato de megestrol, acetato de melengestrol, melfalán, menogaril, merbarona, mercaptopurina, meterelina, metioninasa, metotrexato, metotrexato sódico, metoclopramida, metoprina, meturedpa, inhibidores de la proteína cinasa C microalgal, inhibidor de MIF, mifepristona, miltefosina, mirimostim, ARN bicatenario mal apareado, mitindomida, mitocarcina, mitocromina, mitogilina, mitoguazona, mitolactol, mitomalcina, mitomicina-saporina, análogos de mitomicina, mitonafida, mitosper, mitotano, mitotoxina, factor de crecimiento de fibroblastos, mitoxantrona, clorhidrato de mitoxantrona, mofaroteno, molgramostim, anticuerpo monoclonal, gonadotrofina coriónica humana, monofosforil lípido del esqueleto de la pared celular de micobacteria, mopidamol, inhibidor del gen de multiresistencia a fármacos, terapia a base de supresor tumoral múltiple 1, anticancerígeno de mostaza, micaperoxida B, extracto de pared celular micobacteriana, ácido micofenólico, miriaporona, n-acetildinalina, nafarelina, nagrestip, naloxona/pentazocina, napavina, nafterpina, nartograstim, nedaplatino, nemorrubicina, ácido neridróico, endopeptidasa neutra, nilutamida, nisamicina, moduladores del óxido nítrico, antioxidante nítróido, nitrulina, nocodazol, nogalamicina, benzamida n-sustituída, O6-benzilguanina, octreotida, oquiicenona, oligonucleótidos, onapristona, ondansetrón, oracina, inductor de citosina oral, ormaplatino, osaterona, oxaliplatino, oxaunomicina, oxisurano, paclitaxel, análogos de paclitaxel, derivados de paclitaxel, palauamina, palmitoilrizoxina, ácido pamidróico, panaxitriol, panomifeno, parabactina, pazeliptina, pegaspargasa, peldesina, peliomicina, pentamustina, polisulfato sódico de pentosano, pentostatina, pentozol, sulfato de peplomicina, perflubrón, perfosfamida, alcohol perilílico, fenazinomicina, fenilacetato, inhibidores de la fosfatasa, picibanilo, clorhidrato de pilocarpina, pipobromano, pipsulfano, pirarrubicina, piritrexim, clorhidrato de piroxantrona, placetina A, placetina B, inhibidor del activador de plasminógeno, complejo de platino, compuestos de platino, complejo platino-triamina, plicamicina, plomestano, porfímero sódico, porfiromicina, prednimustina, clorhidrato de procarbazona, propil bis-acridona, prostaglandina J2, antiandrógeno de carcinoma prostático, inhibidores del proteasoma, modulador inmunitario a base de proteína A, inhibidor de la proteína cinasa C, inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa, inhibidores de la purina-nucleósido fosforilasa, puromicina, clorhidrato de puromicina, purpurinas, pirazorurina, pirazoloacridina, conjugado de hemoglobina piridoxilada-polioxi-etileno, antagonistas de RAF, raltitrexed, ramosetrón, inhibidores de la proteína farnesil transferasa RAS, inhibidores de RAS, inhibidor de RAS-GAP, reteliptina desmetilada, etidronato de renio RE 186, rizoxina, riboprina, ribozimas, RH retinarnida, ARNi, rogletimida, rohituquina, romurtida, roquinimex, rubiginona B1, ruboxil, safingol, clorhidrato de safingol, saintopina, sarcnu, sarcotil A, sargramostim, miméticos de SDI1, semustina, derivado del inhibidor 1 de la senescencia, oligonucleótidos sentido, inhibidores de la transducción de señales, moduladores de la transducción de señales, simtrazeno, proteína de unión al antígeno de una sola cadena, sizofirano, sobuzoxano, borocaptato de sodio, fenilacetato de sodio, solverol, proteína de unión a somatomedina, sonermina, esparfosato sódico, ácido esparfósico, esparsomicina, espicamicina D, clorhidrato de espirogermanio, espiromustina, espiroplatino, esplenopentina, espongiostatina 1, escualamina, inhibidor de células madre, inhibidores de la división de células madre, estipiarnida, estreptonigrina, estreptozocina, inhibidores de la estromelina, sulfinosina, sulfofenur, antagonistas del péptido intestinal vasoactivo superactivo, suradista, suramina, swainsonina, glucosaminoglucanos sintéticos, talisomicina, talimustina, metyoduro de tamoxifeno, taumustina, tazaroteno, tecogalán sódico, tegafur, telurapirilio, inhibidores de la telomerasa, clorhidrato de teloxantrona, temoporquina, temozolomida, tenipósido, teroxirona, testolactona, tetraclorodecaóxido, tetrazomina, taliblastina, talidomida, tiamiprina, tiocoralina, tioguanina, tiotepa, trombopoyetina, miméticos de trombopoyetina, timalfasina, agonista del receptor de timopoyetina, timotrinano, hormona estimulante de la tiroides, tiazofurina, etiopurpurina de etilo de estaño, tirapazamina, dicloruro de titanoceno, clorhidrato de topotecán, topsentina, toremifeno, citrato de toremifeno, factor de células madre totipotentes, inhibidores de la traducción, acetato de trestolona, tretinoína, triacetiluridina, triciribina, fosfato de triciribina, trimetrexato, trimetrexato glucuronato, triptorelina, tropisetron, clorhidrato de tubulozol, turosterida, inhibidores de la tirosina cinasa, tirstofinas, inhibidores de UBC, ubenimex, mostaza de uracilo, uredepa, factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital, antagonistas del receptor de urocina, vapreotida, variolina B, velaresol, veramina, verdinas, verteporfina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, vindesina, sulfato de vindesina, sulfato de vinepidina, sulfato de vinglicinato, sulfato de vinleurosina, vinorelbina o tartrato de vinorelbina, sulfato de vinrosidina, vinxaltina, sulfato de vinzolidina, vitaxina, vorozol, zanoterona, zeniplatino, zilascorb, zinostatina, zinostatina, estimalamero o clorhidrato de zorrubicina.

Formulaciones farmacéuticas

Las nanopartículas desveladas en el presente documento se pueden combinar con vehículos farmacéuticamente aceptables para formar una composición farmacéutica, de acuerdo otro aspecto de la invención. Como apreciarán los expertos en la materia, los vehículos se pueden elegir basándose en la vía de administración como se describe a continuación, la ubicación del problema que es la diana, el fármaco que se va entregar, el tiempo de entrega del fármaco, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar a un paciente mediante cualquier medio conocido en el área incluidas las vías oral y parenteral. El término "paciente", como se usa en el presente documento, se refiere a seres humanos así como no humanos, incluidos, por ejemplo, mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. Por ejemplo, los no humanos pueden ser mamíferos (por ejemplo un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, un primate o un cerdo). En ciertas realizaciones las rutas parenterales son

deseables puesto que evitan el contacto con las enzimas digestivas que se encuentran en el canal alimentario. De acuerdo con dichas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden administrar mediante inyección (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular o peritoneal), por vía rectal, vaginal, tópica (por ejemplo mediante polvos, cremas, pomadas o gotas), o por inhalación (por ejemplo mediante pulverizaciones).

- 5 En una realización particular, las nanopartículas de la presente invención se administran a un sujeto que lo necesita sistémicamente, por ejemplo, mediante infusión o inyección IV.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, las suspensiones estériles inyectables acuosas u oleosas se pueden formular de acuerdo con las técnicas conocidas usando agentes dispersantes o agentes humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación estéril inyectable también puede ser una solución, suspensión o emulsión estéril inyectable en un diluyente o disolvente atóxico aceptable para su uso parenteral, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el agua, la solución de Ringer U.S.P. y la solución de cloruro de sodio isotónica. Además, convencionalmente se emplean aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin se puede utilizar cualquier aceite no volátil suave incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables se usan ácidos grasos tales como el ácido oleico. En una realización, el conjugado de la invención se suspende en un fluido vehículo que comprende el 1 % (p/v) de carboximetilcelulosa de sodio y el 0,1 % (v/v) de TWEEN™ 80. Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro que retenga bacterias, o mediante la incorporación de agentes esterilizante en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril o cualquier otro medio inyectable estéril antes de su uso.

20 Las formas farmacéuticas sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el conjugado encapsulado o no encapsulado se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o (a) cargas o expansores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes tales como por ejemplo carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, (c) humectantes tales como glicerol, (d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (e) agentes retardantes de la solución tales como parafina; (f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) absorbentes como caolín y bentonita y (i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, los comprimidos y las píldoras, las formas farmacéuticas también pueden contener tampones.

Se apreciará que la dosis exacta de la partícula dirigida al PSMA es elegida por el médico individual a la vista del paciente que se va a tratar; en general, la dosis y la administración se ajustan para proporcionar una cantidad eficaz de la partícula dirigida al PSMA al paciente en tratamiento. Como se usa en el presente documento, la "cantidad eficaz" de una partícula dirigida al PSMA se refiere a la cantidad necesaria para producir una respuesta biológica deseada. Como apreciarán los expertos en la materia, la cantidad eficaz de partícula dirigida al PSMA puede variar dependiendo de factores tales como el criterio de valoración biológico deseado, el fármaco que se va a administrar, el tejido que es la diana, la vía de administración, etc. Por ejemplo, la cantidad eficaz de partícula dirigida al PSMA que contiene un antineoplásico podría ser la cantidad que produzca una reducción en el tamaño del tumor en una cantidad deseada en un determinado período de tiempo. Otros factores que se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad del estado patológico; la edad, el peso y el género del paciente en tratamiento; la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración; las combinaciones de fármacos; las reacciones de sensibilidad; y la tolerancia/respuesta al tratamiento.

Las nanopartículas de la divulgación se pueden formular en formas farmacéuticas unitarias para facilitar la administración y la uniformidad de dosis. La expresión "forma farmacéutica unitaria" como se usa en el presente documento se refiere a una unidad físicamente discreta de nanopartícula apropiada para el paciente que se va a tratar. Se comprenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones de la presente invención será decidido por el médico tratante según su criterio profesional. Para cualquier nanopartícula, la dosis terapéuticamente eficaz se puede calcular inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, generalmente en ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también se usa para conseguir un intervalo de concentración y una vía de administración deseables. Dicha información se puede usar después para determinar las dosis y las vías útiles para la administración en los seres humanos. La eficacia terapéutica y la toxicidad de las nanopartículas se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) y la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como el cociente, DL_{50}/DE_{50} . Las composiciones farmacéuticas que tienen índices terapéuticos grandes pueden ser útiles en algunas realizaciones. Los datos obtenidos de esos ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosis para su uso en humanos.

En una realización, las composiciones desveladas en el presente documento pueden incluir menos de aproximadamente 10 ppm de paladio, o menos de aproximadamente 8 ppm, o menos de aproximadamente 6 ppm de paladio. Por ejemplo, en el presente documento se proporciona una composición que incluye nanopartículas que

tienen un conjugado polimérico PLA-PEG-GL2 en las que la composición tiene menos de aproximadamente 10 ppm de paladio.

En una realización de ejemplo, se desvela una composición farmacéutica que incluye una pluralidad de nanopartículas cada una de las cuales comprende un agente terapéutico; de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 30 por ciento en moles del contenido total de polímero, o de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 20 por ciento en moles, o de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10 por ciento en moles, o de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 5 por ciento en moles del contenido total de polímero de una nanopartícula de una primera macromolécula que comprende un copolímero PLGA-PEG o un copolímero PLA-PEG conjugado con un ligando que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 100 g/mol y 500 g/mol; y una segunda macromolécula que comprende un copolímero PLGA-PEG o un copolímero PLA-PEG, en los que el copolímero no está unido a un resto de direccionamiento; y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el primer copolímero puede tener de aproximadamente el 0,001 y el 5 por ciento en peso del ligando con respecto al contenido total de polímero.

En algunas realizaciones, se considera una composición adecuada para congelación, que incluye nanopartículas desveladas en el presente documento y una solución adecuada para congelación, por ejemplo, se añade una solución de sacarosa a la suspensión de nanopartículas. La sacarosa puede actuar, por ejemplo, como un crioprotector para evitar que las partículas se agreguen al congelarlas. Por ejemplo, en el presente documento se proporciona una formulación de nanopartículas que comprenden una pluralidad de nanopartículas desveladas, sacarosa y agua; en los que la relación nanopartículas/sacarosa/agua es de aproximadamente el 3-30 %/10-30 %/50-90 % (p/p/p) o aproximadamente el 5-10 %/10-15 %/80-90 % (p/p/p).

Procedimientos de tratamiento

En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio de, inhibir el avance de, reducir la gravedad de y/o reducir la incidencia de, uno o más síntomas o características de una enfermedad, un trastorno y/o una afección. En algunas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención se pueden usar para tratar tumores sólidos por ejemplo cáncer y/o células cancerosas. En ciertas realizaciones, las partículas dirigidas de la invención se pueden usar para tratar cualquier cáncer en el que se exprese el PSMA sobre la superficie de células cancerosas o la neovascularización del tumor en un sujeto que lo necesita, incluida la neovascularización de tumores sólidos de próstata o no prostáticos. Los ejemplos de indicaciones relacionadas con PSMA incluyen, pero no se limitan a, cáncer de próstata, cáncer de mama, carcinoma pulmonar no microcítico, carcinoma colorrectal y glioblastoma.

El término "cáncer" incluye cánceres premalignos así como malignos. Los cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de piel, por ejemplo, melanomas o carcinomas de células basales, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cánceres de cabeza y cuello, cáncer bronquial, cáncer pancreático, cáncer de vejiga urinaria, cáncer cerebral o del sistema nervioso central, cáncer de sistema nervioso periférico, cáncer esofágico, cáncer de la cavidad oral o la faringe, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer testicular, cáncer del tracto biliar, cáncer de intestino delgado o apéndice, cáncer de glándula salival, cáncer de glándula tiroides, cáncer de glándula suprarrenal, osteosarcoma, condrosarcoma, cáncer de tejidos hematológicos y similares. Las "células cancerosas" pueden estar en forma de un tumor, existir solas en un sujeto (por ejemplo células de leucemia), o ser líneas celulares derivadas de un cáncer.

El cáncer se puede asociar a una diversidad de síntomas físicos. Los síntomas del cáncer dependen generalmente del tipo y la ubicación del tumor. Por ejemplo, el cáncer de pulmón puede provocar tos, falta de aliento y dolor torácico, mientras que el cáncer de colon con frecuencia causa diarrea, estreñimiento y sangre en las heces. Sin embargo, para proporcionar unos pocos ejemplos, los síntomas siguientes se asocian en general, con frecuencia, a muchos tipos de cáncer: fiebre, escalofríos, sudoración nocturna, tos, disnea, pérdida de peso, pérdida del apetito, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, anemia, ictericia, hepatomegalia, hemoptisis, fatiga, malestar general, disfunción cognitiva, depresión, trastornos hormonales, neutropenia, dolor, úlceras que no cicatrizan, ganglios linfáticos agrandados, neuropatía periférica y disfunción sexual.

En un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para el tratamiento del cáncer (por ejemplo el cáncer de próstata o de mama). En algunas realizaciones, el tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de las partículas dirigidas de la invención a un sujeto que lo necesita, en tales cantidades y durante tal tiempo como sea necesario para conseguir el resultado deseado. En ciertas realizaciones de la presente invención una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una partícula dirigida de la invención es la cantidad eficaz para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el inicio de, inhibir el avance de, reducir la gravedad de y/o reducir la incidencia de, uno o más síntomas o características del cáncer.

En un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para administrar composiciones de la invención a un sujeto que sufre de cáncer (por ejemplo de cáncer de próstata). En algunas realizaciones, se proporcionan partículas a un sujeto en tales cantidades y por tal tiempo como sea necesario para lograr el resultado deseado (es decir, el tratamiento del cáncer). En ciertas realizaciones de la presente invención una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una partícula dirigida de la invención es la cantidad eficaz para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar el

inicio de, inhibir el avance de, reducir la gravedad de y/o reducir la incidencia de, uno o más síntomas o características del cáncer.

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

En otras realizaciones, las nanopartículas de la presente invención se pueden usar para inhibir el crecimiento de células cancerosas, por ejemplo de células de cáncer prostático. Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibe el crecimiento de células cancerosas" o "inhibe el crecimiento de células cancerosas" se refiere a reducir la velocidad de la proliferación y/o la migración de células cancerosas, detener la proliferación y/o la migración de células cancerosas, o provocar la muerte de las células cancerosas, de modo que la velocidad de crecimiento de las células cancerosas se reduzca en comparación con la velocidad observada o prevista de crecimiento de células cancerosas de control sin tratar. La expresión "inhibe el crecimiento" también se puede referir a una reducción en el tamaño o a la desaparición de una célula cancerosa o un tumor, así como a la reducción de su potencial metastásico. Preferentemente, dicha inhibición a nivel celular puede reducir el tamaño, impedir el crecimiento, reducir la agresividad, o prevenir o inhibir las metástasis de un cáncer en un paciente. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente, mediante cualquiera de una diversidad de indicios adecuados, si el crecimiento de las células cancerosas es inhibido.

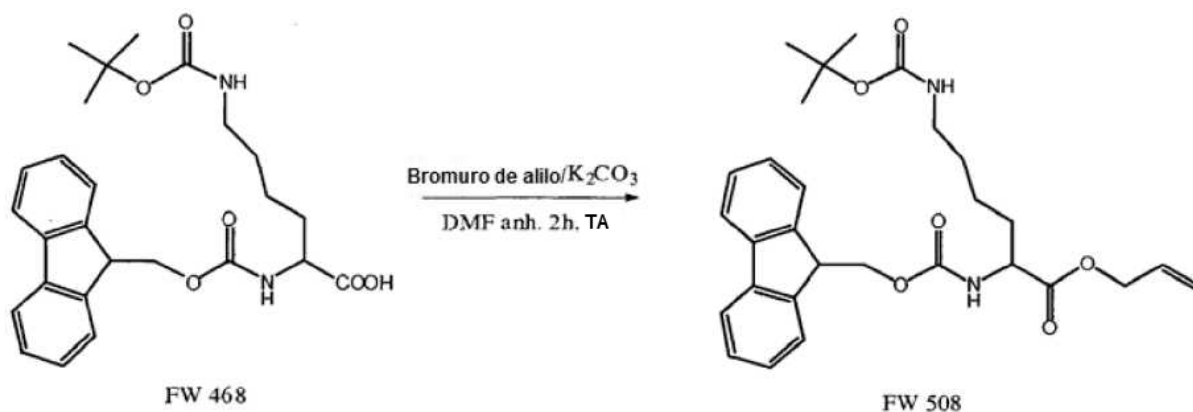
La inhibición del crecimiento de células cancerosas puede ser evidenciada, por ejemplo, por detención de las células cancerosas en una fase particular del ciclo celular, por ejemplo, detener en la fase G2/M del ciclo celular. La inhibición del crecimiento de células cancerosas también se puede evidenciar por medición directa o indirecta del tamaño de las células cancerosas o el tumor. En pacientes humanos con cáncer, dichas mediciones se hacen generalmente usando procedimientos de formación de imágenes bien conocidos tales como resonancia magnética, tomografía computarizada axial y radiografías. El crecimiento de células cancerosas también se puede determinar indirectamente, determinando los niveles circulantes de antígeno carcinoembrionario, antígeno prostático específico u otros antígenos específicos del cáncer que se correlacionan con el crecimiento de células cancerosas. La inhibición del crecimiento del cáncer también se correlaciona generalmente con una supervivencia prolongada y/o mayor salud y bienestar del sujeto.

También se proporcionan en el presente documento procedimientos de administración a un paciente de una nanopartícula desvelada que incluye un agente activo, en los que, después de la administración al paciente, dichas nanopartículas reducen sustancialmente el volumen de distribución y/o reducen sustancialmente la $C_{m\acute{a}x}$ libre, en comparación con la administración del agente activo solo (es decir, no como una nanopartícula desvelada).

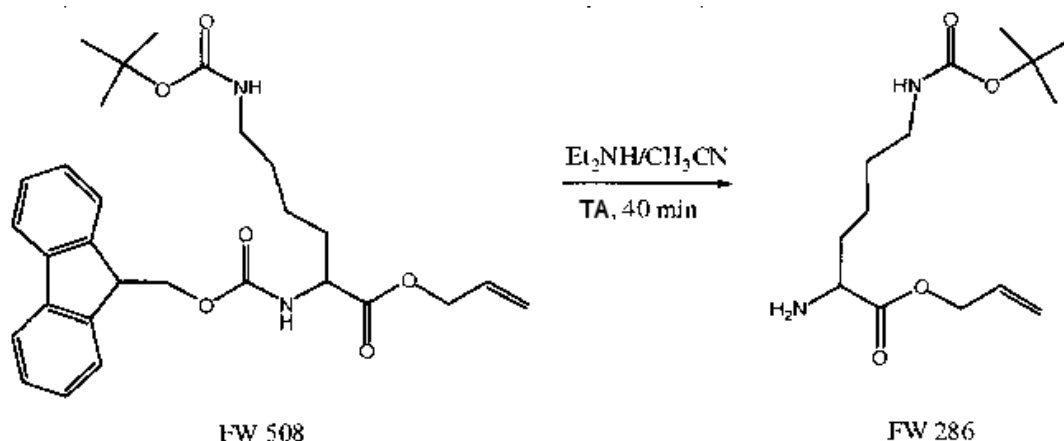
Ejemplos

La invención que se describe ahora en general, se comprenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente con fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención y no pretenden limitar la invención en modo alguno.

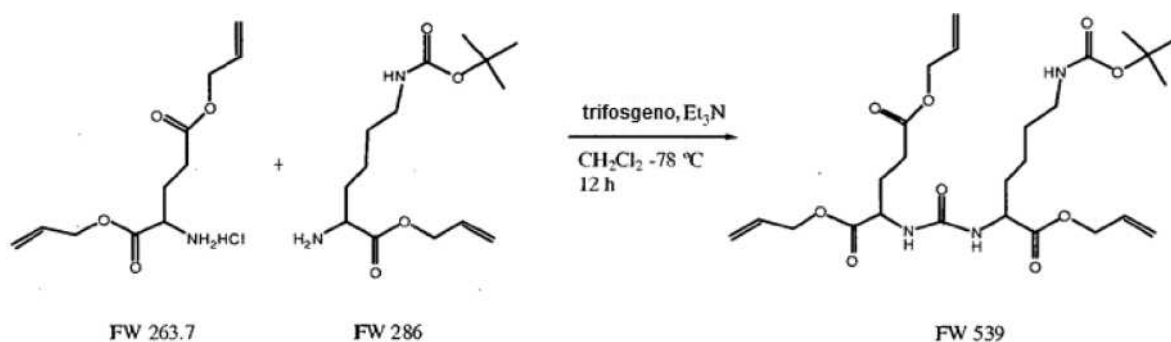
Ejemplo 1: Síntesis de un ligando de PSMA de bajo peso molecular (GL2)



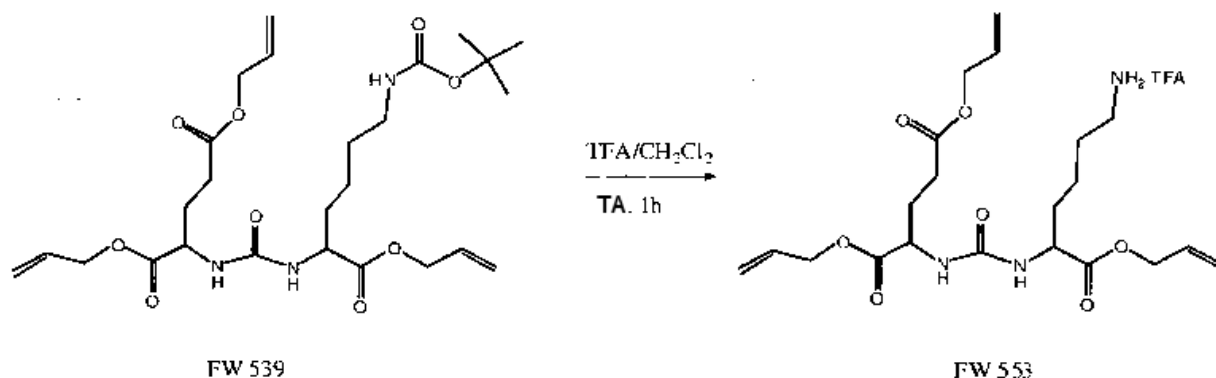
Se disolvieron 5 g (10,67 mmol) del compuesto de partida en 150 ml de DMF anhidra. A esta solución se le añadió bromuro de alilo (6,3 ml, 72 mmol) y K_2CO_3 (1,47 g, 10,67 mmol). La reacción se agitó durante 2 h, se retiró el disolvente, el material en bruto se disolvió en AcOEt y se lavó con H_2O hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con $MgSO_4$ (anhidro) y se evaporó para proporcionar 5,15 g (95 %) del material. (CCF en $CH_2Cl_2:MeOH$ 20:1 R_f = 0,9, comenzó R_f compuesto = 0,1, se reveló con ninhidrina y luz UV).



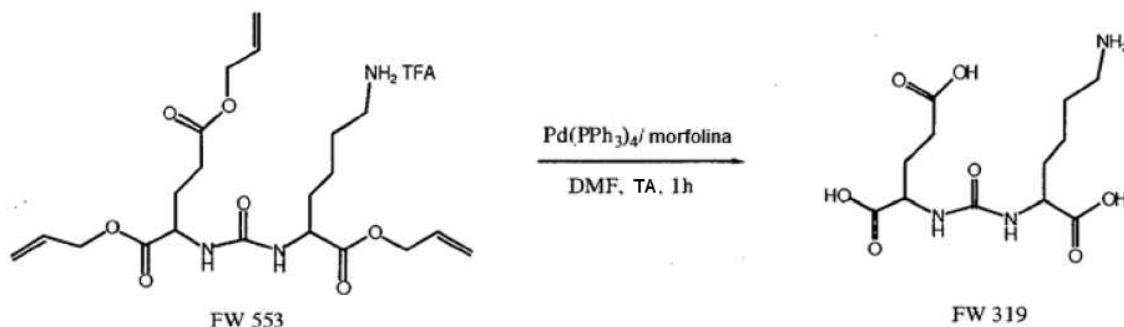
A una solución del compuesto (5,15 g, 10,13 mmol) en CH_3CN (50 ml) se le añadió Et_2NH (20 ml, 0,19 mol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. El disolvente se retiró y el compuesto se purificó por cromatografía en columna (hexano:AcOEt 3:2) para proporcionar 2,6 g (90 %). (CCF en $CH_2Cl_2:MeOH$ 10:1 R_f = 0,4, se reveló con ninhidrina (el compuesto tiene un color violeta). $RMN-^1H$ ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 5,95-5,85 (m, 1H, $-CH_2CHCH_2$), 5,36-5,24 (m, 2H, $-CH_2CHCH_2$), 4,62-4,60 (m, 3H, $-CH_2CHCH_2$, $NHBoc$), 3,46 (t, 1H, $CH(Lys)$), 3,11-3,07 (m, 2H, CH_2NHBoc), 1,79 (s a, 2H, NH_2), 1,79-1,43 (m, 6H, $3CH_2(Lys)$), 1,43 (s, 9H, Boc).



A una solución agitada de glutamato de dialilo (3,96 g, 15 mmol) y trifosgeno (1,47 g, 4,95 mmol) en CH_2Cl_2 (143 ml) a $-78^\circ C$ se le añadió Et_3N (6,4 ml, 46 mmol) en CH_2Cl_2 (28 ml). Se permitió que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente y se agitó durante 1,5 h. Después se añadió el derivado de lisina (2,6 g, 9,09 mmol) en una solución de CH_2Cl_2 (36 ml) a $-78^\circ C$ y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La solución se diluyó con CH_2Cl_2 , se lavó dos veces con H_2O , se secó en $MgSO_4$ (anh.) y se purificó por cromatografía en columna (hexano:AcOEt 3:1 \rightarrow 2:1 \rightarrow AcOEt) para proporcionar 4 g (82 %) (CCF en $CH_2Cl_2:MeOH$ 20:1 R_f = 0,3, se reveló con ninhidrina). $RMN-^1H$ ($EDCl_3$, 300 MHz) δ 5,97-5,84 (m, 3H, $3-CH_2CHCH_2$), 5,50 (t a, 2H, $2NH_{urea}$), 5,36-5,20 (m, 6H, $3-CH_2CHCH_2$), 4,81 (s a, 1H, $NHBoc$), 4,68-4,40 (m, 8H, $3-CH_2CHCH_2$, $CH(Lys)$, $CH(glu)$), 3,09-3,05 (m, 2H, CH_2NHBoc), 2,52-2,39 (m, 2H, $CH_2(glu.)$), 2,25-2,14 y 2,02-1,92 (2m, 2H, $CH_2(glu.)$), 1,87-1,64 (m, 4H, $2CH_2(Lys)$), 1,51-1,35 (m, 2H, $CH_2(Lys)$), 1,44 (s, 9H, Boc).



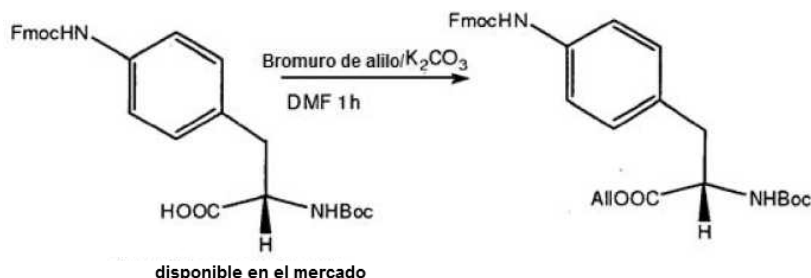
5 A una solución del compuesto (4 g, 7,42 mmol) en CH_2Cl_2 seco (40 ml) se le añadió TFA (9 ml) a 0 °C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se retiró al vacío a sequedad total para proporcionar 4,1 g (cuantitativo). (CCF en $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 20:1 Rf = 0,1, se reveló con ninhidrina). RMN- ^1H (CDCb, 300 MHz) δ 6,27-6,16 (2d, 2H, 2NHurea), 5,96-5,82 (m, 3H, 3- CH_2CHCH_2), 5,35-5,20 (m, 6H, 3- CH_2CHCH_2), 4,61-4,55 (m, 6H, 3- CH_2CHCH_2), 4,46-4,41 (m, 2H, CH(Lys), CH(glu)), 2,99 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{NH}\text{Boc}$), 2,46 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{glu.})$), 2,23-2,11 y 2,01-1,88 (2m, 2H, $\text{CH}_2(\text{glu.})$), 1,88-1,67 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2(\text{Lys})$), 1,45 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{Lys})$).



10 A una solución del compuesto (2 g, 3,6 mmol) en DMF (anh.) (62 ml) en atmósfera de argón se le añadió $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0,7 g, 0,6 mmol) y morfolina (5,4 ml, 60,7 mmol) a 0 °C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se retiró. Después el producto en bruto se lavó dos veces con CH_2Cl_2 y después se disolvió en H_2O . A esta solución se le añadió una solución diluida de NaOH (0,01 N) hasta que el pH fue muy básico. El disolvente se retiró a presión reducida. El sólido se volvió a lavar con CH_2Cl_2 , AcOEt y una mezcla de MeOH- CH_2Cl_2 (1:1), se disolvió en H_2O y se neutralizó con resina Amberlite IR-120 H+. El disolvente se evaporó y el compuesto se precipitó con MeOH, para proporcionar 1 g (87 %) de GL2. RMN- ^1H (D_2O , 300 MHz) δ 4,07 (m, 2H, CH(Lys), CH(glu)), 2,98 (m, 2H, CH_2NH_2), 2,36 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{glu.})$), 2,08-2,00 (m, 1H, $\text{CH}_2(\text{glu.})$), 1,93-1,60 (m, 5H, $\text{CH}_2(\text{glu.})$, 2 $\text{CH}_2(\text{Lys})$), 1,41 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{Lys})$). IEN de masas: 320,47 [M + H $^+$], 342,42 [M + Na $^+$].

15

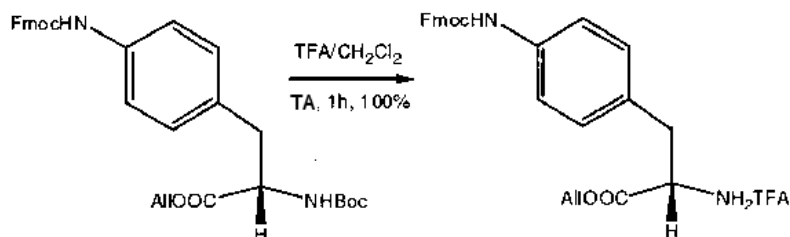
Ejemplo 2: Síntesis de un ligando de PSMA de bajo peso molecular (GL1)



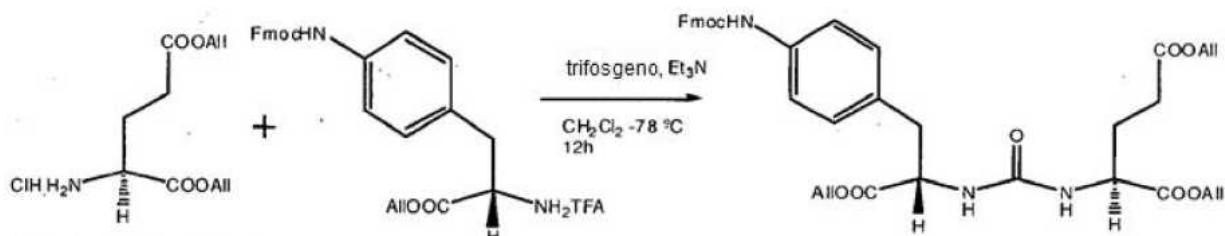
20 Se disolvieron 130 mg (0,258 mmol) del compuesto de partida en 3 ml de DMF anhidra. A esta solución se le añadió bromuro de alilo (150 μl , 1,72 mmol) y K_2CO_3 (41 mg, 0,3 mmol). La reacción se agitó durante 1 h, se retiró el disolvente, el producto en bruto se disolvió en AcOEt y se lavó con H_2O hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con MgSO_4 (anhidro) y se evaporó para proporcionar 130 mg (93 %). (CCF en $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 20:1 Rf = 0,9, comenzó Rf del compuesto = 0,1, se reveló con ninhidrina y luz UV). RMN- ^1H (CdCl_3 , 300 MHz) δ 7,81-7,05 (12H, aromáticos), 6,81 (s a, 1H, NHFmoc), 5,93-5,81. (m, 1H, $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$), 5,35-5,24 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$), 5,00 (d a, 1H, NHboc), 4,61-4,53 (m, 5H, $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$, $\text{CH}_2(\text{Fmoc})$, CH(pheala.)), 4,28 (t, 1H, CH(Fmoc)), 3,12-2,98 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{pheala.})$,

25

1,44 (s, 9H, Boc).

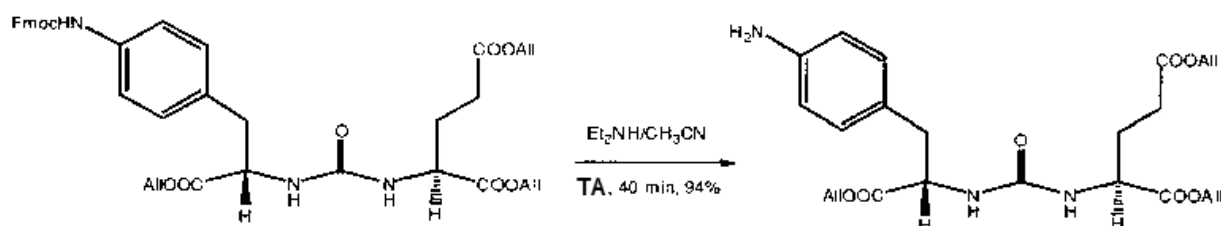


A una solución del compuesto (120 mg, 0,221 mmol) en CH_2Cl_2 seco (2 ml) se le añadió TFA (1 ml) a 0 °C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se retiró al vacío, se añadió agua y se volvió a retirar, se añadió CH_2Cl_2 y se volvió a retirar a sequedad total para proporcionar 120 mg (cuantitativo). (CCF en CH_2Cl_2 :MeOH 20:1 $R_f = 0,1$, se reveló con ninhidrina y luz UV). RMN- ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,80-7,00 (13H, aromáticos, NHfmoc), 5,90-5,75 (m, 1H, $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$), 5,35-5,19 (m, 3H, $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$, NHboc), 4,70-4,40 (2m, 5H, $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$, $\text{CH}_2(\text{Fmoc})$, $\text{CH}(\text{pheala.})$), 4,20 (t, 1H, $\text{CH}(\text{Fmoc})$), 3,40-3,05 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{pheala.})$).

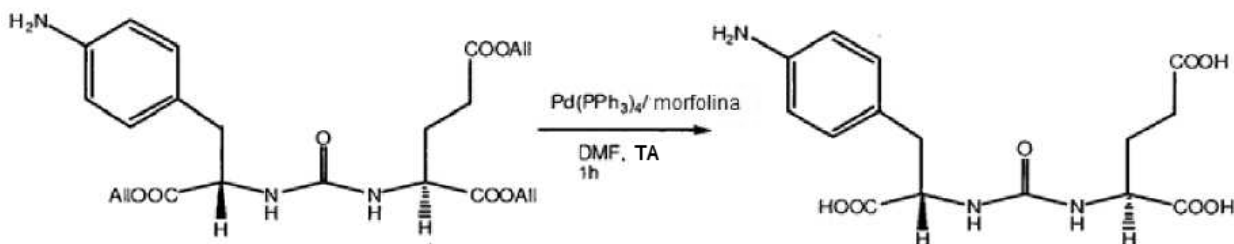


disponible en el mercado

- 10 A una solución agitada de glutamato de dialilo (110 mg, 0,42 mmol) y trifosgeno (43 mg, 0,14 mmol) en CH_2Cl_2 (4 ml) a -78 °C se le añadió Et_3N (180 μl , 1,3 mmol) en CH_2Cl_2 (0,8 ml). Se permitió que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente y se agitó durante 1,5 h. Después se añadió el derivado de fenilalanina (140 mg, 0,251 mmol) en una solución de CH_2Cl_2 (1 ml) y Et_3N (70 μl , 0,5 mmol) a -78 °C y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La solución se diluyó con CH_2Cl_2 , se lavó dos veces con H_2O , se secó en MgSO_4 (anh.) y se purificó por cromatografía en columna (hexano:AcOEt 3:1) para proporcionar 100 mg (57 %) (CCF en CH_2Cl_2 :MeOH 20:1 $R_f = 0,3$, se reveló con ninhidrina y luz UV). RMN- ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,80-6,95 (13H, aromáticos, NHfmoc), 5,98-5,82 (m, 3H, $3-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$), 5,54 (d a, 1H, NHurea), 5,43-5,19 (m, 7H, $3-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$, NHurea), 4,85-4,78 (m, 1H, $\text{CH}(\text{pheala.})$), 4,67-4,50 (m, 9H, $3-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$, $\text{CH}_2(\text{Fmoc})$, $\text{CH}(\text{glu.})$), 4,28 (t, 1H, $\text{CH}(\text{Fmoc})$), 3,05 (d, 2H, $\text{CH}_2(\text{pheala.})$), 2,53-2,33 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{glu.})$), 2,25-2,11 y 1,98-1,80 (2m, 2H, $\text{CH}_2(\text{glu.})$).



- 20 A una solución del compuesto de partida (60 mg, 0,086 mmol) en CH_3CN (1 ml) se le añadió Et_2NH (1 ml, 10 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. El disolvente se retiró y el compuesto se purificó por cromatografía en columna (hexano:AcOEt 2:1) para proporcionar 35 mg (85 %). (CCF en CH_2Cl_2 :MeOH 1,0:1 $R_f = 0,5$, comenzó R_f compuesto = 0,75, se reveló con ninhidrina (el compuesto tiene color violeta) y luz UV).
- 25 RMN- ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 6,85 y 6,55 (2d, 4H, aromáticos), 5,98-5,82 (m, 3H, $3-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$), 5,56 (d a, 1H, NHurea), 5,44-5,18 (m, 7H, $3-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$, NHurea), 4,79-4,72 (m, 1H, $\text{CH}(\text{pheala.})$), 4,65-4,49 (m, 7H, $3-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$, $\text{CH}(\text{glu.})$), 3,64 (s a, 2H, NH_2), 3,02-2,89 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{pheala.})$), 2,49-2,31 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{glu.})$), 2,20-2,09 y 1,91-1,78 (2m, 2H, $\text{CH}_2(\text{glu.})$).

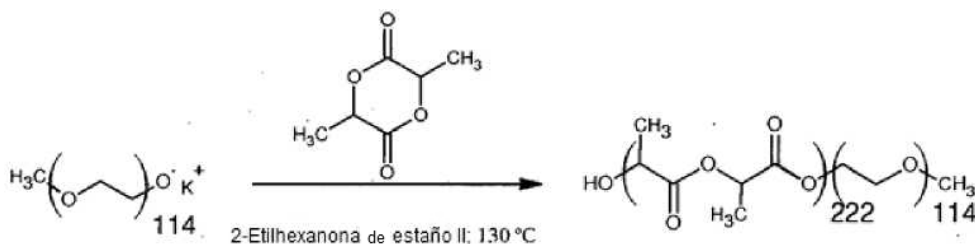


5 A una solución del compuesto (50 mg, 0,105 mmol) en DMF (anh., 1,5 ml) en atmósfera de argón se le añadió Pd(PPh₃)₄ (21 mg, 0,018 mmol) y morfolina (154 µl, 1,77 mmol) a 0 °C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se retiró el disolvente. El material en bruto se lavó dos veces con CH₂Cl₂ y después se disolvió en H₂O.

10 A esta solución se le añadió una solución diluida de NaOH (0,01 N) hasta que el pH fue muy básico. El disolvente se retiró a presión reducida. El sólido se volvió a lavar con CH₂Cl₂, AcOEt y mezcla de MeOH-CH₂Cl₂ (1:1), se disolvió en H₂O y se neutralizó con resina Amberlite IR-120 H+. El disolvente se evaporó y el compuesto se precipitó con MeOH, para proporcionar 25 mg (67 %) de GL1. RMN-¹H (D₂O, 300 MHz) δ 7,08 y 6,79 (2d, 4H, aromáticos), 4,21 (m, 1H, CH(pheala.)), 3,90 (m, 1H, CH(glu.)), 2,99 y 2,82 (2dd, 2H, CH₂(pheala.)), 2,22-2,11 (m, 2H, CH₂(glu.)), 2,05-1,70 (2m, 2H, CH₂(glu.)). RMN-¹³C (D₂O, 75 MHz) δ 176,8, 174,5, 173,9 (3 COO), 153,3 (NHCONH), 138,8 (H₂N-C(Ph)), 124,5, 122,9, 110,9 (aromáticos), 51,3 (CH(pheala.)), 49,8 (CH(glu.)), 31,8 (CH₂(pheala.)), 28,4 y 23,6 (2CH₂-glu.). IEN de masas: 354,19 [M + H⁺], 376,23 [M + Na⁺].

Ejemplo 3: Preparación de PLA-PEG

15 La síntesis se realizó mediante polimerización de apertura del anillo de d,1-láctido con α-hidroxi-ω-metoxipoli(etilenglicol) como el iniciador macro y se realizó a una temperatura elevada usando 2-etilhexanoato de estaño (II) como catalizador, como se muestra a continuación (PEG Pn (peso molecular promedio en número) ≈ 5.000 Da; PLA Pn ≈ 16.000 Da; PEG-PLA Pn ≈ 21.000 Da)



20 El polímero se purificó disolviendo el polímero en diclorometano y precipitándolo en una mezcla de hexano y éter dietílico. El polímero recuperado de este paso se debe secar en una estufa.

Ejemplo 4: Preparación de PLA-PEG-Ligando

25 La síntesis, que se muestra en la figura 2, comienza con la conversión de Fmoc, BOC lisina en Fmoc, BOC, alil lisina haciendo reaccionar Fmoc, BOC lisina con bromuro de alilo y carbonato de potasio en dimetilformamida, seguido de tratamiento con dietilamina en acetonitrilo. Después se hace reaccionar BOC, alil lisina con trifosgeno y glutamato de dialilo, seguido de tratamiento con ácido trifluoroacético en cloruro de metileno para proporcionar el compuesto "GL2P".

30 La cadena lateral amina de la lisina en GL2P se pegila después mediante adición de hidroxil-PEG-ácido carboxílico con EDC y NHS. La conjugación de GL2P a PEG es a través de una unión amida. La estructura de este compuesto resultante es etiquetada "HO-PEG-GL2P". Después de la pegilación, se usa polimerización por apertura del anillo (ROP, del inglés *ring opening polymerization*) de d,1-láctido con el grupo hidroxilo de HO-PEG-GL2P como iniciador para unir un polímero en bloque de poliláctido a HO-PEG-GL2P a través de un enlace éster para proporcionar "PLA-PEG-GL2P". Se usa 2-etilhexanoato de estaño (II) como catalizador para la polimerización de apertura del anillo.

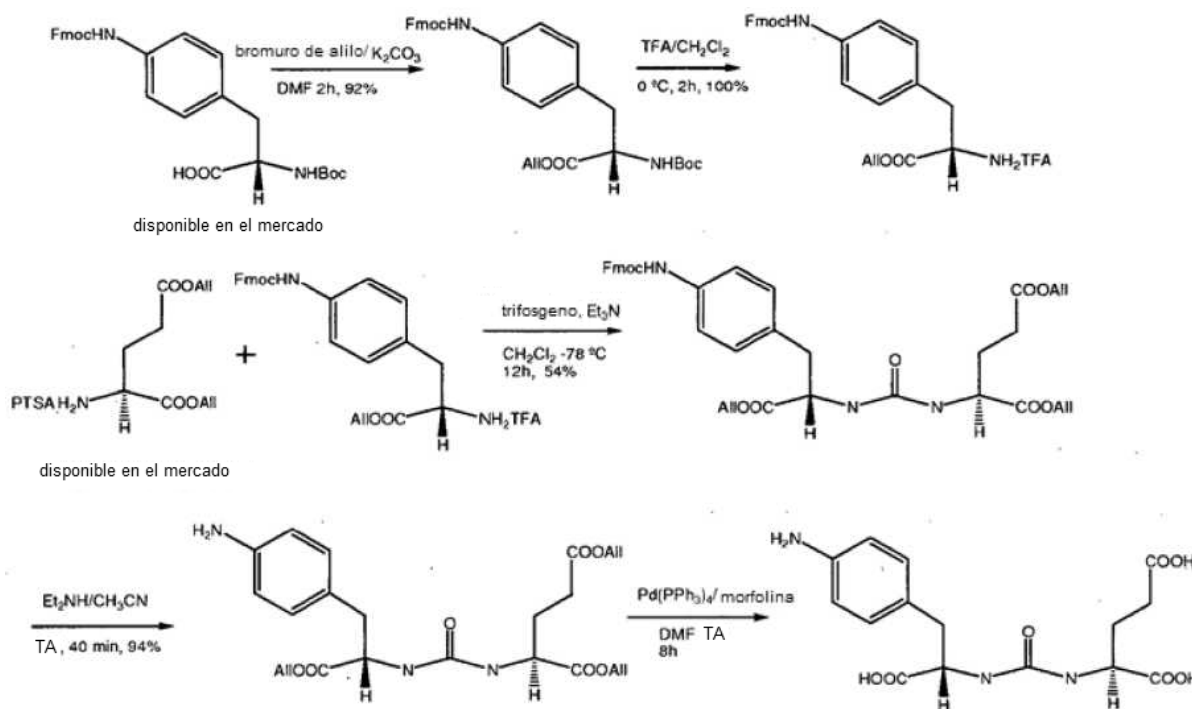
35 Finalmente, se retiran los grupos alilo de PLA-PEG-GL2P usando morfolina y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (como catalizador) en diclorometano, para proporcionar el producto final PLA-PEG-Ligando. El compuesto final se purifica por precipitación en éter dietílico/hexano 30/70 % (v/v).

Ejemplo 5: Preparación de nanopartículas -Nanoprecipitación

Se pueden preparar nanopartículas utilizando ligando GL1 o GL2. El inhibidor de PSMA a base de urea GL2, que tiene un grupo amino libre ubicado en una región no crítica para la unión de PSMA, se sintetiza a partir de materiales de partida disponibles en el mercado Boc-Phe(4NHfmoc)-OH y ácido dialil glutámico de acuerdo con el

procedimiento que se muestra en el esquema 1. Las nanopartículas se forman usando nanoprecipitación. El conjugado polímero-ligando se disuelve en un disolvente orgánico miscible con agua junto con un fármaco u otro agente para seguir la absorción de la partícula. Se puede incluir un polímero no funcionalizado adicional para modular la densidad superficial del ligando. La solución de polímero se dispersa en una fase acuosa y las partículas resultantes se recogen por filtración. Las partículas se pueden secar o analizar inmediatamente con relación a la absorción celular in vitro o la actividad antitumor prostético in vivo.

5

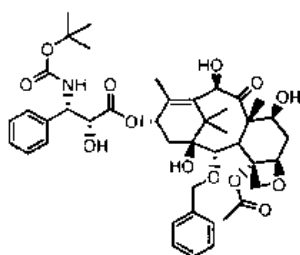


Esquema 1

Ejemplo 6: Preparación de nanopartículas - Procedimiento de emulsión

10

Se forma una fase orgánica compuesta por un 5 % de sólidos (% en peso) que incluye un 2 % de copolímero en dibloque poli(láctido-co-glicólido)-poli(etilenglicol) (PLGA-PEG; 45 kDa-5 kDa), un 2 % de poli(D,L-láctido) (PLA; 8,5 kDa) y un 1 % de docetaxel (DTXL) en los que el docetaxel tiene la estructura



15

Los disolventes orgánicos son acetato de etilo (EA) y alcohol bencílico (BA) en los que BA constituye el 20 % (% en peso) de la fase orgánica. Se usa BA en parte para solubilizar el docetaxel. La fase orgánica se mezcla con una fase acuosa en una relación de aproximadamente 1:5 (fase oleosa:fase acuosa) en la que la fase acuosa está compuesta por un 0,5 % de colato de sodio, un 2 % de BA y un 4 % de EA (% en peso) en agua. La emulsión primaria se forma combinando las dos fases por mezcla simple o mediante el uso de un homogeneizador de rotor y estator. La emulsión primaria se convierte después en una emulsión fina mediante el uso de una sonda de ultrasonido o un homogeneizador de alta presión.

20

Después la emulsión fina se enfría añadiendo un medio de enfriamiento enfriado (0-5 °C) de agua desionizada mientras se mezcla. La relación medio de enfriamiento:emulsión es de aproximadamente 8,5:1. Después se añade una solución del 25 % (% en peso) de Tween 80 al medio de enfriamiento para obtener aproximadamente el 2 % de Tween 80 total. Después las nanopartículas se aíslan por centrifugación o ultrafiltración/diafiltración. Posteriormente, la suspensión de nanopartículas se puede congelar con un crioprotector, tal como sacarosa al 10 % en peso.

25

Se encontró que la adición de PLA además del copolímero PLGA-PEG aumentaba significativamente la carga de

fármaco. Es posible el uso de BA por sí mismo también sirva para aumentar la eficiencia de la encapsulación, aumentando la eficiencia de la encapsulación aun cuando el BA no fuera necesario para solubilizar el DTXL. Se encontró que la temperatura del medio de enfriamiento tenía un papel fundamental en la carga de fármaco. El uso de un medio de enfriamiento frío (generalmente mantenido a 0-5 °C) aumentó significativamente la carga de fármaco en comparación con la carga de fármaco cuando se usó un medio de enfriamiento a temperatura ambiente.

El DTXL tiene una solubilidad muy baja en agua y se encontró que el DTXL no encapsulado con frecuencia formaba cristales que eran difíciles de aislar de las nanopartículas formadas. Se añadió solubilizante de fármaco (Tween 80) después de que se hubiera enfriado la emulsión fina. El Tween 80 es capaz de solubilizar eficazmente los cristales de DTXL y permitir el aislamiento de nanopartículas de DTXL no encapsulado evitando la formación de cristales de DTXL y/o solubilizando eficazmente todos los cristales de DTXL que se formaron cuando se templó la emulsión fina. Un conjunto convencional de condiciones de nanoemulsión fueron las siguientes:

Control:

Atributo	Valor
Copolímero en bloque (tipo/cantidad)	45/5 PLGA (50/50 L:G)-PEG (5 kDa), 80 %
Homopolímero (tipo/cantidad)	Ninguno
Fármaco (cantidad de DTXL)	10 %
Disolvente orgánico (tipo/cantidad)	Acetato de etilo (EA)
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Ninguno
Fase acuosa	1 % de PVA con 6,5 % de EA
Temperatura del medio de enfriamiento	~5 °C
RESULTADOS	
Atributo	Valor
Tamaño de partícula	191 nm
Carga de fármaco	0,8 %
Liberación in vitro (24 horas a 37 °C)	No determinado (ND)
Otro	NA

La adición de homopolímero como aditivo produjo una mayor carga de fármaco si bien el tamaño de partícula es menor, como se muestra a continuación:

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Copolímero en bloque (tipo/cantidad)	45/5 PLGA (50/50 L:G)-PEG (5 kDa), 90 %	45/5 PLGA (50/50 L:G)-PEG (5 kDa), 45 %
Homopolímero (tipo/cantidad)	Ninguno	8,5 kDa PLA, 45 %
Fármaco (cantidad de DTXL)	10 %	10 %
Disolvente orgánico (tipo/cantidad)	EA	EA, 80 %
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Ninguno	Alcohol bencílico (BA), 20 %
Fase acuosa	1 % de PVA con 6,5 % de EA	1 % de PVA con 6,5 % de EA
Temperatura del medio de enfriamiento	~5 °C	~5 °C
RESULTADOS		
Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Tamaño de partícula	191 nm	134 nm
Carga de fármaco	0,8 %	2,4 %
Liberación in vitro (24 horas a 37 °C)	No determinado (ND)	No determinado (ND)
Otro	NA	NA

Temperatura de enfriamiento

En este caso el control utilizado para la comparación es diferente del control anterior, ya que éste ya se realizaron a temperatura de enfriamiento fría.

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Copolímero en bloque (tipo/cantidad)	45/5 PLGA (50/50 L:G)-PEG 47,5 %	45/5 PLGA (50/50 L:G), 47,5 %
Homopolímero (tipo/cantidad)	~30 kDa PLGA (50/50 L:G), 47,5 %	~30 kDa PLGA (50/50 L:G), 47,5 %
Fármaco (cantidad de DTXL)	5 %	5 %
Disolvente orgánico (tipo/cantidad)	Diclorometano (DCM)	Diclorometano (DCM)
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Ninguno	Ninguno
Fase acuosa	0,5 % de colato de sodio	0,5 % de colato de sodio
Temperatura del medio de enfriamiento	~25 °C	~5 °C
RESULTADOS		
Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Tamaño de partícula	210 nm	214 nm
Carga de fármaco	1,2 %	3,6 %
Liberación in vitro (24 horas a 37 °C)	No determinado (ND)	No determinado (ND)
Otro	NA	NA

Parámetros de ejemplo

Atributo	Valor
Copolímero en bloque (tipo/cantidad)	45/5 PLA-PEG, 40 % (5 moles % que contienen PLA-PEG-GL2)
Homopolímero (tipo/cantidad)	8,5 kDa PLA, 40 %
Fármaco (cantidad de DTXL)	20 %
Disolvente orgánico (tipo/cantidad)	EA, 80 %
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	BA, 20 %
Fase acuosa	0,5 % de colato de sodio, 4 % de EA, 2 % de BA
Temperatura del medio de enfriamiento	~5 °C
RESULTADOS	
Atributo	Valor
Tamaño de partícula	98,5 nm
Carga de fármaco	3,0 %
Liberación in vitro (24 horas a 37 °C)	~60 %

5 Ejemplo 7: Procedimiento de emulsión

El procedimiento que se describe a continuación usa un aumento en el contenido de sólidos de la fase oleosa. Un diagrama de flujo general del procedimiento se describe en la figura 3 y un diagrama de flujo del procedimiento se representa en la figura 4. Reduciendo el contenido de disolvente de la fase oleosa emulsionada, se pierde menos

5 fármaco en el líquido de enfriamiento cuando las nanopartículas se endurecen. Se elige un sistema de sólidos y disolvente para evitar que sea excesivamente viscoso, que puede limitar la capacidad de emulsionarse en gotitas de ~100 nm. El uso de un copolímero de peso molecular relativamente bajo (PLA-PEG de ~16 kDa-5 kDa) y homopolímero de bajo peso molecular (PLA de ~7 kDa) permite que la formulación mantenga una viscosidad suficientemente baja con un elevado contenido de sólidos. Se elige un sistema de disolventes que tenga un poder de solvatación adecuado para mantener el fármaco en solución a concentraciones altas. El uso de un sistema cosolvente (normalmente acetato de etilo:alcohol bencílico 79:21) permite una solución continua de hasta el 50 % de sólidos con una mezcla polímero:docetaxel 80:20.

10 Se forma una fase orgánica compuesta por una mezcla de docetaxel (DTXL) y polímero (homopolímero, copolímero y copolímero con ligando). La fase orgánica se mezcla con una fase acuosa a una relación de aproximadamente 1:5 (fase oleosa:fase acuosa) en la que la fase acuosa está compuesta por un tensioactivo y algo de disolvente disuelto. Para conseguir una carga de fármaco elevada, se usa aproximadamente el 30 % de sólidos en la fase orgánica.

15 Se forma una fase orgánica compuesta por una mezcla de docetaxel (DTXL) y polímero (homopolímero, copolímero y copolímero con ligando). Las composiciones y disolventes orgánicos se enumeran en la tabla. La fase orgánica se mezcla con una fase acuosa a una relación de aproximadamente 1:5 (fase oleosa:fase acuosa) en la que la fase acuosa está compuesta por un tensioactivo y algo de disolvente disuelto. La emulsión primaria se forma combinando las dos fases por mezcla simple o mediante el uso de un homogeneizador de rotor y estator. La emulsión primaria se convierte después en una emulsión fina mediante el uso de un homogeneizador de alta presión. Después la emulsión fina se enfría añadiendo agua desionizada a una temperatura dada (enumerada en la tabla) mientras se mezcla. La relación medio de enfriamiento:emulsión es de aproximadamente 8,5:1. Después se añade una solución del 25 % (% en peso) de Tween 80 al medio de enfriamiento para obtener aproximadamente el 2 % de Tween 80 total. Esto sirve para disolver el fármaco libre, no encapsulado y hace factible el procedimiento de aislamiento de la nanopartícula. Después las nanopartículas se aíslan por centrifugación o ultrafiltración/diafiltración.

Control

25 A continuación se proporciona un conjunto convencional de condiciones de nanoemulsión. Se forman partículas que no contienen ligando (nanopartículas no dirigidas).

Atributo	Valor
N.º de Lote	15-157D
Homopolímero (tipo/cantidad)	6,5 kDa PLA
Copolímero (tipo/cantidad)	16/5 PLA-PEG, 40 %
Fármaco (cantidad de DTXL)	20 %
Disolvente orgánico (tipo/cantidad)	Acetato de etilo (EA), 79 %
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Alcohol bencílico (BA), 21 %
Fase acuosa	0,5 % de colato de sodio, 2 % de BA, 4 % de EA en agua
[sólidos] en fase oleosa	5 % en peso
RESULTADOS	
Atributo	Valor
Tamaño de partícula	114,7 nm
Carga de fármaco	3,97 %

10 % de sólidos

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
N.º de Lote	15-157D	15-157C
Homopolímero (tipo/cantidad)	6,5 kDa PLA	6,5 kDa PLA

ES 2 462 090 T5

(continuación)

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Copolímero (tipo/cantidad)	16/5 PLA-PEG, 40 %	16/5 PLA-PEG, 40 %
Fármaco (cantidad de DTXL)	20 %	20 %
Disolvente orgánico (tipo/cantidad)	Acetato de etilo (EA), 79 %	Acetato de etilo (EA), 79 %
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Alcohol bencílico (BA), 21 %	Alcohol bencílico (BA), 21 %
Fase acuosa	0,5 % de colato de sodio, 2 % de BA, 4 % de EA en agua	0,5 % de colato de sodio, 2 % de BA, 4 % de EA en agua
[sólidos] en fase oleosa	5 % en peso	10 % en peso
RESULTADOS		
Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Tamaño de partícula	114,7 nm	11,5,1 nm
Carga de fármaco	3,97 %	13,36 %

20 % de sólidos

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
N.º de Lote	15-157D	15-157A
Homopolímero (tipo/cantidad)	6,5 kDa PLA	6,5 kDa PLA
Copolímero (tipo/cantidad)	16/5 PLA-PEG, 40 %	16/5 PLA-PEG, 40 %
Fármaco (cantidad de DTXL)	20 %	20 %
Disolvente orgánico (tipo/cantidad)	Acetato de etilo (EA), 79 %	Acetato de etilo (EA), 79 %
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Alcohol bencílico (BA), 21 %	Alcohol bencílico (BA), 21 %
Fase acuosa	0,5 % de colato de sodio, 2 % de BA, 4 % de EA en agua	0,5 % de colato de sodio, 2 % de BA, 4 % de EA en agua
[sólidos] en fase oleosa	5 % en peso	20 % en peso
RESULTADOS		
Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Tamaño de partícula	114,7 nm	130,3 nm
Carga de fármaco	3,97 %	16,15 %

40 % de sólidos

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
N.º de Lote	15-157D	15-171A

(continuación)

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Homopolímero (tipo/cantidad)	6,5 kDa PLA	6,5 kDa PLA
Copolímero (tipo/cantidad)	16/5 PLA-PEG, 40 %	16/5 PLA-PEG, 40 %
Fármaco (cantidad de DTXL)	20 %	20 %
Disolvente orgánico (tipo/cantidad)	Acetato de etilo (EA), 79 %	Acetato de etilo (EA), 79 %
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Alcohol bencílico (BA), 21 %	Alcohol bencílico (BA), 21 %
Fase acuosa	0,5 % de colato de sodio, 2 % de BA, 4 % de EA en agua	0,5 % de colato de sodio, 2 % de BA, 4 % de EA en agua
[sólidos] en fase oleosa	5 % en peso	40 % en peso
RESULTADOS		
Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Tamaño de partícula	114,7 nm	130 nm
Carga de fármaco	3,97 %	14,07 %

30 % de sólidos con mayor concentración de tensioactivo para la reducción del tamaño de partícula; lote de nanopartícula dirigida.

Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
N.º de Lote	15-157D	35-03A
Homopolímero (tipo/cantidad)	6,5 kDa PLA	8,2 kDa PLA
Copolímero (tipo/cantidad)	16/5 PLA-PEG, 40 %	16/5 PLA-PEG, 40 %, con 1 % en peso como GL2-PEG-PLA
Fármaco (cantidad de DTXL)	20 %	20 %
Disolvente orgánico (tipo/cantidad)	Acetato de etilo (EA), 79 %	Acetato de etilo (EA), 79 %
Cosolvente orgánico (tipo/cantidad)	Alcohol bencílico (BA), 21 %	Alcohol bencílico (BA), 21 %
Fase acuosa	0,5 % de colato de sodio, 2 % de BA, 4 % de EA en agua	1 % de colato de sodio, 2 % de BA, 4 % de EA en agua
[sólidos] en fase oleosa	5 % en peso	30 % en peso
RESULTADOS		
Atributo	Valor de control	Valor de ejemplo
Tamaño de partícula	114,7 nm	114,1 nm
Carga de fármaco	3,97 %	11,85 %

Ejemplo 8: Preparación de nanopartículas - Procedimiento de emulsión 2

Se forma una fase orgánica compuesta por una mezcla de docetaxel (DTXL) y polímero (homopolímero, copolímero y copolímero con ligando). La fase orgánica se mezcla con una fase acuosa a una relación de aproximadamente 1:5 (fase oleosa:fase acuosa) en la que la fase acuosa está compuesta por un tensioactivo y algo de disolvente disuelto. Para lograr una carga de fármaco elevada, se usa aproximadamente el 30 % de sólidos en la fase orgánica.

La emulsión gruesa primaria se forma combinando las dos fases por mezcla simple o mediante el uso de un homogeneizador de rotor y estator. El rotor/estator produjo una solución lechosa homogénea, mientras que la barra de agitación produjo una emulsión gruesa visiblemente más grande. Se observó que el procedimiento de la barra de agitación dio como resultado gotitas de fase oleosa significativas que se adhirieron al lateral del vaso de alimentación, lo que sugiere que si bien el tamaño de la emulsión gruesa no es un parámetro crítico del procedimiento para la calidad, se debe hacer suficientemente fina para evitar pérdidas de rendimiento o separación de fase. Por tanto, el rotor y estator se usan como el procedimiento convencional de formación de la emulsión gruesa, aunque puede ser adecuado un mezclador de alta velocidad a una escala mayor.

La emulsión primaria se convierte después en una emulsión fina mediante el uso de un homogeneizador de alta presión. El tamaño de la emulsión gruesa no afecta significativamente al tamaño de partícula después de los pases sucesivos (103) a través del homogeneizador. M-110-EH (Figura 5).

Se encontró que la presión de alimentación del homogeneizador tenía un impacto significativo sobre el tamaño de partícula resultante. En los homogeneizadores tanto neumáticos como eléctricos M-110EH, se encontró que reducir la presión de alimentación también reducía el tamaño de partícula (Figura 6). Por tanto, la presión operativa convencional utilizada para el M-110EH es 4000-5000 psi (27,57-34,46 MPa) por cámara de interacción, que es la presión de procesamiento mínima de la unidad. El M-110EH también tiene la opción de una o dos cámaras de interacción. Viene por defecto con una cámara Y restrictiva, en serie con una cámara Z menos restrictiva de 200 µm. Se encontró que el tamaño de partícula se redujo realmente cuando se retiró la cámara Y y se la reemplazó por una cámara de blanco. Además, retirar la cámara Y aumentó significativamente la velocidad de flujo de emulsión durante el procesamiento.

Después de 2-3 pases el tamaño de partícula no se redujo significativamente y los pases sucesivos incluso pueden provocar un aumento del tamaño de partícula. Los resultados se resumen en la figura 7, en la que la fase orgánica placebo consistía en un 25,5 % de polímero combinado de 50:50 PLA/PEG:8,2 PLA. La fase orgánica se emulsionó 5:1 O:W con fase acuosa convencional y se realizaron múltiples pases discretos, enfriando una pequeña porción de la emulsión después de cada pase. La escala indicada representa los sólidos totales de la formulación.

El efecto de la escala sobre el tamaño de partícula mostró una sorprendente dependencia de la escala. La tendencia muestra que en el intervalo de tamaño del lote de 2-10 g, los lotes más grandes producen partículas más pequeñas. Se demostró que esta dependencia de la escala se elimina al considerar lotes a escala superior a 10 g. La cantidad de sólidos utilizados en la fase oleosa fue de aproximadamente el 30 %. Las figuras 8 y 9 representan los efectos de la concentración de sólidos sobre el tamaño de partícula y la carga de fármaco; con la excepción de las series 15-175, todos los lotes son placebo. Para los lotes de placebo el valor de % de sólidos representa el % de sólidos cuando el fármaco está presente en el 20 % p/p convencional.

La tabla A resume los parámetros del procedimiento de emulsión.

TABLA A

Parámetro	Valor	Observación
Formación de la emulsión gruesa	Homogeneizador de rotor y estator	El tamaño de la emulsión gruesa no afecta el tamaño final de partícula, pero la emulsión gruesa grande puede provocar una mayor retención de la fase oleosa en el recipiente de alimentación
Presión de alimentación del homogeneizador	4000-5000 psi por cámara	Menores presiones reducen el tamaño de partícula
Cámara(s) de interacción	Cámara Z 2 x 200 µm	La cámara Z de 200 µm produce el menor tamaño de partícula y permite el rendimiento más alto del homogeneizador
Número de pases por el homogeneizador	2-3 pases	Los estudios demostraron que el tamaño de partícula no se reduce significativamente después de 2 pases discretos y el tamaño puede incluso aumentar con los pases sucesivos

(continuación)

Parámetro	Valor	Observación
Fase acuosa [colato de sodio]	0,1 %	[colato de sodio] puede alterar eficazmente el tamaño de partícula; el valor se optimiza para un procedimiento y una formulación determinados
Relación W:O	5:1	La relación más baja sin un aumento significativo del tamaño de partícula es ~5:1
[Sólidos] en fase oleosa	30 %	Mayor eficiencia del procedimiento, mayor encapsulación del fármaco, viscosidad que se puede trabajar

Después la emulsión fina se enfría añadiendo agua desionizada a una temperatura dada mientras se mezcla. En la operación de la unidad de enfriamiento, la emulsión se añade a un medio de enfriamiento acuoso frío en agitación. Esto sirve para extraer una porción significativa de los disolventes de la fase oleosa, endureciendo eficazmente las nanopartículas para la filtración posterior. Enfriar el medio de enfriamiento mejoró significativamente la encapsulación del fármaco. La relación medio de enfriamiento:emulsión es de aproximadamente 5:1.

Se añade una solución del 35 % (% en peso) de Tween 80 al medio de enfriamiento para lograr aproximadamente el 2 % de Tween 80 total. Una vez que se enfría la emulsión se añade una solución de Tween 80 que actúa como solubilizante del fármaco, permitiendo la eliminación eficaz del fármaco no encapsulado durante la filtración. La tabla B indica cada uno de los parámetros del procedimiento de enfriamiento.

Tabla B Resumen de los parámetros del procedimiento de enfriamiento

Parámetro	Valor	Observación
Temperatura inicial del enfriamiento	< 5 °C	La baja temperatura produce mayor encapsulación del fármaco
Solución de [Tween 80]	35 %	Mayor concentración que se puede preparar y dispersar fácilmente en el medio de enfriamiento
Relación Tween 80:fármaco	25:1	Cantidad mínima de Tween 80 necesaria para eliminar eficazmente el fármaco no encapsulado
Relación Q:E	5:1	Mínima relación Q:E que mantiene una elevada encapsulación del fármaco
Mantenimiento del enfriamiento/temperatura de procesamiento	≤ 5 °C (con relación Q:E 5:1, relación Tween-80:fármaco 25:1)	Temperatura que evita una filtración significativa del fármaco durante el tiempo de retención del enfriamiento y el paso de concentración inicial

La temperatura debe mantenerse lo suficientemente fría con una suspensión suficientemente diluida (concentración suficientemente baja de disolventes) para mantenerse debajo de T_g de las partículas. Si la relación Q:E no es suficientemente alta, entonces la mayor concentración de disolvente plastifica las partículas y permite la filtración del fármaco. A la inversa, temperaturas menores permiten una elevada encapsulación del fármaco a bajas relaciones Q:E (~3:1), haciendo posible que el procedimiento tenga lugar más eficientemente.

Después las nanopartículas se aíslan a través de un procedimiento de filtración de flujo tangencial para concentrar la suspensión de nanopartículas y el intercambio de los disolventes, el fármaco libre y el solubilizante de fármacos de la solución de enfriamiento en agua. Se usa una membrana de celulosa regenerada con un peso molecular de corte (MWCO, del inglés *molecular weight cutoff*) de 300.

Se realiza una diafiltración (DF) de volumen constante para retirar los disolventes del medio de enfriamiento, el fármaco libre y el Tween-80. Para realizar una DF de volumen constante, se añade tampón al recipiente del retenido a la misma velocidad que se retira el filtrado. Los parámetros del procedimiento para las operaciones TFF se resumen en la tabla C. La velocidad de flujo cruzado se refiere a la velocidad de flujo de la solución a través de los canales de alimentación y a través de la membrana. Este flujo proporciona la fuerza para barrer las moléculas que pueden ensuciar la membrana y restringir el flujo de filtrado. La presión transmembrana es la fuerza que conduce las moléculas permeables a través de la membrana.

Tabla C: parámetros de TFF

Parámetro	Valor optimizado	Efecto
Material de membrana	Celulosa regenerada - Membrana de malla gruesa	No hay diferencia en el comportamiento entre RC y PES, pero la compatibilidad del disolvente es superior para RC.
Peso molecular de corte	300 kDa	No hay diferencia en las características NP (es decir Tween residual) se observa un aumento en la velocidad de flujo con membrana de.500 kDa pero no se dispone de.500 kDa para RC
Velocidad de flujo cruzado	11 l/min/m ²	Mayor velocidad de flujo cruzado condujo a mayor flujo
Presión transmembrana	20 psid (0,14 MPa)	Las membranas de canal abierto tienen velocidades de flujo máximas entre 10 psid (0,07 MPa) y 30 psid (0,21 MPa). Las membranas de canal grueso tienen velocidades de flujo con TMP min (~20 psid (0,14 MPa)).
Concentración de la suspensión de nanopartículas por diafiltración	30 mg/ml	La diafiltración es más eficiente a [NP] ~50 mg/ml con membranas TFF de canal abierto basándose en velocidades de flujo y rendimiento. Con membranas de canal grueso la velocidad de flujo se optimiza a ~30 mg/ml en el tampón de partida.
Número de diavolumenes	>15 (basándose en el aumento del flujo)	Se necesitan aproximadamente 15 diavolumenes para eliminar eficazmente el Tween 80. El punto final de la diafiltración se determina mediante control en procedimiento (meseta del aumento de flujo).
Área de la membrana	~1 m ² /kg	Las membranas se dimensionaron basándose en las velocidades de flujo anticipadas y los volúmenes requeridos.

5 La suspensión de nanopartículas filtrada se cicla térmicamente a una temperatura elevada durante el tratamiento. Una porción pequeña (normalmente el 5-10 %) del fármaco encapsulado se libera desde las nanopartículas muy rápidamente después de su exposición a 25 °C. Debido a este fenómeno, los lotes que se mantienen fríos durante todo el tratamiento son susceptibles de liberar fármaco o cristales de fármaco que se forman durante la administración o cualquier porción del almacenamiento no congelado. Exponiendo la suspensión de nanopartículas a temperatura elevada durante el tratamiento, se puede eliminar este fármaco "encapsulado libremente" y mejorar la estabilidad del producto a expensas de una gota más pequeña al cargar el fármaco. La tabla D resume dos ejemplos de procesamiento a 25 °C. Otros experimentos demostraron que el producto es suficientemente estable después de ~2-4 diavolumenes para exponerlo a 25 °C sin perder la mayor parte del fármaco encapsulado. Se usan 5 diavolumenes como la cantidad para el procesamiento en frío antes del tratamiento a 25 °C.

Tabla D:

		Lotes A	Lotes B
Carga de fármaco	Tratamiento en frío	11,3 %	9,7 %
	Tratamiento a 25 °C ¹	8,7-9,1 %	9,0-9,9 %
Estabilidad ²	Tratamiento final en frío	<1 día	<1 día
	Tratamiento a 25 °C ¹	5-7 días	2-7 días
Estallido <i>in vitro</i> ³	Tratamiento en frío	~10 %	No se realizó
	Tratamiento a 25 °C ¹	~2 %	

¹Los sublotos del tratamiento a 25 °C se expusieron a 25 °C después de al menos 5 diavolumenes durante diversos periodos de tiempo. Se informan los intervalos porque hubo múltiples sublotos con exposición a 25 °C.

²Los datos de estabilidad representan el tiempo que el producto final pudo ser mantenido a 25 °C a concentraciones de nanopartículas de 10-50 mg/ml antes de la formación de cristales en la suspensión (visible por microscopía)

³El estallido *in vitro* representa el fármaco liberado en el primer tiempo (casi inmediatamente)

Después del procedimiento de filtración la suspensión de nanopartículas se hace pasar a través de un filtro de grado esterilizante (0,2 µm absoluto). Se usan prefiltros para proteger el filtro de grado esterilizante para usar una relación área de filtración/tiempo razonable para el procedimiento. Los valores se resumen en la tabla E.

Tabla E:

Parámetro	Valor O	Efecto
Concentración de la suspensión de nanopartículas	50 mg/ml	A mayor [NP], las pérdidas de rendimiento son mayores pero la capacidad de filtrar a 50 mg/ml obvia la necesidad de concentrar asépticamente después de la filtración
Velocidad de flujo de filtración	~1,3 l/min/m ²	La capacidad de filtración disminuye a medida que aumenta la velocidad de flujo

- 5 El tren de filtración es Ertel Alsop Micromedia XL filtro de profundidad M953P membrana (0,2 µm Nominal); Pall SUPRAcap con Seitz EKSP medio de filtración en profundidad (0,1 - 0,3 µm Nominal); Pall Life Sciences Supor EKV 0,65/ 0,2 micrómetros filtro PES de grado esterilizante.

Se pueden usar 0,2 m² de superficie de filtración por kg de nanopartículas para los filtros de profundidad y 1,3 m² de superficie de filtración por kg de nanopartículas para los filtros de grado esterilizante.

10 **Ejemplo 9**

Se pueden preparar nanopartículas específicas para la diana que incluyan un conjugado de polímero biocompatible con, por ejemplo, PEG, los quimioterápicos descritos en el presente documento y opcionalmente conjugado con GL1 o GL2. Las nanopartículas de ejemplo se muestran en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1 Nanopartículas que tienen un agente terapéutico enumerado y un conjugado polimérico que comprende: polímero biocompatible-polímero-(resto de direccionamiento)			
Agente terapéutico	Polímero biocompatible	Polímero	Resto de direccionamiento (opcional)
vincristina	PLGA	PEG	GL1
vincristina	PLA	PEG	GL1
vincristina	PGA	PEG	GL1
vincristina	PLGA	PEG	GL2
vincristina	PLA	PEG	GL2
vincristina	PGA	PEG	GL2
vincristina	PLGA	PEG-DSPE	GL1
vincristina	PLA	PEG-DSPE	GL1
vincristina	PGA	PEG-DSPE	GL1
vincristina	PLGA	PEG-DSPE	GL2
vincristina	PLA	PEG-DSPE	GL2
vincristina	PGA	PEG-DSPE	GL2
docetaxel	PLGA	PEG	GL1
docetaxel	PLA	PEG	GL1
docetaxel	PGA	PEG	GL1
docetaxel	PLGA	PEG	GL2
docetaxel	PLA	PEG	GL2

(continuación)

Tabla 1			
Nanopartículas que tienen un agente terapéutico enumerado y un conjugado polimérico que comprende: polímero biocompatible-polímero-(resto de direccionamiento)			
Agente terapéutico	Polímero biocompatible	Polímero	Resto de direccionamiento (opcional)
Docetaxel	PGA	PEG	GL2
Docetaxel	PLGA	PEG-DSPE	GL1
docetaxel	PLA	PEG-DSPE	GL1
docetaxel	PGA	PEG-DSPE	GL1
docetaxel	PLGA	PEG-DSPE	GL2
docetaxel	PLA	PEG-DSPE	GL2
docetaxel	PGA	PEG-DSPE	GL2
sirolimus	PLGA	PEG	GL1
sirolimus	PLA	PEG	GL1
sirolimus	PGA	PEG	GL1
sirolimus	PLGA	PEG	GL2
sirolimus	PLA	PEG	GL2
sirolimus	PGA	PEG	GL2
sirolimus	PLGA	PEG-DSPE	GL1
sirolimus	PLA	PEG-DSPE	GL1
sirolimus	PGA	PEG-DSPE	GL1
sirolimus	PLGA	PEG-DSPE	GL2
sirolimus	PLA	PEG-DSPE	GL2
sirolimus	PGA	PEG-DSPE	GL2
gemcitabina	PLGA	PEG	GL1
gemcitabina	PLA	PEG	GL1
gemcitabina	PGA	PEG	GL1
gemcitabina	PLGA	PEG	GL2
gemcitabina	PLA	PEG	GL2
gemcitabina	PGA	PEG	GL2
gemcitabina	PLGA	PEG-DSPE	GL1
gemcitabina	PLA	PEG-DSPE	GL1
gemcitabina	PGA	PEG-DSPE	GL1
gemcitabina	PLGA	PEG-DSPE	GL2
gemcitabina	PLA	PEG-DSPE	GL2
gemcitabina	PGA	PEG-DSPE	GL2

(continuación)

Tabla 1			
Nanopartículas que tienen un agente terapéutico enumerado y un conjugado polimérico que comprende: polímero biocompatible-polímero-(resto de direccionamiento)			
Agente terapéutico	Polímero biocompatible	Polímero	Resto de direccionamiento (opcional)
5-fluorouracilo	PLGA	PEG	GL1
5-fluorouracilo	PLA	PEG	GL1
5-fluorouracilo	PGA	PEG	GL1
5-fluorouracilo	PLGA	PEG	GL2
5-fluorouracilo	PLA	PEG	GL2
5-fluorouracilo	PGA	PEG	GL2
5-fluorouracilo	PLGA	PEG-DSPE	GL1
5-fluorouracilo	PLA	PEG-DSPE	GL1
5-fluorouracilo	PGA	PEG-DSPE	GL1
5-fluorouracilo	PLGA	PEG-DSPE	GL2
5-fluorouracilo	PLA	PEG-DSPE	GL2
5-fluorouracilo	PGA	PEG-DSPE	GL2
paclitaxel	PLGA	PEG	GL1
paclitaxel	PLA	PEG	GL1
paclitaxel	PGA	PEG	GL1
paclitaxel	PLGA	PEG	GL2
paclitaxel	PLA	PEG	GL2
paclitaxel	PGA	PEG	GL2
paclitaxel	PLGA	PEG-DSPE	GL1
paclitaxel	PLA	PEG-DSPE	GL1
paclitaxel	PGA	PEG-DSPE	GL1
paclitaxel	PLGA	PEG-DSPE	GL2
paclitaxel	PLA	PEG-DSPE	GL2
paclitaxel	PGA	PEG-DSPE	GL2
daunorrubicina	PLGA	PEG	GL1
daunorrubicina	PLA	PEG	GL1
daunorrubicina	PGA	PEG	GL1
daunorrubicina	PLGA	PEG	GL2
daunorrubicina	PLA	PEG	GL2
daunorrubicina	PGA	PEG	GL2
daunorrubicina	PLGA	PEG-DSPE	GL1

(continuación)

Agente terapéutico	Polímero biocompatible	Polímero	Resto de direccionamiento (opcional)
Daunorrubicina	PLA	PEG-DSPE	GL1
daunorrubicina	PGA	PEG-DSPE	GL1
daunorrubicina	PLGA	PEG-DSPE	GL2
daunorrubicina	PLA	PEG-DSPE	GL2
daunorrubicina	PGA	PEG-DSPE	GL2

Ejemplo 10

Las nanopartículas que se muestran en la tabla 2 se preparan utilizando el procedimiento del ejemplo 8. Las nanopartículas que comprenden macromoléculas de PLGA-PEG y macromoléculas de PLGA-PEG-ligando de molécula pequeña (SML, del inglés *small molecule ligand*) se prepararon como se muestra en los estudios 1 y 2, a continuación. En los estudios 3 y 4, se prepararon nanopartículas que comprendían macromoléculas de PLA-PEG, macromoléculas de PLGA-PEG-SML y macromoléculas de PLA (DB = copolímero en dibloque).

La relación entre macromoléculas funcionalizadas con restos de direccionamiento de molécula pequeña y macromoléculas no funcionalizadas se puede ajustar y usando el estudio 1, se pueden preparar nanopartículas con composiciones poliméricas que son aproximadamente el 0,94 % en moles, el 4,63 % en moles y el 9,01 % en moles de macromoléculas funcionalizadas (véase "% en moles de DB-GL2 del Polím. total"). Además, usando esos procedimientos, se pueden preparar nanopartículas que comprenden aproximadamente el 0,015, el 0,073 y el 0,143 % en peso de ligando de molécula con respecto al polímero total (véase "% en peso de GL2 polim. wrt").

También se pueden preparar nanopartículas con polímeros funcionalizados que constituyen aproximadamente el 0,1 - 30, por ejemplo, el 0,1 - 20, por ejemplo, el 0,1 - 10 por ciento en moles de toda la composición polimérica de la nanopartícula, así como nanopartículas que tienen un porcentaje en peso de ligando de bajo peso molecular respecto al polímero total entre 0,001 y 5, por ejemplo, entre 0,001 y 2, por ejemplo, entre 0,001 y 1.

	% en peso de sólidos	% en peso de polímero	% en peso de DB-GL2 en PLA-PEG	% en moles de DB-GL2 del Polím. total
Estudio 1	0,362	0,381052632	NA	0,947217483
	1,81	1,905263158	NA	4,630814102
	3,62	3,810526316	NA	9,011251618
Estudio 2	0,181	0,190526316	NA	0,474958408
	0,362	0,381052632	NA	0,947217483
	0,543	0,571578947	NA	1,416800171
	1,81	1,905263158	NA	4,630814102
Estudio 3	0,362	0,4525	NA	0,178974269
	1,81	2,2625	NA	0,891043972

Tabla 2				
	% en peso de sólidos	% en peso de polímero	% en peso de DB-GL2 en PLA-PEG	% en moles de DB-GL2 de Polím. total
Estudio 4	0,080241	0,100300903	0,200601805	0,079390136
Calc. para 45K-5K PLA-PEG	0,161616	0,202020202	0,404040404	0,159825753
	0,842105	1,052631579	2,105263158	0,829427309
	1,702128	2,127659574	4,255319149	1,668024361
Estudio 4 Calc. para 16K-5K PLA-PEG	0,190522	0,238151941	0,476303882	0,16998719
	0,381134	0,476417342	0,952834683	0,340027827
	1,909308	2,386634845	4,77326969	1,702280075
	3,827751	4,784688995	9,56937799	3,409927685
SIN PLA	0,323232	0,404040404	0,404040404	0,159825753

Tabla 2 (continuación)			
	% en moles de GL2	% en peso de GL2 polim. wrt	Contenido de GL2 ppm
Estudio 1	0,947217483	0,015108	151,0812
	4,630834102	0,07386]	738,6148
	9,01125J618	0,143729	1437,295
Estudio 2	0,474958408	0,007576	75,75587
	0,947217483	0,015108	J51,08J2
	1,416800173	0,022598	225,9796
	4,630814102	0,073861	738,6148
Estudio 3	0,178974269	0,002855	28,5464
	0,891043972	0,014212	142,1215
Estudio 4 Calc. para 45K-SK PIA-PEG	0 079390136	0,001266	12,66273
	0,159825753	0,002549	25,4922]
	0,829427309	0,013229	132,2937

(continuación)

	% en moles de GL2	% en peso de GL2 polim. wrt	Contenido de GL2 ppm
	1,668024361	0,026605	266 0499
Estudio 4 <i>Calc. para 16K-5K PIA-PEG</i>	0,1699879	0002711	27,11296
	0,340027827	0-005423	54,23444
	1,702280075	0,027151	271,5137
	3,409927685	0-054388	543,8835
SIN PLA	0,159825753	0,002549	25,49221

Ejemplo 11

Se forman diversas formulaciones de nanopartículas usando el procedimiento del ejemplo 8 como se describe y compara en la tabla F:

5

Tabla F:

Formulación	Tipo de polímero	% de sólidos	Carga y tamaño de partícula
Relación polímero-PEG:PLA (80:0; 60:20;40:40 (al inicio), 20:60)	Relación 16-5 PLA-PEG:PLA	5 %	
	Relación 45-5 PLGA-PEG:PLA	5 %	
Peso molecular de PLA = 1,9, 4, 6,5 (al inicio), 8,5 kDa	16-5 PLA-PEG:PLA (40:40)	5 %	1,9 y 4 kDa tuvieron menor carga = 2,5 %
15-5 Vs 16-5 PLA-PEG: PLA (40:40)	15-5 PLA-PEG:PLA (40:40)	5 %	Tanto 15-5 PLA-PEG como 16-5 PLA-PEG son iguales en carga y tamaño de partícula
% de sólidos totales 5 % Vs. 15 %	16-5 PLA-PEG:PLA (40:40)	5 % o 15 %	Cuando se usa 15 % de sólidos; 3X mayor eficiencia de encapsulación
16-5 PLGA-PEG Vs. PLA-PEG (al inicio) con PLA (40:40)	16-5 PLGA-PEG:PLA (40:40)	15 %	Tanto 16-5 PLGA-PEG como 16-5 PLA-PEG son equivalentes en porcentaje de carga y tamaño de partícula
Polímero alternativo: PLGA-PEG	28-5 PLGA-PEG:PLA (40:40)	15 %	28-5 PLGA-PEG = mayor tamaño de partícula en comparación con los otros
	45-5 PLGA-PEG:PLA (40:40)	15 %	45-5 PLGA-PEG = mayor tamaño de partícula
Relación entre alcohol bencílico y acetato de etilo: 11:89, 21:79 (al inicio), 32:68 BA:EA	16-5 PLA-PEG:PLA (40:40)	15 %	Relación = 21:79 (10,8 % de carga); 32:68 y 11:89 resultó en 9,4 y 8,8 % de carga, respectivamente.
Disolvente comparado a alcohol bencílico: heptanol o hexanol	16-5 PLA-PEG:PLA (40:40)	15 %	Disolvente = alcohol bencílico (10,8 % de carga); heptanol y hexanol ambos resultaron en ~2 % de carga
Carga buscada 10, 20 (al inicio), 30 %	16-5 PLA-PEG:PLA (40:40)	15 %	La carga aumentó con la carga buscada: % de carga = 5,8 %, 9 %, 13,3 %, respectivamente

Se puede lograr un tamaño de partícula óptimo sin usar homopolímero PLA y sin sacrificar significativamente la carga de fármaco, como se muestra en la figura 10. Los lotes con homopolímero PLA liberan el fármaco significativamente más rápido que los lotes fabricados usando copolímero solo (Figura 11). Los diversos tipos de polímero y pesos moleculares no añadieron valor adicional en la optimización de la carga de fármaco y el tamaño de partícula. Al contrario, al 15 % de sólidos totales con "polímero alternativo" los tamaños de partícula fueron normalmente más grandes que un tamaño buscado de 100-120 nm. La incorporación de alcohol cetílico al 5 % en peso aumentó en general la velocidad de liberación in vitro (Figura 12).

10

Ejemplo 12 Crioprotector

La congelación de una suspensión de una nanoemulsión de nanopartículas en agua desionizada sola da como resultado la agregación de partículas. Se cree que esto se debe a la cristalización y enredo de las cadenas de PEG en la superficie de las nanopartículas (Jaeghere y col.; *Pharmaceutical Research* 16(6), págs. 859-852). Los excipientes a base de azúcar (sacarosa, trehalosa o manitol) pueden actuar como crioprotectores de las nanopartículas en condiciones de congelación/descongelación, a una concentración tan baja como del 1 % en peso para suspensiones de nanopartículas diluidas (~10 mg/ml). Una formulación incluye sacarosa al 10 % en peso, que contiene sacarosa en exceso a la necesaria y es la misma osmolalidad que la solución salina fisiológica

La tabla G muestra que el copolímero 16/5 PLA-PEG es menos susceptible a la agregación por congelación-descongelación.

Tabla G

Descripción	Mediana original de PSD/PD	Mediana de PS post cong./descong (nm)	Poli-dispersidad post C/D	Índice basal post C/D
1:1 45/5 y PLA (al inicio)	143,4, 0,124	358,9	0,358	0,0/23,16 %
16/5 PLA-PEG y PLA (1:1)	186,7, 0,080	189,5	0,126	9,7/91,57 %
2:1:1 16/5:PLA:cetilo	174,1, 0,084	232,7	0,146	0,0/61,19 %
2:1:1 45/5:PLA:cetilo	111,0, 0,182	0	0	0,0/1,55 %
16/5 PLA-PEG solo	218,8, 0,098	226,9	0,03	7,3/60,56 %
16/5 PLA-PEG y PLA (3:1)	222,2, 0,126	230,7	0,065	4,1/35,36 %
45/5 PLGA-PEG y PLA (3:1)	162,7, 0,099	178,6	0,091	7,7/95,41 %
2:1:1 45/5 PLA-PEG:PLA:cetilo	115,9, 0,154	734,6	0,392	0,0/13,27 %

Ejemplo 13 Retirada del paladio

Basándose en un nivel de dosis (pg/día) en ensayos clínicos humanos, un nivel máximo aceptable de paladio en una composición PLA-PEG-GL2 es aproximadamente 10 ppm. Se cargaron soluciones de polímero (PLA-PEG-GL2) (20 o 35 mg/ml) en diclorometano (DCM) en columnas de 5 g de resina (presolvatadas con 10 ml de DCM) y posteriormente se eluyeron usando 30 ml de DCM por gravedad. El polímero se recuperó mediante retirada del disolvente usando evaporación rotatoria seguida de secado al vacío a temperatura ambiente. La recuperación del polímero se determinó gravimétricamente y el contenido de paladio residual se determinó por espectroscopía con plasma acoplado inductivamente (ICP, del inglés *Inductively Coupled Plasma*) en Galbraith Laboratories Inc.

Tabla H

Resina utilizada	Solución de PLA-PEG-GL2 y rendimiento				Contenido de paladio (ppm)		
	Disolvente	mg/ml	mg/5 g de resina	% en peso de recuperación	Prueba 1	Prueba 2	Promedio
Guanidina	DCM	20	220	23	337	347	342
Tiol	DCM	20	220	62	39	30	34,5
TMT	DCM	20	220	92	11	7	9
Urea	DCM	20	220	60	4470	NA	4470
Tiourea	DCM	20	220	45	40	36	38
Control	DCM	20	NA	NA	4060	3980	4020
TMT	DCM	35	335	91	9	7	8
Urea	DCM	35	335	60	5360	4920	5140

(continuación)

Resina utilizada	Solución de PLA-PEG-GL2 y rendimiento				Contenido de paladio (ppm)		
	Disolvente	mg/ml	mg/5 g de resina	% en peso de recuperación	Prueba 1	Prueba 2	Promedio
Control	DCM	NA	NA	NA	4240	4300	4270
TMT	DCM	35	1050	92	3,8	2,7	3,25
Control	DCM	NA	NA	NA	3780	3880	3830

Como se ve en la tabla H, las funcionalidades tiol, TMT, urea y tiourea llevaron los niveles de paladio por debajo de 50 ppm, a la carga de polímero por unidad de peso de resina evaluada. Sin embargo, solo la resina de TMT (trimecaptotriazina) produjo una buena recuperación del polímero (>90 %). Además, la resina de TMT también produjo contenidos de paladio por debajo del umbral de aceptación de 10 ppm. Pareció haber alguna variabilidad de los resultados dependiendo de las condiciones experimentales utilizadas. En particular, la retirada del paladio fue más eficaz cuando la columna de 5 g de resina de TMT se cargó con 1050 mg de polímero. Esto puede deberse al mayor tiempo de residencia de la especie polimérica y el catalizador de paladio en esas condiciones experimentales.

Ejemplo 14 Formulación

Una formulación que incluya nanopartículas de PLA-PEG-ligando, PLA, PLA-PEG y docetaxel, en una composición de sacarosa/agua está formada por:

Componente	Concentración nominal (mg/ml)
<i>Docetaxel</i>	5
<i>PLA-PEG-Ligando</i>	1,1
<i>PLA-PEG</i>	21,4
<i>PLA</i>	22,5
<i>Sacarosa</i>	100
<i>Agua</i>	c.s.

Ejemplo 15 - Liberación *in vitro*

Se usa un procedimiento de liberación *in vitro* para determinar la fase de aceleración inicial de la liberación desde esas nanopartículas, tanto a temperatura ambiente como a 37 °C. Para mantener las condiciones de libre saturación y evitar que las nanopartículas ingresen en las muestras de liberación, se diseñó un sistema de diálisis. Después de obtener una ultracentrífuga capaz de sedimentar partículas de 100 nm, se retiraron las membranas de diálisis y se usó centrifugación para separar el fármaco liberado del fármaco encapsulado.

El sistema de diálisis es como se indica a continuación: se colocan por pipeteo 3 ml de suspensión de nanopartículas de docetaxel (aprox 250 µg/ml de nanopartículas de fármaco/PLGA/PLA, correspondientes a una concentración de sólido de 2,5 mg/ml) en agua DI, en un tubo interior de un dializador de un MWCO de 300 kDa. La nanopartícula se suspende en este medio. El dializador se coloca en frascos de vidrio que contienen 130 ml de medio de liberación (hidroxil beta ciclodextrina al 2,5 % en PBS), que es continuamente agitado a 150 rpm usando un agitador para evitar la formación de una capa de agua sin agitar en la superficie de contacto de membrana/solución externa. A tiempos predeterminados, se extrajeron alícuotas de las muestras (1 ml) de la solución externa (dializado) y se analizaron para determinar la concentración de docetaxel por HPLC.

El sistema centrífugo se opera usando condiciones similares, a menores volúmenes de suspensión, sin bolsas de diálisis. Las muestras se centrifugan a 60.000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se somete a ensayo para determinar el contenido de fármaco respecto al fármaco liberado medido.

Ejemplo 16 Liberación *in vitro* de nanopartículas de docetaxel

Una suspensión de nanopartículas de docetaxel preparada como en el ejemplo 8 (docetaxel al 10 % en peso y polímero al 90 % en peso (PLA-PEG-GL2 al 1,25 % en peso y PLA-PEG al 98,75 % en peso, Pn de PLA = 16 Da; Pn de PEG = 5 Da) se colocó en un módulo de diálisis y se incubó en un depósito de PBS a 37 °C con agitación. Se recogieron muestras del dializado y se analizaron para determinar docetaxel utilizando HPLC de fase inversa. A efectos comparativos, se sometió docetaxel convencional al mismo procedimiento. La figura 13 describe el perfil de

liberación in vitro de las nanopartículas en comparación con el docetaxel convencional. La liberación del docetaxel encapsulado de la matriz polimérica fue esencialmente lineal en las primeras 24 horas siendo el resto liberado gradualmente de las partículas en un período de aproximadamente 96 horas.

Ejemplo 17 Nanopartículas de sirolimus

5 Se prepararon lotes de nanopartículas usando el procedimiento general del ejemplo 8, con polímero-PEG o polímero-PEG al 80 % (p/p) con homopolímero de PLA al 40 % (p/p) cada uno, con un lote de porcentaje total de sólidos del 5 %, el 15 % y el 30 %. Los disolventes utilizados fueron: alcohol bencílico al 21 % y acetato de etilo al 79 % (p/p). Para cada lote de 2 g de tamaño, se usaron 400 mg de fármaco y 1,6 g de 16-5 polímero-PEG o 0,8 g de 16-5 polímero-PEG + 0,8 g de PLA (homopolímero) de 10 kDa. Se usó el polímero en dibloque 16-5 PLA-PEG o
 10 PLGA-PEG (50:50 L:G) y cuando se usó, el homopolímero: PLA con un Pn = 6,5 kDa, Pm (peso molecular promedio en masa) =10 kDa y Pm/Pn =1,55.

La fase orgánica (fármaco y polímero) se preparó en lotes de 2 g: añadir fármaco y polímero o polímeros a un vial de centelleo de 20 ml. La masa de disolventes necesaria a la concentración en % de sólidos, se muestra a continuación:

- 15 i. 5 % de sólidos: 7,98 g de alcohol bencílico + 30,02 g de acetato de etilo
- ii. 15 % de sólidos: 2,38 g de alcohol bencílico + 8,95 g de acetato de etilo
- iii. 30 % de sólidos: 0,98 g de alcohol bencílico + 3,69 g de acetato de etilo

Se prepara una solución acuosa con colato de sodio al 0,5 %, alcohol bencílico al 2 % y acetato de etilo al 4 % en agua. A un frasco de 2 l añadir 7,5 g de colato de sodio, 1402,5 g de agua DI, 30 g de alcohol bencílico y 60 g de acetato de etilo y mezclar sobre placa de agitación hasta disolución.
 20

Para formar la emulsión, se usa una relación entre fase acuosa y fase oleosa de 5:1. La fase orgánica se vierte en la solución acuosa y se homogeniza usando IKA durante 10 segundos a temperatura ambiente para formar una emulsión gruesa. La solución se introduce a través del homogeneizador (110S) a 9 Kpsi (62,05 MPa) (45 psi (0,06 MPa) de manómetro) para 2 pases discretos para formar la nanoemulsión.

25 La emulsión se vierte en el medio de enfriamiento (agua D.I.) a <5 °C mientras se agita sobre la placa de agitación. La relación de medio de enfriamiento a emulsión es de 8:1. Se añade Tween 80 al 35 % (p/p) en agua al medio de enfriamiento en una relación de 25:1 de Tween 80 a fármaco. Las nanopartículas se concentran a través de TFF y el medio de enfriamiento se concentra en TFF con módulo Pall de.500 kDa (membrana 2) hasta ~100 ml. Se usa diafiltración utilizando ~20 diavolumenes (2 litros) de agua DI fría y el volumen se reduce hasta un volumen mínimo y
 30 después se recoge la suspensión final, ~100 ml. Se determina la concentración de sólidos de la suspensión final sin filtrar, usando un vial de centelleo de 20 ml tarado, añadiendo 4 ml de suspensión final y secando al vacío en liofilizador/estufa y se determina el peso de las nanopartículas en los 4 ml de suspensión seca. Se añade sacarosa concentrada (0,666 g/g) a la muestra de suspensión final para obtener sacarosa al 10 %.

35 La concentración de sólidos de la suspensión final filtrada por 0,45 um se determinó filtrando aproximadamente 5 ml de muestra de suspensión final antes de añadir la sacarosa a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm; a un vial de centelleo de 20 ml tarado se le añadieron 4 ml de muestra filtrada y se secó al vacío en liofilizador/estufa.

La muestra restante de la suspensión final sin filtrar se congeló con sacarosa. Formulaciones de rapamicina (sirolimus):

Nombre	Polímero	Tamaño (nm)	Carga de fármaco	Liberación de fármaco (t = h)			
				T = 0	T = 2	T = 4	T = 24
5 % de sólidos	16/5 PLA/PEG	123,1	3,61 %	ND	ND	ND	ND
	16/5 PLA/PEG + PLA	119,7	4,49 %	ND	ND	ND	ND
15 % de sólidos	16/5 PLA/PEG	82,1	4,40 %	ND	ND	ND	ND
	16/5 PLA/PEG+PLA	120,6	11,51 %	ND	ND	ND	ND
23 % de sólidos	16/5 PLA/PEG	88,1	7,40 %	ND	ND	ND	ND
	16/5 PLA/PEG + PLA	118,3	7,8 %	ND	ND	ND	ND
30 % de sólidos	16/5 PLA/PEG	88,5	10,26 %	8,5	17,3	22,4	64,2
	16/5 PLA/PEG + PLA	118,3	10,18 %	9,3	30,4	44,7	98,2

El efecto del contenido de sólidos y las inclusiones de homopolímero de ácido poli(láctico) se muestran en la figura 14.

Se estudian experimentos de liberación in vitro dispersando nanopartículas en PBS que contienen el 10 % (p/p) de Tween 20 (T20) a 37 °C. Se usó T20 para aumentar la solubilidad de la rapamicina en PBS hasta niveles bien detectables por HPLC así como manteniendo las condiciones de libre saturación. Se redispersaron 3 ml de nanopartículas cargadas de fármaco en 130 ml de medio de liberación en un frasco a una concentración conocida (aproximadamente 250 µg/ml). Estos volúmenes se eligieron para asegurar que la máxima concentración del fármaco en el medio de liberación siempre sería menor del 10 % de la solubilidad máxima es decir, las condiciones de libre saturación. El medio y la suspensión de nanopartículas se agitaron a 150 rpm. A tiempos predeterminados, se centrifugaron alícuotas de 4 ml a 50.000 rpm (236.000 g) durante 1 h para separar las nanopartículas del medio de elución. El medio de elución se inyectó en un HPLC para determinar el fármaco liberado de las nanopartículas. La liberación de rapamicina mostró una liberación lenta y sostenida, como se muestra en la figura 15.

Ejemplo 18 - Temsirolimus

Se prepararon nanopartículas como en los ejemplos 17 y 8, excepto por que se usó temsirolimus con un 30 % de contenido de sólidos en la fase orgánica antes de la emulsión:

Nombre	Polímero	Tamaño (nm)	Carga de fármaco	Liberación de fármaco (t = h)			
				T = 0	T = 2	T = 4	T = 24
30 % de sólidos	16/5 PLA/PEG	97,5	9,9 %	11,5	15,6	17,9	40,9
	16/5 PLA/PEG + PLA	112,8	14,2 %	9,8	22,3	29,9	88,0
	16/5 PLCA/PEG + PLA	150,3	4,6	ND	ND	ND	ND
	16/5 PLGA/PEG + PLA	ND	6,9	10,6	35,7	45,8	87,0

La figura 16 representa el % en peso de temsirolimus y la figura 17 describe la nanopartícula para las diferentes nanopartículas poliméricas que tienen temsirolimus. Los resultados de un experimento de liberación in vitro como en el ejemplo 17 muestran la liberación lenta y sostenida de temsirolimus como se muestra en la figura 18.

Ejemplo 19 Nanopartículas de vinorelbina

Se prepararon lotes de nanopartículas usando el procedimiento general del ejemplo 8, con 80 % (p/p) de polímero-PEG o polímero-PEG con homopolímero PLA a 40 % (p/p) cada uno, con un lote del % total de sólidos del 5 %, el 15 % y el 30 %. Los disolventes utilizados fueron: alcohol bencílico al 21 % y acetato de etilo al 79 % (p/p). Para cada lote de 2 g de tamaño, se usaron 400 mg de vinorelbina y 1,6 g de 16-5 polímero-PEG o 0,8 g de 16-5 polímero-PEG + 0,8 g de PLA (homopolímero) de 10 kDa. Se usó el polímero en dibloque 16-5 PLA-PEG o PLGA-PEG (50:50 L:G) y cuando se usó, el homopolímero: PLA con un Pn = 6,5 kDa, Pm=10 kDa y Pm/Pn=1,55.

La fase orgánica (fármaco y polímero) se preparó en lotes de 2 g: a un vial de centelleo de 20 ml añadir fármaco y polímero o polímeros. La masa de disolventes necesaria al % de sólidos se muestra a continuación:

- i. 5 % de sólidos: 7,98 g de alcohol bencílico + 30,02 g de acetato de etilo
- ii. 15 % de sólidos: 2,38 g de alcohol bencílico + 8,95 g de acetato de etilo
- iii. 30 % de sólidos: 0,98 g de alcohol bencílico + 3,69 g de acetato de etilo

Se prepara una solución acuosa con colato de sodio al 0,5 %, alcohol bencílico al 2 % y acetato de etilo al 4 % en agua. Añadir al frasco 7,5 g de colato de sodio, 1402,5 g de agua DI, 30 g de alcohol bencílico y 60 g de acetato de etilo y mezclar sobre placa de agitación hasta disolución.

Para la formación de la emulsión, se usa una relación entre fase acuosa y fase oleosa de 5:1. La fase orgánica se vierte en la solución acuosa y se homogeniza usando IKA durante 10 segundos a temperatura ambiente para formar una emulsión gruesa. La solución se introduce a través del homogeneizador (110S) a 9 Kpsi (62,05 MPa) (45 psi (0,06 MPa) de manómetro) para 2 pases discretos para formar la nanoemulsión.

La emulsión se vierte en el medio de enfriamiento (agua D.I.) a <5 °C mientras se agita sobre la placa de agitación. La relación entre medio de enfriamiento y emulsión es 8:1. Se añade Tween 80 al 35 % (p/p) en agua al medio de enfriamiento en una relación de 25:1 entre Tween 80 y fármaco. Las nanopartículas se concentran a través de TFF y el medio de enfriamiento se concentra en TFF con módulo Pall de.500 kDa (membrana 2) hasta ~100 ml. Se usa diafiltración utilizando ~20 diavolumenes (2 litros) de agua DI fría, el volumen se reduce hasta un volumen mínimo y después se recoge la suspensión final, ~100 ml. La concentración de sólidos de la suspensión final sin filtrar, se determina usando un vial de centelleo de 20 ml tarado y añadiendo 4 ml de suspensión final y secando al vacío en liofilizador/estufa y se determina el peso de las nanopartículas en los 4 ml de suspensión seca. Se añade sacarosa concentrada (0,666 g/g) a la muestra de suspensión final para conseguir sacarosa al 10 %.

Se determinó la concentración de sólidos de suspensión final filtrada por 0,45 µm, filtrando aproximadamente 5 ml de muestra de suspensión final antes de añadir la sacarosa a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm; a un vial de centelleo de 20 ml tarado añadir 4 ml de muestra filtrada y secar al vacío en liofilizador/estufa.

La muestra restante de la suspensión final sin filtrar se congeló con sacarosa. Formulaciones de vinorelbina:

% de sólidos	Liberación in vitro conducida	Tipo de polímero:	% de carga de vinorelbina (HPLC)	Tamaño de partícula (nm)
5 %		16-5 PLA-PEG	4,27	143,3
		16-5 PLA-PEG + PLA	3,39	105,7
15 %		16-5 PLA-PEG	6,2	100,3
		16-5 PLA-PEG + PLA	15,95	141,3
30 %		16-5 PLA-PEG (n = 3)	10,41	90,8
			10,31	84,4
	*		12,01	95
	*	16-5 PLA-PEG + PLA	15,03	125,5
	*	16-5 PLGA-PEG + PLA	14,66	120,3

* = liberación in vitro hecha en las muestras

- 5 La liberación in vitro se realizó en tres formulaciones con un 30 % de sólidos totales: 16-5 PLA-PEG; 16-5 PLA-PEG + PLA; y 16-5 PLGA-PEG + PLA y los datos de liberación in vitro se recogieron a 37 °C en una cámara de aire utilizando urea al 10 % en solución de PBS como medio de liberación. La tabla siguiente y la figura 19 describen los resultados:

	16-5 PLAPEG	16-5 PLA-PEG + PLA 10 kDa	16-5 PLGA-PEG + PLA 10 kDa
Tiempo (horas)			
0	5,62	0,84	4,79
2	35,29	35,35	67,63
5	41,28	49,58	87,05
24	65,20	91,81	101,62
48	73,02	88,63	89,57
144	81,08	84,98	91,46

Ejemplo 20 - Vincristina

- 10 Las formulaciones de nanopartículas que incluyen vincristina se prepararon usando el procedimiento general del ejemplo 8.

Formulaciones de vincristina:

N.º de ref.	Componentes	Composición en peso (%)
50-103-3-5	mPEG(5k)-/PLA(16K) /Vincristina	96/4
50-117-1-5	mPEG(5k)-/PLA(16K) /Vincristina	95/5
50-117-2-5	mPEG(5k)-/PLA(16K) /Vincristina	96/4
50-103-4	mPEG(5k)-/PLA(16K) / /PLA(16K) /Vincristina	46/46/8
50-103-2	mPEG(5k)-/PLA(16K) / /PLA(16K) /Vincristina	47/47/6

Caracterización analítica de las formulaciones de vincristina:

N.º de ref.	Tamaño (nm)	Carga de fármaco (%)	Eficiencia de la encapsulación (%)
50-103-3-5	103	4,4	21,8
50-117-1-5	110	4,6	22,8
50-117-2-5	115	4,2	20,8
50-103-4	146	8,3	41,6
50-103-2	98	6,0	30,0

Se realizó la liberación in vitro en las formulaciones de vincristina y se obtuvieron los datos de liberación in vitro a 37 °C en una cámara de aire, usando urea al 10 % en solución de PBS como medio de liberación. La figura 20 describe la liberación in vitro para varios de los lotes a los que se hace referencia.

5 **Ejemplo 21 Farmacocinética**

Se determinó la farmacocinética (FC) de las nanopartículas que tienen vincristina preparadas como en el ejemplo 20 y que tienen docetaxel preparadas como en el ejemplo 8 en ratas Sprague-Dawley (SD). Se administró a las ratas (Sprague Dawley machos, de aproximadamente 300 g con cánula yugular) una única dosis intravenosa de 0,5 mg/kg de fármaco libre o nanopartículas dirigidas pasivamente que encapsulaban fármaco (10 % en peso de fármaco, 90 % en peso de polímero (PLA-PEG, Pn de PLA=16 Da; Pn de PEG=5 Da, PTNP) con 5 mg/kg y PTNP en el tiempo = 0. Se extrajeron muestras de sangre de la cánula yugular, a diversos tiempos después de la administración, en tubos que contenían heparina de litio y se preparó el plasma. Los niveles plasmáticos se determinaron mediante extracción de los fármacos del plasma seguida de análisis LCMS.

15 La figura 21 describe los perfiles farmacocinéticos de vincristina y vincristina PTNP y de docetaxel y docetaxel PTNP.

Ejemplo 22 Análisis del tamaño de partícula

20 El tamaño de partículas se analiza por dos técnicas: dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés *dynamic light scattering*) y difracción láser. La DLS se realiza utilizando un instrumento Brookhaven ZetaPals a 25 °C en suspensión acuosa diluida utilizando un láser de 660 nm dispersado a 90 ° y se analiza utilizando los procedimientos Cumulants y NNLS (TP008). La difracción láser se realiza con un instrumento Horiba LS950 en suspensión acuosa diluida utilizando tanto un láser de HeNe a 633 nm como un LED a 405 nm, dispersados a 90 ° y se analiza usando el procedimiento óptico Mie (TP009). El resultado de la DLS se asocia al radio hidrodinámico de las partículas, que incluye la 'corona' de PEG, mientras que el instrumento de difracción láser está más estrechamente asociado al tamaño geométrico del 'centro' de la partícula de PLA.

25 **Ejemplo 23 - Densidad de ligando**

Suponiendo que el diámetro general de partícula es equivalente al diámetro hidrodinámico medido con el dimensionador de partículas Brookhaven, las nanopartículas son esferas perfectas y todo el PEG hidrófilo y el ligando se expresan sobre la superficie así como todo el PEG está totalmente hidratado, se puede construir un modelo de la superficie de la partícula como se muestra en la tabla I:

30 Tabla I: Modelo de la superficie de la nanopartícula para partículas de 100 nm de 16/5 copolímero y homopolímero de 6,5 kDa

% de ligando	Polímero (moléculas o SA/partícula)			Cobertura de ligando		
	Homopolímero	Copolímero	nm ² /PEG	mol/g de NP	Moléculas/partícula	nm ² /ligando
0 % (NTNP)	7050	2182	14,40	0	0	NA
1 % de GL2	7049	2183	14,39	1,72 x 10 ⁻⁰⁷	22	1439
5 % de GL2	7047	2187	14,37	8,63 x 10 ⁻⁰⁷	109	287
10 % de GL2	7043	2191	14,34	1,73 x 10 ⁻⁰⁷	219	143

Ejemplo 24 - Direccionamiento al tumor de cáncer de mama

Se evaluó la capacidad de las nanopartículas administradas por vía intravenosa preparadas como en el ejemplo 8 (docetaxel al 10 % en peso, polímero al 90 % en peso (PLA-PEG-GL2 al ~1,25 % en peso; y PLA-PEG al ~98,75 %, Pn de PLA = 16 Da; Pn de PEG = 5 Da) (etiquetadas como BIND-14) para inhibir el crecimiento del tumor no prostático en comparación con docetaxel convencional y partículas de control no dirigidas que tenían la misma composición fármaco/polímero (PTNP) en ratones a los que se les implantaron xenoinjertos MX-1. Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de 300 mm³, a los ratones se les administraron los artículos de ensayo (sacarosa, docetaxel, PTNP, BIND-14) cada 4 días por 3 dosis. Los volúmenes tumorales promedio con el paso del tiempo para cada grupo de tratamiento se muestran en la figura 22.

Se evaluó la capacidad de las partículas dirigidas (BIND-14) para potenciar la entrega de docetaxel a los tumores después de la administración intravenosa en ratones que tenían xenoinjertos de cáncer de mama humano MX-1, con un volumen promedio de tumor de 1700 mm³. Se analizaron las concentraciones de docetaxel (ng/mg) en tumores extirpados 24 horas después de la dosis IV, de animales a los que se les administró BIND-14, PTNP y docetaxel convencional, para determinar el contenido de docetaxel utilizando CL/EM/M y se presentan en la figura 23.

Ejemplo 25 - Direccionamiento al tumor de cáncer de próstata

Se evaluó la entrega de nanopartículas de docetaxel utilizando nanopartículas preparadas como en el ejemplo 8 (docetaxel al 10 % en peso, polímero al 90 % en peso (PLA-PEG-GL2 al ~1,25 % en peso; y PLA-PEG al ~98,75 %, Pn PLA = 16 Da; Pn PEG = 5 Da; BIND-14) a tumores, después de la administración intravenosa en ratones SCID machos con xenoinjertos de LNCaP de cáncer de próstata humano. Los ratones SCID machos se inocularon por vía subcutánea con células LNCaP de cáncer de próstata humano. Tres a cuatro semanas después de la inoculación, se administró una única dosis IV de 5 mg/kg de docetaxel como BIND-014 o como docetaxel convencional. Los ratones se sacrificaron 2 h o 12 h post administración. Se extirparon y analizaron los tumores de cada grupo para determinar docetaxel mediante un procedimiento CL-EM.

Doce horas después de una única dosis de 50 mg/kg de BIND-14, la concentración de docetaxel en el tumor en animales que recibieron BIND-014 fue aproximadamente 7 veces mayor que en los animales que recibieron DTXL convencional, lo que indica que las nanopartículas dirigidas a PSMA de circulación prolongada entregan más DTXL al sitio del tumor como se muestra la figura 24.

También se evaluó la capacidad de dosis repetidas de BIND-014 para suprimir el crecimiento del tumor en el modelo de xenoinjerto de tumor LNCaP como se muestra en la figura 25. Los ratones SCID machos se inocularon por vía subcutánea con células LNCaP de cáncer prostático humano. Tres a cuatro semanas después de la inoculación, los ratones se trataron día por medio por cuatro dosis con BIND-014, docetaxel (DTXL) convencional, DTXL encapsulado en nanopartículas no dirigidas (PTNP) y vehículo (Control). Después de las cuatro dosis de 5 mg/kg, la reducción del volumen del tumor fue mayor en los animales que recibieron BIND-014 en comparación con el docetaxel convencional o las partículas no dirigidas (PTNP). El aumento en la concentración de docetaxel en el tumor resultó en un efecto citotóxico más pronunciado.

En un aspecto, la divulgación proporciona nanopartículas terapéuticas que incluyen un agente activo o agente terapéutico, por ejemplo taxano y uno, dos o tres polímeros biocompatibles. Por ejemplo, en el presente documento se desvela una nanopartícula terapéutica que comprende aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 35 por ciento en peso de un agente terapéutico; de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 99 por ciento en peso de copolímero ácido poli(láctico)-poli(etilenglicol) o copolímero ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico)-poli(etilenglicol); y de aproximadamente el 0 a aproximadamente el 50 por ciento en peso de ácido poli(láctico) o ácido poli(láctico)-co-ácido poli(glicólico). Los agentes terapéuticos de ejemplo incluyen antineoplásicos tales como taxanos, por ejemplo docetaxel y pueden incluir de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 30 por ciento en peso de un agente terapéutico, por ejemplo, un agente taxano.

En el presente documento se proporciona, en parte, un procedimiento para preparar una pluralidad de nanopartículas terapéuticas desveladas, que comprende combinar un agente terapéutico, un primer polímero y un segundo polímero, con un disolvente orgánico (por ejemplo, un disolvente elegido entre: acetato de etilo, alcohol bencílico, cloruro de metileno, dimetilformamida, Tween 80 y Span 80 y combinaciones de dos o más de éstos) para formar una primera fase orgánica que tenga de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 50 % de sólidos; combinar la primera fase orgánica con una primera solución acuosa (que en algunas realizaciones, puede incluir un reactivo elegido entre: colato de sodio, acetato de etilo, alcohol bencílico o combinaciones de los mismos) para formar una segunda fase; emulsionar la segunda fase para formar una fase en emulsión; enfriar la fase en emulsión para formar una fase enfriada; añadir un solubilizante de fármaco a la fase enfriada para formar una fase solubilizada de agente terapéutico no encapsulado; y filtrar la fase solubilizada para recuperar las nanopartículas furtivas específicas para la diana, formando de este modo una suspensión de nanopartículas terapéuticas con un diámetro de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 150 nm. En algunas realizaciones, emulsionar la segunda fase puede implicar emulsionar la segunda fase para formar una emulsión gruesa y emulsionar la emulsión gruesa para formar una fase en emulsión fina. La emulsión de la segunda fase se puede realizar, por ejemplo, utilizando un homogeneizador de rotor y estator, una sonda de ultrasonidos, una barra de agitación o un mezclador de alta

presión. La emulsión de la emulsión gruesa se puede realizar utilizando, por ejemplo, un homogeneizador de alta presión que puede tener múltiples cámaras de interacción (2, 3, 4 o más) y con, por ejemplo, una presión de alimentación de aproximadamente 4000 psi (27,57 Mpa) a aproximadamente 8000 psi (55,14 MPa) por cámara de interacción.

- 5 En algunas realizaciones, el enfriamiento se puede realizar por lo menos parcialmente a una temperatura de aproximadamente 5 °C o menos, por ejemplo, de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C. Una relación medio de enfriamiento:emulsión puede ser de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 5:1, o de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 40:1.

- 10 Los solubilizantes de fármaco de ejemplo para su uso en los procedimientos desvelados pueden incluir Tween 80, Tween 20, polivinilpirrolidona, ciclodextrano, dodecilsulfato de sodio o colato de sodio. En algunas realizaciones, un solubilizante de fármacos se selecciona entre el grupo que consiste en dietilnitrosamina, acetato de sodio, urea, glicerina, propilenglicol, glicofurol, poli(etilen)glicol, bis(polioxi(etilenglicol)dodecil) éter, benzoato de sodio y salicilato de sodio. La relación entre solubilizante de fármacos y agente terapéutico puede ser de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 10:1.

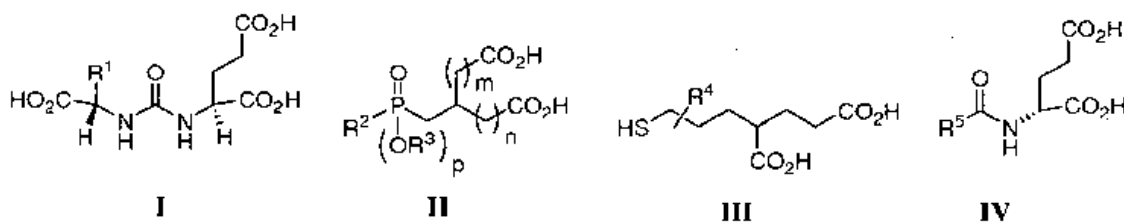
- 15 En una realización, un procedimiento puede incluir filtrar la fase solubilizada que contiene nanopartículas usando por ejemplo un sistema de filtración de flujo tangencial. La filtración se puede realizar, por ejemplo, a una primera temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C y después a una segunda temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C. Como alternativa, la filtración se puede realizar por ejemplo, a una primera temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C y después a una segunda temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C. En algunas realizaciones, la filtración comprende procesar de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 diavolumenes a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C y procesar al menos un diavolumen a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, por ejemplo, filtrar puede implicar procesar de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 diavolumenes a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C y procesar de aproximadamente 1 diavolumen a aproximadamente 15 diavolumenes a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C. En una realización, filtrar puede incluir procesar diferentes diavolumenes a diferentes temperaturas definidas. La fase solubilizada se puede purificar anteriormente de dicha filtración para retirar sustancialmente dicho disolvente orgánico, agente terapéutico no encapsulado y/o solubilizante de fármacos.

- 20 Los procedimientos desvelados pueden comprender la filtración esterilizante de la suspensión de nanopartículas terapéuticas utilizando un tren de filtración a una velocidad controlada. Por ejemplo, se puede usar un tren de filtración que comprenda un filtro de profundidad y un filtro esterilizante.

- 25 También se desvela en el presente documento un procedimiento de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas que comprende combinar un agente terapéutico, un primer polímero y un segundo polímero, con un disolvente orgánico para formar una primera fase orgánica, combinar la primera fase orgánica con una primera solución acuosa para formar una segunda fase; emulsionar la segunda fase para formar una fase en emulsión; enfriar la fase en emulsión para formar una fase enfriada; añadir un solubilizante de fármacos a la fase enfriada para formar una fase solubilizada de agente terapéutico no encapsulado; y filtrar la fase solubilizada utilizando filtración de flujo tangencial con diafiltración de volumen constante en la que al menos un diavolumen se expone a aproximadamente 25 °C después de haber expuesto un diavolumen diferente a una temperatura de aproximadamente - 5 °C a aproximadamente 10 °C. Por ejemplo, filtrar puede incluir procesar de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 diavolumenes a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C y después procesar al menos un diavolumen a 25 °C durante al menos un período de tiempo.

- 30 En el presente documento se proporcionan procedimientos de fabricación de nanopartículas terapéuticas que pueden ser estables durante al menos 2 días a 25 °C a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml. Las nanopartículas terapéuticas formadas utilizando los procedimientos desvelados, pueden liberar menos del 10 % en peso de agente terapéutico en al menos 5 días a 25 °C. En algunas realizaciones, una nanopartícula terapéutica formada utilizando un procedimiento desvelado puede, por ejemplo, encapsular de aproximadamente el 2 a aproximadamente el 30 por ciento de agente terapéutico.

- 35 En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas desveladas que comprenden combinar un agente terapéutico, un primer polímero (por ejemplo, copolímero PLGA-PEG o PLA) y un segundo polímero (por ejemplo PLA, PLGA o PEG, o copolímeros de los mismos) y opcionalmente un tercer polímero (por ejemplo PLA o PLGA no unido a un ligando) en los que el primer polímero está unido a un ligando que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 1000 g/mol, por ejemplo, un ligando de bajo peso molecular, por ejemplo, un ligando de PSMA. Dicho ligando de PSMA de bajo peso molecular se puede seleccionar entre el grupo que consiste en los compuestos I, II, III y IV:



y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos; en los que

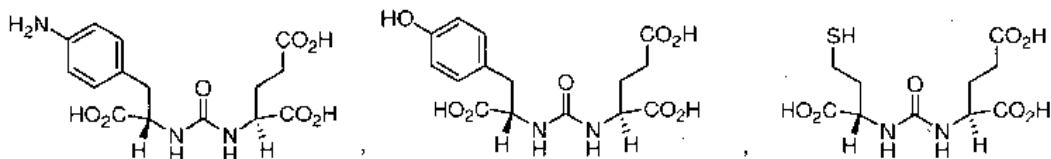
m y n cada uno, independientemente, es 0, 1, 2 o 3;

p es 0 o 1;

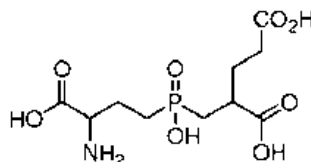
R¹, R², R⁴ y R⁵ cada uno, independientemente, se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir y cualquier combinación de los mismos; y

R³ es H o CH₃;

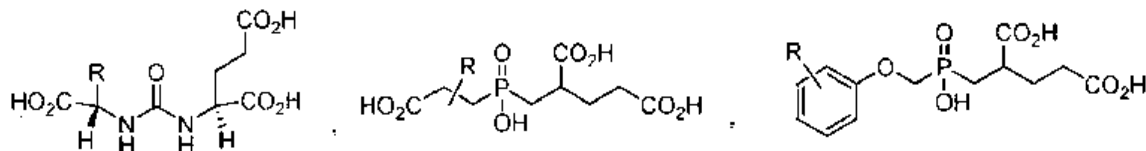
en los que R¹, R², R⁴ o R⁵ comprenden un punto de unión covalente a la nanopartícula. Por ejemplo, R¹, R², R⁴ y R⁵ puede ser cada uno, independientemente, alquilo C₁₋₆ o fenilo, o cualquier combinación de alquilo C₁₋₆ o fenilo, que están independientemente sustituidos una o más veces con OH, SH, NH₂ o CO₂H y en los que el grupo alquilo puede estar interrumpido por N(H), S u O. En otra realización, por ejemplo, R¹, R², R⁴ y R⁵ cada uno, independientemente, es CH₂-Ph, (CH₂)₂-SH, CH₂-SH, (CH₂)₂C(H)(NH₂)CO₂H, CH₂C(H)(NH₂)CO₂H, CH(NH₂)CH₂CO₂H, (CH₂)₂C(H)(SH)CO₂H, CH₂-N(H)-Ph, O-CH₂-Ph o O-(CH₂)₂-Ph, en los que cada Ph puede estar independientemente sustituido una o más veces con OH, NH₂, CO₂H o SH. El ligando de PSMA de bajo peso molecular de ejemplo se puede seleccionar entre el grupo que consiste en



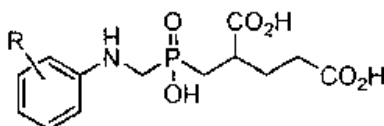
y



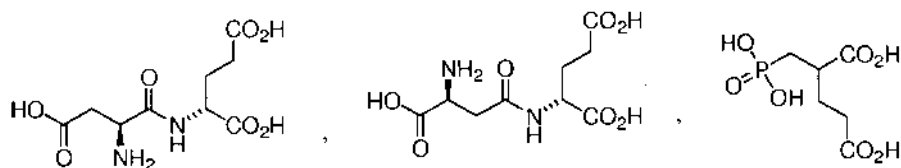
y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos; y en los que los grupos NH₂, OH o SH sirven como el punto de unión covalente a la primera partícula, o se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en



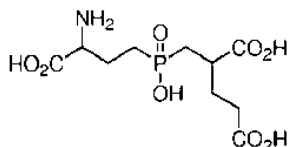
y



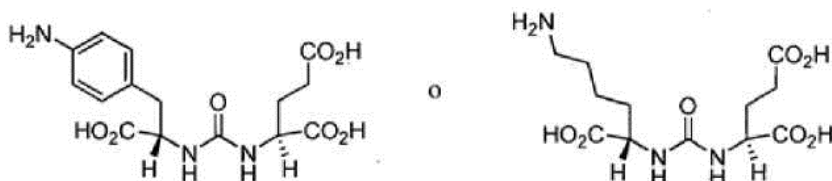
y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos; en los que R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en NH₂, SH, OH, CO₂H, alquilo C₁₋₆ que está sustituido con NH₂, SH, OH o CO₂H y fenilo que está sustituido con NH₂, SH, OH o CO₂H, y en los que R sirve como el punto de unión covalente al primer polímero. Los ligandos de ejemplo incluyen



y



- 5 y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos; cualquiera de los cuales puede estar sustituido además con NH₂, SH, OH, CO₂H, alquilo C₁₋₆ que está sustituido con NH₂, SH, OH o CO₂H, o fenilo que está sustituido con NH₂, SH, OH o CO₂H, en los que estos grupos funcionales sirven como el punto de unión covalente al primer polímero, por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular puede ser



- 10 y los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereoisómeros o racematos de los mismos; en los que los grupos NH₂ sirven como el punto de unión covalente al primer polímero.

En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas desveladas que comprenden combinar un agente terapéutico, un primer polímero (por ejemplo, copolímero PLGA-PEG o PLA) y un segundo polímero (por ejemplo, PLA, PLGA o PEG, o copolímeros de los mismos) y opcionalmente un tercer polímero (por ejemplo PLA o PLGA no unido a un ligando). En algunas realizaciones, el agente terapéutico es docetaxel. En otras realizaciones, el agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en agentes antineoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), mitoxantrona, gemcitabina (gemzar), daunorrubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleucina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, camptotecina, CTP-11, 10-hidroxi-7-etilcamptotecina (SN38), dacarbazona, S-I capecitabina, fluorouracilo, 5-desoxiflurouridina, UFT, eniluracilo, desoxicidina, 5-azacitidina, alopurinol, 2-cloroadenosina, trimetrexato, aminopterina, metileno-10-deazaaminopterina (MDAM), oxaplatino, picoplatino, tetraplatino, satraplatino, platino-DACH, ormaplatino, CI-973, JM-216 y análogos de los mismos, epirubicina, fosfato de etopósido, 9-aminocamptotecina, 10,11-metilenodioxycamptotecina, karenitecina, 9-nitrocamptotecina, TAS 103, vindesina, mostaza de L-fenilalanina, ifosfamidamefosfamida, perfosfamida, trofosfamida, carmustina, semustina, epotilones A-E, tomudex, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, amsacrina, fosfato de etopósido, karenitecina, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir, amantadina, rimantadina, lamivudina, zidovudina, bevacizumab, trastuzumab, rituximab y 5-fluorouracilo, metotrexato, budesonida, sirolimus, vincristina y combinaciones de los mismos, o el agente terapéutico puede ser un ARNip.

- 30 También se proporcionan en el presente documento procedimientos para tratar el cáncer de próstata en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de la nanopartícula preparada por los procedimientos desvelados.

En una realización, también se proporciona en el presente documento una nanopartícula terapéutica preparada mediante: la emulsión de una primera fase orgánica que comprende un primer polímero y un agente terapéutico y una segunda fase que forma una fase en emulsión; en la que la fase en emulsión se enfría después a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C formando una fase enfriada; y la filtración de la fase enfriada a una primera temperatura de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 10 °C; y la filtración de la fase enfriada a una segunda temperatura de aproximadamente 25 °C; formando de este modo nanopartículas terapéuticas que son estables durante al menos 5 días a 25 °C.

- 40 También se proporciona en una realización, un procedimiento de estabilización de nanopartículas terapéuticas que tienen un agente terapéutico que comprende: proporcionar una suspensión que comprenda un agente terapéutico encapsulado por nanopartículas y un solubilizante de fármacos; filtrar la suspensión a una primera temperatura de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 10 °C; filtrar la suspensión a una segunda temperatura de aproximadamente 25 °C.

45

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una pluralidad de nanopartículas terapéuticas, que comprende:
 - combinar un agente terapéutico, un primer polímero y opcionalmente un segundo polímero, con un disolvente orgánico para formar una primera fase orgánica que tenga sólidos del 5 al 50 %;
 - 5 combinar la primera fase orgánica con una primera solución acuosa para formar una segunda fase;
 - emulsionar la segunda fase para formar una fase en emulsión;
 - enfriar la fase en emulsión para formar una fase enfriada, en el que el enfriamiento se realiza al menos parcialmente a una temperatura de 5 °C o menos;
 - añadir un solubilizante de fármacos a la fase enfriada para formar una fase solubilizada del agente terapéutico no
 - 10 encapsulado; y
 - filtrar la fase solubilizada para recuperar las nanopartículas furtivas específicas para la diana, formando de este modo una suspensión de nanopartículas terapéuticas con un diámetro de 80 nm a 150 nm.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que emulsionar la segunda fase comprende:
 - emulsionar la segunda fase para formar una fase en emulsión gruesa, y
 - 15 emulsionar la emulsión gruesa para formar una fase en emulsión fina.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que:
 - a) el disolvente orgánico comprende un disolvente elegido entre: acetato de etilo, alcohol bencílico, cloruro de metileno, cloroformo, tolueno, metil etil cetona, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, acetona, acetonitrilo, ácido acético, Tween 80 y Span 80 y combinaciones de dos o más de los mismos; y/o
 - 20 b) la solución acuosa comprende un reactivo elegido entre: colato de sodio, acetato de etilo, alcohol bencílico o combinaciones de los mismos.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que emulsionar la segunda fase comprende usar un homogeneizador de rotor y estator, una sonda de ultrasonido, una barra de agitación o un homogeneizador de alta presión.
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 2 o 4, en el que emulsionar la emulsión gruesa comprende usar un homogeneizador de alta presión, opcionalmente en el que emulsionar la emulsión primaria comprende de 2 a 3 pases a través del homogeneizador.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que:
 - a) la presión de alimentación del homogeneizador es de 13,79 a 55,14 MPa por cámara de interacción y/o
 - 30 b) el homogeneizador comprende múltiples cámaras de interacción.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el enfriamiento se realiza de 0 °C a 5 °C.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la relación de enfriamiento:emulsión es:
 - a) de 8:1 a 5:1, o
 - b) de 2:1 a 40:1.
- 35 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que filtrar comprende usar un sistema de filtración de flujo tangencial.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que filtrar comprende filtrar a una primera temperatura de 0 °C a 5 °C.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente filtrar a una segunda temperatura de
- 40 20 °C a 30 °C, opcionalmente en el que filtrar comprende:
 - a) procesar de 1 a 6 diavolumenes de 0 °C a 5 °C y procesar al menos un diavolumen de 20 °C a 30 °C, o
 - b) procesar de 1 a 6 diavolumenes de 0 °C a 5 °C y procesar de un diavolumen a 15 diavolumenes de 20 °C a 30 °C.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que:
 - a) el primer o segundo polímero se selecciona entre el grupo que consiste en:
 - (i) ácido poli-L-láctico, ácido poli-D-láctico, ácido poli-D,L-láctico, poli-L-láctido, poli-D-láctido y poli-D,L-láctido (denominados colectivamente "PLA");
 - (ii) poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) y poli(láctido-co-glicólido) (denominados colectivamente "PLGA"); y
 - (iii) poli(etilenglicol) ("PEG");
- 45

o copolímeros de los mismos; y/o

b) el primer polímero es un PLGA-PLA o PLA y el segundo polímero es un copolímero PLGA-PLA-PEG, un copolímero PLGA-*bloque*-PEG, o un copolímero PLA-*bloque*-PEG.

13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el agente terapéutico:

5 a) es docetaxel; o

b) se selecciona entre el grupo que consiste en agentes quimioterápicos tales como doxorubicina (adriamicina), mitoxantrona, gemcitabina (gemzar), daunorrubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleucina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, camptotecina, 10-hidroxi-7-etilcamptotecina (SN38), dacarbazina, S-I capecitabina, ftorafur, 5'-desoxifluorouridina, eniluracilo, desoxicitidina, 5-azacitosina, 5-azadesoxicitosina, alopurinol, 2-cloroadenosina, trimetrexato, aminopterina, metileno-10-deazaaminopterina (MDAM), oxaplatino, picoplatino, tetraplatino, satraplatino, platino-DACH, ormaplatino y análogos del mismo, epirubicina, fosfato de etopósido, 9-aminocamptotecina, 10,11-metilenodioxycamptotecina, karenitecina, 9-nitrocamptotecina, vindesina, mostaza de L-fenilalanina, ifosfamidamefosfamida, perfosfamida, trofosfamida, carmustina, semustina, epotilones A-E, tomudex, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, amsacrina, fosfato de etopósido, karenitecina, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir, amantadina, rimantadina, lamivudina, zidovudina, bevacizumab, trastuzumab, rituximab y 5-fluorouracilo, metotrexato, budesonida, sirolimus, vincristina y combinaciones de los mismos, o

15 c) un ARNip.

20 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en el que filtrar la fase solubilizada comprende la concentración, la diafiltración y la filtración terminal de la fase solubilizada.

FIGURA 1

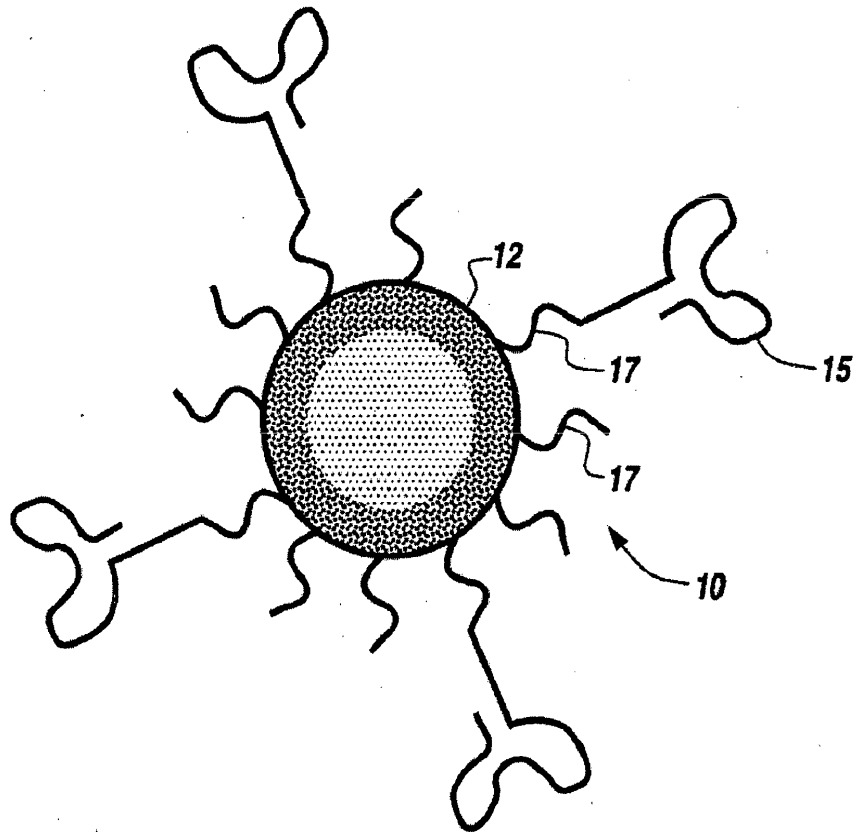


FIGURA 2

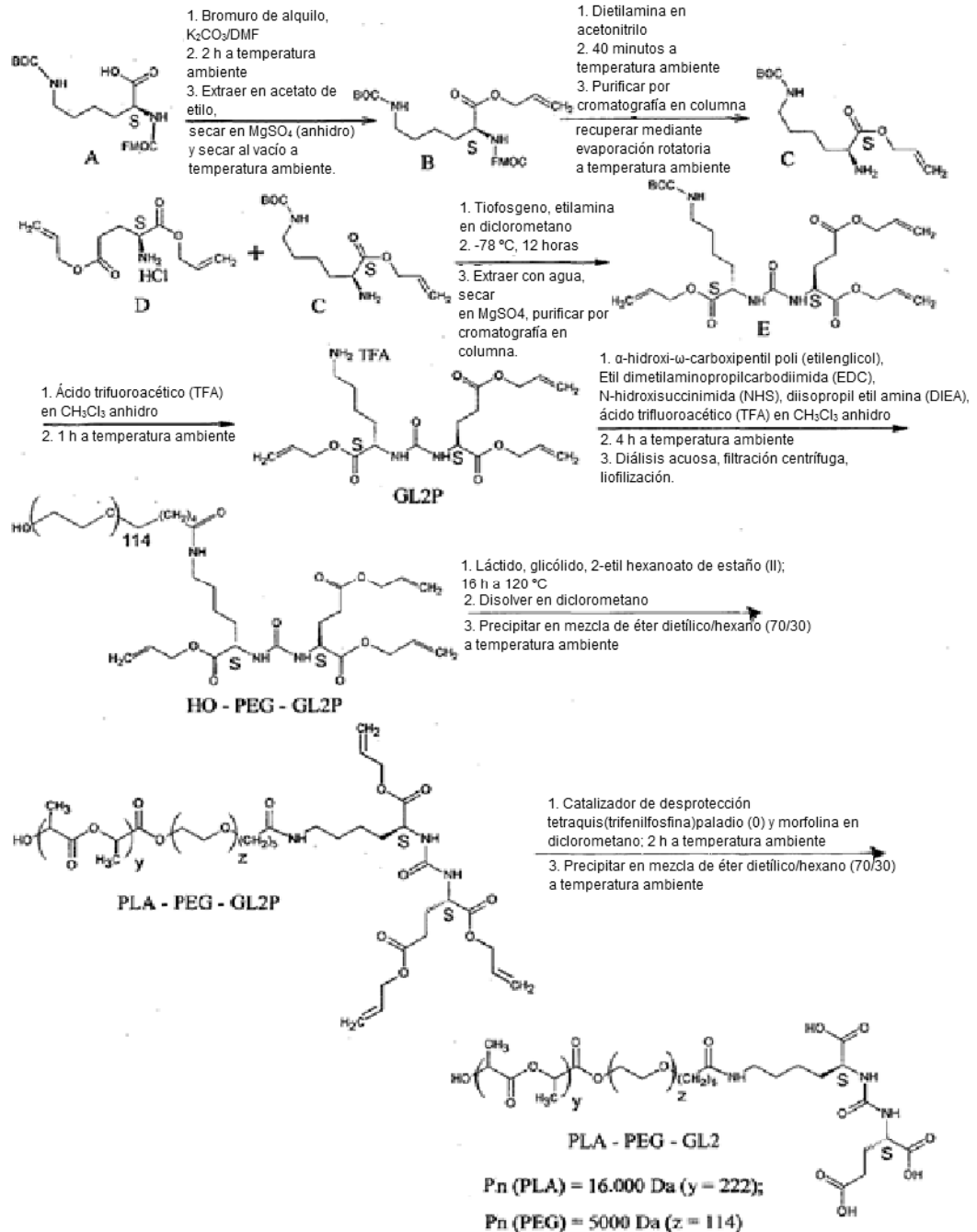


FIGURA 3

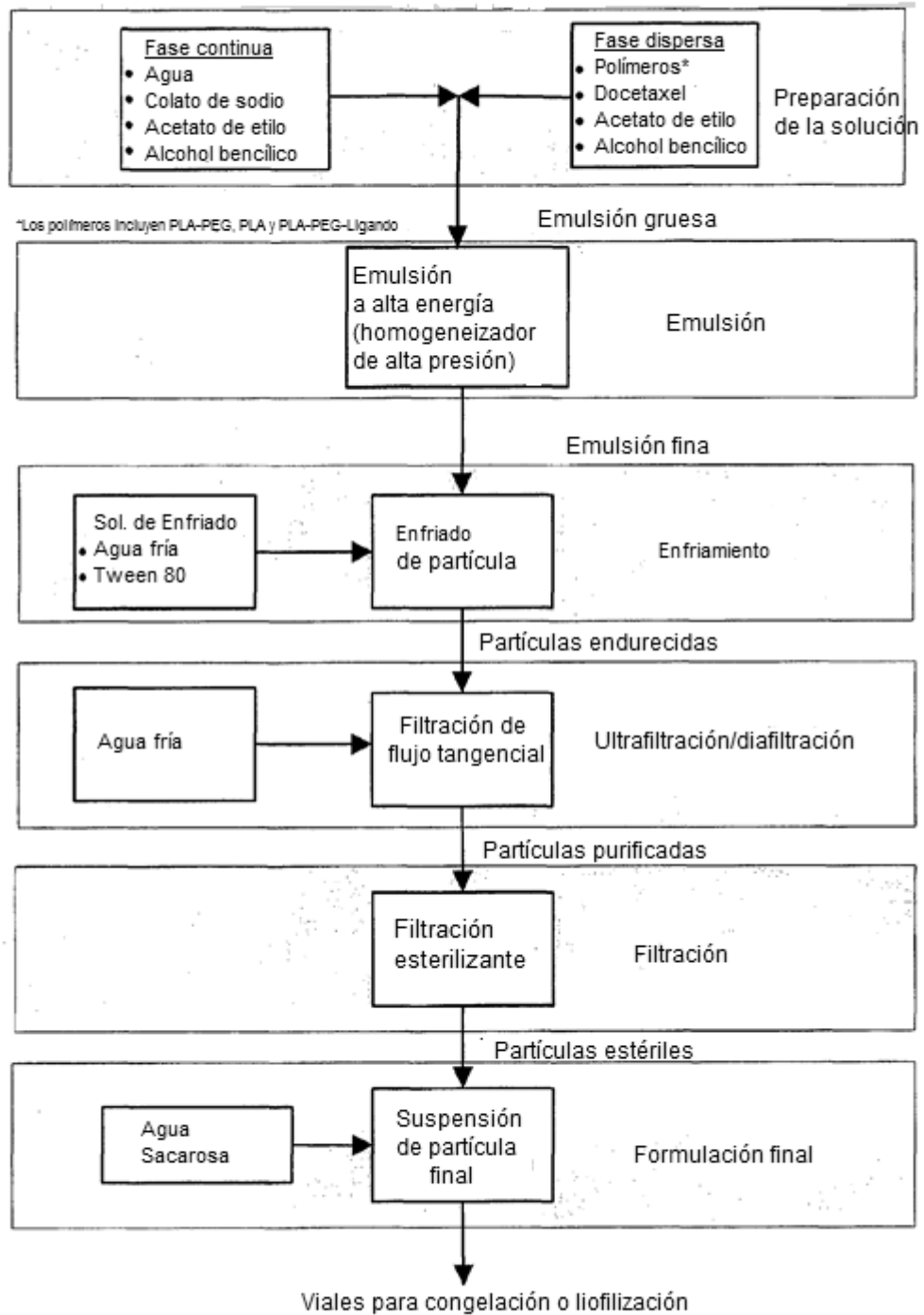


FIGURA 4

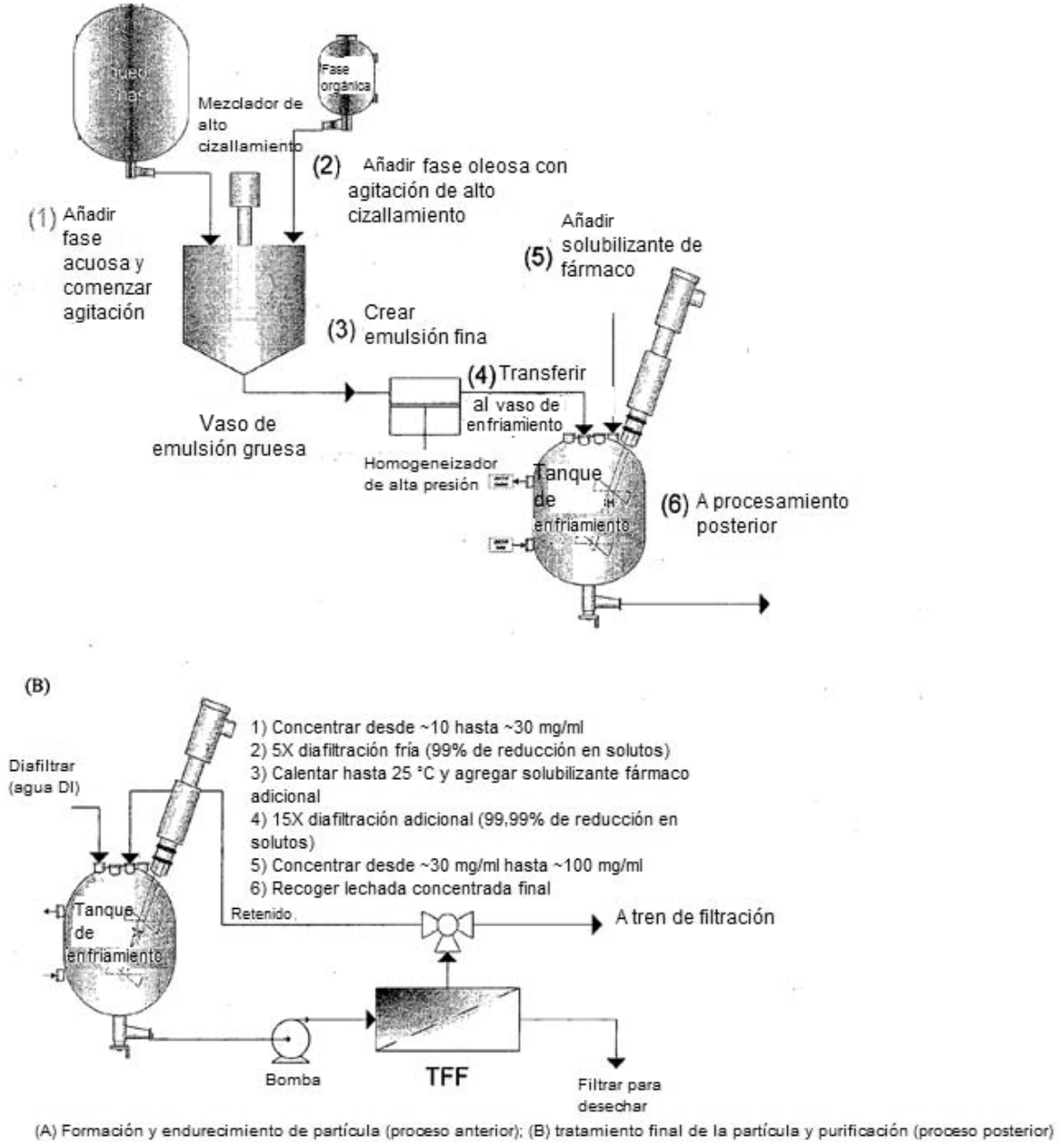


FIGURA 5

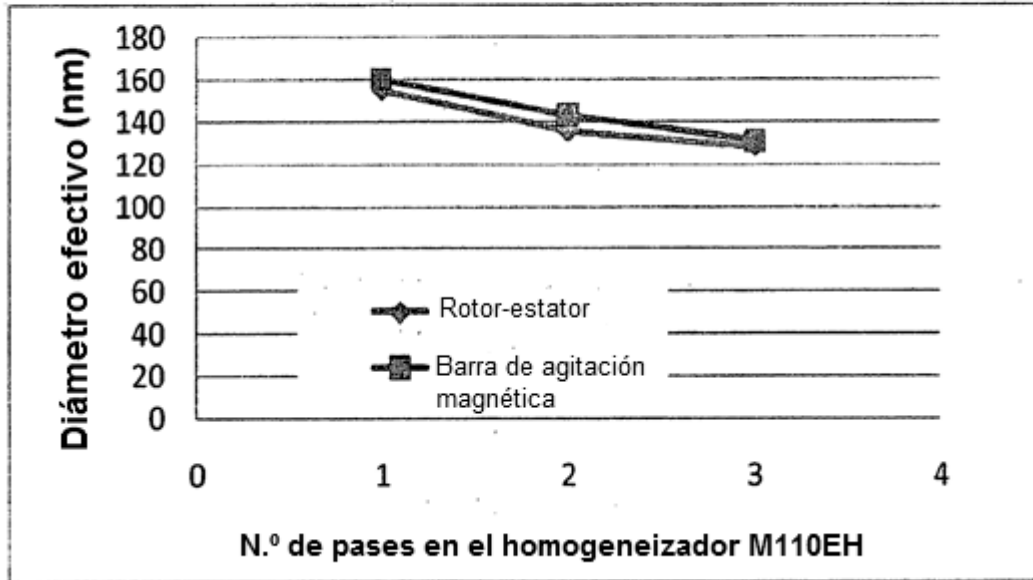


FIGURA 6

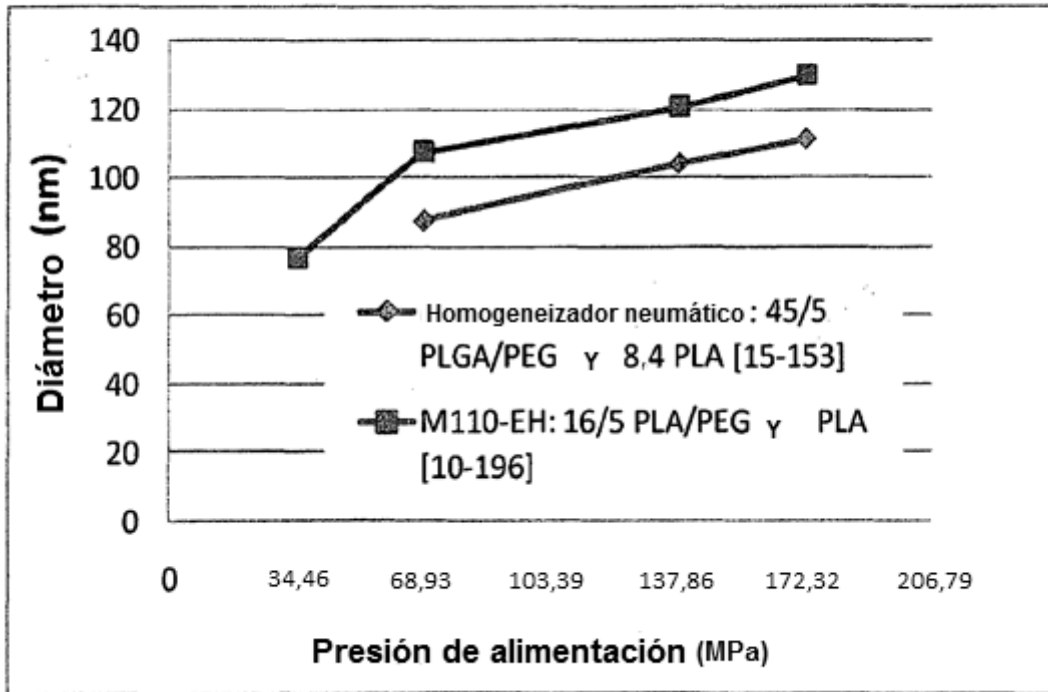


FIGURA 7

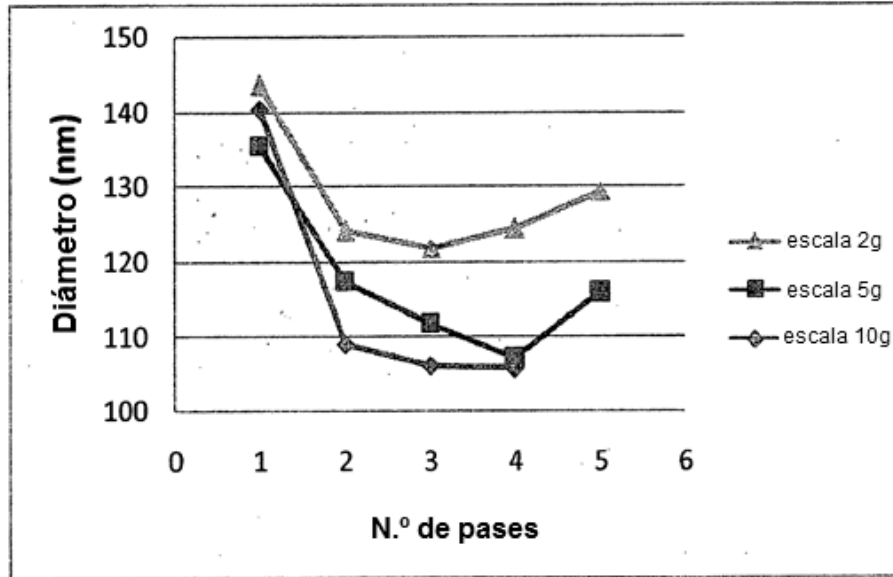


FIGURA 8

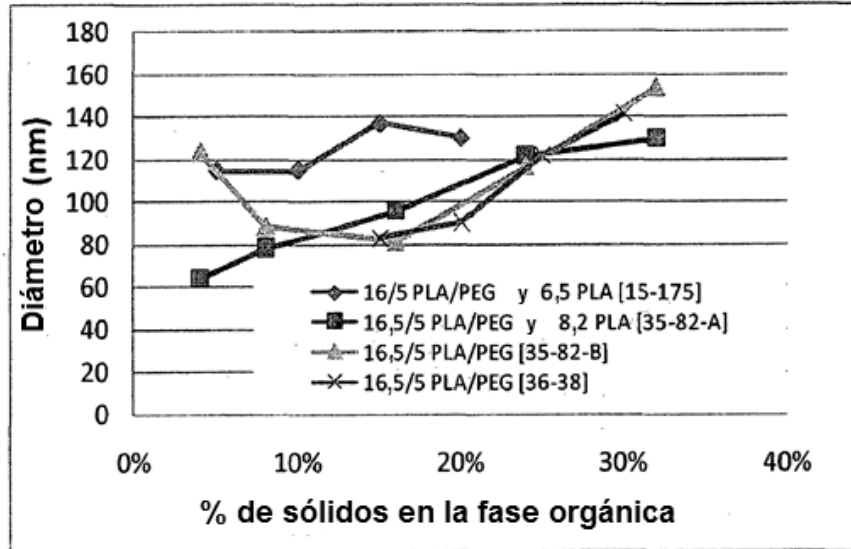


FIGURA 9

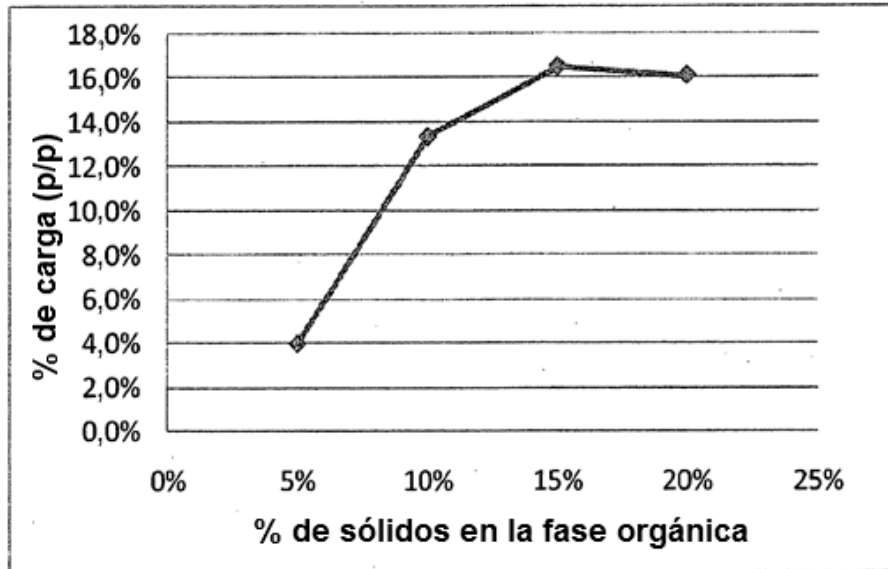


FIGURA 10

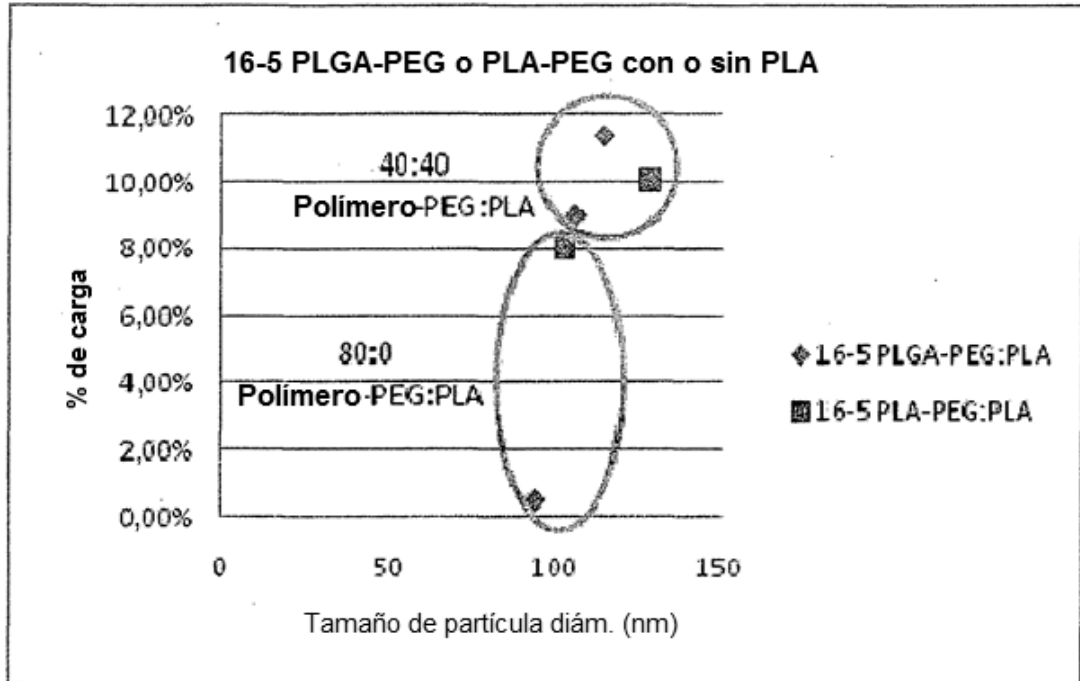


FIGURA 11

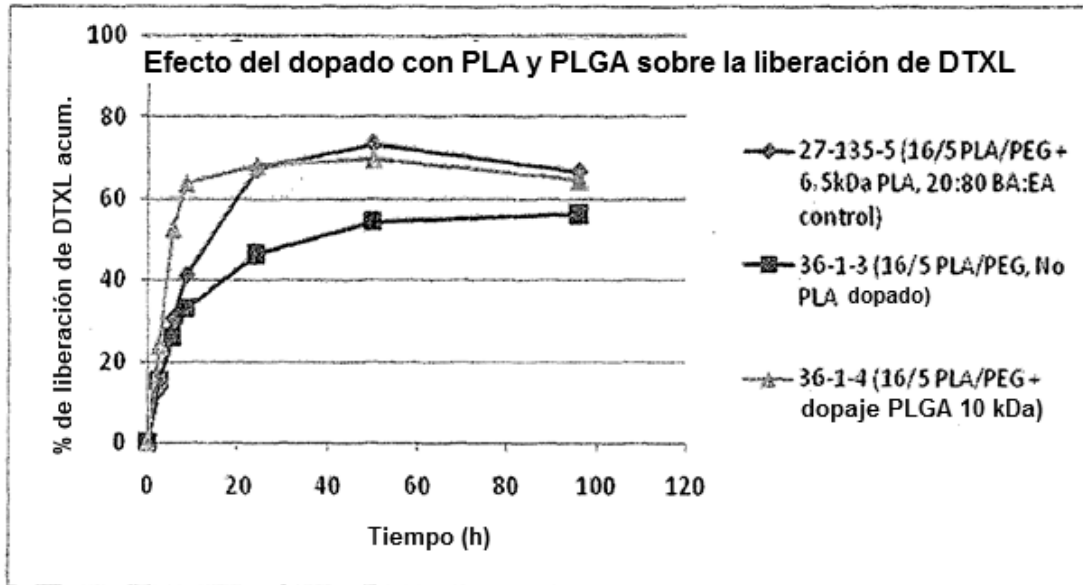


FIGURA 12

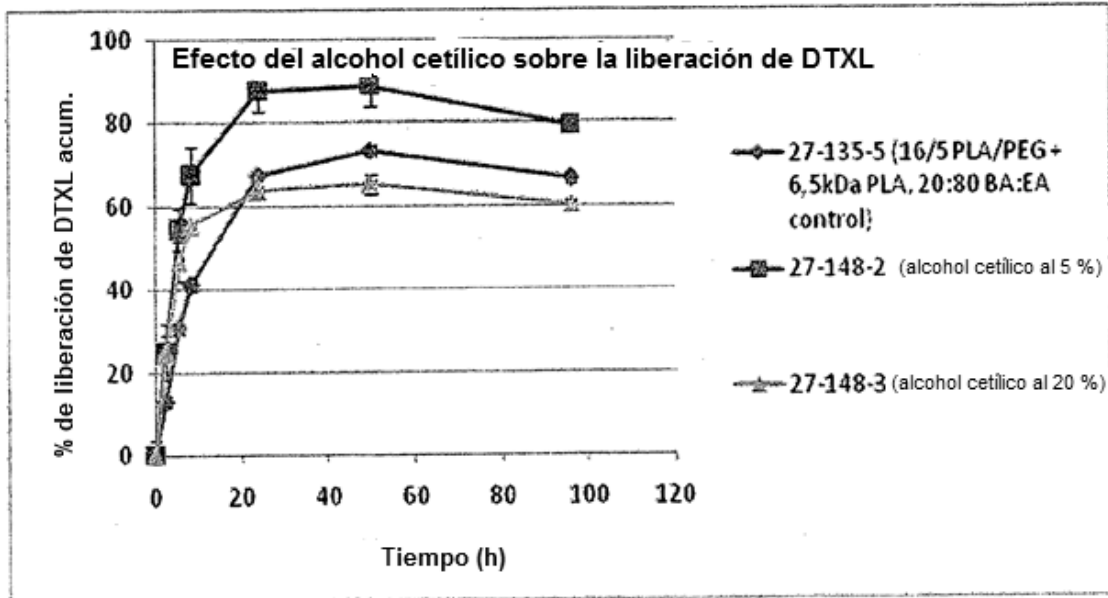


FIGURA 13

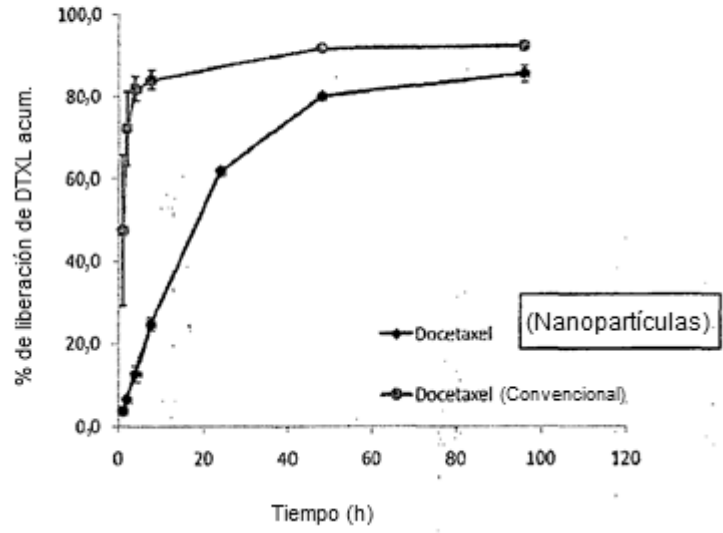


FIGURA 14

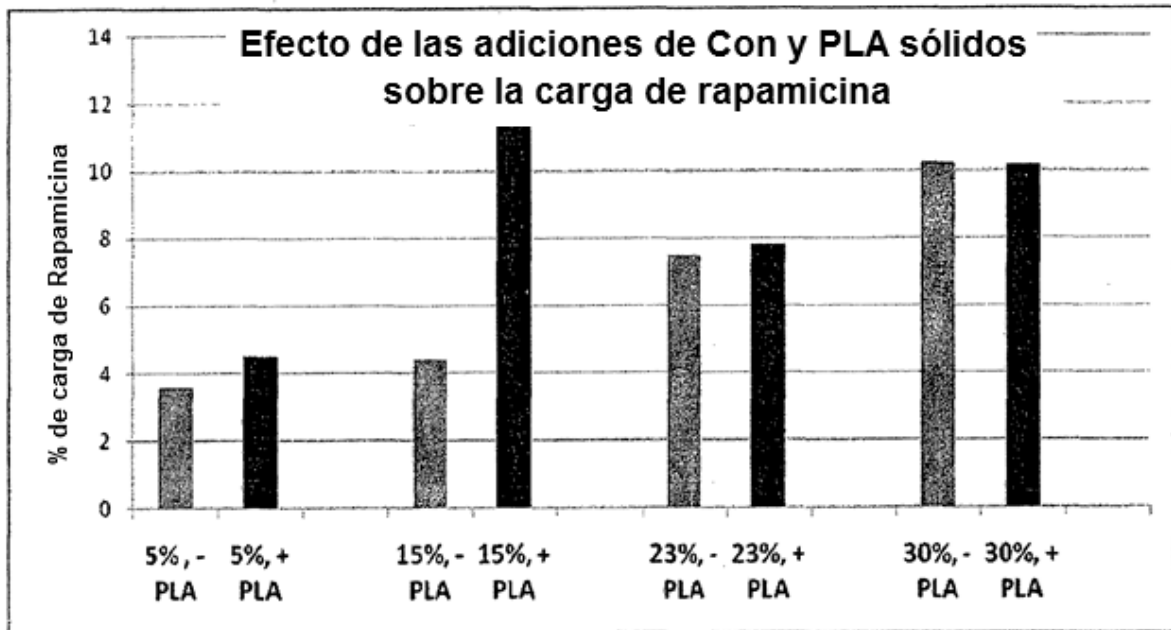


FIGURA 15

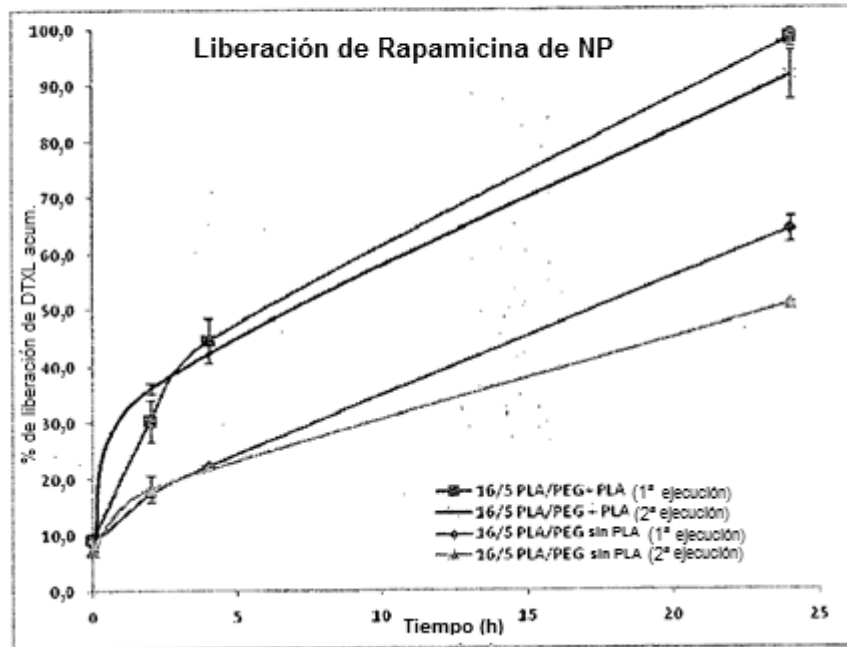


FIGURA 16

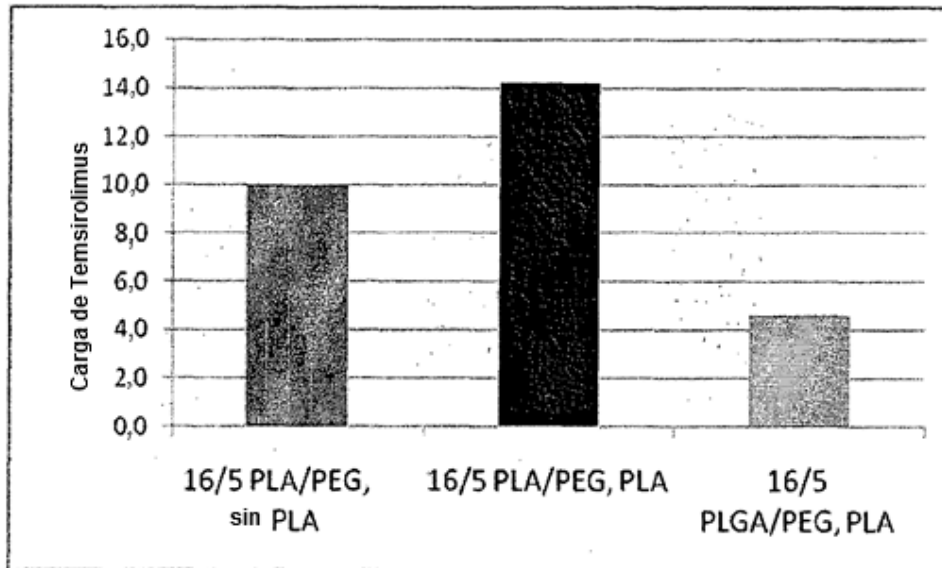


FIGURA 17

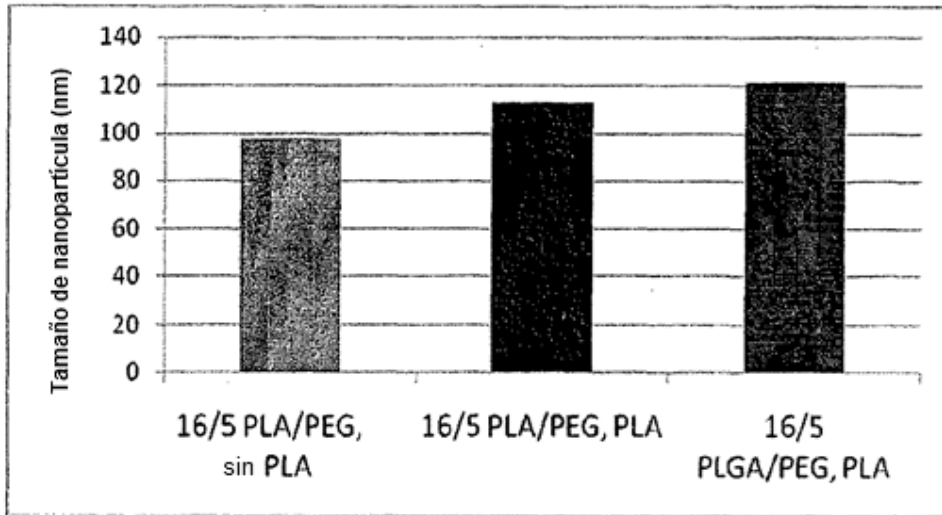


FIGURA 18

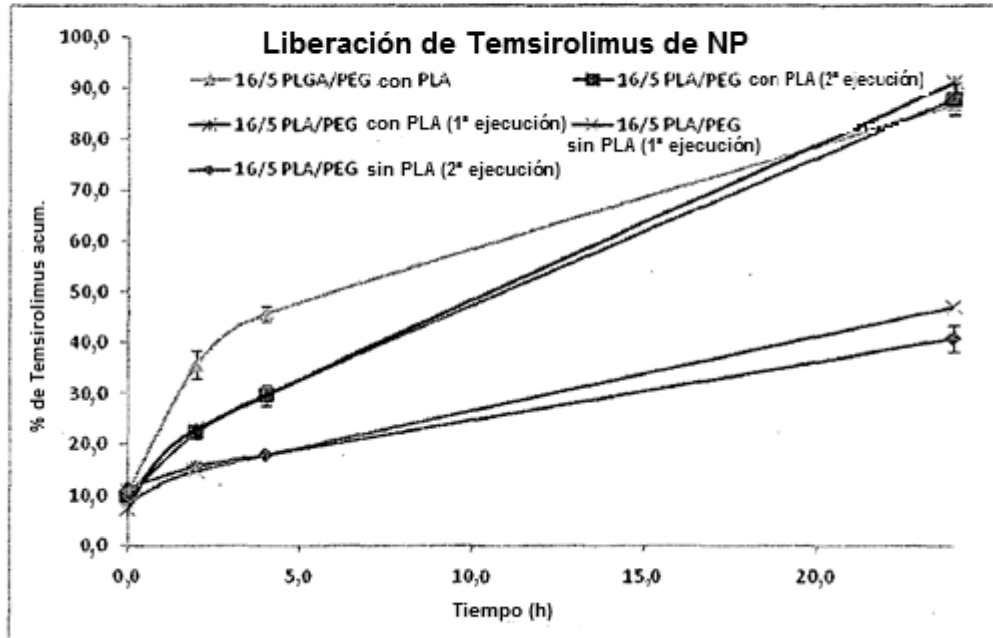


FIGURA 19

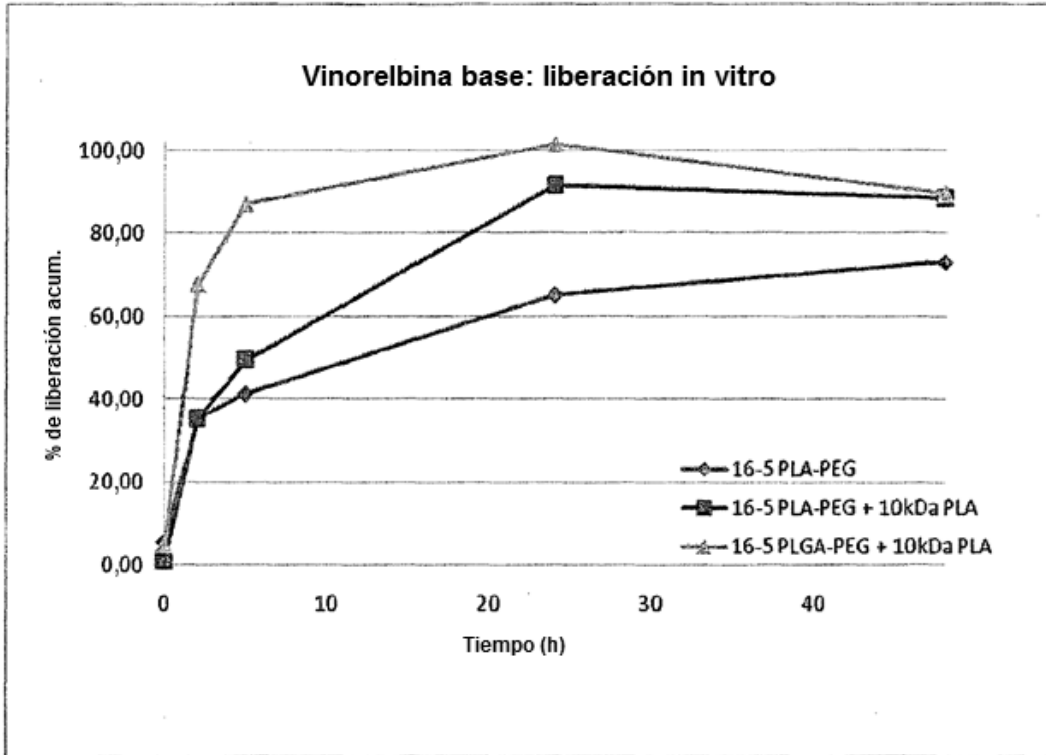


FIGURA 20

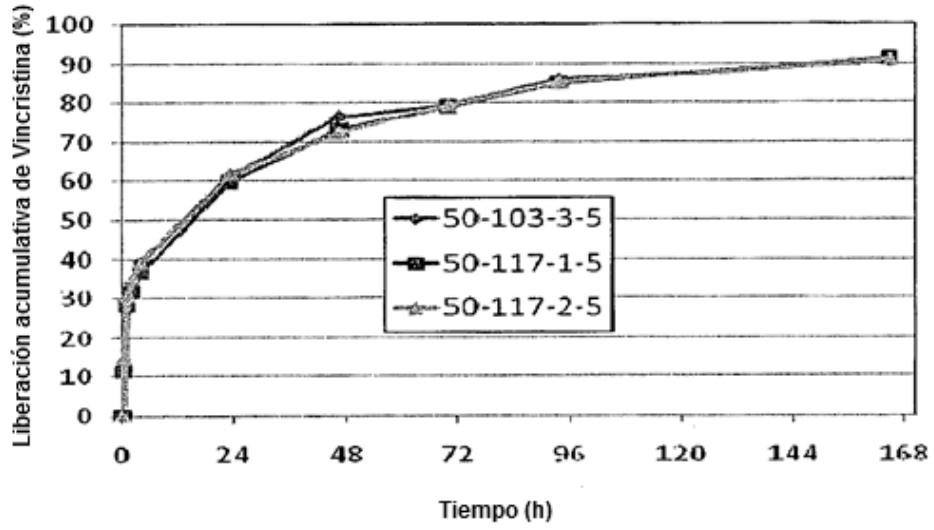


FIGURA 21

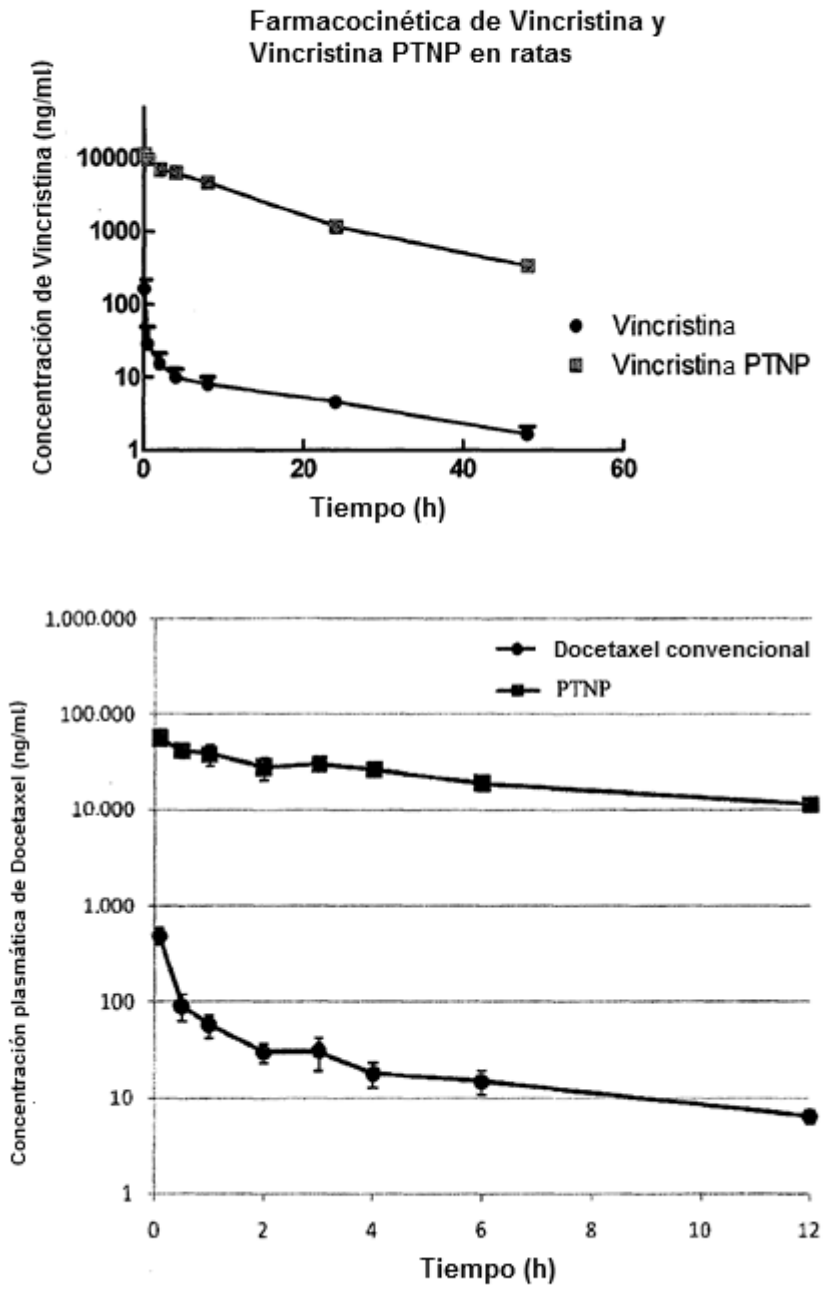


FIGURA 22

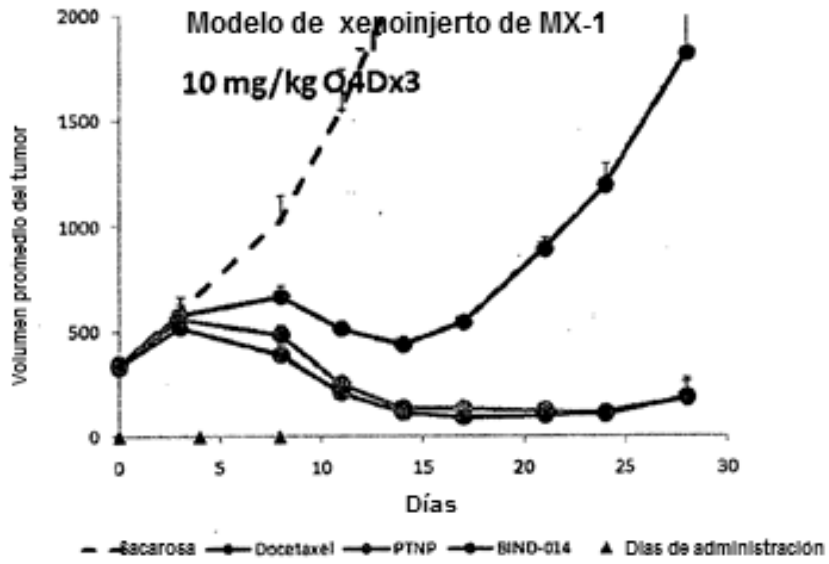


FIGURA 23

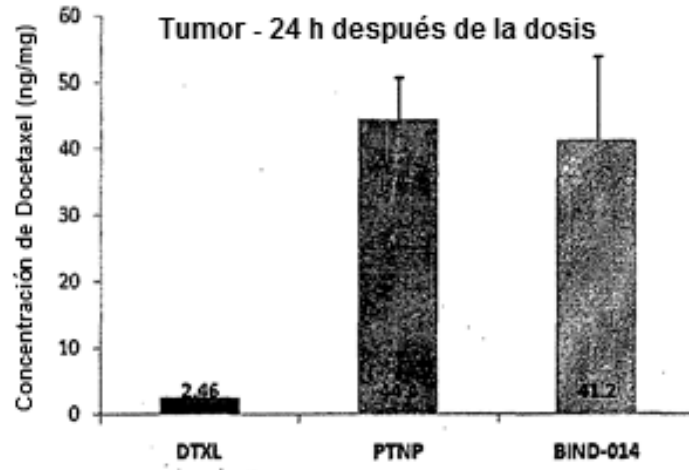


FIGURA 24

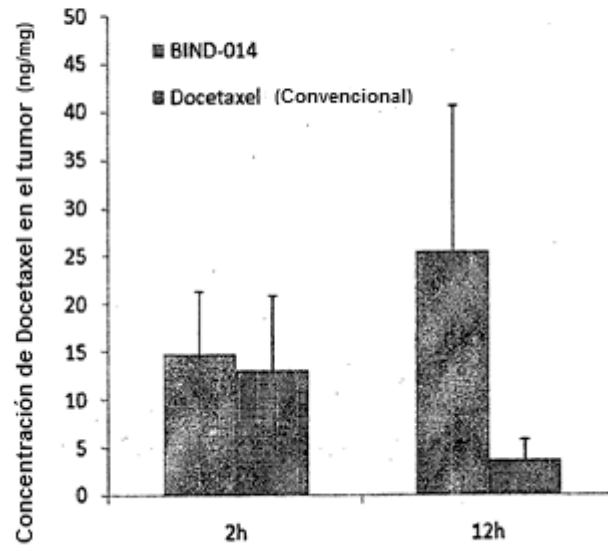


FIGURA 25

