

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 912 286**

51 Int. Cl.:

A61K 47/69 (2007.01)
A61K 47/64 (2007.01)
G01N 33/48 (2006.01)
A61K 33/24 (2009.01)
A61K 38/08 (2009.01)
A61K 47/54 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/62 (2007.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 33/242 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2018 PCT/US2018/012882**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2018 WO18129501**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2018 E 18736294 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.02.2022 EP 3568694**

54 Título: **Nanoconjugados de doxorrubicina-oro dirigido para terapia tumoral**

30 Prioridad:

09.01.2017 US 201762444114 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2022

73 Titular/es:

**THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF
MISSOURI (100.0%)
316 University Hall
Columbia, MO 65211, US**

72 Inventor/es:

**KANNAN, RAGHURAMAN;
ZAMBRE, AJIT y
UPENDRAN, ANANDHI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 912 286 T3

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

DESCRIPCIÓN

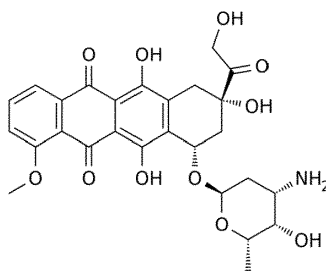
Nanoconjugados de doxorrubicina-oro dirigido para terapia tumoral

CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN

La presente descripción se refiere a nanoconjugados de doxorrubicina-oro que pueden usarse para el tratamiento del cáncer. La divulgación también se refiere a métodos para preparar y usar los nanoconjugados.

ANTECEDENTES

La doxorrubicina (DOX) es un fármaco quimioterapéutico actualmente en uso clínico para varios tumores, incluyendo cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de riñón, y otros.



Doxorrubicina

Uno de los principales efectos secundarios asociados con la doxorrubicina es su cardiotoxicidad. La cardiotoxicidad se puede minimizar mediante la administración dirigida o mediante la reducción de la concentración del fármaco. Sin embargo, la reducción de la cantidad de fármaco administrado reduce correspondientemente la citotoxicidad y la eficacia. Se han desarrollado conjugados de fármaco-anticuerpo para la administración dirigida, pero aún existe la necesidad de desarrollar una plataforma de administración de doxorrubicina con baja cardiotoxicidad y/o alta eficacia. El documento US 2013/138032 A1 describe un conjugado de doxorrubicina-nanopartículas de oro sensible al pH

SUMARIO

La presente descripción proporciona nanoconjugados de oro para la administración dirigida de doxorrubicina. La presente descripción proporciona un nanoconjugado que comprende: una nanopartícula de oro (AuNP), ácido dietilentriaminopentaacético ditiolado (DTDTPA), un péptido terminado en ácido tióctico y doxorrubicina, en donde el DTDTPA está directamente unido a la superficie de la nanopartícula de oro a través de al menos un enlace Au-S., El péptido terminado en ácido tióctico se une directamente a la superficie de la nanopartícula de oro a través de al menos un enlace Au-S, y la doxorrubicina se une al DTDTPA.

En algunas realizaciones, el péptido terminado en ácido tióctico es bombesina tióctica. En algunas realizaciones, la bombesina tióctica tiene una secuencia: Lipoic-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂.

En algunas realizaciones, la doxorrubicina se une al DTDTPA a través de un enlace amida.

La presente descripción también proporciona un proceso para preparar un nanoconjugado descrito en el presente documento, en donde el proceso comprende conjugar una nanopartícula de AuNP-DTDTPA con el péptido terminado en ácido tióctico, en donde el oro en la nanopartícula de oro y el péptido terminado en ácido tióctico están presentes en una relación estequiométrica de aproximadamente 1:0,5 a aproximadamente 1:4. En algunas realizaciones, el oro en la nanopartícula de oro y el péptido terminado en ácido tióctico están presentes en una relación estequiométrica de aproximadamente 1:2.

En algunas realizaciones, el nanoconjugado descrito en el presente documento comprende aproximadamente del 1% a aproximadamente el 40% del péptido terminado en ácido tióctico en peso del nanoconjugado. En algunas realizaciones, el nanoconjugado descrito en el presente documento comprende aproximadamente del 20% al 30% del péptido terminado en ácido tióctico en peso del nanoconjugado.

En algunas realizaciones, el nanoconjugado descrito en el presente documento comprende aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,05% de doxorrubicina en peso del nanoconjugado. En algunas realizaciones, el nanoconjugado descrito en el presente documento comprende aproximadamente el 0,03% de doxorrubicina en peso del nanoconjugado.

En algunas realizaciones, el nanoconjugado tiene un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 110 nm a aproximadamente 140 nm medido por dispersión de luz dinámica (DLS). En algunas realizaciones, el nanoconjugado tiene un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 120 nm a aproximadamente 130 nm medido por dispersión de luz dinámica (DLS).

En algunas realizaciones, el nanoconjugado tiene un valor de potencial zeta de aproximadamente -15 mV a aproximadamente -30 mV. En algunas realizaciones, el nanoconjugado tiene un valor de potencial zeta de aproximadamente -20 mV a aproximadamente -25 mV.

5 La presente descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende el nanoconjugado descrito en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción proporciona además compuestos para su uso en un método para tratar un cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del nanoconjugado descrito en el presente documento a un sujeto que lo necesite.

10 En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloblástica aguda (AML), sarcoma óseo, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, cáncer no Hodgkin linfoma, cáncer de hígado, cáncer de riñón, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, sarcoma de tejidos blandos, tiomas, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga, sarcoma uterino, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas, tumor de Wilms y macroglobulinemia de Waldenstrom.

15 En algunas realizaciones, el nanoconjugado se administra al sujeto mediante inyección.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La siguiente es una breve descripción de los dibujos que se presentan con el propósito de ilustrar las realizaciones ejemplares descritas en el presente documento y no con el propósito de limitar las mismas.

FIG. 1 muestra la síntesis de BBN-AuNP-DTDTA-DOX (NP2-DOX).

20 FIG. 2 muestra una estructura esquemática de BBN-AuNP-DTDTA-DOX (NP2-DOX).

FIG. 3 muestra un gráfico de la titulación de bombesina terminada en ácido tióctico (TA-BBN) con [AuNP(DTDTA)] para determinar la cantidad de TA-BBN que debe acomodar [AuNP(DTDTA)] medida por HPLC. Las relaciones estequiométricas de Au:BBN se presentan en el paréntesis.

25 Figs. 4A y 4B muestran imágenes TEM de nanoconjugados NP1 y NP2, respectivamente. FIG. 3C muestra el espectro de absorción UV-visible de los nanoconjugados NP1 y NP2.

FIG. 5A muestra el espectro de sondeo XPS del nanoconjugado NP2. FIG. 5B muestra el espectro XPS de alta resolución de la región C1s del nanoconjugado NP2.

FIG. 6A muestra el espectro XPS de alta resolución de la región S2p de la nanoconstrucción NP2. FIG. 6B muestra el espectro XPS de alta resolución de la región Au4f de la nanoconstrucción NP2.

30 FIG. 7 muestra el espectro de fluorescencia de la doxorrubicina cuando se excita a 580 nm y la emisión a 590 nm.

FIG. 8 muestra la estimación de la carga de doxorrubicina en los nanoconjugados NP1 y NP2 mediante espectroscopia de fluorescencia.

FIG. 9 muestra el espectro de fluorescencia de los nanoconjugados NP1 y NP1-DOX.

FIG. 10 muestra el espectro de fluorescencia de los nanoconjugados NP2 y NP2-DOX.

35 FIG. 11 muestra el espectro de absorción UV-Visible de NP1, NP2, NP1-DOX y NP2-DOX.

Figs. 12A y 12B muestran estudios de estabilidad *in vitro* de nanoconjugados NP1 y NP2 por espectroscopía de absorción UV-visible. Figs. 12C y 12D estudios de estabilidad *in vitro* de nanoconjugados NP1 y NP2 por tamaño hidrodinámico. Figs. 12E y 12F estudios de estabilidad *in vitro* de nanoconjugados NP1 y NP2 por potencial zeta cuando se incuban en varias soluciones biológicamente relevantes.

40 FIG. 13 muestra valores de IC₅₀ de nanoconjugado NP2 en varias relaciones estequiométricas de Au: BBN (1:0,4, 1:2, 1:4) contra ¹²⁵I-BBN en receptores de GRP que expresan células PC-3 de tumor de próstata.

FIG. 14 muestra citotoxicidad *in vitro* de la doxorrubicina sola, NP1-DOX y NP2-DOX en células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 que no expresan GRP.

45 FIG. 15 compara el efecto de NP1-DOX, NP2-DOX con doxorrubicina sola en células de cáncer de mama humano que no expresan GRP.

FIG. 16 muestra citotoxicidad *in vitro* de la doxorrubicina sola, NP1-DOX y NP2-DOX en células de cáncer de próstata humano PC3 que expresan GRP.

FIG. 17 compara el efecto de NP1-DOX, NP2-DOX con doxorubicina sola en células de cáncer de próstata humano que expresan GRP.

FIG. 18 compara valores de IC₅₀ de doxorubicina en los nanoconjugados (NP1-DOX y NP2-DOX) con doxorubicina sola en células cancerosas humanas que expresan GRP (PC3).

- 5 FIG. 19 compara valores de IC₅₀ de doxorubicina en los nanoconjugados (NP1-DOX y NP2-DOX) con doxorubicina sola en células cancerosas humanas que no expresan GRP (MDA-MB-231).

FIG. 20 compara la diferencia del porcentaje de muerte celular para NP1-DOX y NP2-DOX en células cancerosas humanas que expresan GRP (PC3) y que no expresan GRP (MDA-MB-231)

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 10 Los receptores del péptido liberador de gastrina (GRP) se sobreexpresan en una variedad de células cancerosas humanas, tales como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon y otros tipos de cáncer. Se sabe que el péptido bombesina y sus análogos se dirigen a los receptores de GRP. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un sistema de administración de nanopartículas multicomponente (nanoconjugado) que comprende nanopartículas de oro (AuNP), un agente de direccionamiento (p. ej., bombesina (BBN)) y doxorubicina
- 15 (DOX) como agente terapéutico contra el cáncer. Las nanopartículas de oro se estabilizan con ácido dietilentriaminopentaacético ditiolado (DTDTPA) y pueden tener una estructura multicapa. Por tanto, en ciertas realizaciones, el nanoconjugado puede ser BBN-AuNP(DTDTPA)-DOX. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* realizados en células de cáncer de mama demostraron sorprendentemente que BBN-AuNP(DTDTPA)-DOX es mucho más potente en comparación con la doxorubicina libre.

- 20 Son posibles varios ejemplos y realizaciones del objeto inventivo descrito aquí y serán evidentes para un experto en la materia, dado el beneficio de esta descripción. En esta descripción, la referencia a "algunas realizaciones", "ciertas realizaciones" y frases similares significa que esas realizaciones son ejemplos no limitativos del objeto de la invención, y existen realizaciones alternativas que no están excluidas.

- 25 Los artículos "un", "una" y "el/la" se utilizan aquí para referirse a uno o más de uno (*es decir.*, a al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento. El término "o" significa "y/o". Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (*es decir.*, que significan "que incluye, pero no se limita a").

- 30 La palabra "que comprende" se usa de manera consistente con su significado abierto, *es decir.*, para indicar que un producto o proceso determinado también puede tener características o elementos adicionales además de los expresamente descritos. Se entiende que siempre que se describan realizaciones con el lenguaje "que comprende", también se contemplan realizaciones análogas descritas en términos de "que consisten en" y/o "que consisten esencialmente en" y están dentro del alcance de esta descripción.

- 35 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa $\pm 10\%$ del valor indicado. Únicamente a modo de ejemplo, una composición que comprenda "aproximadamente el 30 por ciento en peso" de un compuesto podría incluir desde el 27 por ciento en peso del compuesto incluyendo hasta el 33 por ciento en peso del compuesto.

- 40 Como se usa en el presente documento, el término "nanoconjugado" se refiere a un nanomaterial que comprende una nanopartícula de oro y otros componentes, tales como un agente estabilizador, un agente de direccionamiento y un agente terapéutico. En determinadas realizaciones, el agente estabilizador y el agente de direccionamiento pueden unirse directamente a la superficie de las nanopartículas de oro a través de uno o más enlaces covalentes o no covalentes. Algunos componentes, tal como el agente terapéutico, pueden unirse a la nanopartícula de oro a través de otro componente, tal como el agente estabilizador.

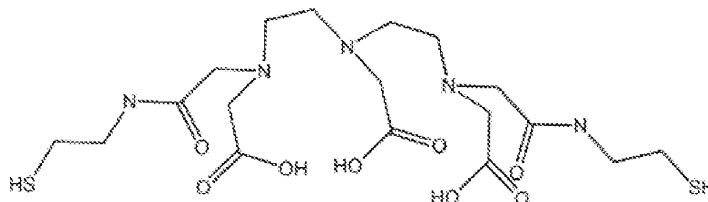
Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad eficaz, cuando se administra a un paciente, para proporcionar el beneficio terapéutico pretendido. La cantidad que es "aficaz" puede variar de un sujeto a otro, dependiendo de la edad y el estado general del individuo, y similares.

- 45 En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un nanoconjugado que comprende: una nanopartícula de oro (AuNP), ácido dietilentriaminopentaacético ditiolado (DTDTPA), un péptido terminado en ácido tióctico y doxorubicina, en donde el DTDTPA está directamente unido a la superficie de la nanopartícula de oro a través de al menos un enlace Au-S, el péptido terminado en ácido tióctico está directamente unido a la superficie de la nanopartícula de oro a través de al menos un enlace Au-S, y la doxorubicina está unida al DTDTPA.

- 50 En ciertas realizaciones, el nanoconjugado descrito en el presente documento consiste esencialmente en: una nanopartícula de oro (AuNP), ácido dietilentriaminopentaacético ditiolado (DTDTPA), un péptido terminado en ácido tióctico y doxorubicina, en donde el DTDTPA está directamente unido a la superficie de la nanopartícula de oro a través de al menos un enlace Au-S, el péptido terminado en ácido tióctico está directamente unido a la superficie de la nanopartícula de oro a través de al menos un enlace Au-S, y la doxorubicina está unida al DTDTPA.

Las nanopartículas de oro estabilizadas con DTDTPA, *es decir.*, AuNP-DTDTPA, son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el documento WO 2015/103028 y Deboutiere et al., Advan. Funt. Mater. 2006, 16:2330-39 describir la preparación y el uso de AuNP-DTDTPA.

La estructura química de DTDTPA se muestra a continuación. Las moléculas de DTDTPA se pueden unir a la superficie de las nanopartículas de oro a través de uno o dos enlaces Au-S.



Sin pretender limitar la teoría, se cree que los bucles de DTDTPA que rodean la superficie de AuNP pueden incluir una, dos, tres, cuatro, cinco o más moléculas de DTDTPA. Por ejemplo, en algunas realizaciones y de nuevo sin desear limitarse a una teoría en particular, se cree que ambos grupos tiol de una molécula de DTDTPA dada pueden formar un enlace Au-S con la superficie de AuNP, formando así un bucle con una molécula de DTDTPA. En otra realización, un grupo tiol de una molécula de DTDTPA dada puede formar un enlace Au-S con la superficie de AuNP, mientras que el segundo grupo tiol puede formar un enlace disulfuro intermolecular (S-S) con una segunda molécula de DTDTPA. La segunda molécula de DTDTPA puede unirse a otra molécula de DTDTPA mediante un enlace disulfuro, o puede unirse a la superficie de AuNP mediante un enlace Au-S formando así un bucle que consta de dos o más moléculas de DTDTPA. Dependiendo de cómo se organicen las moléculas de DTDTPA, las nanopartículas estabilizadas pueden contener una capa orgánica multicapa de moléculas de ácido pentaacético en la superficie de las AuNP. Véase Deboutiere et al., Advan. Funt. Mater. 2006, 16:2330-39; y **Figura 2**.

En algunas realizaciones, el nanoconjugado descrito en el presente documento comprende aproximadamente del 10% al 60% de DTDTPA en peso del nanoconjugado. En algunas realizaciones, el nanoconjugado comprende aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 41%, aproximadamente 42%, aproximadamente 43%, aproximadamente 44%, aproximadamente 45%, aproximadamente 46%, aproximadamente 47%, aproximadamente 48%, aproximadamente 49%, aproximadamente 50%, aproximadamente 51%, aproximadamente 52%, aproximadamente 53%, aproximadamente 54%, aproximadamente 55% o aproximadamente 60% de DTDTPA por peso del nanoconjugado, p. ej., alrededor del 45%, o un intervalo entre cualquiera de los dos valores anteriores, p. ej., aproximadamente 30% a aproximadamente 60%, o aproximadamente 40% a aproximadamente 50%. En algunas realizaciones, el nanoconjugado comprende aproximadamente el 45% de DTDTPA en peso del nanoconjugado.

En realizaciones típicas, y como se discutió anteriormente, el nanoconjugado descrito en el presente documento puede comprender un péptido terminado en ácido tióctico como agente de dirección. En ciertas realizaciones, el péptido dirigido puede ser un péptido de bombesina. El péptido bombesina se puede usar para funcionalizar nanomateriales de oro para atacar ciertas células tumorales. Véase Chanda et al., Nano Lett. 2009, 9(5): 1798-1805; Chanda et al. PNAS 2010, 107(19): 8760-8765; Suresh et al., Bioconjugate Chem. 2014, 25, 1565-1579; y Silva et al., Bioconjugate Chem. 2016, 27, 1153-1164. El péptido bombesina de 14 aminoácidos aislado del anfibio Bombina de la piel y los péptidos liberadores de gastrina (GRP) relacionados presentan una respuesta mejorada en una variedad de tejidos tumorales, p. ej., en cáncer de células pequeñas de pulmón, próstata, mama y colon. Se ha informado que los análogos de bombesina con estructuras modificadas presentaron una afinidad similar o incluso mayor por los receptores de GRP. Véase, p. ej., Chanda et al., Nano Lett. 2009, 9(5): 1798-1805 y las referencias citadas en el mismo. En ciertas realizaciones descritas en el presente documento, se usó un análogo de bombesina truncado (BBN) de siete aminoácidos, mostrado en la Figura 1, como agente de direccionamiento.

En algunas realizaciones, el péptido terminado en ácido tióctico puede ser bombesina terminada en ácido tióctico (TA-BBN, denominada alternativamente como BBN en el presente documento) que tiene una secuencia: Lipoic-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂.

En algunas realizaciones, el péptido terminado en ácido tióctico (p. ej., TA-BBN) se puede unir directamente a la superficie de la nanopartícula de oro a través de uno o dos enlaces Au-S.

En algunas realizaciones, el nanoconjugado descrito en el presente documento comprende entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 40% del péptido terminado en ácido tióctico en peso del nanoconjugado. En algunas realizaciones, el nanoconjugado comprende aproximadamente 1%, aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 11%, aproximadamente 12%, aproximadamente 13%, aproximadamente 14%, aproximadamente 15%, aproximadamente 16%, aproximadamente 17%, aproximadamente 18%, aproximadamente 19%, aproximadamente 20%, aproximadamente 21%, aproximadamente 22%, aproximadamente 23%, aproximadamente 24%, aproximadamente 25%, aproximadamente 26%, aproximadamente 27%, aproximadamente 28%, aproximadamente 29%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, o aproximadamente 40% del péptido

terminado en ácido tióctico por peso del nanoconjugado, p. ej., aproximadamente 20% o aproximadamente 25%, o un intervalo entre cualquiera de los dos valores anteriores, p. ej., aproximadamente 10% a aproximadamente 30%, aproximadamente 20% a aproximadamente 30%, o aproximadamente 15% a aproximadamente 25%. En algunas realizaciones, el nanoconjugado comprende aproximadamente el 20% o aproximadamente el 25% del péptido terminado en ácido tióctico en peso del nanoconjugado.

En algunas realizaciones, la construcción AuNP-DTDTA-BBN, que puede unirse posteriormente con doxorubicina, puede prepararse mediante un proceso que comprende conjugar nanopartículas de AuNP-DTDTA con el péptido terminado en ácido tióctico, en donde el oro en la nanopartícula de oro y el ácido tióctico el péptido terminado puede estar presente en la reacción de conjugación en una relación estequiométrica de aproximadamente 1:0,5 a aproximadamente 1:4. La relación estequiométrica utilizada en el presente documento se refiere a una relación molar.

En algunas realizaciones, la relación estequiométrica del oro en la nanopartícula de oro al péptido terminado en ácido tióctico utilizado en la reacción de conjugación puede ser de aproximadamente 1:0,75, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:1,5, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1: 2,5, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:3,5 o aproximadamente 1:4, p.ej., aproximadamente 1:2, o un intervalo entre cualquiera de las dos relaciones anteriores, p.ej., aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1,5 a aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:1,5 a aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:1,5 a aproximadamente 1:2,5, o aproximadamente 1:1,5 a aproximadamente 1:2.

En algunas realizaciones, la cantidad del péptido terminado en ácido tióctico usado en la reacción de conjugación está en una proporción con el oro en la nanopartícula de oro de al menos aproximadamente 1:1,5, al menos aproximadamente 1:2, al menos aproximadamente 1:2,5, o al menos alrededor de 1:3.

En algunas realizaciones, la proporción estequiométrica del oro en la nanopartícula de oro al péptido terminado en ácido tióctico usado en la reacción de conjugación es de aproximadamente 1:2.

Típicamente, la doxorubicina en el nanoconjugado se une al DTDTA a través de un enlace amida, formado entre un grupo carboxilato del DTDTA y el grupo amino de la doxorubicina.

En algunas realizaciones, el nanoconjugado descrito en el presente documento comprende de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,05% de doxorubicina en peso del nanoconjugado. En algunas realizaciones, el nanoconjugado puede comprender aproximadamente 0,01%, aproximadamente 0,015%, aproximadamente 0,02%, aproximadamente 0,025%, aproximadamente 0,03%, aproximadamente 0,035%, aproximadamente 0,04%, aproximadamente 0,045% o aproximadamente 0,05% de doxorubicina en peso del nanoconjugado, p.ej., alrededor de 0,03%, o un intervalo entre cualquiera de los dos valores anteriores, p.ej., aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,04%, aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,03%, aproximadamente 0,02% a aproximadamente 0,05%, aproximadamente 0,02% a aproximadamente 0,04%, aproximadamente 0,02% a aproximadamente 0,03%, o aproximadamente 0,025% a 0,035%. En algunas realizaciones, el nanoconjugado comprende aproximadamente el 0,03% de doxorubicina en peso del nanoconjugado.

Los nanoconjugados se pueden caracterizar por su diámetro hidrodinámico (*es decir*, tamaño hidrodinámico). En algunas realizaciones, el nanoconjugado descrito en el presente documento tiene un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 150 nm o de aproximadamente 110 nm a aproximadamente 140 nm medido mediante dispersión de luz dinámica (DLS). En algunas realizaciones, el nanoconjugado tiene un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 100 nm, aproximadamente 110 nm, aproximadamente 115 nm, aproximadamente 120 nm, aproximadamente 125 nm, aproximadamente 130 nm, aproximadamente 135 nm, aproximadamente 140 nm, aproximadamente 145 nm o aproximadamente 150 nm medido por dispersión de luz dinámica (DLS), p.ej., aproximadamente 125 nm, o un intervalo entre cualquiera de los dos valores anteriores, p. ej., aproximadamente 120 nm a aproximadamente 125 nm, aproximadamente 120 nm a aproximadamente 130 nm, o aproximadamente 125 nm a aproximadamente 130 nm. En algunas realizaciones, el nanoconjugado tiene un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 125 nm medido por dispersión de luz dinámica (DLS).

Los nanoconjugados también se pueden caracterizar por su potencial zeta. En algunas realizaciones, el nanoconjugado descrito en el presente documento tiene un valor de potencial zeta de aproximadamente -15 mV a aproximadamente -30 mV. En algunas realizaciones, el nanoconjugado tiene un valor de potencial zeta de aproximadamente -15 mV, aproximadamente -16 mV, aproximadamente -17 mV, aproximadamente -18 mV, aproximadamente -19 mV, aproximadamente -20 mV, aproximadamente -21 mV, aproximadamente -22 mV, aproximadamente -23 mV, aproximadamente -24 mV, aproximadamente -25 mV, aproximadamente -26 mV, aproximadamente -27 mV, aproximadamente -28 mV, aproximadamente -29 mV, o aproximadamente -30 mV, por ejemplo, aproximadamente -23 mV, o un intervalo entre cualquiera de los dos valores anteriores, p.ej., de aproximadamente -15 mV a aproximadamente -25 mV, de aproximadamente -20 mV a aproximadamente -25 mV, o de aproximadamente -20 mV a aproximadamente -30 mV. En algunas realizaciones, el nanoconjugado tiene un valor de potencial zeta de aproximadamente -20 mV a aproximadamente -25 mV.

- En una realización, el nanoconjugado descrito en el presente documento consiste esencialmente de una nanopartícula de oro (AuNP), ácido dietilentriaminopentaacético ditiolado (DTDTPA), un péptido de bombesina terminado en ácido tióctico (TA-BBN) y doxorubicina, en donde el DTDTPA está directamente unido a la superficie de la nanopartícula de oro a través de al menos un enlace Au-S, el TA-BBN está directamente unido a la superficie de la nanopartícula de oro a través de al menos un enlace Au-S, y la doxorubicina está unida al DTDTPA; en donde el precursor del nanoconjugado AuNP-DTDTPA-BBN se prepara mediante un proceso que comprende conjugar nanopartículas de AuNP-DTDTPA con TA-BBN, en donde el oro en la nanopartícula de oro y el péptido de bombesina terminado en ácido tióctico están presentes en la reacción de conjugación en una relación estequiométrica de aproximadamente 1:2.
- En determinadas realizaciones, el nanoconjugado descrito anteriormente puede comprender una nanopartícula de oro (AuNP), ácido dietilentriaminopentaacético ditiolado (DTDTPA), un péptido de bombesina terminado en ácido tióctico (TA-BBN) y doxorubicina, en donde el nanoconjugado comprende aproximadamente 15% a aproximadamente 25% de TA-BBN, aproximadamente 25% a aproximadamente 35% de DTDTPA, y aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,05% de doxorubicina, en peso del nanoconjugado.
- En otra realización, el nanoconjugado descrito en el presente documento puede comprender una nanopartícula de oro (AuNP), ácido dietilentriaminopentaacético ditiolado (DTDTPA), un péptido de bombesina terminado en ácido tióctico (TA-BBN) y doxorubicina, en donde el nanoconjugado comprende aproximadamente el 20% de TA-BBN, aproximadamente el 30% de DTDTPA y aproximadamente el 0,03% de doxorubicina, en peso del nanoconjugado.
- Aunque el péptido dirigido está normalmente presente en los nanoconjugados descritos en el presente documento, en algunas realizaciones, el nanoconjugado descrito en el presente documento no comprende un péptido terminado en ácido tióctico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el nanoconjugado comprende una nanopartícula de oro (AuNP), ácido dietilentriaminopentaacético ditiolado (DTDTPA) y doxorubicina, en donde el DTDTPA está directamente unido a la superficie de la nanopartícula de oro a través de al menos un enlace Au-S, y doxorubicina está unido al DTDTPA como se describe en otra parte del presente documento. Esta construcción se denomina en el presente documento AuNP(DTDTPA)-DOX.
- En determinadas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para preparar el nanoconjugado descrito en el presente documento, comprendiendo el método acoplar doxorubicina con una nanopartícula funcionalizada con DTDTPA. En algunas realizaciones, el método comprende (1) conjugar AuNP-DTDTPA con un péptido terminado en ácido tióctico (p. ej., TA-BBN) para formar un conjugado; y (2) acoplar el conjugado con doxorubicina para formar el nanoconjugado.
- En algunas realizaciones, la etapa de acoplamiento forma un enlace amida entre un grupo carboxilo de DTDTPA y el grupo amina de DOX. En algunas realizaciones, la etapa de acoplamiento tiene lugar utilizando un agente activador, tales como EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida).
- En determinadas realizaciones, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende el nanoconjugado descrito en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- En determinadas realizaciones, la presente descripción también proporciona compuestos para su uso en un método para tratar un cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del nanoconjugado descrito en el presente documento a un sujeto que lo necesite. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.
- En algunas realizaciones, el cáncer tratado puede seleccionarse del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloblástica aguda (AML), sarcoma óseo, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, Linfoma de No-Hodgkin, cáncer de hígado, cáncer de riñón, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas), sarcoma de tejidos blandos, tiomas, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga (p. ej., cáncer de vejiga de células de transición), sarcoma uterino, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, tumor de Wilms y macroglobulinemia de Waldenström.
- En algunas realizaciones, el cáncer tratado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento está asociado con la sobreexpresión de GRP. En algunas realizaciones, el cáncer asociado con la sobreexpresión de GRP puede ser cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de páncreas.
- El nanoconjugado o la composición farmacéutica descrita en el presente documento se puede administrar a un sujeto mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el nanoconjugado o la composición farmacéutica de la presente descripción se puede administrar por inyección o por vía oral.

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos de las composiciones y métodos descritos en el presente documento y no pretenden limitar el alcance del mismo.

EJEMPLOS

Métodos generales: Los materiales utilizados para la síntesis de nanopartículas de oro (AuNP) se obtuvieron de proveedores estándar. Trihidrato de ácido tetracloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), borohidruro de sodio (NaBH_4), ácido dietilentriaminopentacético (DTPA), anhídrido acético, piridina anhidra, clorhidrato de 2-aminoetanotiol, trietilamina, ácido acético glacial (CH_3COOH), nitrato de galio ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$), hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl), metanol (MeOH), éter dietílico (Et_2O), cloruro de sodio (NaCl), dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO), se adquirieron de Aldrich y se usaron tal como se recibieron. Para la preparación de disoluciones acuosas y para el enjuague de nanopartículas de oro, se utilizó agua Milli-Q (DI) ($\rho > 18\text{M}\Omega$). El kit de ensayo de proliferación de células MTT se obtuvo de Promega Corporation, EE. UU.

Espectroscopia UV-Visible: Los espectros de absorción UV-Visible se registraron a temperatura ambiente utilizando un espectrofotómetro Cytation 3 (Biotek) en una placa desechable de 96 pocillos con corrección de longitud de trayectoria.

Microscopio de electrones: Las imágenes del microscopio electrónico de transmisión se obtuvieron en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL 1400, JEOL LTD., Tokio, Japón. Las muestras de TEM se prepararon colocando 5 μL de solución de nanopartículas de oro en la rejilla de cobre recubierta de carbono de malla 300. El exceso de disolución se eliminó con cuidado y la rejilla se dejó secar durante cinco minutos más. El tamaño promedio y la distribución del tamaño de las nanopartículas se determinaron procesando la imagen TEM Adobe Photoshop con complementos Fovea.

Dispersión dinámica de luz (DLS) y análisis de potencial Zeta: Las mediciones DLS se realizaron con un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd. EE. UU.) equipado con un láser He-Ne de 633 nm y que opera en un ángulo de 173° . El software utilizado para recopilar y analizar los datos fue el software de tecnología de dispersión (DTS) versión 5.10 de Malvern. Se midieron 600 μL de cada muestra en cubetas de tamaño semi-micro desechables de bajo volumen (Fisher Scientific, EE. UU.) con una longitud de paso de 10 mm. Se realizaron mediciones por triplicado en una posición de 4,65 mm desde la pared de la cubeta con un atenuador automático. Para cada muestra, se realizaron 15 pruebas de 10 segundos. La distribución de tamaño, el diámetro promedio Z y el índice de polidispersión (PDI) se obtuvieron de la función de autocorrelación usando el "modo de propósito general" para todas las muestras de nanopartículas. Se utilizaron el factor de filtro predeterminado del 50% y el umbral inferior predeterminado de 0,05 y el umbral superior de 0,01. Las mediciones del potencial zeta se realizaron por triplicado utilizando agua como dispersante y el modelo de Huckel. Para cada muestra, se realizaron 20 pruebas con el modo de análisis automático.

Análisis de seguimiento de nanopartículas: Los diámetros hidrodinámicos de las AuNP se midieron utilizando el sistema NanoSight LM10-HSGFT configurado con una unidad de visualización de muestras LM14G con control de temperatura equipada con un láser (verde) de 532 nm (NanoSight Limited, Amesbury, Reino Unido). El seguimiento de video de los AuNP basado en la dispersión de Raleigh se capturó con una cámara CCD monocromática Marlin (Allied Vision Technologies, Alemania). Se usó una jeringa de 1 ml (Becton Dickinson, NJ) para llevar las muestras a la cámara de visualización y la temperatura se mantuvo constante a 22°C . Se utilizó el programa NanoSight 2.2 para recopilar y analizar datos de muestra. Cada medición de tamaño se basó en un video de 30 segundos y se utilizó la ecuación de Stokes-Einstein para calcular el diámetro hidrodinámico medio. Como se indica a continuación, las muestras se diluyeron 30 veces en relación con la concentración de AuNP stock antes de las mediciones de NTA. Esta dilución se seleccionó de tal manera que se rastrearon ~ 900 partículas en un video de 30 segundos. Estas condiciones proporcionaron una muestra representativa de toda la muestra y se confirman por el hecho de que la distribución del tamaño no cambió con videos más largos en los que se analizaron significativamente más nanopartículas. Se realizaron tres mediciones para cada muestra para proporcionar un tamaño promedio y una desviación estándar.

Cultivo de células: Se cultivaron células de carcinoma de próstata humano PC-3 y de mama humano MDA-MB231 (ATCC, EE. UU.) en medio RPMI 1640 (obtenido de Gibco BRL, Grand Island, NY) suplementado con 4,5 g/L de D-glucosa, 25 mM de Hepes, 0,11 g/L de piruvato de sodio, 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, L-glutamina 2 mM, suero bovino fetal termoinactivado al 10% (Atlanta Biologicals, EE. UU.) y disolución antibiótica de penicilina/estreptomicina al 1%. Las células se cultivaron en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO_2 a 37°C (Thermo Scientific, EE. UU.), cambiando el medio cada dos días. Las células se adhirieron en monocapas y, cuando confluyeron, se recogieron de los matraces de cultivo celular con tripsina-EDTA (Invitrogen) y se sembraron más separadas.

Mediciones de IC_{50} : La afinidad de unión al receptor de los conjugados se determinó mediante un ensayo competitivo de unión celular en cultivos de células PC-3 utilizando ^{125}I -Tyr4-bombesina como radioligando específico de GRP. Se incubaron aproximadamente 30 000 células a 37°C durante 40 minutos en una atmósfera de CO_2 al 5% en presencia de ^{125}I -Tyr4-bombesina 20000 cpm (2200 Ci/mmol) y concentración creciente del conjugado ensayado. Después de la incubación, se aspiró el medio de reacción y se lavaron las células tres veces con tampón modificado RPMI 1640 frío. La radiactividad asociada a las células se determinó contando en un sistema de conteo Packard Riasar y. Los valores de IC_{50} se calcularon utilizando el software gráfico Graph Fit 4.0. El % de ^{125}I -Tyr4-bombesina unida a las células se graficó frente al aumento de la concentración del conjugado analizado para determinar su valor de IC_{50} .

Ensayo de citotoxicidad in vitro: La evaluación de citotoxicidad in vitro de NP1-DOX y NP2-DOX con controles respectivos tales como NP1, NP2, doxorubicina libre se realizó en células cancerosas que expresan y no expresan GRP, PC3 y MDA-MB-231, respectivamente. La evaluación de la citotoxicidad se realizó por triplicado y se siguió el protocolo descrito por el fabricante. Brevemente, las células $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ en la fase de crecimiento exponencial se colocaron en una placa recubierta de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron durante 12 horas en una incubadora de CO₂ al 5% de CO₂ y 37 °C. En el medio se preparó una serie de concentraciones que van de 0 a 10 µg/mL (0, 0,31, 0,625, 1,25, 2,5, 5,0 y 10 µg/mL) de NP1-Dox y NP2-Dox. Cada concentración se añadió a la placa en cuadrupletes. Después de 24 horas de incubación, se añadieron 10 µl de MTT por pocillo (como se recibió del fabricante, Promega Corporation, EE. UU.) y se mantuvieron durante 4 horas, y los cristales de formazán así formados se disolvieron en 100 µl de detergente/tampón solubilizador. Las placas se mantuvieron durante 2 horas en la oscuridad a 25°C para disolver todos los cristales, y la intensidad del color desarrollado se midió con un lector de microplacas (Epoch, BioTek, EE. UU.) que operaba a una longitud de onda de 570 nm. Se utilizaron como blancos pocillos con medio completo, nanopartículas y MTT, pero sin células. Las células no tratadas se consideraron 100% viables.

Estudios de Estabilidad In Vitro: Los estudios de estabilidad in vitro se realizaron incubando soluciones de NP1 y NP2 a varias condiciones de pH: 2, 5, 7, 10 y 12 por un periodo de 24 horas. El comportamiento de estabilidad para ambos también se controló desafiando soluciones acuosas de NP1 y NP2 (0,5 ml) con 0,5 ml de cisteína 0,2 M, histidina 0,2 M, HSA 0,2 M y soluciones salinas al 10%. La estabilidad se midió controlando las medidas de absorbancia UV-visible, radio hidrodinámico y potencial zeta de 0 a 96 horas (0, 1, 24, 48, 72 y 96 horas). Un cambio insignificante en la banda de plasmón UV-Vis de NP1 y NP2 confirmó la retención de la composición de nanopartículas con un comportamiento estable en todas las disoluciones desafiantes, excepto la cisteína. Las disoluciones tratadas no mostraron ningún cambio notable en los radios hidrodinámicos, lo que confirma la estabilidad de estos conjugados.

Ejemplo 1

Síntesis y caracterización de conjugados BBN-AuNP-DTDTA

Se usaron nanopartículas de oro funcionalizadas con ácido dietilentriaminopentaacético ditiolado (DTDTA) (AuNP-DTDTA; **NP1**) como precursores para conjugar el péptido dirigido, bombesina (BBN), y un agente quimioterapéutico, DOX, en la superficie de la nanopartícula. Véase **Figura 1**.

La primera etapa fue conjugar el péptido dirigido a **NP1**. Se usó bombesina terminada en tioctilo (TA-BBN) para conjugar el péptido a **NP1** mediante enlaces oro-tiol. Se utilizaron tres relaciones estequiométricas diferentes de AuNP:BBN (1:0,5, 1:2 y 1:4). El exceso de BBN sin reaccionar se eliminó mediante lavados repetidos y BBN-AuNP-DTDTA (**NP2**) se aisló como gránulos de nanopartículas puras. Se utilizó análisis por HPLC de las disoluciones sobrenadantes obtenidas tras la conjugación de TA-BBN a **NP1** para cuantificar TA-BBN unido a **NP2**. Se construyó una curva de calibración estándar usando diferentes concentraciones de TA-BBN y se determinó por HPLC el área bajo la curva (AUC) de concentraciones conocidas de TA-BBN usadas en las reacciones. El análisis de AUC en los sobrenadantes y la concentración conocida de TA-BBN se correlacionaron para determinar la cantidad de TA-BBN conjugado en la superficie de **NP2** (**figura 3**). La conjugación de la construcción de AuDTDTA con TA-BBN en una proporción de 1:2 (Au:TA-BB) resultó en la incorporación de aproximadamente 0,26 mg de TA-BBN en la construcción por 1 mg de AuDTDTA. Véase **Figura 3**. **NP2** preparado con una relación de 1:2 mostró una estabilidad notable y, por lo tanto, se eligió para estudios posteriores.

Los nanoconjugados se caracterizaron en detalle mediante análisis de imágenes de microscopio electrónico de transmisión (TEM), espectroscopia de absorción UV-visible, dispersión de luz dinámica (DLS) y mediciones de potencial Zeta. Las imágenes TEM mostraron una distribución de tamaño uniforme de los nanoconjugados, con un intervalo de tamaño de 3-5 nm (**Figuras 4A y 4B**). **NP2** no mostró ningún cambio en el espectro de absorción UV-visible en comparación con **NP1** tras la conjugación a BBN. (**Figura 4C**). Se observó un cambio de 20 nm en el diámetro hidrodinámico en **NP2** en comparación con **NP1** tras la conjugación con BBN (1:2, Au:BBN). El cambio de potencial zeta fue insignificante (~3 unidades) en **NP2** en comparación con **NP1**. El tamaño de partícula promedio determinado mediante el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) se correlacionó bien con las mediciones de dispersión de luz dinámica. Las propiedades fisicoquímicas de **NP1** y **NP2** Los conjugados se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1

	Tamaño hidrodinámico DLS (<i>d</i> nm)	Carga (mV)
NP1	78	-72
NP1-DOX	95	-23
NP2	105	-69
NP2-DOX	124	-23

Ejemplo 2

Análisis XPS

Para comprender la naturaleza de los enlaces y las interacciones químicas entre AuNP-DTDTTPA y TA-BBN, se realizó un análisis XPS detallado. El espectro XPS de **NP2** presenta un pico característico de C, N, O, S y Au (**Figura 5A**). El espectro de alta resolución XPS de las regiones C1s muestra varias regiones C-C, C-H, C-O, C-N, O-C=O, N-C=O como se esperaba del péptido TA-BBN conjugado (**Figura 5B**). Las composiciones elementales relativas y las asignaciones de picos para las especies de carbono de **NP2** se muestran en las **Tablas 2 y 3**, respectivamente.

Tabla 2: Composiciones elementales relativas de BBN-[AuNP(DTDTTPA)] determinadas por XPS [% de átomos]

	C	N	O	Na †	Si*	S	Au
BBN-[AuNP(DTDTTPA)]	57	14	19	3,0	1,2	3,1	3,6
† Sodio detectado debido a la disolución en solución de NaOH							
* Silicio detectado debido a la deposición en la oblea de silicio							

Tabla 3: Composiciones relativas y asignaciones máximas más probables para especies de carbono determinadas por XPS, región C1s [% de átomos]

	CC, CH	C-O, C-N	O-C=O, N-C=O
BBN-[AuNP(DTDTTPA)]	41	35	24

El análisis del espectro de alta resolución XPS para la región S 2p sugiere que hay dos especies S diferentes (especie 1 y especie 2) y cada una se divide en un doblete. La especie 1 presenta dos picos de azufre distintos a 162,3 y 163,5 eV, atribuidos al enlace Au-S de DTDTTPA. El pico de azufre doblete, con acoplamiento S 2p_{3/2} y S 2p_{1/2} de 1,2 eV, confirma la adsorción de tioles sobre superficie de oro. Los valores de energía de unión y acoplamiento se correlacionan bien con los reportados en la literatura para **NP1**; sin embargo, los picos se desplazan hacia una región de energía de enlace ligeramente superior (0,5 eV) tras la conjugación con BBN. Además, los dos picos de azufre distintos para la especie 2 a 163,2 y 164,4 eV con una relación de 2:1 corresponden a Au-S (azufre coordinado con AuNP) y S-CH₃ (azufre presente en el aminoácido metilcisteína en el esqueleto del péptido BBN), respectivamente. Cada clase de pico de azufre se dividió aún más en el doblete con un acoplamiento S2p_{3/2} y S2p_{1/2} de 1,2 eV, lo que confirma la conjugación de BBN a AuNP como se informa en la literatura. Tal presencia de doblete con un área equivalente a una energía de enlace más alta indica que ambos átomos de azufre de TA-BBN formaron un enlace Au-S en la superficie de AuNP. Tras la conjugación con BBN, los valores de energía de unión cambian a una región de energía más baja en comparación con AuNP-BBN informados en la literatura. Esto puede deberse a la diferencia en el tamaño del núcleo de las nanopartículas que se usaron para la conjugación de BBN. Las energías para el S elemental y algunas formas orgánicas de S caen en el intervalo de 162-164 eV (**Figura 6A**). Debido a que no se observan más picos en la región de mayor energía del espectro correspondiente al azufre oxidado, estas mediciones son consistentes con la observación de que el BBN-AuNP-DTDTTPA (**NP2**) es el producto exclusivo formado durante la reacción de nanoconjugación.

La región 4f del espectro muestra dos señales diferentes para el oro con energías de 83,6, 84,3 y 87,2, 88,0 eV para Au 4f_{7/2} y Au 4f_{5/2}, respectivamente, correspondientes al átomo de oro del núcleo Au (0) y al oro superficial con carácter parcial de Au (I) (**Figura 6B**). A partir de varios estudios recientes, se cree ampliamente que el disulfuro en el ácido tióctico se agrega oxidativamente a las AuNP, lo que da como resultado un carácter Au (I) parcial en la superficie de la nanopartícula. La señal correspondiente a las energías de unión de 84,3 y 88 eV para los picos de Au en la región 4f es similar a las AuNP conjugadas con péptidos reportadas en la literatura, lo que sugiere que el Au está unido al átomo S de DTDTTPA y TA-BBN. De acuerdo con este hecho, se observaron dos estados de oxidación diferentes del oro correspondientes a los átomos de oro de la superficie y del núcleo en el espectro XPS. Los resultados de varios estudios de XPS sobre nanopartículas de oro confirmaron hallazgos similares. Las observaciones anteriores establecen claramente la unión de TA-BBN en **NP2** nanoconjugado.

Ejemplo 3

Síntesis y caracterización de conjugados BBN-AuNP-DTDTA-DOX

Los grupos carboxilo de DTDTA en la superficie de AuNP están disponibles para una mayor funcionalización. Estos grupos carboxilo se utilizaron para conjugar doxorubicina. Se usó la química tradicional de EDC-sulfoNHS para conjugar el grupo amina de DOX con los grupos carboxilo de DTDTA para obtener AuNP-DTDTA-doxorrubicina no dirigida (**NP1-DOX**) y BBN-AuNP-DTDTA-DOX dirigida (**NP2-DOX**).

Carga de doxorubicina en **NP1** y **NP2** se estimó mediante espectroscopia de fluorescencia. La doxorubicina muestra una marca de fluorescencia a 600 nm cuando se excita a 485 nm y se emite a 590 nm (**Figura 7**). Se realizaron diluciones en serie de DOX y se construyó una curva de calibración estándar para registrar las intensidades de fluorescencia (**Figura 8**). Las intensidades de fluorescencia de los sobrenadantes se registraron y correlacionaron con la curva de calibración estándar para cuantificar la cantidad de doxorubicina conjugada con AuNP. Mediante mediciones de fluorescencia, se encontró que se conjugaron 0,53 µg y 0,3 µg de doxorubicina por mg de AuNP-DTDTA y BBN-AuNP-DTDTA, respectivamente. Además, las diluciones en serie de **NP1-DOX** y **NP2-DOX** se realizaron y se registraron las intensidades fluorescentes. La variación de la intensidad de la fluorescencia fue proporcional y consistente, lo que confirma la conjugación de DOX a **NP1** y **NP2**. La medición de la fluorescencia también sugiere que la fluorescencia de la doxorubicina no se ve afectada por la conjugación en AuNP (**Figura 9 y 10**). Los espectros UV-visible de **NP1-DOX**, **NP2-DOX** con sus respectivos controles se muestra en **Figuras 11**. Se observó un cambio de 10-20 nm en el diámetro hidrodinámico tras la conjugación con DOX con ambos **NP1** y **NP2**. El potencial zeta cambió a positivo tras la conjugación con DOX. El valor de potencial zeta negativo de -72 y -69 mV para **NP1** y **NP2**, respectivamente, cambiado a -23 mV indica que las partículas se repelen entre sí y que no hay tendencia a que las partículas se agreguen. Las propiedades fisicoquímicas de **NP1-DOX** y **NP2-DOX** Los conjugados se resumen en la **Tabla 1**.

Ejemplo 4

Estudios de estabilidad in vitro

la estabilidad de **NP1** y **NP2** conjugados se investigó en varias disoluciones biológicamente relevantes. Las disoluciones de **NP1** y **NP2** fueron desafiados con NaCl al 0,9%, cisteína al 0,5%, histidina 0,2 M, albúmina sérica humana (HSA) al 0,5% y albúmina sérica bovina (BSA) al 0,5%. La estabilidad de los nanoconjugados en diferentes momentos se analizó mediante tres técnicas, (i) control de la resonancia del plasmón mediante espectroscopia UV-visible, (ii) cambios en el diámetro hidrodinámico y (iii) mediciones de carga electroforética (potencial Zeta). El cambio en la longitud de onda de resonancia del plasmón superficial y el ancho de banda del plasmón y la medición del diámetro hidrodinámico están directamente relacionados con la comprensión del comportamiento de agregación de las nanopartículas. La medición del potencial zeta es una indicación de las fuerzas repulsivas que están presentes en la disolución acuosa y se puede utilizar para predecir la estabilidad in vitro/in vivo a largo plazo de las dispersiones de nanopartículas. Los estudios de estabilidad se realizaron para nanoconjugados preparados con relaciones estequiométricas de 1:2 y 1:4 de Au:BBN. El uso de una proporción de 1:4 de Au:BBN mostró agregación durante el período de 24 horas, mientras que ambos conjugados **NP1** y **NP2** [relación 1:2 (Au:BBN)] fueron estables en estas soluciones biológicamente relevantes. Los picos de absorción UV-visible permanecen inalterados, los cambios en el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta son mínimos, lo que confirma la integridad estructural y la robustez del conjugado (**Figura 12**). Sin embargo, en presencia de cisteína se observó que tanto **NP1** y **NP2** mostró un aumento en el tamaño hidrodinámico durante un período de tiempo (24 h) debido a las interacciones del tiol de oro y el aumento no fue significativo. Los datos de estabilidad *in vitro* indican que **NP1** y **NP2** tener una estabilidad cinética óptima para su uso en divulgaciones posteriores dirigidas a receptores *in vivo*.

Ejemplo 5

Estudios de afinidad de unión al receptor in vitro de NP2

Las células PC-3 de tumor de próstata humano expresan un gran número de receptores de GRP en la superficie de las células. La afinidad de unión de **NP2** se evaluó realizando un ensayo de inhibición competitiva y determinando los valores de IC₅₀. Se utilizaron nanopartículas preparadas con tres relaciones estequiométricas diferentes de Au:BBN (1:0,5, 1:2, 1:4). Una comparación de valores de IC₅₀ para diferentes relaciones estequiométricas de Au:BBN (1:0,5, 1:2, 1:4) se graficó (**Figura 13**). Los valores IC₅₀ de diferentes proporciones del conjugado **NP2** se informan en microgramos, ya que los pesos moleculares de los nanoconjugados no se pueden determinar con precisión. Es evidente a partir de los datos que los valores IC₅₀ o la afinidad de unión celular de los conjugados dependen del grado de recubrimiento del péptido TA-BBN sobre la superficie de las AuNP. Por ejemplo, conjugar **NP2** con relación Au:BBN= 1:4, que tiene un mayor número de moléculas de péptidos TA-BBN en la superficie de AuNPs, presentó un valor de IC₅₀ más bajo (o mayor afinidad de unión celular) en comparación con otros conjugados. Sin embargo, este conjugado no es muy estable y no se usó para estudios celulares. El estudio de inhibición competitiva confirma las propiedades de direccionamiento del receptor de **NP2**.

Ejemplo 6

Ensayos de citotoxicidad *in vitro*:

La citotoxicidad *in vitro* de las AuNP conjugadas con doxorubicina, NP1-DOX y NP2-DOX, en células cancerosas humanas que expresan y no expresan GRP se examinó con controles adecuados mediante el ensayo MTT. Las células de cáncer de próstata humano (PC3) tienen un gran número de receptores de GRP en la superficie de las células. Específicamente, la literatura muestra que 44000 sitios receptores de bombesina están presentes en la superficie de las células de cáncer de próstata humano. Se usaron células cancerosas de mama humana (MDA-MB231) como células cancerosas que no expresan GRP. La doxorubicina libre mostró un IC₅₀ de 9,5 µg/ml en PC3 (**Figura 14**) y >10 µg/ml en células cancerígenas MDA-MB231 (**Figura 16**). Un gráfico comparativo que muestra el efecto de **NP1-DOX** y **NP2-DOX** con DOX en la citotoxicidad de las células que expresan GRP y no GRP se muestra en **Figuras 15, 17, y 20**. **NP1-DOX** y **NP2-DOX** mostraron un IC₅₀ de 6 µg/ml y 9 µg/ml, respectivamente, en células cancerosas que no expresan GRP, mientras que en células PC3 se encontró que los valores de IC₅₀ eran 10 µg/ml y 5 µg/ml, respectivamente (**Tabla 4**). Cabe señalar que el valores IC₅₀ representados aquí para **NP1-DOX** y **NP2-DOX** se basa en el peso total del nanoconjugado y la cantidad de DOX cargada en el nanoconjugado es de 0,53 µg/mg y 0,3 µg/mg, respectivamente. los valores IC₅₀ de los nanoconjugados en términos de doxorubicina se enumeran en la Tabla 4 y **Figuras 18 y 19**.

Tabla 4

	IC ₅₀ (µg/ml)			
	Células PC3		Células MDA-MB231	
	Conc. de nanoconjugado	Conc. De Doxorubicina	Conc de Nanoconjugado.	Conc de Doxorubicina.
NP1-DOX	9,89	0,0052	6	0,00318
NP2-DOX	5	0,0015	9	0,0027
Doxorrubicina	9,5	9,5	>10	>10

Como puede verse anteriormente, las AuNP conjugadas con doxorubicina presentaron una citotoxicidad mucho más potente que la doxorubicina libre. Por ejemplo, la citotoxicidad de NP2-DOX aumentó 3000 veces y 6000 veces en comparación con la doxorubicina libre en células cancerosas sin expresión de GRP y con expresión de GRP, respectivamente.

Ejemplo 7

Síntesis de AuNP-DTDTA

Los AuNP funcionalizados con ácido dietilentriaminopentaacético ditiolado (DTDTA) se prepararon a través de un protocolo modificado por Brust et. al., JJ. Chem. Soc., Chem. Commun.1995, 1655-1656. Brevemente, se disolvieron 200 mg (0,507 mmol) de HAuCl₄·3H₂O en 120 ml de metanol en un matraz de fondo redondo de 500 ml. En un matraz separado, se disolvieron 482 mg (0,943 mmol) de DTDTA en 40 ml de MeOH y 2 ml de ácido acético glacial. Esta disolución se añadió con agitación continua a una disolución acuosa de sal de oro para producir una solución naranja. A esta mezcla, se añadieron 190 mg (5 mmol) de NaBH₄ disueltos en 14 ml de agua DI bajo agitación vigorosa a temperatura ambiente. Inmediatamente después de la adición de NaBH₄, la disolución se volvió de color marrón oscuro seguido de la aparición de un floculado negro. La mezcla resultante se dejó en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se añadieron 5 ml de HCl acuoso 1M. Esta disolución negra de nanopartículas de oro se sometió después a centrifugación a 7000 RPM durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las partículas se lavaron dos veces con HCl 0,01 M manteniendo los mismos parámetros de centrifugación que antes. Las partículas se lavaron adicionalmente a fondo y sucesivamente con agua DI seguida de éter dietílico. El polvo negro resultante de AuNP-DTDTA se secó al vacío y se almacenó a -20°C. Según fue necesario, las partículas se dispersaron fácilmente en NaOH 0,01 M y se mantuvieron estables durante más de un mes.

Ejemplo 8**Síntesis de ácido tióctico-péptido BBN**

La síntesis de BBN se realizó usando síntesis de péptidos en fase sólida empleando la metodología química Fmoc y los péptidos finales se purificaron por HPLC. Se utilizó una resina de 4-hidroximetilfenoxiacetil-4'-metilbencihidrilamina como soporte sólido para la síntesis. Los aminoácidos protegidos con Fmoc se activaron utilizando un equivalente de soluciones de HBTU/HOBt 0,45 M y dos equivalentes de N,N-diisopropiletilamina. Los aminoácidos se desprotegieron con Fmoc usando piperidina y se acoplaron usando NMM.HBTU. Después del acoplamiento de todos los aminoácidos en la secuencia apropiada, se acopló ácido tióctico (ácido lipoico) usando DIC.HOBt. La escisión del péptido de la resina se realizó usando TFA. Esta etapa de escisión también eliminó los grupos protectores de la cadena lateral de aminoácidos. El péptido se purificó en una columna de HPLC/C18 de fase inversa usando un gradiente AB de B al 0%, donde A es TFA al 0,1% en agua y B es TFA al 0,1% en acetonitrilo. Después de la purificación, la masa peptídica se midió mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas o desorción/ionización láser asistida por matriz, y la pureza se midió mediante cromatografía HPLC de fase inversa.

Ejemplo 9**Síntesis de nanoconjugados de oro específicos del receptor de bombesina estabilizados con DTDTPA (BBN-AuNP-DTDTPA)**

La bombesina terminada en ácido tióctico se hizo reaccionar con nanopartículas de oro con relaciones estequiométricas de Au:BBN 1:0,25, 1:0,5, 1:1, 1:2 y 1:4. Típicamente, en un vial de vidrio de 20 ml, se preparó una disolución de AuNP-DTDTPA ([Au] = 2,28 μ mol) utilizando una mezcla acuosa/metanólica (1:9) de NaOH 0,01 M. Se disolvieron 0,64 mg (0,57 μ mol), 1,28 mg (1,14 μ mol), 2,56 mg (2,27 μ mol), 5,12 mg (4,54 μ mol) y 10,24 mg (9,08 μ mol) de bombesina terminada en ácido tióctico (TA-BBN) en 4 ml de MeOH y luego se añade a la solución de nanopartículas. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y se observó la formación de un precipitado de color marrón oscuro. La mezcla se centrifugó (9300 g durante 10 min a 20°C) y se eliminó el sobrenadante. Las AuNP precipitadas se lavaron dos veces con MeOH y tres veces con agua. Los BBN-AuNP-DTDTPA se secaron a baja presión y se almacenaron a -20°C.

Ejemplo 10**Síntesis de AuNP-DTDTPA-Doxorrubicina y BBN-AuNP-DTDTPA-Doxorrubicina**

La síntesis de nanopartículas de oro conjugadas con doxorrubicina con y sin péptido de bombesina se realizó por triplicado. Las nanopartículas de oro, 0,5 mg, se suspendieron en IX PBS mediante sonicación. A 100 μ l de esta disolución, 2 mg de clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) y 2 mg de sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) en ácido 2-(morfolino)etano sulfónico 0,1 M (Se añadió tampón MES) (pH 4,6). El pH de la mezcla de reacción se mantuvo entre 5,3 - 5,4 utilizando tampón MES. La reacción se agitó durante 3 horas a 37°C a 700 RPM. Después de 3 horas, la mezcla de reacción se centrifugó a 20000 g durante 20 min a 25°C. Se utilizó doxorrubicina clínica 0,7 mg para la conjugación con nanopartículas. A la disolución de doxorrubicina, se añadieron nanopartículas con grupos carboxilo activados y la mezcla de reacción se agitó con vórtex. El acoplamiento se realizó durante la noche a 25°C a 750 rpm. La mezcla de reacción se centrifugó a 20000 g durante 20 minutos a 25°C y los sedimentos se lavaron posteriormente dos veces con PBS IX y se resuspendieron en disolución de PBS IX. Tanto los sedimentos como los sobrenadantes se usaron para estudiar la eficacia de la conjugación mediante análisis de espectroscopia de fluorescencia.

REIVINDICACIONES

1. Un nanoconjugado que comprende: una nanopartícula de oro (AuNP), ácido dietilentriaminopentaacético ditiolado (DTDTPA) y doxorubicina,
5 en donde el DTDTPA está directamente unido a la superficie de la nanopartícula de oro a través de al menos un enlace Au-S; y
 la doxorubicina está ligada al DTDTPA.
2. El nanoconjugado de la reivindicación 1, que comprende además un péptido terminado en ácido tióctico unido directamente a la superficie de la nanopartícula de oro a través de al menos un enlace Au-S y, opcionalmente, en donde el péptido terminado en ácido tióctico es bombesina terminada en ácido tióctico.
- 10 3. El nanoconjugado de la reivindicación 2, en donde la bombesina terminada en ácido tióctico tiene una secuencia: Lipoic-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂.
4. El nanoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la doxorubicina está unida al DTDTPA a través de un enlace amida.
5. El nanoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que se prepara mediante un proceso
- 15 que comprende conjugar nanopartículas de AuNP-DTDTPA con el péptido terminado en ácido tióctico, en donde el oro en la nanopartícula de oro y el péptido terminado en ácido tióctico están presentes en la reacción de conjugación en una relación estequiométrica de aproximadamente 1:0,5 a aproximadamente 1:4.
6. El nanoconjugado de la reivindicación 5, en donde el oro en la nanopartícula de oro y el péptido terminado en ácido tióctico están presentes en la reacción de conjugación en una relación estequiométrica de aproximadamente 1:2.
- 20 7. El nanoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde el péptido terminado en ácido tióctico comprende de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 40% en peso del nanoconjugado.
8. El nanoconjugado de la reivindicación 7, en donde el péptido terminado en ácido tióctico comprende aproximadamente del 20% al 30% en peso del nanoconjugado.
9. El nanoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la doxorubicina comprende de
- 25 aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,05% en peso del nanoconjugado.
10. El nanoconjugado de la reivindicación 9, en donde la doxorubicina comprende aproximadamente el 0,03% en peso del nanoconjugado.
11. El nanoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el nanoconjugado tiene un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 110 nm a aproximadamente 140 nm medido por dispersión de luz dinámica (DLS).
- 30 12. El nanoconjugado de la reivindicación 11, en el que el nanoconjugado tiene un diámetro hidrodinámico de aproximadamente de 120 nm a aproximadamente de 130 nm medido mediante dispersión de luz dinámica (DLS).
13. El nanoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el nanoconjugado tiene un valor de potencial zeta de aproximadamente -15 mV a aproximadamente -30 mV.
14. El nanoconjugado de la reivindicación 13, en donde el nanoconjugado tiene un valor de potencial zeta de
- 35 aproximadamente -20 mV a aproximadamente -25 mV.
15. El nanoconjugado según la reivindicación 1, que comprende: un péptido terminado en ácido tióctico, en donde el péptido terminado en ácido tióctico está directamente unido a la superficie de la nanopartícula de oro a través de al menos un enlace Au-S.
16. Una composición farmacéutica que comprende el nanoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 17. El nanoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para usar en el tratamiento de un cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del nanoconjugado a un sujeto que lo necesite.
18. El nanoconjugado de la reivindicación 17 para uso en el tratamiento de un cáncer, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloblástica aguda (AML), sarcoma óseo, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de hígado, cáncer de riñón, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, sarcoma de tejidos blandos, tiomas, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga, sarcoma uterino, cáncer de próstata,
- 45

cáncer de colon, cáncer de ovario cáncer, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas, tumor de Wilms y macroglobulinemia de Waldenstrom.

19. El nanoconjugado de la reivindicación 17 o la reivindicación 18 para uso en el tratamiento de un cáncer mediante inyección.

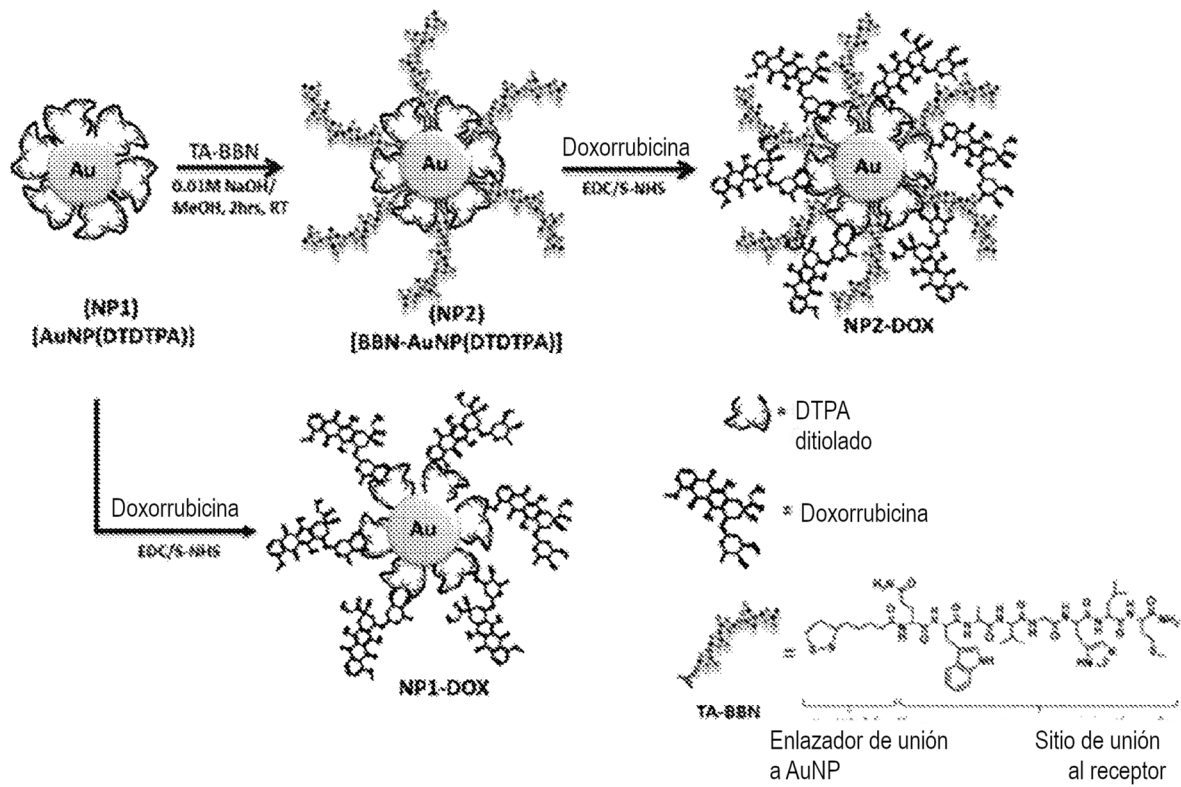


Figura 1

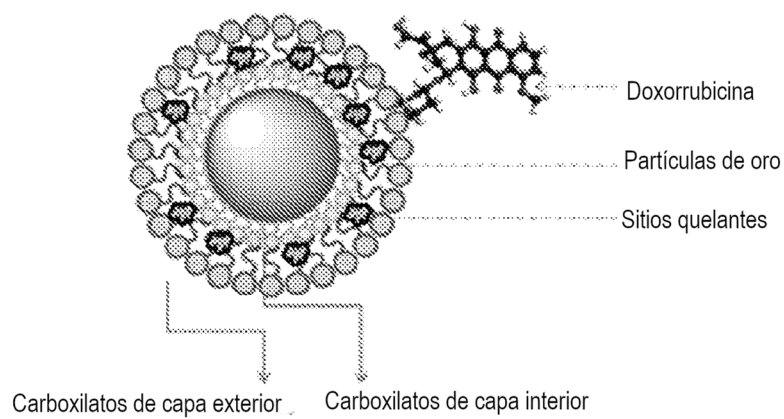


Figura 2

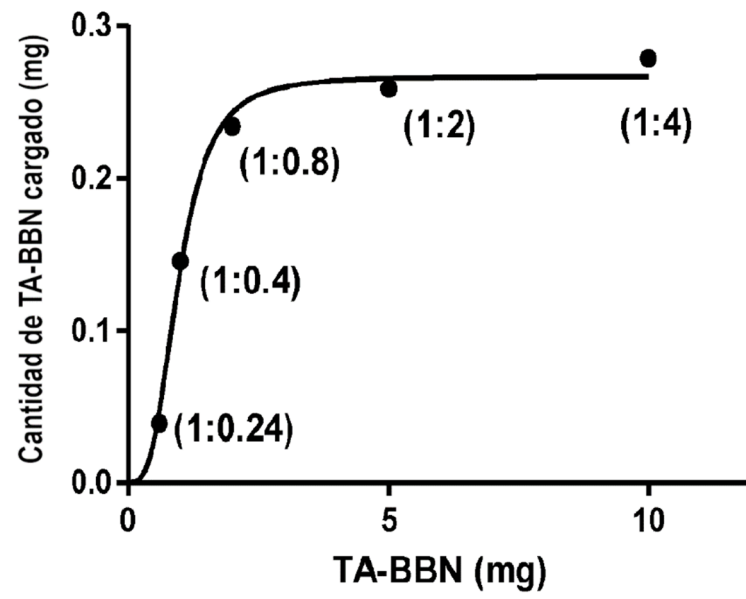


Figura 3

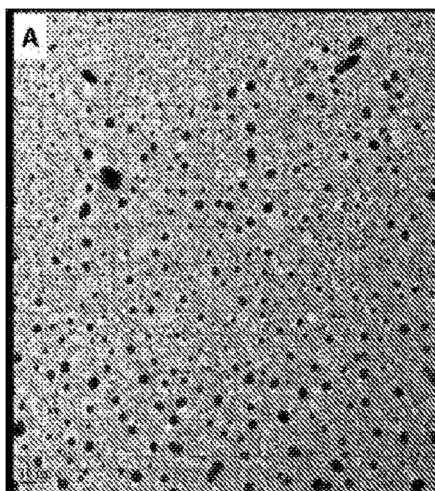


Figura 4A

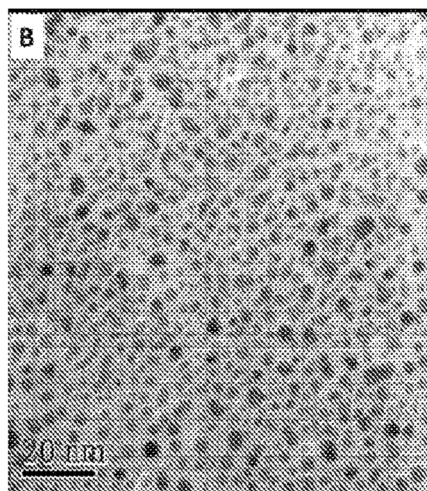


Figura 4B

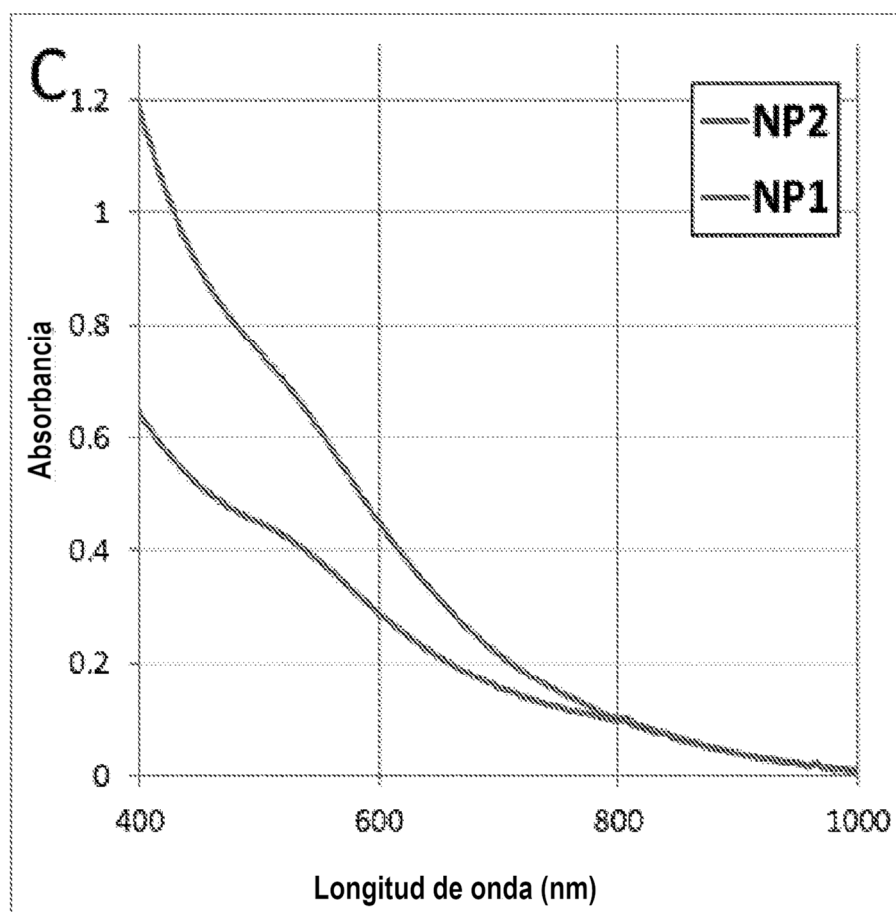


Figura 4C

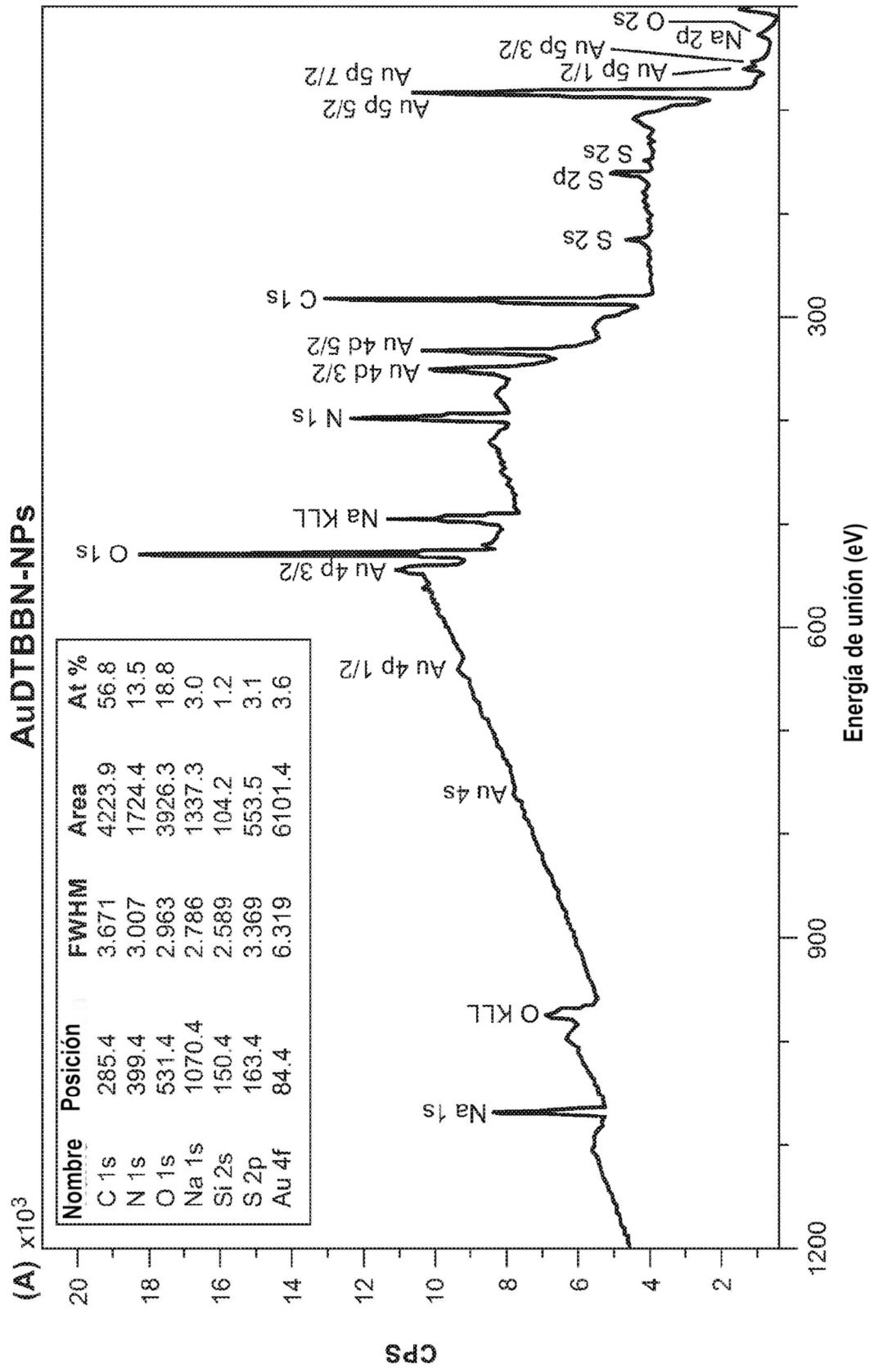


Figura 5A

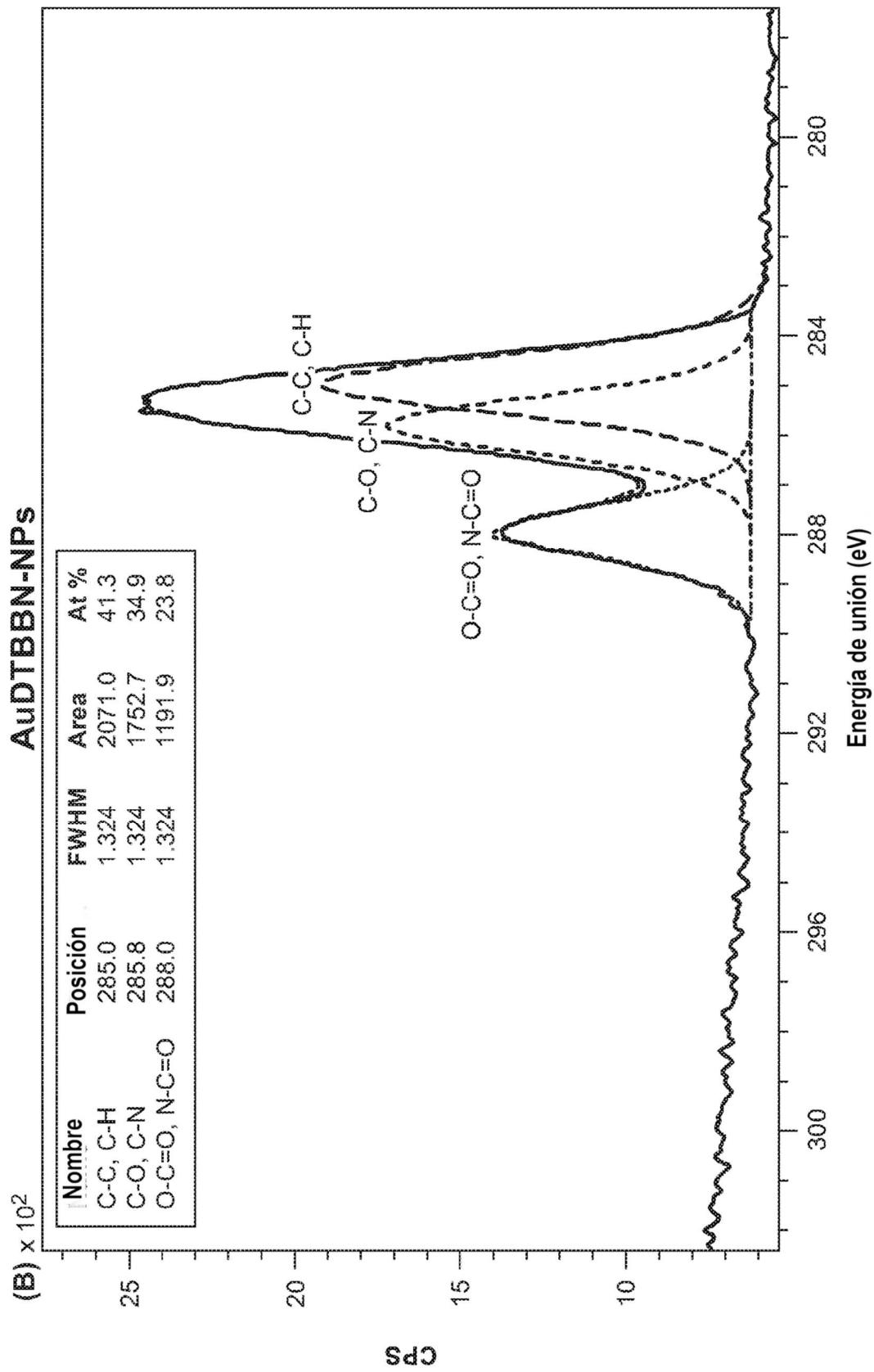


Figura 5B

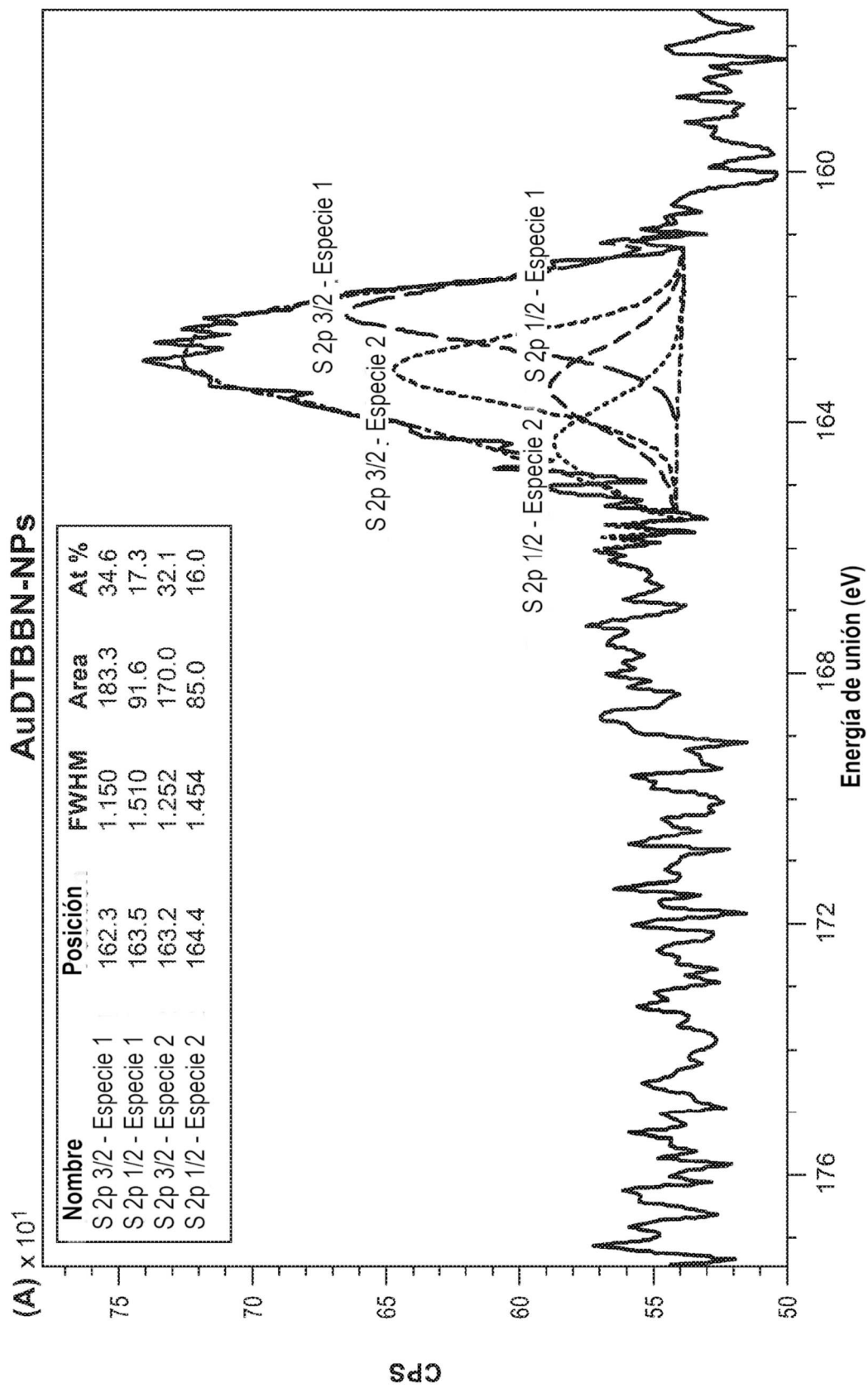


Figura 6A

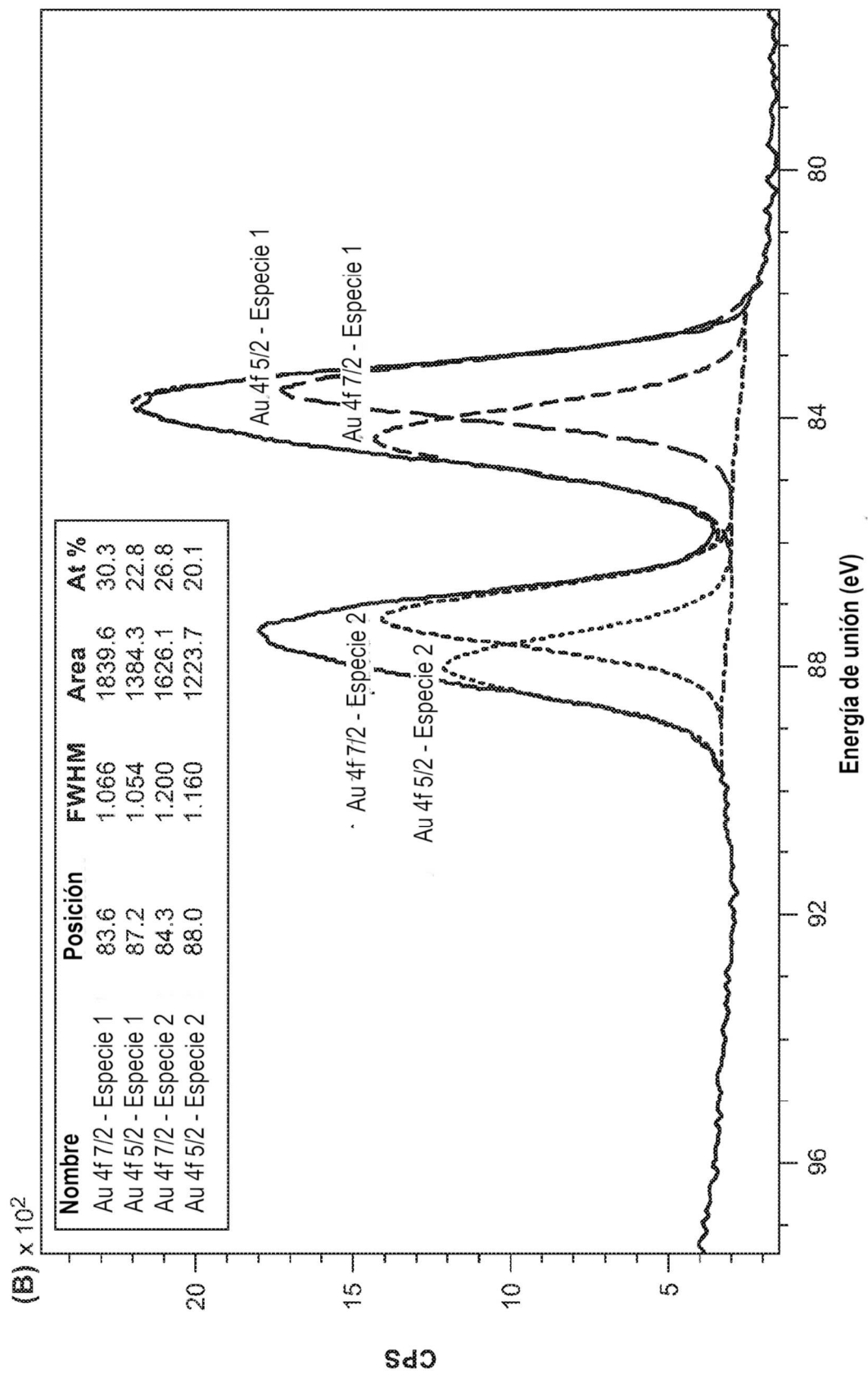


Figura 6B

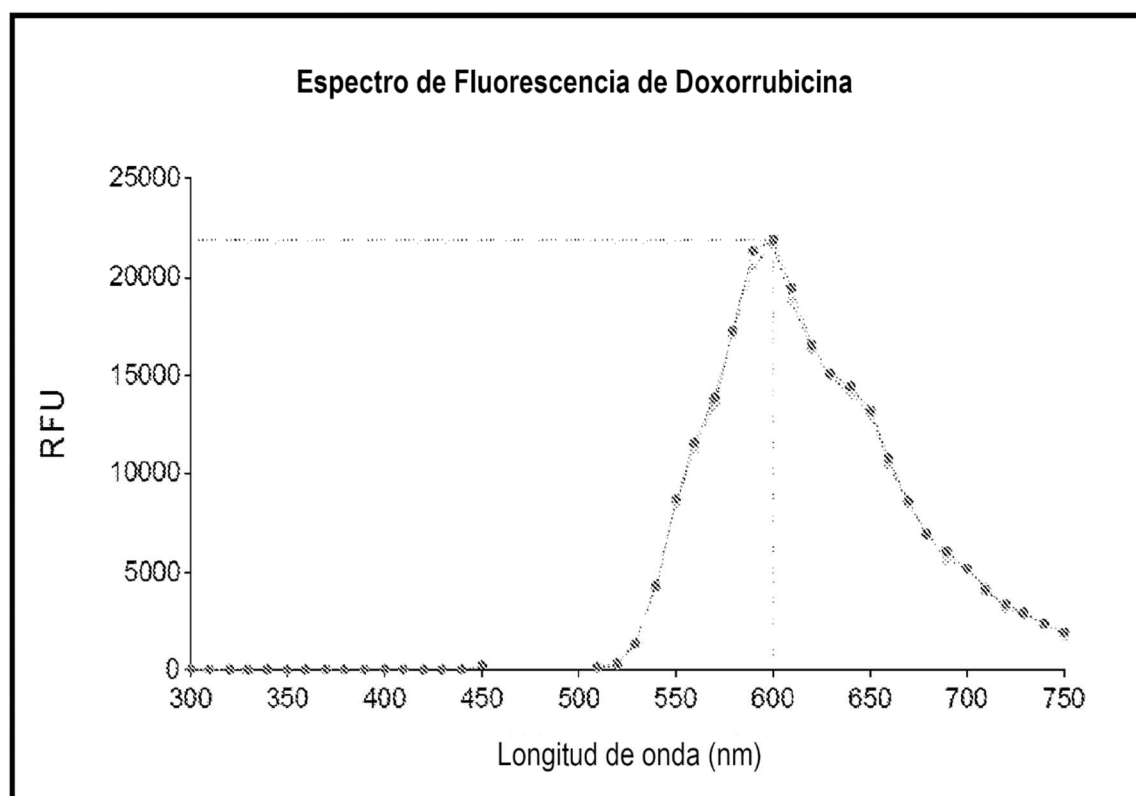


Figura 7

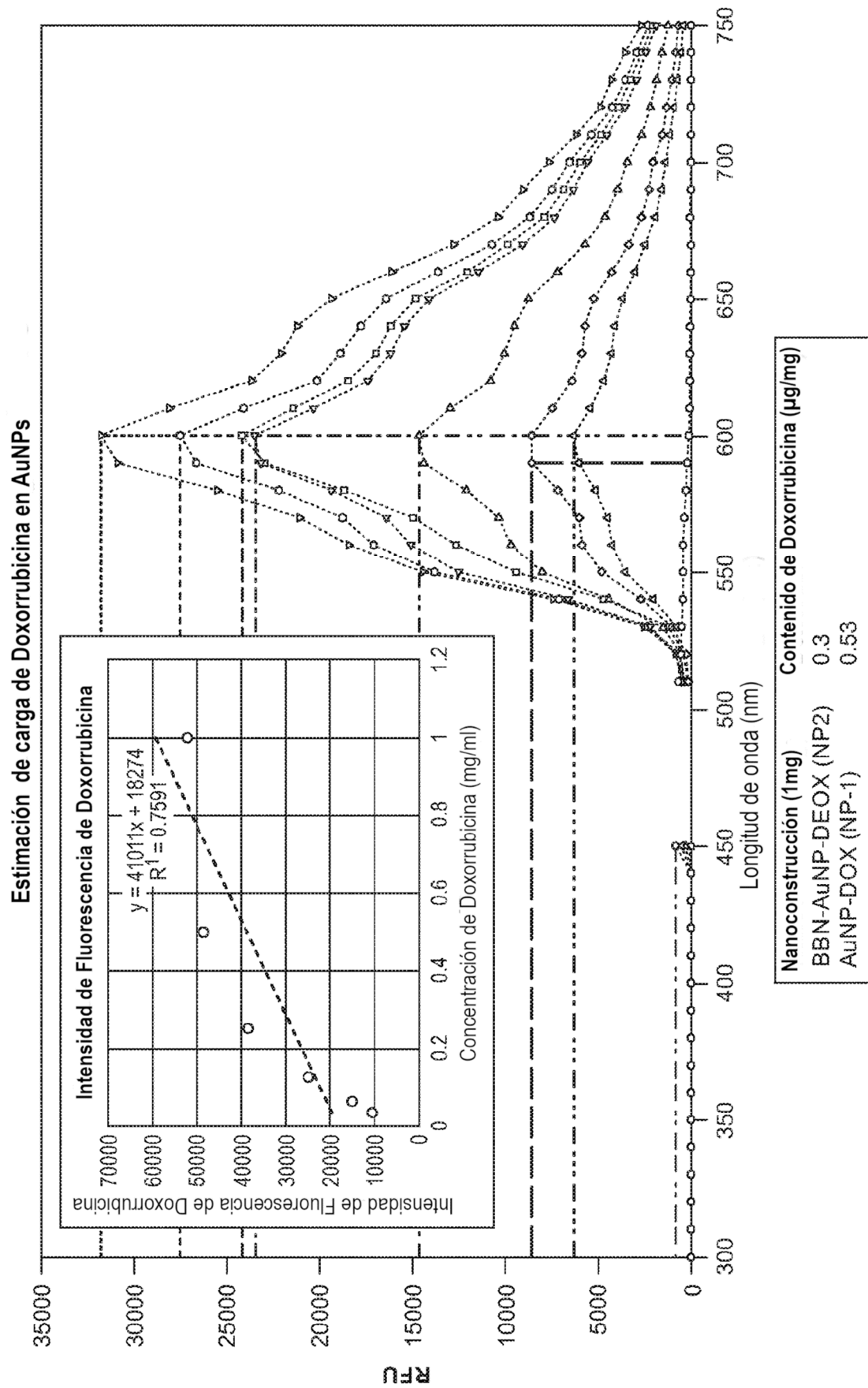


Figura 8

**Fluorescencia de gr nulos de AuNP-DTDTPA y AuNP-DTDTPA-DOX después del lavado
(Ej. 485 Em.590)**

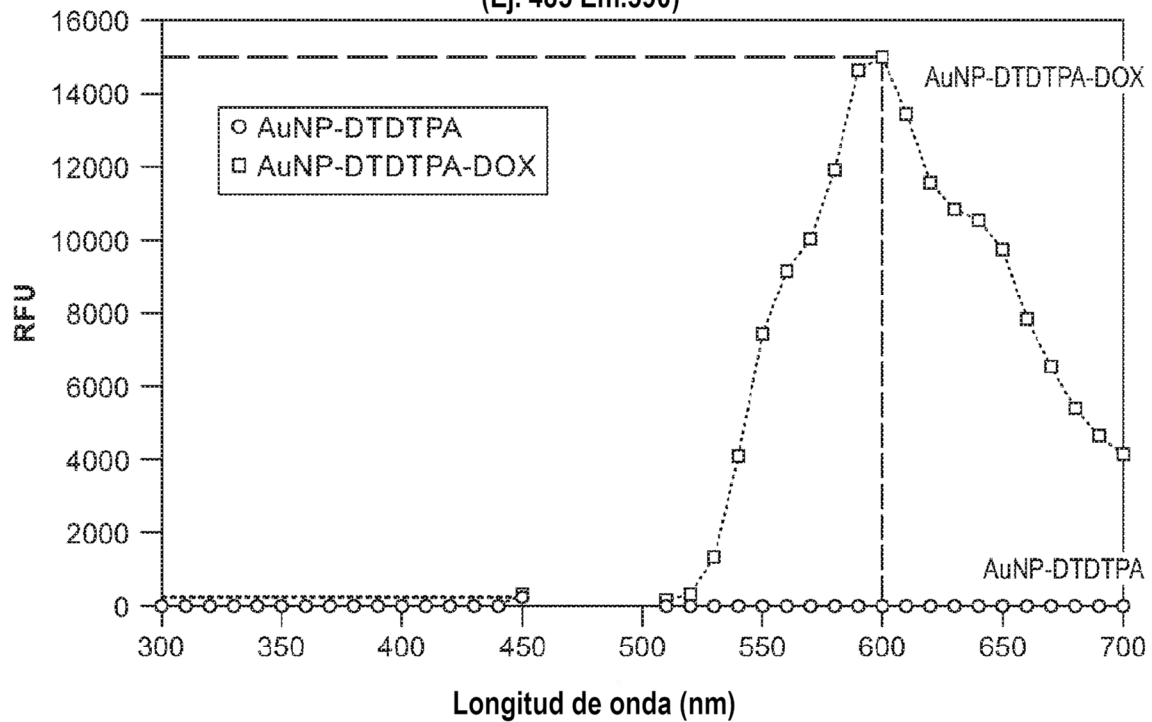


Figura 9

**Fluorescencia de gr nulos de BBN-AuNP-DTDTPA y
BBN-AuNP-DTDTPA-DOX después del lavado
(Ej. 0485 Em.590)**

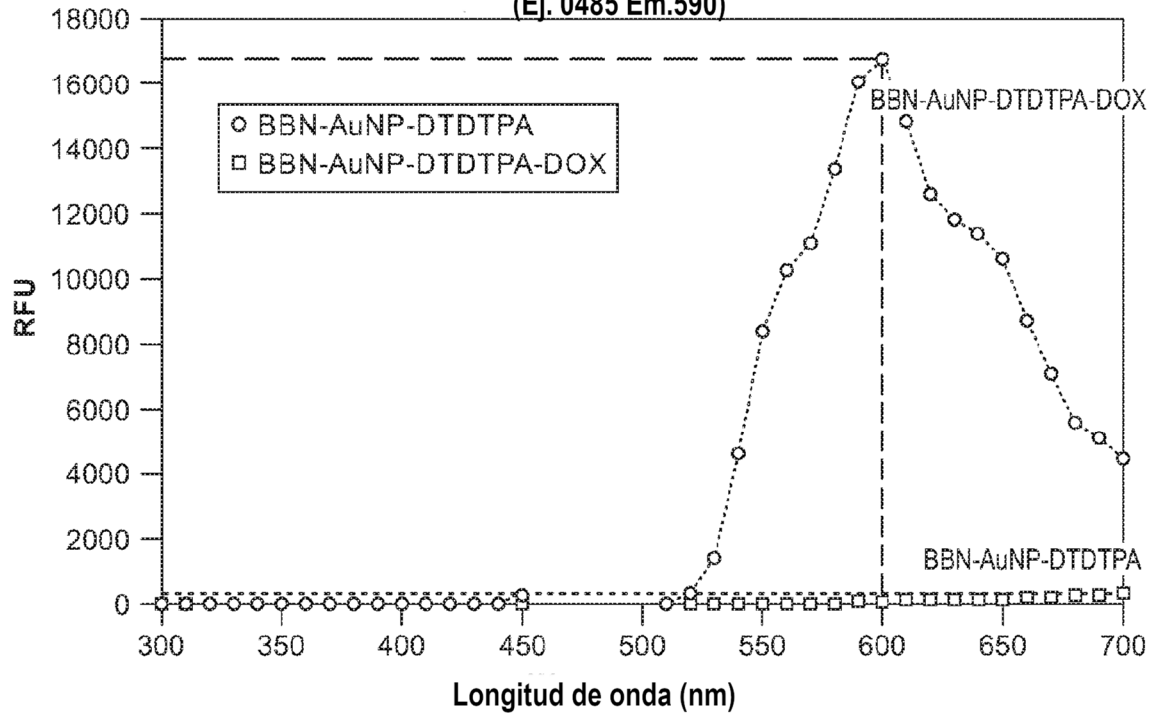


Figura 10

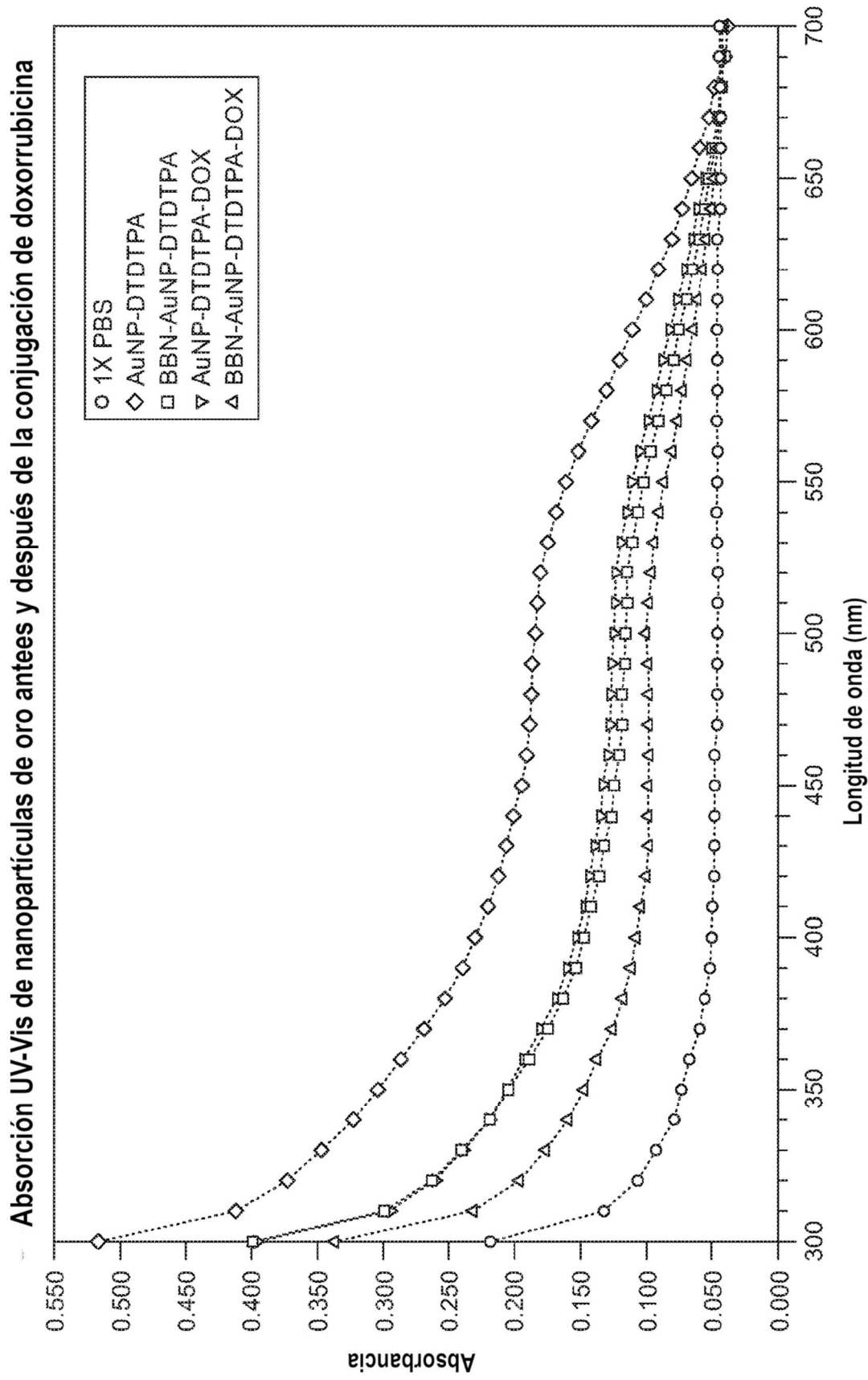


Figura 11

Estabilidad de NP1 mediante espectrometría de absorción UV-Vis

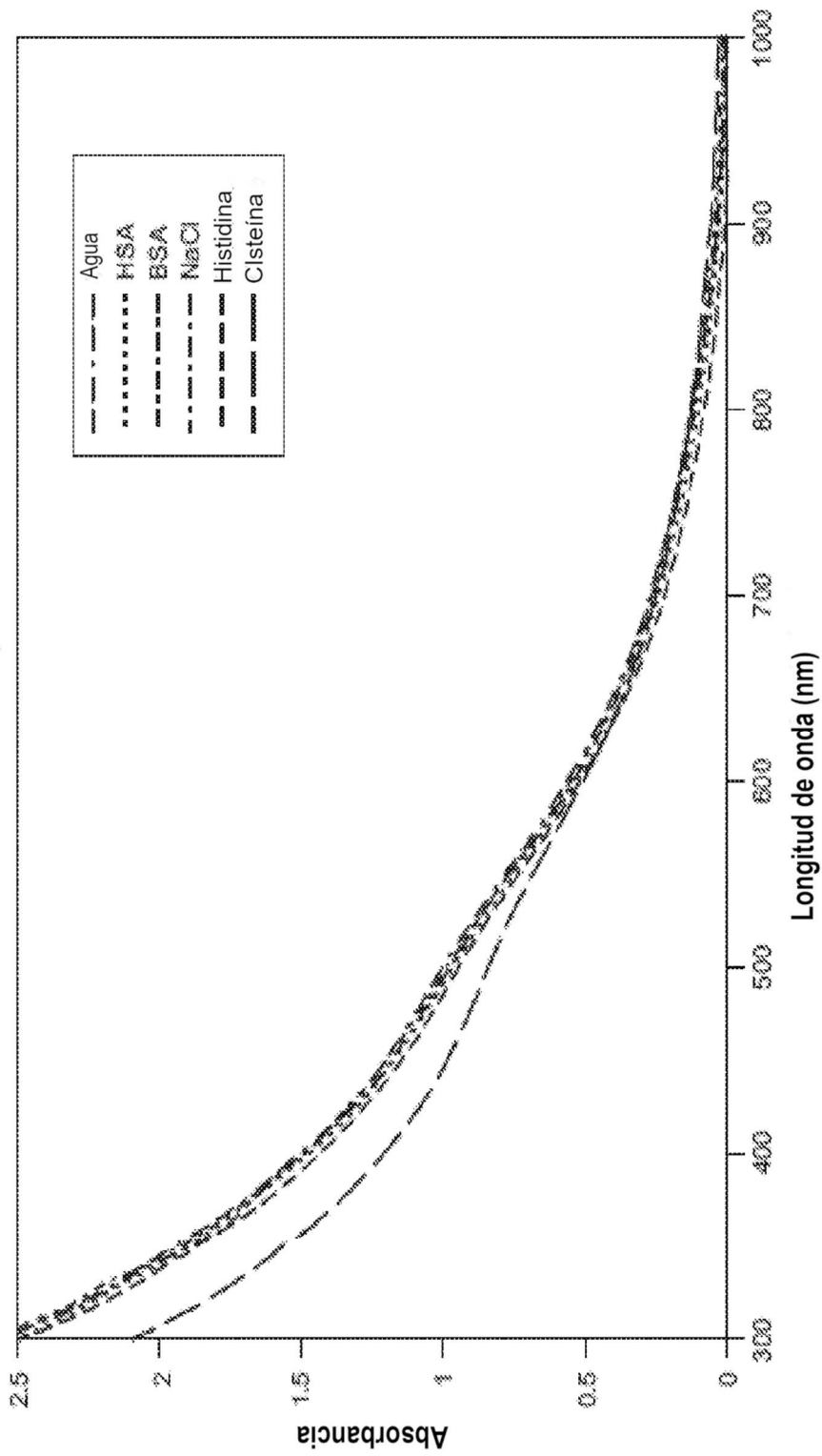


Figura 12A

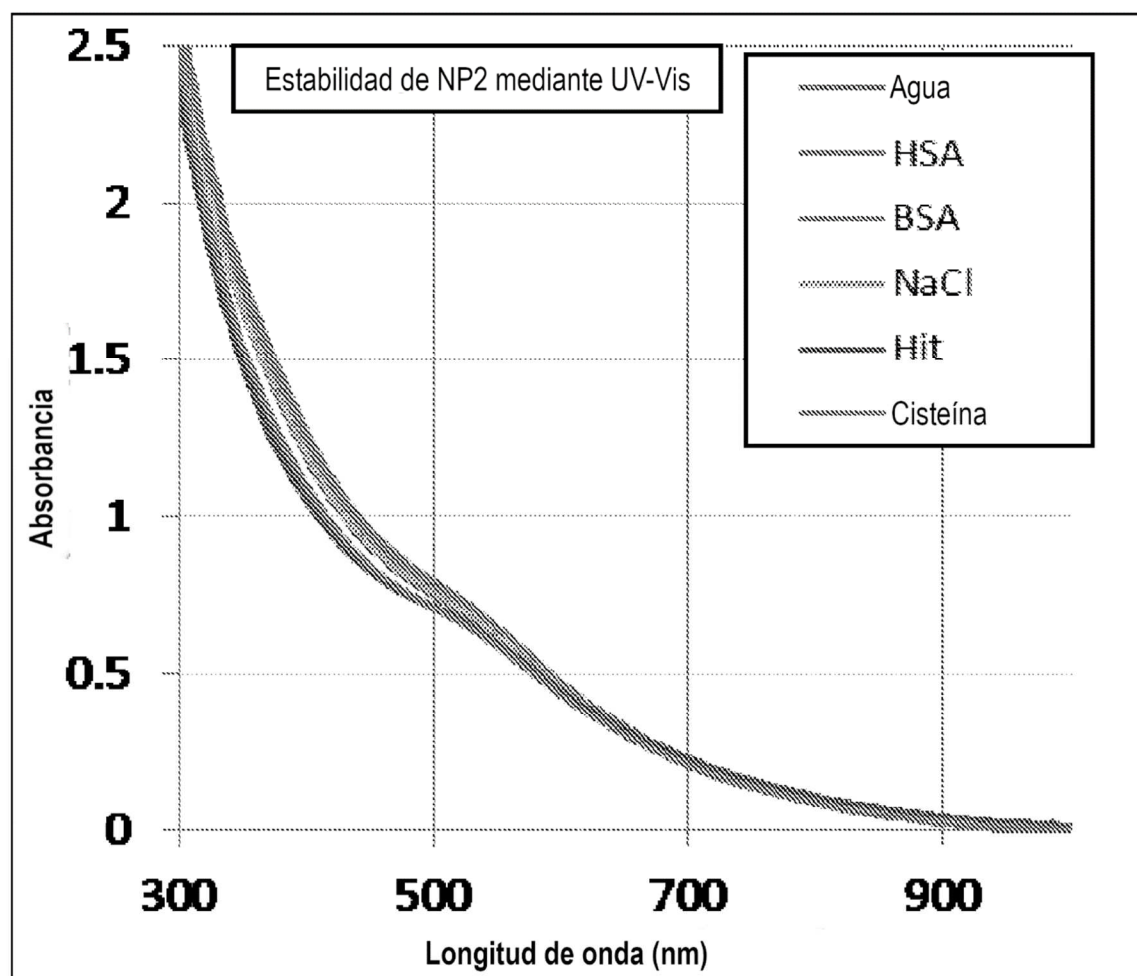


Figura 12B

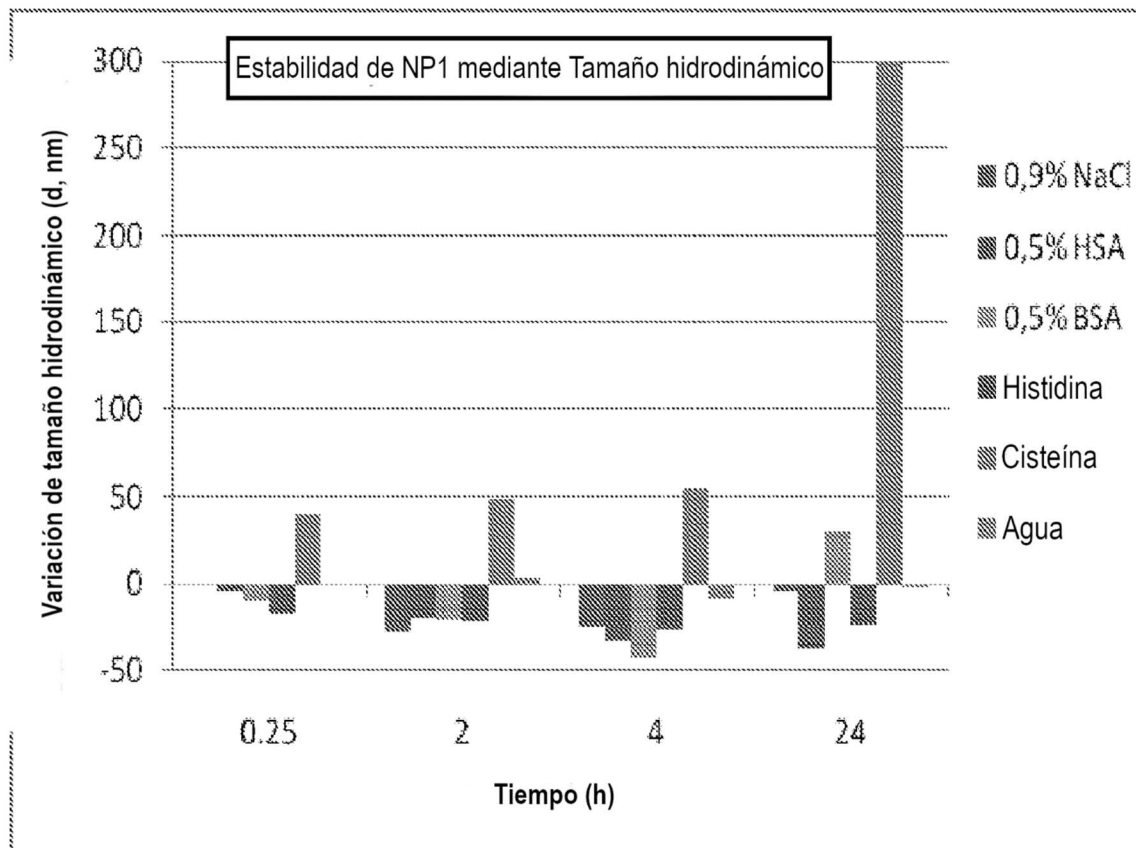


Figura 12C

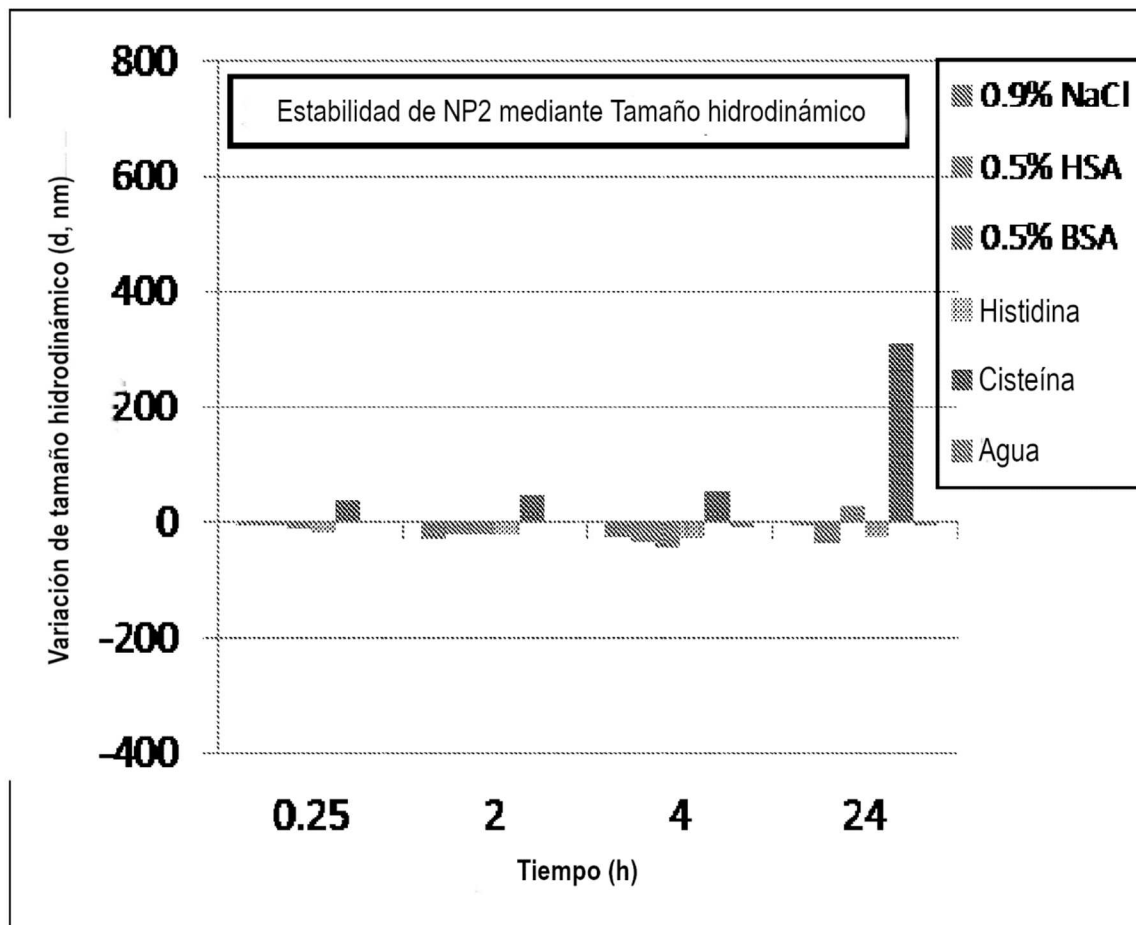


Figura 12D

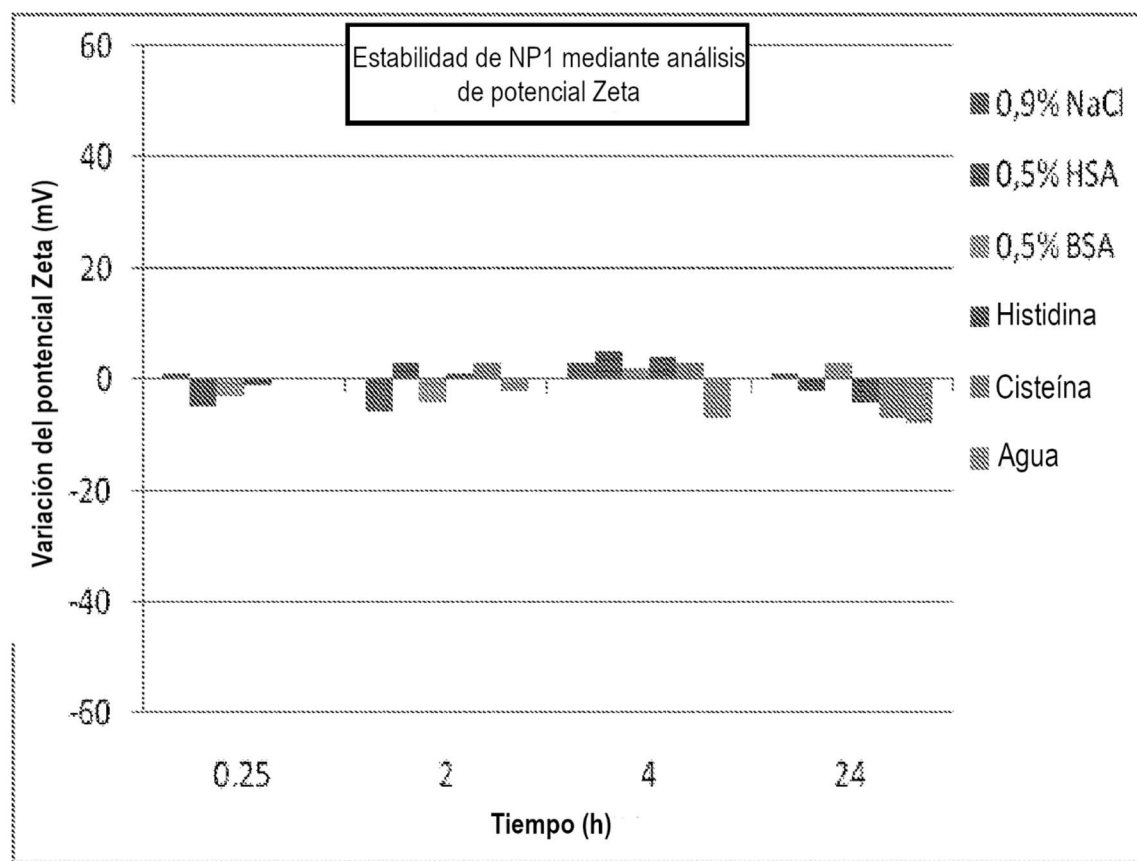


Figura 12E

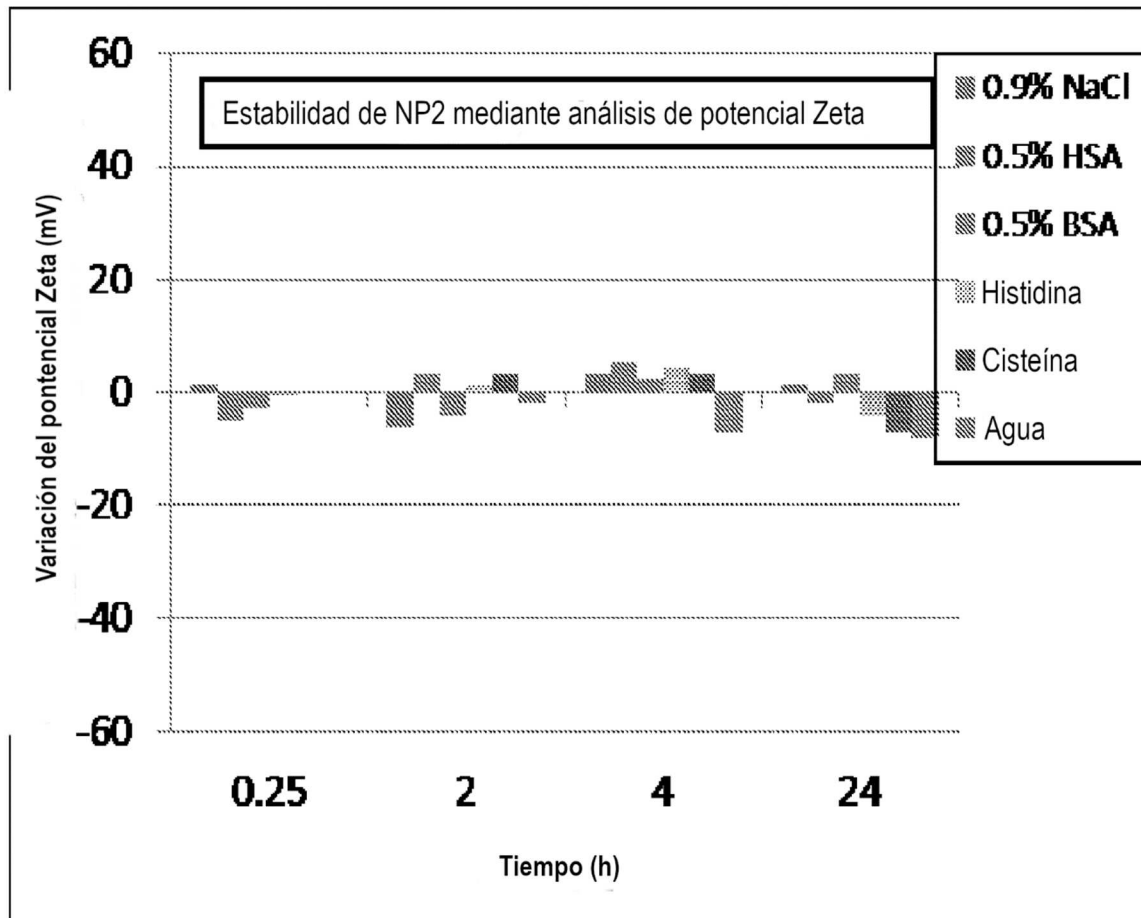


Figura 12F

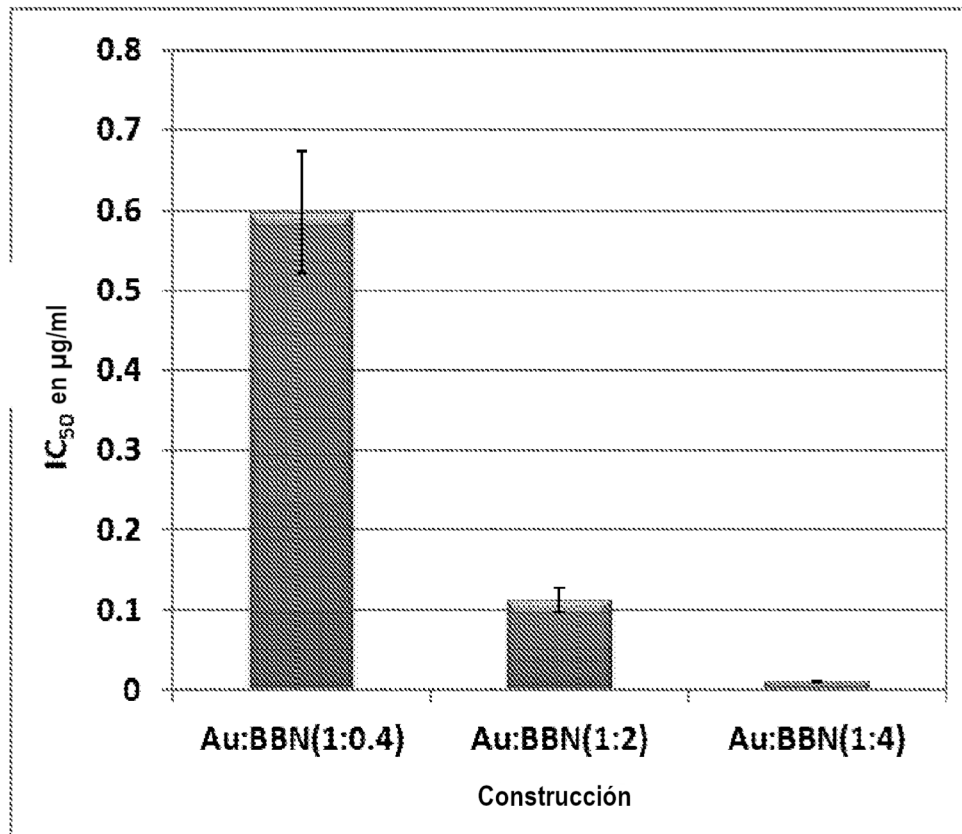


Figura 13

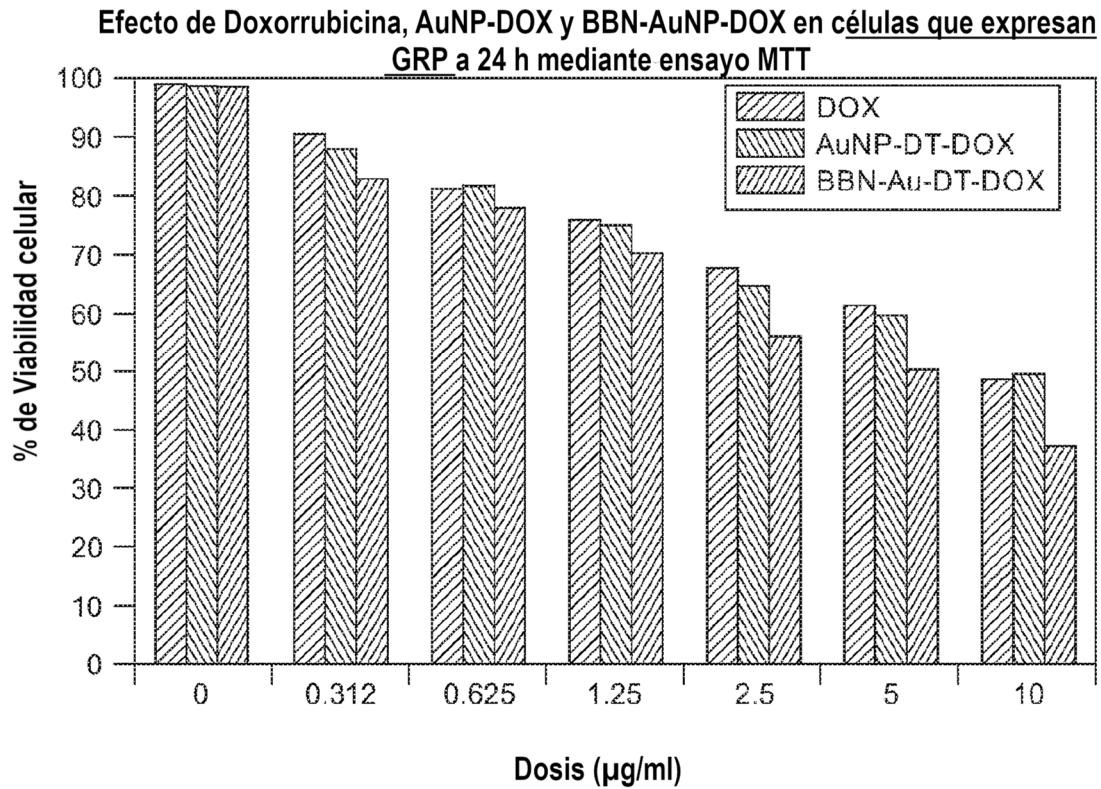


Figura 14

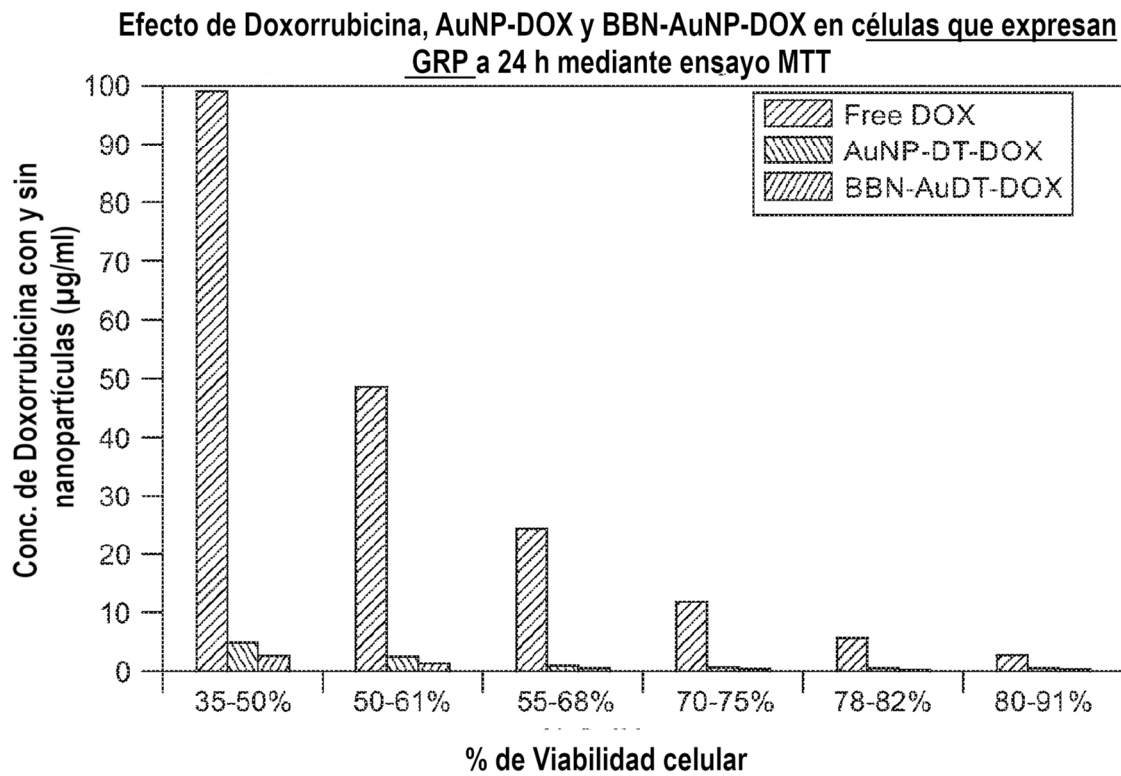
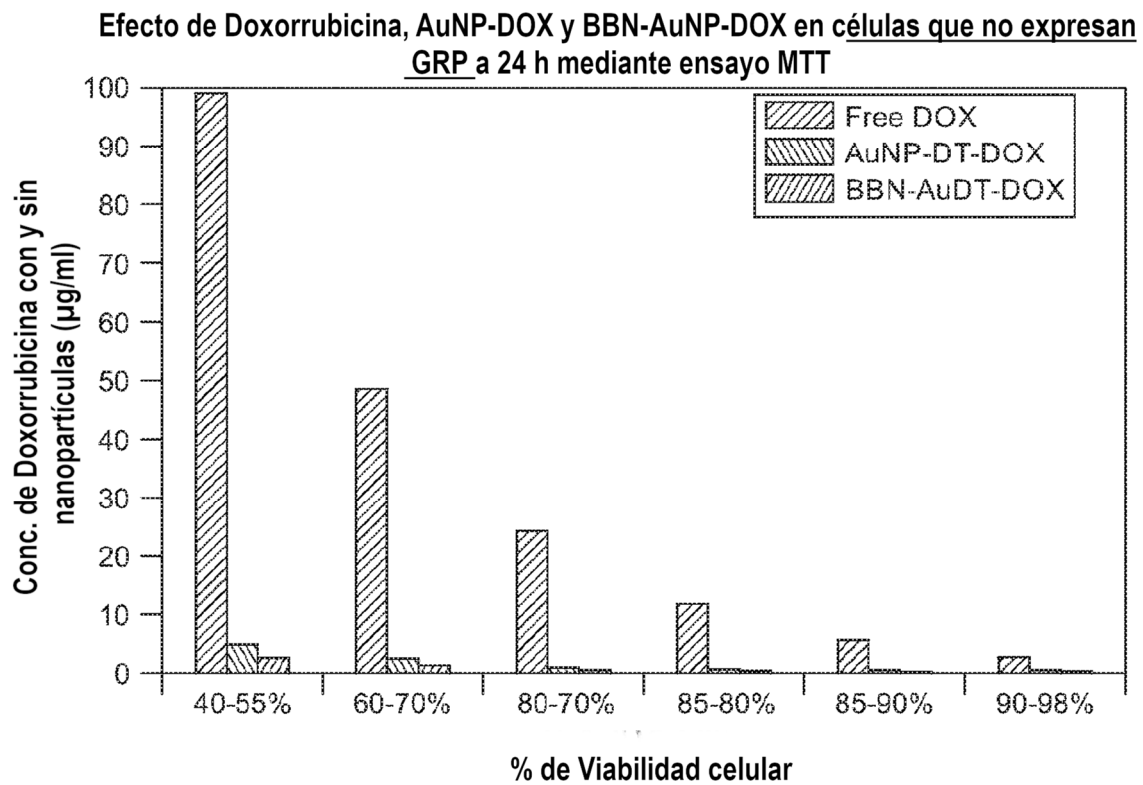
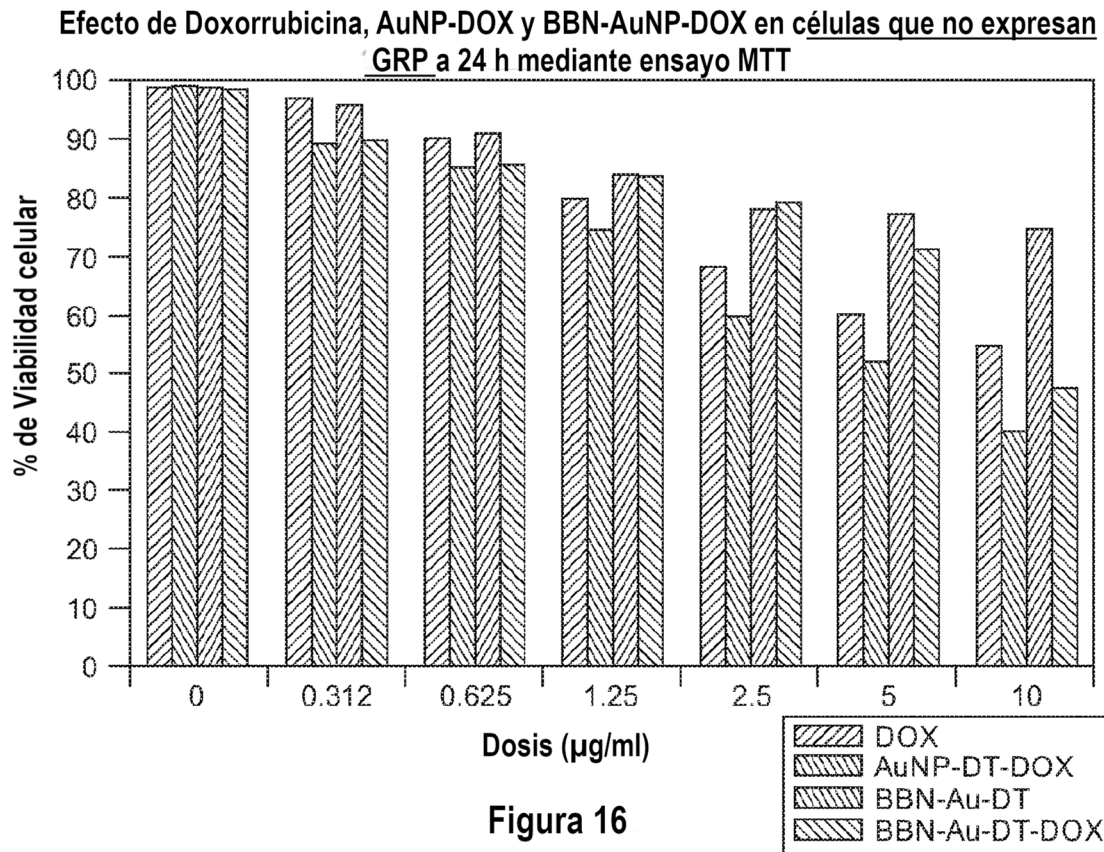


Figura 15



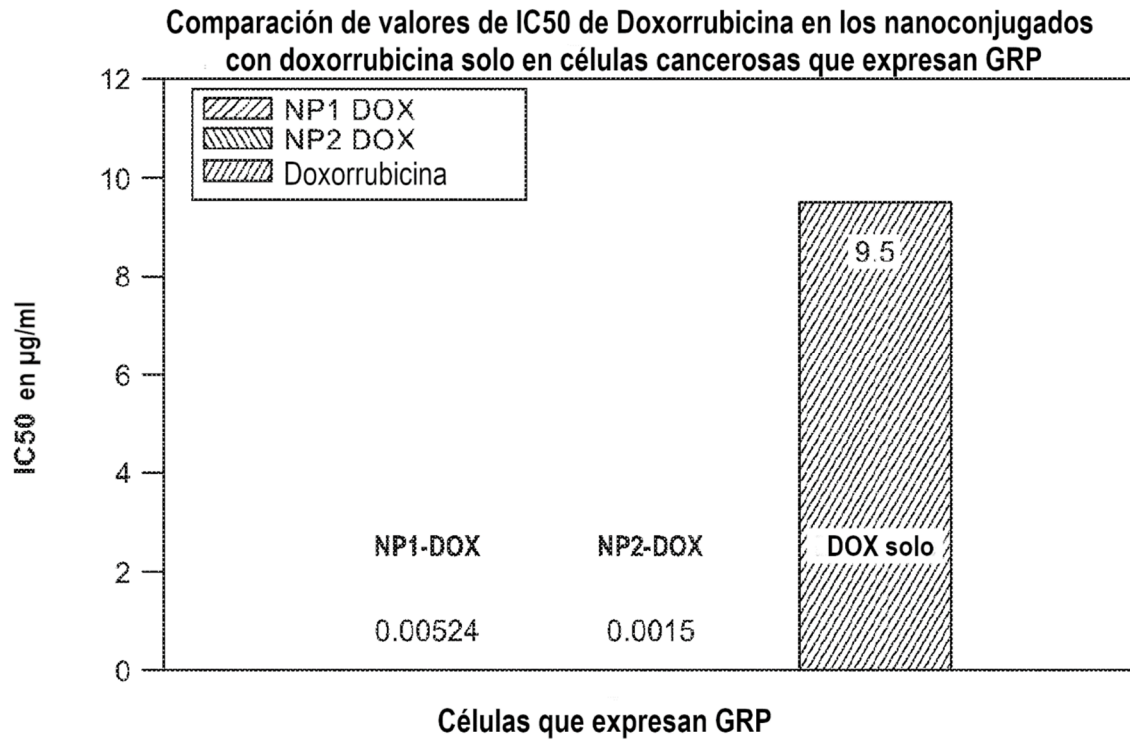


Figura 18

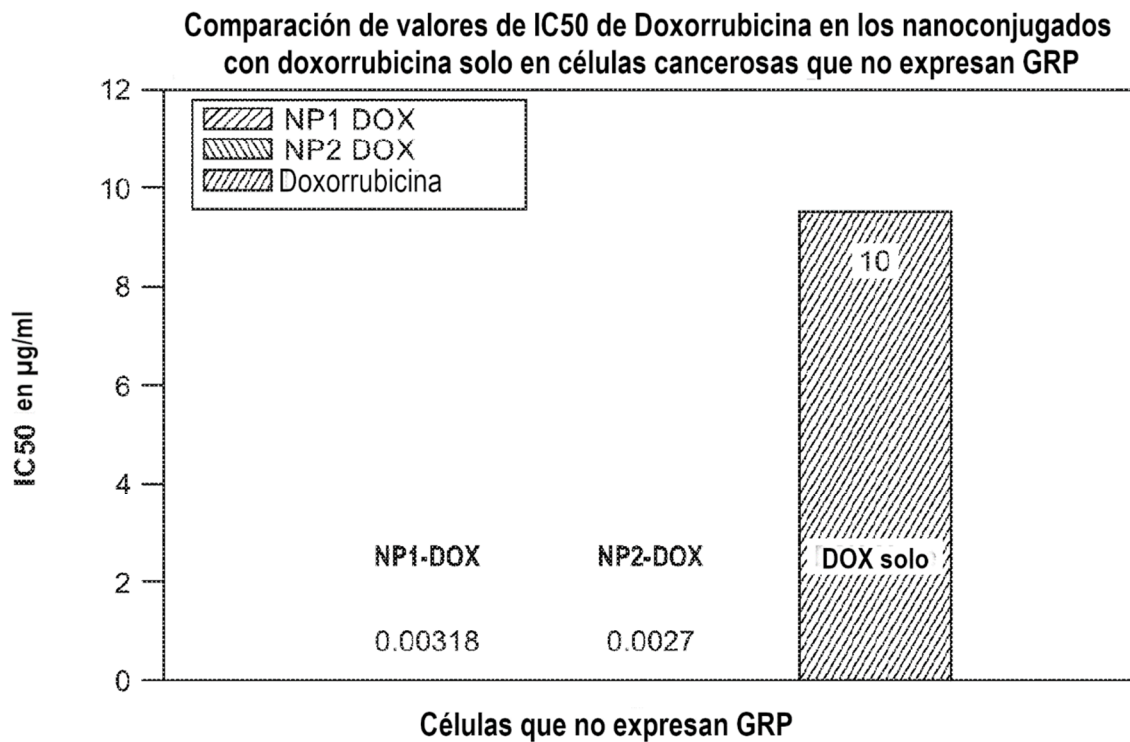


Figura 19

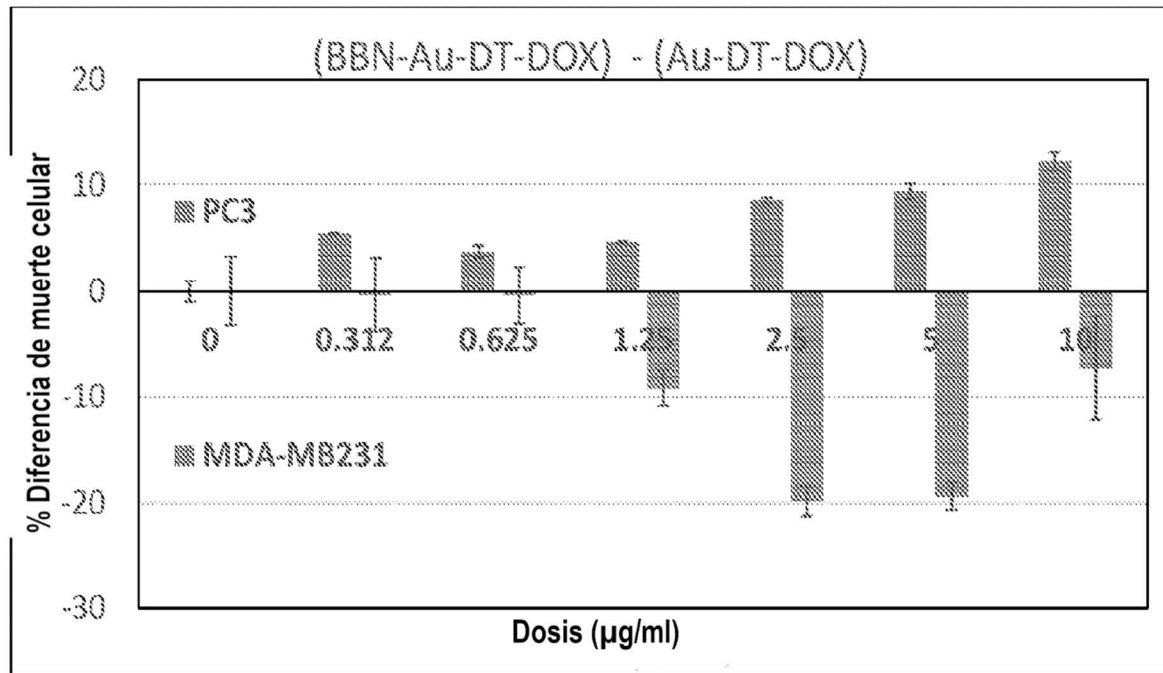


Figura 20