

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 598**

21 Número de solicitud: 201830993

51 Int. Cl.:

A61K 47/50 (2007.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C08L 25/06 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

15.10.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.07.2020

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2019/070259

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
HOSPITAL REAL. AVDA. DEL HOSPICIO S/N
18071 GRANADA ES**

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ MARTÍN , Rosario María ;
MARCHAL CORRALES, Juan Antonio;
DÍAZ MOCHÓN, Juan José;
CANO CORTÉS, Victoria;
NAVARRO MARCHAL , Saúl Abenhamar y
RUIZ BLAS, Maria Paz**

54 Título: **NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONALES PARA TERAGNOSIS**

57 Resumen:

Nanopartículas multifuncionales para teragnosis.

La presente invención se refiere al campo de la medicina, en particular a nanopartículas (NP) funcionalizadas para ser utilizadas en la terapéutica (tratamiento o diagnóstico) de cáncer, a composiciones farmacéuticas o nanodispositivos que las comprenden y también al método para obtener dichas nanopartículas funcionalizadas. Las nanopartículas descritas en la presente invención se pueden usar específicamente para tratar el cáncer de una manera eficiente ya que son capaces de detectar selectivamente las células tumorales.

ES 2 776 598 A1

DESCRIPCIÓN

NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONALES PARA TERAGNOSIS

SECTOR DE LA TÉCNICA

5 La presente invención se engloba en el área médica, refiriéndose a nanopartículas funcionalizadas (NPs) y su uso en la teragnosis (tratamiento y diagnóstico) del cáncer, a las formulaciones farmacéuticas o nanodispositivos que las comprenden y también a los métodos para obtener dichas nanopartículas funcionalizadas. Las nanopartículas descritas en la presente invención se pueden usar de forma específica para el tratamiento del cáncer de
10 forma eficiente, pudiendo detectar de forma selectiva las células tumorales.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Orientación activa tumoral

La eficacia terapéutica de los sistemas de liberación de fármacos dirigidos a tumores no está optimizada. La primera razón es la pobre internalización celular en el tumor. La presentación
15 en la superficie de las NPs de un ligando tumoral específico, como anticuerpos (Ac), fragmentos de Ac, péptidos, aptámeros, polisacáridos, sacáridos, ácido fólico, y otros compuestos, podría incrementar la retención y acumulación de las NPs en el sistema vascular tumoral, dando lugar a una internalización eficiente y selectiva en las células tumorales, proceso conocido como "*orientación activa tumoral*". Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado
20 que las NPs dirigidas activamente mediante un ligando con diferentes formulaciones de fármacos presentan un incremento, si bien en diferentes grados, de su acción terapéutica, si se compara con la forma pasiva. Además de la orientación celular tumoral, la neovasculatura del tumor representa otra diana interesante para la quimioterapia del cáncer, como la angiogénesis tumoral que se sabe que es de gran importancia en el crecimiento y la
25 metástasis de los tumores sólidos. La obliteración de la neovasculatura tumoral dará como resultado la contracción del tumor sólido establecido al bloquear el suministro de sangre (privación selectiva de cáncer). En los últimos años, diferentes tipos de ligandos dirigidos como el RGD cíclico (cRGD), ácido fólico (FA), ácido hialurónico (AH), el receptor epidérmico humano 2 (Her2), galactosa glicirrizina, bisfosfonatos, y (S, S-2- (3- (Ácido 5-amino-1-
30 carboxipentil) ureido) -pentanodioico (ACUPA) se han usado para la liberación de fármacos dirigidos activamente hacia el tumor.

Liberación dirigida hacia la vasculatura tumoral

La vasculatura tumoral, estructural y funcionalmente diferente comparada con la vasculatura de los tejidos normales, es muy desorganizada con vasos sanguíneos sorprendentemente tortuosos y fenestrados. De hecho, los vasos que se forman de nuevo son discontinuos, con
5 filtraciones y presentan una expresión irregular de numerosas moléculas como las integrinas, receptores de los factores de crecimiento de las células endoteliales, proteoglicanos de la superficie celular, proteasas y componentes de la matriz celular. En concreto, las proteínas funcionalmente importantes para la angiogénesis tumoral, que representan las dianas potenciales frente a las que se dirige la terapia anti-angiogénica, son los receptores para el
10 factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR), las integrinas $\alpha\beta_3$ y $\alpha\beta_5$, el ligando 4 delta (DDL4) , efrina B4 (Eph-B4) , efrina B2 (Eph-B2), los marcadores 5 y 8 de los tumores endoteliales (TEM 5, TEM 8), annexina A1 (ANXA 1) y fibronectina con dominio extra B (FN-ED-B).

La técnica de presentación de fagos (*phage display*) ha sido ampliamente utilizada para
15 analizar la diversidad estructural y molecular de la vasculatura normal y tumoral. El estudio de la presentación de fagos tiene como objetivo descubrir los péptidos diana de la vasculatura. Hasta la fecha, se han descubierto secuencias capaces de dirigirse hacia la vasculatura de tejidos u órganos normales como el cerebro, el riñón, el pulmón, los músculos, el páncreas, el timo y las glándulas mamarias.

En particular, el péptido RGD está dirigido a la vasculatura tumoral que expresa
20 selectivamente las integrinas $\alpha\beta_3$ y $\alpha\beta_5$. Las integrinas $\alpha\beta_3$ y $\alpha\beta_5$ están sobreexpresadas en la vasculatura asociada con las células tumorales y de glioma y su activación desencadena las vías responsables de la proliferación celular y la angiogénesis inducida por tumores. Los efectos antiangiogénicos y antitumorales de los péptidos que contienen el dominio RGD se
25 han probado en modelos preclínicos y clínicos, así como su eficacia en aplicaciones de imágenes.

Nanopartículas multifuncionales y teragnosis

Las aplicaciones recientes de nanopartículas multifuncionales se centran en la integración del diagnóstico y la terapia en un nanodispositivo, se denominan teragnosis. Este enfoque permite
30 el diagnóstico junto con el tratamiento y el control de la eficacia del tratamiento y el progreso de la enfermedad, al mismo tiempo. Se han publicado aplicaciones de diagnóstico en la terapia del cáncer, como quimioterapia, fotodinámica, siARN y terapia fototérmica.

Sin embargo, las nanopartículas poliméricas para el diagnóstico conocidas en la técnica anterior (NPs de oro, NPs de PLGA, etc.) comprenden tanto el fármaco como el fluoróforo encapsulados heterogéneamente dentro de la partícula y la PEGilación se produce mediante adsorción física o mediante enlaces de hidrógeno a la nanopartícula. Finalmente, el ligando para la liberación dirigida se conjuga con la superficie de la nanopartícula. Esta encapsulación heterogénea limita la versatilidad del sistema ya que debe tenerse en cuenta la compatibilidad del fármaco con el fluoróforo y, por otro lado, a medida que el fármaco se libera en el foco tumoral, la señal del fluoróforo también se diluye al encapsularse juntos. Por el contrario, la multifuncionalización controlada de la nanopartícula permite ajustar la relación entre las cantidades de cada uno de los componentes: el fármaco, el ligando y el agente de diagnóstico. Este hecho aumenta considerablemente las posibilidades de desarrollar nanodispositivos más efectivos para liberación controlada y monitoreo en tiempo real.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nanopartículas poliméricas (N) (en lo sucesivo nanopartículas de la invención) funcionalizadas con (a) al menos un agente para la imagen (T) y al menos una molécula bioactiva (D) y al menos un ligando (L). Particularmente, la presente invención proporciona un nanodispositivo de diagnóstico que comprende una nanopartícula que contiene una carga útil terapéutica, un agente de imagen y un ligando para la liberación dirigida.

La nanopartícula puede ser de composición orgánica o inorgánica. Las nanopartículas orgánicas pueden ser nanopartículas basadas en polímeros, incluyen poliestireno (PS) funcionalizado con grupos amino, ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico coglicólico (PLGA), poli (N-vinilpirrolidona) (PVP), polietilenglicol (PEG), policaprolactona, ácido poliacrílico (PAA), polimetil metacrilato y poliacrilamida. Adicionalmente, los polímeros naturales que pueden usarse para preparar las nanopartículas incluyen quitosano, gelatina, alginato de sodio y albúmina. La utilización de poliestireno funcionalizado con grupos aminos es particularmente adecuado para los fines de esta invención y se puede obtener, por ejemplo, mediante un proceso de polimerización por dispersión (Sánchez-Martin et al, 2005, ChemBioChem, 6, 1341-1345).

Además, la presente invención describe un método para producir estas nanopartículas de poliestireno funcionalizadas (NPs).

Como un ejemplo para ilustrar la invención, la nanopartícula de la invención se puede usar para tratar el cáncer de mama. En este caso, la molécula bioactiva (D) sería doxorubicina y

el ligando (L) sería una secuencia peptídica específica del tejido de cáncer de mama. La principal ventaja de la nanopartícula de la invención es su estabilidad en una suspensión acuosa con una aglomeración de partículas mínima. Esto permite llevar a cabo una multifuncionalización de las nanopartículas de una manera eficiente ya que las cargas bioactivas son en general estables en agua. Además, la nanopartícula de la invención ofrece la posibilidad de llevar a cabo la multifuncionalización de forma genérica en disolventes orgánicos y el uso de estrategias ortogonales para conjugar la molécula bioactiva (D) y controlar la cantidad de cada una de estas moléculas bioactivas que se incorpora. Así, una característica importante del nanodispositivo de la invención es su versatilidad ya que simplemente cambiando o adaptando la molécula bioactiva (D) puede adaptarse para el diagnóstico o para la terapia y también puede dirigirse a diferentes tipos de cáncer dependiendo del ligando (L) finalmente elegido. Además, el régimen de dosificación de la molécula bioactiva (D), la concertación del ligando (L) y el agente de imagen (T) pueden modificarse y optimizarse con la nanotecnología utilizada en la invención. Esto permitiría que el sistema se pueda escalar con facilidad, versatilidad y reproducibilidad.

En consecuencia, las nanopartículas de la invención son una herramienta efectiva y no tóxica para tratar o diagnosticar el cáncer *in vivo*. En particular, pueden considerarse como una terapia antitumoral selectiva que también se complementa con el control de la eficacia del tratamiento (grado de reducción del tumor) y la cinética de liberación del fármaco. Por lo tanto, las nanopartículas de la invención permitirán la integración en un único agente terapéutico de las siguientes características: selectividad farmacológica, especificidad tisular y tratamiento personalizado.

Además, la presente invención también se refiere a un nanodispositivo o una composición farmacéutica que comprende las nanopartículas de la invención, a su uso en el tratamiento, monitorización y diagnóstico de cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema que muestra el proceso de funcionalización de las nanopartículas de poliestireno aminometiladas (NP-1). Las NP 1 (Cy7-NP) se funcionalizaron con Cy7 (cianina 7).

Figura 2. Esquema que muestra el proceso de funcionalización de las nanopartículas de poliestireno aminometiladas (NP-2). Las NPs 2 (HP-Cy7-NP) se funcionalizaron con el *homing peptide* (HP) y Cy7.

Figura 3. Esquema que muestra el proceso de funcionalización de las nanopartículas de poliestireno aminometiladas (NP-3). Las NP 3 (Dox-Cy7-NP) se funcionalizaron con doxorubicina (Dox) y Cy7.

Figura 4. Esquema general de síntesis de nanopartículas trifuncionalizadas de la invención.
5 Los NP 4 (Dox-HP-Cy7-NP) se funcionalizaron con HP, Dox y Cy7.

Figura 5. Liberación de Doxorubicina de las Dox-HP-Cy7-NP a pH 7,4 y pH 5,2 en 10% de FBS. Barras de error: media \pm S.D.

Figura 6. Eficiencia de la internalización celular de nanopartículas de la invención por las células MDA MB 231 (24 horas de incubación).

10 **Figura 7.** Comparación entre la eficacia de internalización de la nanopartícula de la invención que es una nanopartícula trifuncionalizada Dox-HP-Cy7-NP (NP 4) en comparación con las nanopartículas bifuncionalizadas: Dox-Cy7-NP (NP-3), HP-Cy7 -NPs (NP-2) y las nanopartículas monofuncionalizadas: Cy7-NPs (NP 1).

Figura 8. Análisis mediante citometría de flujo del tiempo de incubación frente a la eficiencia
15 de internalización (% de células que contienen NP).

Figura 9. Análisis de la eficacia antiproliferativa de la nanopartícula de la invención en comparación con el fármaco en solución. Cálculo del valor de la IC50.

Figura 10. Evaluación *in vivo* llevada a cabo usando un modelo de ratones en el que se ha inducido un tumor en la mama inyectando las células modelo *in vitro* (MDA-MB231).

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

Para el propósito de la presente invención, "funcionalización" se refiere a la introducción de moléculas o polímeros orgánicos en la superficie de la nanopartícula. Dado que la
25 nanopartícula de la invención se funcionaliza con tres tipos diferentes de moléculas (T, D y L) con diferentes funciones, se considera trifuncionalizada.

Para el propósito de la presente invención, el "agente de imágenes (T)" se refiere a cualquier agente que pueda usarse para controlar la eficacia del tratamiento o el diagnóstico. Ejemplos de este agente de imágenes podrían ser (lista no exhaustiva): fluoróforos orgánicos tales

como *bodipys* y colorantes fluorescentes de larga duración para imágenes ópticas, agentes de contraste para imágenes de cáncer de resonancia magnética como derivados de gadolinio: ácido gadopentético, ácido gadotérico de gadodiamina y gadoteridol; derivados del hierro: citrato amónico de hierro III, feróxido y óxido de hierro III; y derivados de magnesio: mangafodipir.

Para el propósito de la presente invención, la "molécula bioactiva (D)" se refiere a cualquier agente terapéutico que puede usarse para tratar el cáncer (u otras enfermedades) o cualquier agente de diagnóstico que pueda usarse para el diagnóstico de cáncer, dependiendo de la intención uso de la nanopartícula de la invención. Ejemplos de los tipos de cáncer que pueden tratarse o diagnosticarse con la nanopartícula de la invención son (lista no exhaustiva): cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, melanoma, etc. Ejemplos de agentes terapéuticos son (lista no exhaustiva): doxorubicina, epirubicina, paclitaxel, 5-FU, gemcitabina, ciclofosfamida, eribulina, capecitabina, etc. En esta invención el agente terapéutico de elección es la doxorubicina usada para el tratamiento del cáncer de mama. Además, la nanopartícula de la invención podría comprender al mismo tiempo más de una molécula bioactiva (D) que se diseñaría por métodos de conjugación química, dando lugar a una plataforma de diagnóstico versátil y altamente específica, mediante la aplicación de estrategias ortogonales que permiten la multifuncionalización.

Para el propósito de la presente invención, el "ligando (L)" se refiere a cualquier molécula, particularmente cualquier péptido específico tumoral dirigido al tumor a tratar o diagnosticar. El ligando o péptido de referencia puede detectar el tumor *in vivo* y liberar agentes anticancerígenos específicamente en el tumor. Ejemplos de ligandos podrían ser (lista no exhaustiva): ligandos peptídicos que están dirigidos a otros objetivos biológicos (por ejemplo, TEM 5 y TEM8, DDL4, etc.) así como anticuerpos monoclonales (por ejemplo, EGFR, HER2, etc.).

Método para producir las nanopartículas

Por lo tanto, la primera realización de la presente invención se refiere a un método (método de la invención) para producir nanopartículas (NP) de poliestireno funcionalizadas, preferiblemente NP de poliestireno amino funcionalizadas capaces de ser bifuncionalizadas, que comprende las siguientes etapas:

a) Introducir las NP en un medio adecuado, preferiblemente dimetilformamida (DMF), en el que un espaciador de PEG protegido (o cualquier otro espaciador adecuado), preferiblemente protegido por Fmoc (fluorenilmetoxicarbonilo), preferiblemente ácido Fmoc-4,7,10-trioxa-1,13-

tridecanodiaminasuccinámico (Fmoc-PEG-OH), se disuelve y activa en el mismo o se activa antes de disolverlo en el medio, durante un periodo de tiempo suficiente para unirse al espaciador de PEG protegido con Fmoc, preferiblemente Fmoc-PEG-OH, a las nanopartículas amino;

5 b) Desproteger opcionalmente el grupo Fmoc de los NP del paso a) y posteriormente agregar uno o más espaciadores PEG protegidos con Fmoc, preferiblemente ácido Fmoc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiaminasuccinámico (Fmoc-PEG-OH) , de la misma manera que se describe en el paso a);

10 c) Desproteger el grupo Fmoc de los NP del paso a) o b) y posteriormente agregar uno o más aminoácidos o sus análogos, preferiblemente una o más lisina que tienen sus grupos N- α -amino y N- ϵ protegidos por grupos protectores ortogonales como Dde y Fmoc, preferiblemente Fmoc-Lys (Dde); y

15 d) Desproteger opcionalmente el grupo Fmoc de los NP del paso c) y posteriormente agregar uno o más espaciadores PEG protegidos con Fmoc, preferiblemente ácido Fmoc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiaminasuccinámico (Fmoc-PEG-OH) , de la misma manera que se describe en el paso a).

20 En la primera realización de la presente invención, las nanopartículas se bifuncionalizan desprotegiendo los grupos Fmoc y Dde y uniendo dos grupos químicos, usados para funcionalizar las NP, respectivamente, al grupo amino de la cadena lateral de lisina unido al grupo protector Dde antes de la etapa de desprotección y al grupo amino unido al grupo protector Fmoc antes de la etapa de desprotección.

En la primera realización de la presente invención se desprotege el grupo Fmoc de las NP de la etapa d) o c) y posteriormente se añade uno o más aminoácidos o análogos protegidos ortogonalmente con Dde y Fmoc, preferiblemente Fmoc-lys- (Dde).

25 En la primera realización de la presente invención, las nanopartículas se trifuncionalizan desprotegiendo los grupos Fmoc y Dde y uniendo tres grupos químicos, usados para trifuncionalizar las NPs, dos grupos amino al menos de la cadena lateral de lisina, respectivamente, unido a los grupos Dde antes de la etapa de desprotección y al amino unido al grupo Fmoc antes de la etapa de desprotección.

30 En la primera realización de la presente invención, la trifuncionalización de las NP se produce uniendo a las NP un grupo químico que comprende dos espaciadores de PEG protegidos ortogonalmente, preferiblemente protegidos con Fmoc, preferiblemente ácido Fmoc-4,7,10-

trioxa-1,13-tridecanodiaminasuccinámico (Fmoc-PEG-OH), de dos unidades cada uno y dos aminoácidos o análogos que tienen sus grupos N- α -amino y N- ϵ protegidos por grupos protectores ortogonales como Dde y Fmoc, preferiblemente Fmoc-Lys (Dde).

5 En la primera realización de la presente invención, un primer espaciador de PEG de dos unidades se acopla directamente a las NP; un primer aminoácido o análogo preferiblemente lisina protegida ortogonalmente se acopla directamente al grupo amino del primer espaciador de PEG; el segundo espaciador de PEG se acopla directamente al grupo alfa-amino del primer grupo lisina y el segundo grupo lisina se acopla directamente al grupo amino del segundo espaciador PEG.

10 En la primera realización de la presente invención, las nanopartículas se trifuncionalizan desprotegiendo los grupos Fmoc y Dde y acoplado tres grupos químicos respectivamente dos grupos amino al menos de la cadena lateral de lisina, respectivamente, unido a los grupos Dde antes de la etapa de desprotección y al amino unido al grupo Fmoc antes de la etapa de desprotección.

15 En la primera realización de la presente invención, las NP se caracterizan por ser reticuladas mediante divinilbenceno.

En la primera realización de la presente invención, la nanopartícula se trifuncionaliza con (a) al menos un agente de imagen (T), al menos una molécula bioactiva (D) y al menos un ligando (L).

20 En la primera realización de la presente invención, el agente de imágenes (T) es un fluoróforo, preferiblemente un derivado de la cianina de rojo lejano (Cy7).

En la primera realización de la presente invención, la molécula bioactiva (D) es un agente terapéutico, un agente de diagnóstico o un fármaco, preferiblemente doxorubicina.

25 En la primera realización de la presente invención, el ligando (L) es un péptido o péptido mimético específico de tumor, preferiblemente el homing peptide RGD.

Nanopartículas de la invención

30 La segunda realización de la presente invención se refiere a una nanopartícula de poliestireno o aminopoliestireno (nanopartícula de la invención) trifuncionalizada, preferiblemente con (a) al menos un agente de imagen (T), al menos una molécula bioactiva (D) y al menos un ligando (L), en el que dicha nanopartícula está unida a un grupo químico que comprende dos espaciadores de PEG protegidos con Fmoc, preferiblemente ácido Fmoc-4,7,10-trioxa-1,13-

tridecanodiaminasuccinámico (Fmoc-PEG-OH), de dos unidades cada uno y dos aminoácidos o análogos, preferiblemente una lisina que tienen sus grupos N- α -amino y N- ϵ protegidos por grupos protectores ortogonales como Dde y Fmoc, preferiblemente Fmoc-Lys (Dde).

5 En la segunda realización preferida de la nanopartícula de la invención, un primer espaciador de PEG de dos unidades se une directamente a las NPs; un primer grupo lisina está directamente unida al grupo amino del primer espaciador PEG; el segundo espaciador de PEG se acopla directamente al grupo alfa-amino del primer grupo lisina y el segundo grupo lisina se acopla directamente al grupo amino del segundo espaciador PEG.

10

En la segunda realización preferida de la nanopartícula de la invención, el rango de tamaño de la nanopartícula es de 100 nm a 2000 nm. Preferiblemente, la nanopartícula de la invención tiene un tamaño de alrededor de 200 nm.

15 En la segunda realización preferida de la nanopartícula, el ligando (L) es un péptido o péptido mimético específico de tumor, preferiblemente el homing peptide RGD.

En la segunda realización preferida de la nanopartícula de la invención, la molécula bioactiva (D) es un agente terapéutico, un agente de diagnóstico o un fármaco, preferiblemente la doxorubicina.

20

En la segunda realización preferida de la nanopartícula, el agente de imagen (T) es un fluoróforo, preferiblemente un derivado de cianina de rojo lejano (Cy7).

25 **Nanodispositivo de la invención**

La tercera realización de la presente invención se refiere a un nanodispositivo, particularmente un nanodispositivo de diagnóstico, que comprende cualquiera de las nanopartículas de la invención que se describen en la segunda realización de la invención o bien una nanopartícula

30

obtenido por el método de la invención.

Usos de las nanopartículas de la invención

La cuarta realización de la presente invención se refiere a la nanopartícula, el nanodispositivo

35

o la nanopartícula obtenida por el método de la invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, el diagnóstico de cáncer o en el control del tratamiento del cáncer.

Composición farmacéutica

La quinta realización de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que
5 comprende la nanopartícula o la nanopartícula obtenida por el método de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Nanopartícula polimérica (NP 1).

La nanopartícula de la invención puede estar hecha de los siguientes materiales (lista no
10 exhaustiva): poliestireno, 4-aminoestireno, estireno, amino poliestireno, ácido poliláctico (PLA), acidopoliolecololítico (PLGA), poli (N-vinilpirrolidona) (PVP), polietilenglicol, policaprolactona, ácido poliacrílico (PAA), poli (metacrilato de metilo), poliacrilamida, quitosano, gelatina o alginato de sodio, entre otros polímeros. En una realización particular, la nanopartícula de la invención está hecha de poliestireno o 4-aminoestireno.

15 Además, la nanopartícula de la invención está reticulada con divinilbenceno (DVB), 1,4-bis (4-vinilfenoxi) butano, bis (2-metacriloil) oxietildisulfuro, azobisisobutironitrilo (AIBN), dihidrocloruro de 2, 2'-azobis (2 -metilpropionamida) o peróxido de benzoilo (BPO). Preferiblemente, la nanopartícula de la invención está reticulada con divinilbenceno.

En otra realización particular, la nanopartícula de la invención se funcionaliza con grupos
20 amino, carboxilo (en particular ácido carboxílico), maleimida, azida, alquino, tetrazina, tiol, ciclooctino, grupos alcohol. Preferiblemente, la nanopartícula de la invención se funcionaliza con grupos amino (animofuncionalizados).

En una realización aún más preferida, la nanopartícula de la invención es poliestireno, reticulada con divinilbenceno y funcionalizada con grupos amino.

25 Ejemplo 2. Protocolos de conjugación de cargas bioactivas a las nanopartículas.

Ejemplo 2.1: Las nanopartículas de aminometil poliestireno (NP-1) se funcionalizaron como se describe a continuación y se resumen en la **Figura 1** siguiendo un protocolo estándar de Fmoc en fase sólida, usando Oxyma y DIC como reactivos de acoplamiento. Las NPs se funcionalizaron con el espaciador polietilenglicol (PEG) de la siguiente manera: las NPs se
30 lavaron y se resuspendieron en (dimetilformamida) DMF. Al mismo tiempo, se disolvió ácido Fmoc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiaminasuccinámico (Fmoc-PEG-OH) (50 eq) en DMF y se activó con oxima y (N, N'-diisopropilcarbodiimida) DIC (50eq). Esta solución se añadió a las

NPs y se agitó durante dos horas a 60°C. A continuación, la desprotección del grupo Fmoc (fluorenilmetoxicarbonilo) de las NPs se llevó a cabo tratando con piperidina / DMF al 20% (3 x 20 minutos). Para la bifuncionalización de NPs, se añadió Fmoc-Lys (Dde) -OH (50 eq), previamente activada con oxima y DIC (50 eq) en DMF, durante dos horas a 60 °C.

5 Posteriormente, se agregaron dos espaciadores PEG de la misma manera que se describe arriba. Las **NPs 1 (Cy7-NP)** se marcaron con el fluoróforo Cy7 (cianina 7) utilizado para marcar la NP para la obtención de imágenes de fluorescencia y la desprotección del grupo protector Dde se llevó a cabo con una solución de hidroxilamina.HCl (0,4 mmol) e imidazol (0,3 mmol) en NMP (1 ml) durante 1 hora, después de lo cual se añadió el fluoróforo Cy7 (1 eq) a las NPs

10 en presencia de DIPEA (2 eq) en DMF y se agitó durante 15 horas a 25 °C.

Ejemplo 2.2: Tal como se muestra en la **Figura 2**, los **NP 2 (HP-Cy7-NP)** se funcionalizaron con el *homing peptide* (HP) RGD. Para esto, después de la desprotección del grupo Fmoc, se añadieron anhídrido succínico (50 eq) y DIPEA (50 eq) a las NPs y se agitaron durante dos horas a 60 °C. Posteriormente, el grupo protector Dde se desprotegió y los NPs se marcaron

15 con Cy7 como se describe anteriormente. Finalmente, las NPs se activaron con oxima y DIC (50 eq) durante 4 horas a 25 °C, después de lo cual se añadió el HP (7 eq) en DMF con DIPEA y se agitó durante 15 horas a 25 °C.

Ejemplo 2.3: Tal como se muestra en la **Figura 3**, las **NPs 3 (Dox-Cy7-NP)** se funcionalizaron con doxorubicina (Dox). Para esto se realizó una desprotección del grupo Fmoc y se conjugó

20 el anhídrido succínico (50 eq) con DIPEA (25 eq) y se agitó durante 2 h a 60 °C. Posteriormente, el grupo Dde se desprotegió y las NPs se marcaron con Cy7, como se describió anteriormente. Las NPs se activaron con oxima y DIC (50 eq) durante 4 horas a 25 °C, y se añadieron 55% v / v (50 eq) de solución de hidrazina en DMF y se dejaron en agitación durante 15 horas a 25 °C. Las NPs se lavaron después con PBS a pH 6. Se disolvió

25 doxorubicina (1,6 mg, 1 eq) en PBS a pH 6 y se añadió a las NPs y la mezcla resultante se dejó en agitación durante 15 horas a 50 °C. Finalmente, las NPs se lavaron con PBS a pH 7,4.

Ejemplo 3. Trifuncionalización de nanopartículas.

Para la trifuncionalización de las **NPs 4 (Dox-HP-Cy7-NP)** (véase la **Figura 4**), las nanopartículas están doblemente PEGiladas con dos unidades del espaciador PEG y bifuncionalizadas utilizando una lisina protegida ortogonalmente con Dde y Fmoc. A continuación, las nanopartículas se funcionalizaron con un grupo carboxilo (utilizando anhídrido succínico) y se trataron con hidrazina antes de la conjugación con el fármaco a través de un enlace de hidrazona (enlazador sensible a pH). En el siguiente paso, se realizó

30

un segundo acoplamiento con Fmoc-Lys (Dde) -OH para lograr la trifuncionalización de la nanopartícula. Se llevó a cabo la carboxifuncionalización de las NPs, seguido del marcaje fluorescente de las mismas usando un derivado rojo de la cianina (Cy7). Este etiquetado permitirá seguir las nanopartículas mediante el uso de técnicas basadas en fluorescencia.

5 Finalmente, el *homing peptide* funcionalizado con un grupo aminoxy permitirá la unión quimioselectiva específica de sitio a nanopartículas carboxifuncionalizadas. Brevemente, las nanopartículas carboxifuncionalizadas se preactivaron con Oxyma y DIC (25 eq) en DMF durante 2 horas a 25 °C antes de la adición del *homing peptide* funcionalizado con el grupo aminoxy (20 equivalentes) y se mezclaron a 25 °C durante 18 horas para producir los

10 nanoconjugados deseados. A continuación, se llevó a cabo la desprotección del grupo Dde y se añadieron anhídrido succínico (50 eq) y DIPEA (50 eq) a las NPs y la solución se agitó durante dos horas a 60 °C. Las NPs se activaron con oxima y DIC (50 eq) durante 4 horas a 25 °C, después de lo cual se añadió una solución de hidrazina al 55% v/v (50 eq) en DMF y se dejó en agitación durante 12 horas a 25 °C. Después, las NPs se lavaron con PBS a pH 6.

15 Se añadió doxorrubicina en PBS a pH 6 a las NPs y la mezcla resultante se dejó en agitación durante 15 horas a 50 °C. Posteriormente, se llevó a cabo la desprotección del grupo Fmoc y se añadió una segunda Fmoc-Lys-OH, se eliminó el grupo Fmoc y se conjugó el anhídrido succínico. Nuevamente se desprotegió el grupo Dde y las NPs se marcaron con Cy7, como se describió anteriormente. Finalmente, las NPs se activaron con oxima y DIC (50 eq) durante

20 4 horas a 25 °C, después de lo cual se añadió el HP (7 eq) en DMF con DIPEA durante 15 horas a 25 °C.

Ejemplo 4. Evaluación de la eficacia de la internalización de las NPs por células de cáncer de mama.

25 Para evaluar la eficacia de la internalización de estas nanopartículas, se utilizó la línea celular de cáncer de mama MDA MB 231 como modelo celular. Se llevaron a cabo varios ensayos para determinar el número de nanopartículas necesarias para lograr el 50% de la internalización celular de las NPs en la población celular (MNF₅₀) (**Figura 6**). Se evaluó un rango de concentraciones de nanopartículas de 50 a 10.000 NPs/células durante 24 horas.

30 La **Figura 7** muestra los resultados obtenidos por citometría de flujo. La internalización de las nanopartículas trifuncionalizadas Cy7-HP-Dox-NP es muy eficiente con un valor de MNF50 de 1700 NPs/célula. La internalización se comparó con las nanopartículas de control: Cy7-NP, Cy7-Dox-NP, Cy7-HP-NP. Se realizó un estudio temporal para evaluar el efecto del tiempo de incubación en la internalización de estas nanopartículas. El tiempo es un factor

35 importante para la nanofección, cuanto mayor sea el tiempo de incubación, menos NPs se

necesitan. Comparamos (**Figura 8**) la internalización celular de las Dox-Cy7-NP con el HP-Dox-Cy7-NP durante un periodo de 72 horas en diferentes intervalos de tiempo (3, 6, 24, 48 y 72 horas), con un número fijo de NPs (5.000 NPs/célula). Como podemos observar en las imágenes de microscopía confocal a las 3 horas de incubación, la nanofección de las células ya se ha logrado, existiendo una clara diferencia entre ambos tipos de NPs, llegando las Dox-Cy7-NP a un 75% de nanofección en comparación con el 15 % de las HP-Dox-Cy7-NP. Mientras que a las 24 horas ambas alcanzan el 100% de nanofección. A partir de estos resultados, podemos concluir que las NPs trifuncionalizadas obtenidas se internalizan eficientemente en las células de cáncer de mama después de 24 horas de incubación.

Curiosamente, la presencia del *homing peptide* en la superficie de las NPs trifuncionalizadas disminuye la cantidad de NPs internalizadas en tiempos cortos (3 h) cuando se comparan con las NPs sin el ligando de orientación. Este resultado refuerza el hecho de que la internalización de estas NPs trifuncionalizadas es selectiva.

Ejemplo 5. Eficiencia terapéutica.

Se realizaron estudios de viabilidad celular para evaluar los efectos del fármaco (doxorubicina) en solución y conjugado a las NPs, en células de cáncer de mama MDA MB 231 triple negativas. La citotoxicidad de la Dox se estudió utilizando resazurina, un método colorimétrico cuantitativo para determinar la viabilidad celular. Para la evaluación de la viabilidad celular, las células se incubaron con diferentes concentraciones de doxorubicina en solución y, con diferente número de HP-Dox-Cy7-NP, como se muestra en las **Figura9**, durante 120 horas (5 días). Posteriormente, se determinó la capacidad de la doxorubicina para inhibir el 50% de crecimiento celular, IC_{50} , de la población con respecto a las células no tratadas mediante el ensayo colorimétrico de la resazurina. La IC_{50} de la doxorubicina en solución es de 1,67 nM mientras que la IC_{50} de la doxorubicina conjugada a las NPs es de 0,1 nM, que se corresponde con 2.200 NPs/célula. Esto demuestra la eficacia de la doxorubicina unida a las NPs ya que mantiene el valor de IC_{50} con respecto a la Dox en solución, lo que hace que las HP-Dox-Cy7-NP sea un agente proliferativo altamente eficaz. Sorprendentemente, la dosis de medicamento antitumoral (Dox) para lograr IC_{50} es mucho menor que la dosis requerida en la solución.

Ejemplo 6. Evaluación *in vivo*. Modelo de cáncer de mama / MBA MD231 / Modelo xenográfico.

Tal como se puede ver en la **Figura 10**, se llevó a cabo una evaluación *in vivo*, utilizando un modelo de ratones en el que se indujo un tumor en la mama inyectando las células modelo *in vitro* (MDA-MB231). Los resultados han sido positivos y refuerzan este prototipo. Como

resultado clave, debe tenerse en cuenta que en estos estudios *in vivo*, las nanopartículas trifuncionalizadas (denominadas VCC 107.4 (NP-4) se localizan en el área del tumor y el tamaño del tumor se reduce marcadamente sin que se observe toxicidad en el ratón.

Ejemplo 7. Descripción detallada de los protocolos de conjugación para la multifuncionalización.

1. Las NPs de la invención fueron sintetizadas mediante polimerización por dispersión.
2. Para llevar a cabo la etapa de conjugación entre los grupos aminos de las NPs 1 y los ácidos del fluoróforo Cy7 (cianina 7), las nanopartículas se acondicionaron previamente mediante su lavado, tres veces, con dimetilformamida (DMF), a través de ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos). Posteriormente, 50 equivalentes de ácido fmoc-4,7 10-trioxa-1,13-tridecanediaminasucinámico (Fmoc-PEG-OH) se disolvieron en 1 mL de DMF junto con 50 equivalentes de Oxima y 50 equivalentes de N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, la solución se añadió a las nanopartículas secas, se suspendió, y la suspensión se dejó agitando a 60 °C y 1.400 rpm durante 2 horas.
3. Pasadas las 2 horas, las nanopartículas se lavaron con tres ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos) para obtener las nanopartículas Fmoc-PEGiladas. La desprotección del grupo protector Fmoc (fluorenilmetoxicarbonilo) se llevó a cabo mediante un tratamiento consistente en tres lavados de 20 minutos con 1 mL de 20% piperidina en DMF. Después del tratamiento con piperidina, se realizaron tres lavados con 1 mL de DMF (13400 rpm, 3 minutos) mediante ciclos de suspensión-centrifugación. Una vez eliminado el grupo Fmoc mediante el tratamiento con el 20% de piperidina en DMF, se vuelve a PEGilar las NPs siguiendo el procedimiento descrito en el párrafo anterior. Tras los tres ciclos de lavado de las NPs (13400 rpm, 3 minutos), se realiza la desprotección del grupo Fmoc mediante el tratamiento con el 20% de piperidina en DMF y se vuelven a lavar las NPs. Seguidamente, 50 equivalentes de Fmoc-Lys-Dde(OH) se disolvieron en 1 mL de DMF junto con 50 equivalentes de Oxima y 50 equivalentes de DIC. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, la solución se añadió a las NPs secas, se suspendió, y la suspensión se dejó agitando a 60°C y 1.400 rpm durante 2 horas.
4. Nuevamente, se volvieron a lavar las NPs con tres ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos), se eliminó el grupo protector Fmoc mediante el tratamiento

con el 20% de piperidina en DMF, se lavaron las NPs con tres ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos) y se añadió a las NPs una solución de 50 equivalentes de Fmoc-PEG-OH con 50 equivalentes de Oxima y 50 equivalentes de DIC, agitada previamente a temperatura ambiente durante 10 minutos. Una vez añadida, se resuspendieron las NPs en dicha solución y se dejó agitando a 60 °C y 1.400 rpm durante 2 horas.

5

5. Se volvió a repetir todo el proceso descrito en el párrafo 4.

10

6. Se lavaron las NPs con tres ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos). Y se procedió a la desprotección del grupo Dde presente en la Fmoc-Lys-Dde(OH) mediante un tratamiento con una solución de 0.4 mmoles de hidroxilamina.HCl y 0.3 mmoles de imidazol disueltos en 1 mL de N-metil-pirrolidona (NMP) durante 1 hora a temperatura ambiente.

15

7. A continuación, se lavaron las NPs con tres ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos), se eliminó el grupo protector Fmoc mediante el tratamiento con el 20% de piperidina en DMF, se lavaron las NPs con tres ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos), simultáneamente se disolvió 0.1 eq de Cy7 junto con 0.1 eq de N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA) en DMF y se añadió esta solución a las NPs secas, se suspendió y se dejó la suspensión en agitación durante 15 horas a temperatura ambiente. Terminada la conjugación se lavaron las NPs con tres ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos) y se resuspendieron en 1 mL de agua miliQ.

20

25

8. Para realizar la conjugación del homing peptide RGD a las NPs 2 se realizaron las conjugaciones descritas en los párrafos 1-5. A continuación, se lavaron las NPs con tres ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos) y se llevó a cabo la desprotección del grupo Fmoc mediante el tratamiento con el 20% de piperidina en DMF, se lavaron las NPs con tres ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos) y se añadió a las NPs secas una solución de 50 equivalentes de anhídrido succínico y 50 equivalentes de DIPEA, agitada previamente a temperatura ambiente durante 2 minutos. Una vez añadida, se resuspendieron las NPs en dicha solución y se dejó agitando a 60°C y 1.400 rpm.

30

9. La desprotección del grupo Dde y la conjugación del fluoróforo Cy7 se llevó a cabo según los procedimientos descritos en los párrafos 6-7.

10. Finalmente, se lavaron las NPs con tres ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos) y se activaron los grupos carboxilos de las NPs mediante la adición de una solución de 50 equivalentes de Oxima y 50 equivalentes de DIC en 1 mL de DMF, se suspendieron las NPs y se dejaron en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. Transcurridas las 4 horas, se centrifugaron las NPs y se añadió una solución de 7 equivalentes del homing peptide RGD y 0.1 equivalente de DIPEA en 1 mL de DMF. Se dejó en agitación durante 15 horas a temperatura ambiente. Terminada la conjugación se lavaron las NPs con tres ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos) y se resuspendieron en 1 mL de agua miliQ.
11. La conjugación de la doxorubicina a las NPs 3 se llevó a cabo siguiendo las conjugaciones descritas en los párrafos 1-5 y 8-9.
12. Posteriormente, se lavaron las NPs con tres ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos) y se activaron las NPs mediante la adición de una solución de 50 equivalentes de Oxima y 50 equivalentes de DIC en 1 mL de DMF, se suspendieron las NPs y se dejaron en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. Transcurridas las 4 horas, se centrifugaron las NPs y se añadió una solución con 50 equivalentes de hidracina al 55% v/v en 1 mL de DMF y se dejaron en agitación durante 15 horas a 25 °C. A continuación, las NPs se lavaron y acondicionaron en 1 mL de PBS pH 6 mediante 3 ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos). Por último, se disolvió 1 equivalente de doxorubicina en 1 mL de PBS a pH 6 y se añadieron a las NPs y la mezcla resultante se dejó en agitación durante 15 horas a 50°C. Para terminar se lavaron las NPs con tres ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos) y se resuspendieron en 1 mL de PBS a pH 7.4.
13. La trifuncionalización de las NPs 4 se realizó siguiendo las conjugaciones descritas en los párrafos 1-6. A continuación, se lavaron las NPs con tres ciclos de suspensión-centrifugación (13.400 rpm, 3 minutos), y se conjugó el anhídrido succínico según el párrafo 8.
14. La conjugación de la doxorubicina se llevó a cabo como se ha descrito en el párrafo 12 pero al final se resuspendieron las NPs en 1 mL de DMF.
15. Se lavaron las NPs con tres ciclos de lavado de las NPs (13400 rpm, 3 minutos), se realizó la desprotección del grupo Fmoc mediante el tratamiento con el 20% de piperidina en DMF y se volvieron a lavar las NPs. Seguidamente, se unió Fmoc-Lys-Dde(OH) según se ha descrito en el párrafo 3. Se volvió a realiza la desprotección del

grupo Fmoc mediante el tratamiento con el 20% de piperidina en DMF y se volvieron a lavar las NPs y se conjugó el anhídrido succínico como se explica en el párrafo 8.

16. La desprotección del grupo Dde y la conjugación del fluoróforo Cy7 se llevó a cabo según los procedimientos descritos en los párrafos 6-7.

5 17. Por último, la activación y conjugación de las NPs al homing peptide RGD se realizó según se describe en el párrafo 10.

REIVINDICACIONES

1. Método para producir nanopartículas (NPs) de poliestireno funcionalizadas, preferiblemente NPs de poliestireno amino funcionalizadas capaces de ser bifuncionalizadas, que comprende los siguientes pasos:

5 a) Introducir las NPs en un medio adecuado, preferiblemente dimetilformamida (DMF), en el que un espaciador PEG protegido (o cualquier otro espaciador adecuado), preferiblemente protegido por Fmoc (fluorenilmetoxicarbonilo), preferiblemente ácido fmoc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediaminasucinamico (Fmoc-PEG-OH), se disuelve y activa en el mismo o se activa antes de disolverlo en el medio, durante un periodo de
10 tiempo suficiente para acoplarse al espaciador de PEG protegido con Fmoc, preferiblemente Fmoc-PEG-OH, a las nanopartículas amino;

b) Desproteger opcionalmente el grupo Fmoc de los NP del paso a) y posteriormente agregar uno o más espaciadores PEG protegidos con Fmoc, preferiblemente ácido fmoc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediaminasucinamico (Fmoc-PEG-OH), de la misma
15 manera que se describe en el paso a);

c) Desproteger el grupo Fmoc de las NPs del paso a) o b) y posteriormente agregar uno o más aminoácidos o sus análogos, preferiblemente una o más lisinas que tienen sus grupos N- α -amino y N- ϵ protegidos por grupos protectores ortogonales como Dde y Fmoc, preferiblemente Fmoc-Lys (Dde); y

20 d) Desproteger opcionalmente el grupo Fmoc de las NPs del paso c) y posteriormente agregar uno o más espaciadores PEG protegidos con Fmoc, preferiblemente ácido fmoc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediaminasucinamico (Fmoc-PEG-OH) , de la misma manera que se describe en el paso a).

2. Método para producir nanopartículas de poliestireno bifuncionalizadas (NPs),
25 preferiblemente NPs de poliestireno amino funcionalizadas, que comprende las etapas de la reivindicación 1, en donde las nanopartículas son bifuncionalizadas desprotegiendo los grupos Fmoc y Dde y acoplando dos grupos químicos, usados para bifuncionalizar las NPs, respectivamente, al grupo amino de la cadena lateral de lisina unido a Dde antes de la etapa de desprotección y al grupo amino unido a Fmoc antes de la etapa de desprotección.

30 3. Método para producir nanopartículas de poliestireno (NPs), preferiblemente NPs de poliestireno amino funcionalizado, que puede trifuncionalizarse, que comprende las etapas de la reivindicación 1, y una etapa adicional que comprende:

e) Desproteger el grupo Fmoc de las NPs del paso d) o c) y posteriormente agregar uno o más aminoácidos o análogos protegidos ortogonalmente con Dde y Fmoc, preferiblemente Fmoc-lisina (Dde).

4. Método para producir nanopartículas de poliestireno trifuncionalizadas (NPs), que
5 comprende las etapas de la reivindicación 3, en el que las nanopartículas se trifuncionalizan desprotegiendo los grupos Fmoc y Dde y uniendo tres grupos químicos, usados para trifuncionalizar las NPs, respectivamente, dos grupos amino al menos de la cadena lateral de lisina, respectivamente, unido a los grupos Dde antes de la etapa de desprotección y al amino unido al grupo Fmoc antes de la etapa de desprotección.
- 10 5. Método para producir nanopartículas de poliestireno (NPs) o NPs de poliestireno funcionalizado que pueden trifuncionalizarse, en el que la trifuncionalización de las NPs se produce uniendo a las NPs un grupo químico que comprende dos espaciadores PEG protegidos ortogonalmente, preferiblemente protegidos con Fmoc, preferiblemente ácido fmoc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediaminasucinámico (Fmoc-PEG-OH), de dos unidades cada
15 uno y dos aminoácidos o análogos que tienen sus grupos N- α -amino y N- ϵ protegidos por grupos protectores ortogonales como Dde y Fmoc, preferiblemente Fmoc-Lys (Dde).
6. El método de la reivindicación 3, en el que un primer espaciador de dos unidades PEG se acopla directamente a las NPs; un primer aminoácido o análogo preferiblemente lisina protegida ortogonalmente se acopla directamente al grupo amino del primer espaciador de
20 PEG; el segundo espaciador de PEG se acopla directamente al grupo alfa-amino del primer grupo lisina y el segundo grupo lisina se acopla directamente al grupo amino del segundo espaciador PEG.
7. Método para producir nanopartículas de poliestireno funcionalizadas (NPs) o
25 funcionalizadas con amino, que comprende las etapas de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que las nanopartículas se trifuncionalizan desprotegiendo los grupos Fmoc y Dde y uniendo tres grupos químicos, usados para trifuncionalizar las NPs, respectivamente, dos grupos amino al menos de la cadena lateral de lisina, respectivamente, unido a los grupos Dde antes de la etapa de desprotección y al amino unido al grupo Fmoc antes de la etapa de desprotección.
- 30 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las NPs se caracterizan por ser reticuladas con divinilbenceno.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 7, en el que la nanopartícula se trifuncionaliza con (a) al menos un agente de imagen (T), al menos una molécula bioactiva (D) y al menos un ligando (L).
- 5 10. Nanopartícula de poliestireno o aminopoliestireno trifuncionalizada, preferiblemente con (a) al menos un agente de imagen (T), al menos una molécula bioactiva (D) y al menos un ligando (L), donde dicha nanopartícula está unida a un grupo químico resto que comprende dos espaciadores de PEG protegidos con Fmoc, preferiblemente ácido fmoc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediaminasucinámico (Fmoc-PEG-OH), de dos unidades cada uno y dos aminoácidos o análogos, preferiblemente una lisina que tiene sus grupos N- α -amino y N- ϵ 10 protegidos por grupos protectores ortogonales como Dde y Fmoc, preferiblemente Fmoc-Lys (Dde).
11. La nanopartícula de la reivindicación 10, en la que un primer espaciador de PEG de dos unidades está directamente acoplado a las NPs; un primera lisina está unida directamente al grupo amino del primer espaciador PEG; el segundo espaciador de PEG se acopla 15 directamente al grupo alfa-amino del primer grupo lisina y el segundo grupo lisina se acopla directamente al grupo amino del segundo espaciador PEG.
12. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en la que el intervalo de tamaño de la nanopartícula es de 100 nm a 2000 nm, preferiblemente, de alrededor de 200 nm.
- 20 13. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 u obtenida por el método de la reivindicación 9, en la que la molécula bioactiva (D) es un agente terapéutico, un agente de diagnóstico o un fármaco, preferiblemente doxorubicina.
14. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 u obtenida mediante el método de la reivindicación 9, en la que el ligando (L) es un péptido o péptido mimético 25 específico de tumor, preferiblemente un *homing peptide* RGD.
15. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 u obtenida por el método de la reivindicación 9, en la que el agente de formación de imágenes (T) es un fluoróforo, preferiblemente un derivado de la cianina del rojo lejano (Cy7).
16. Nanodispositivo que comprende una nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las 30 reivindicaciones 10 a 15.

17. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15 o el nanodispositivo de la reivindicación 16, para uso en el tratamiento del cáncer, el diagnóstico de cáncer o en el control del tratamiento del cáncer.

5 18. La nanopartícula obtenida método de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en el tratamiento del cáncer, el diagnóstico de cáncer o en el control del tratamiento del cáncer

19. Una formulación farmacéutica que comprende una nanopartícula obtenida por el método de las reivindicaciones 1 a 9.

20. Una formulación farmacéutica que comprende la nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15.

Fig 1.

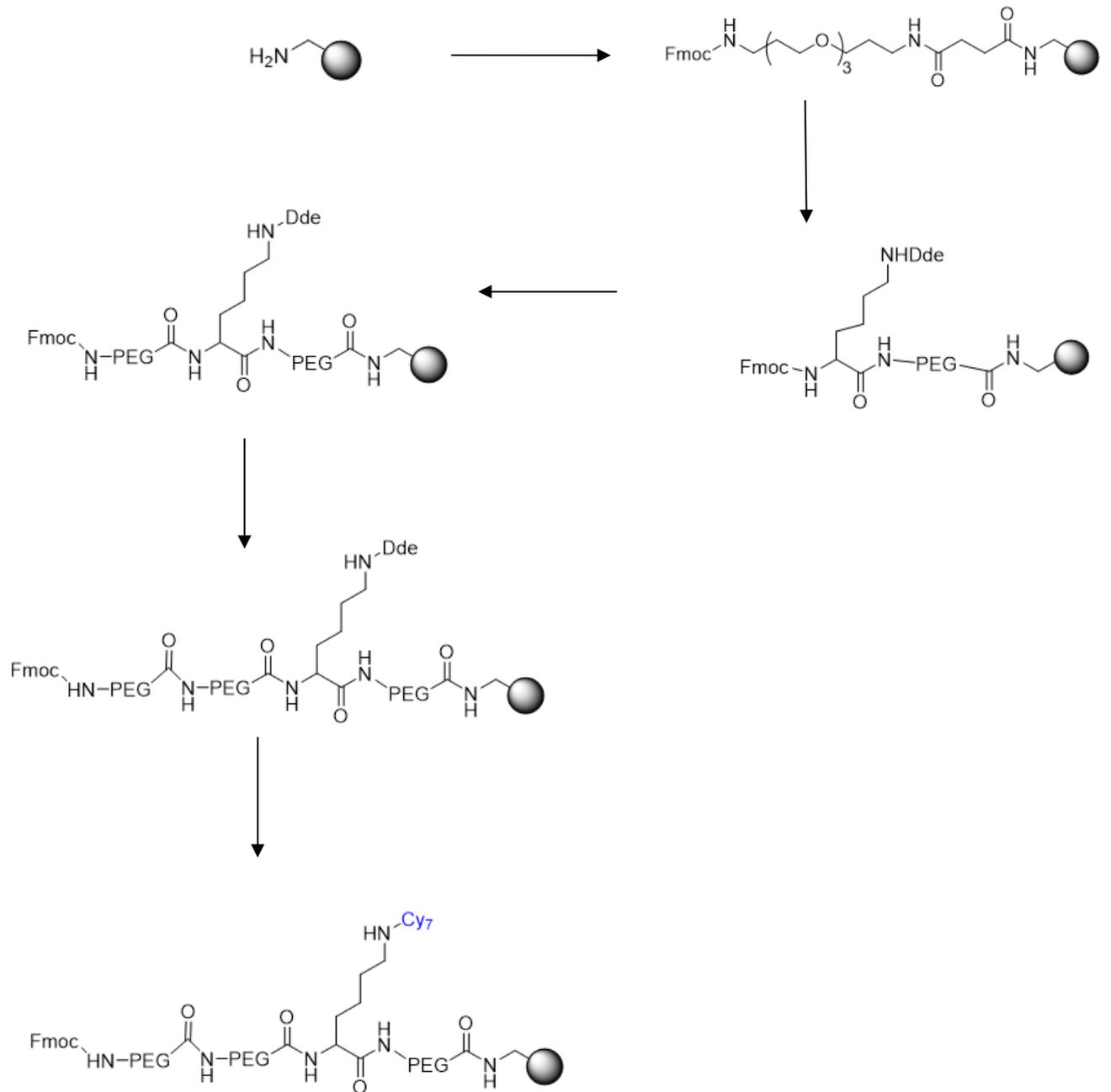


Fig 2.

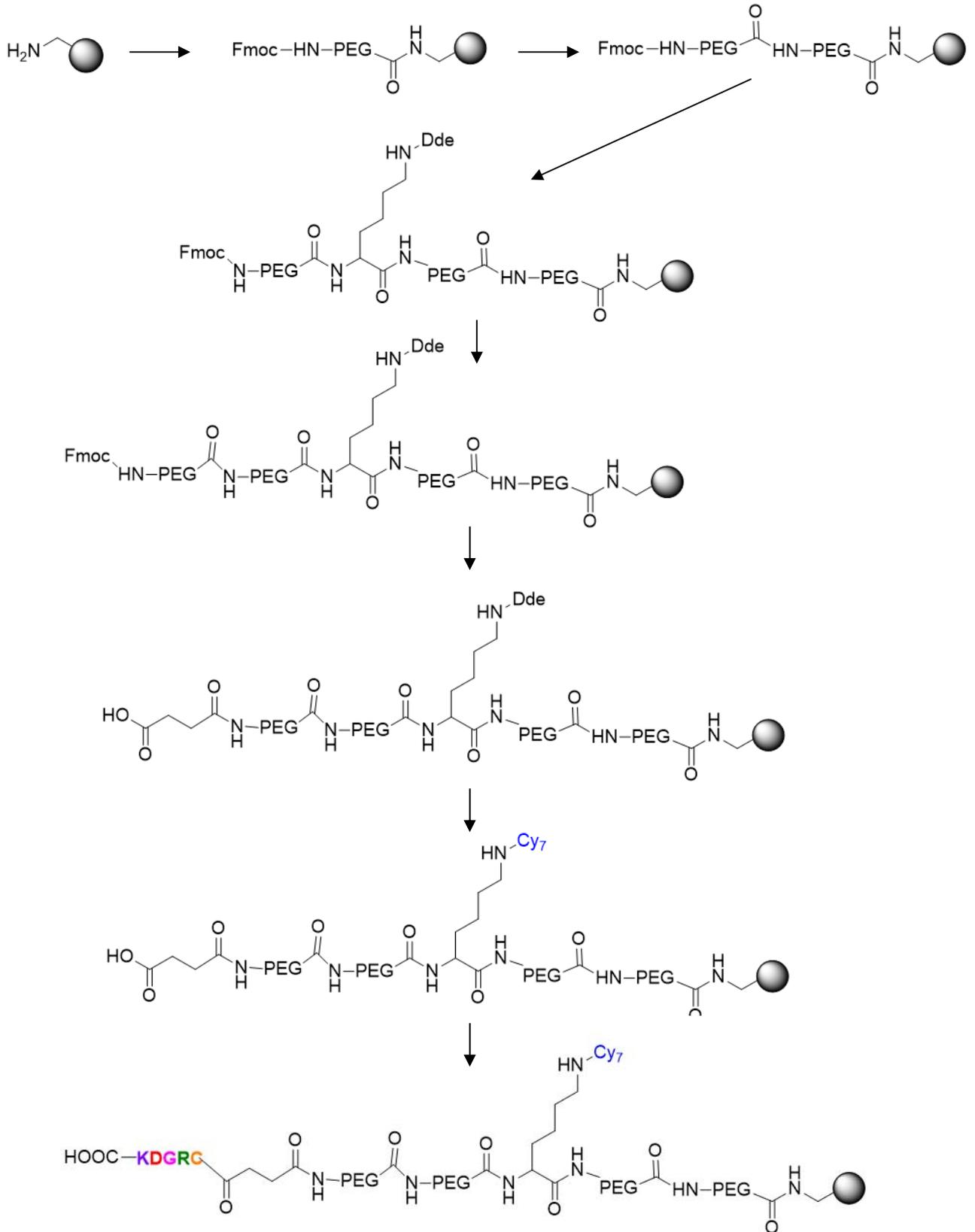


Fig 3.

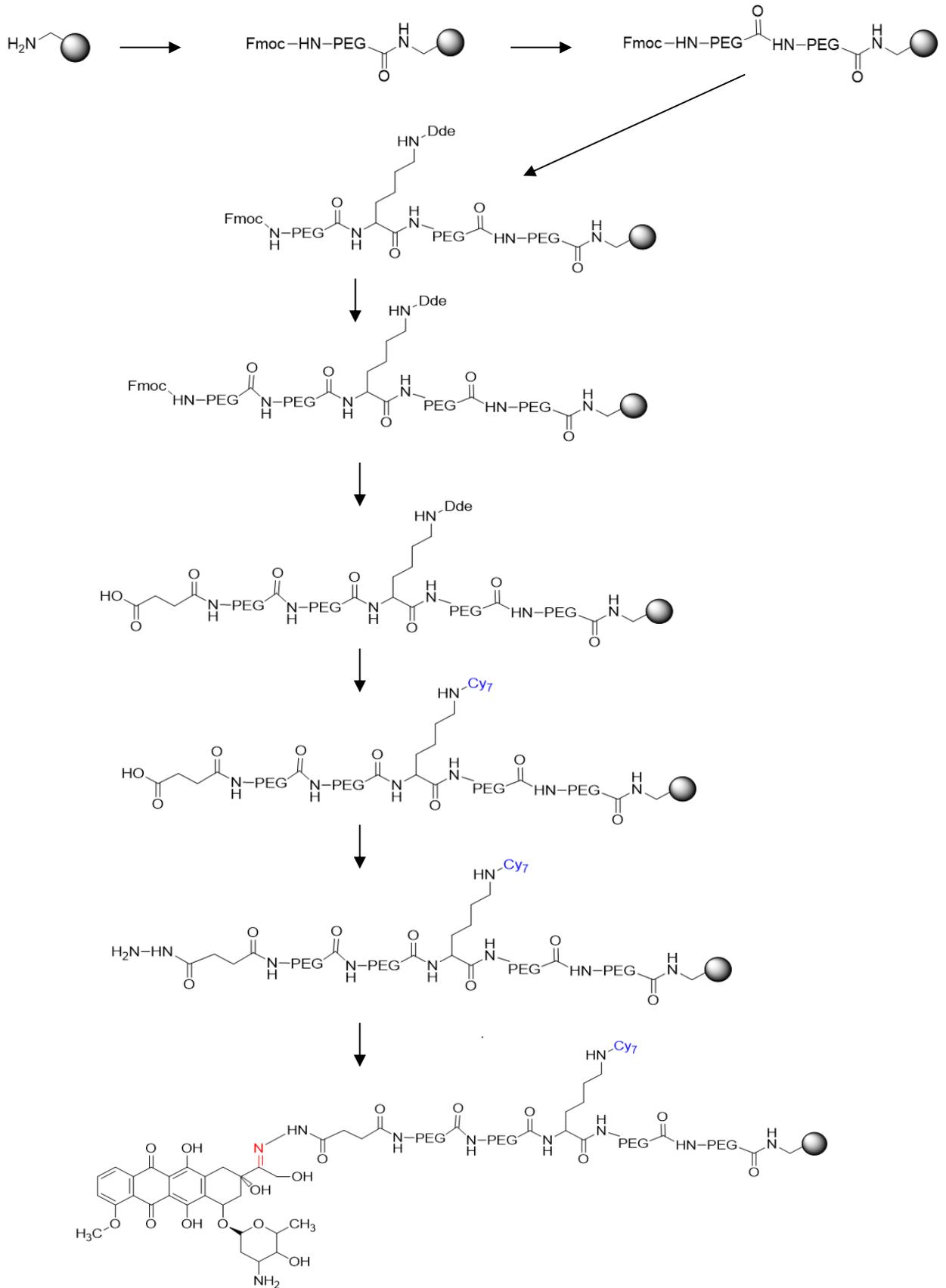


Fig 5.

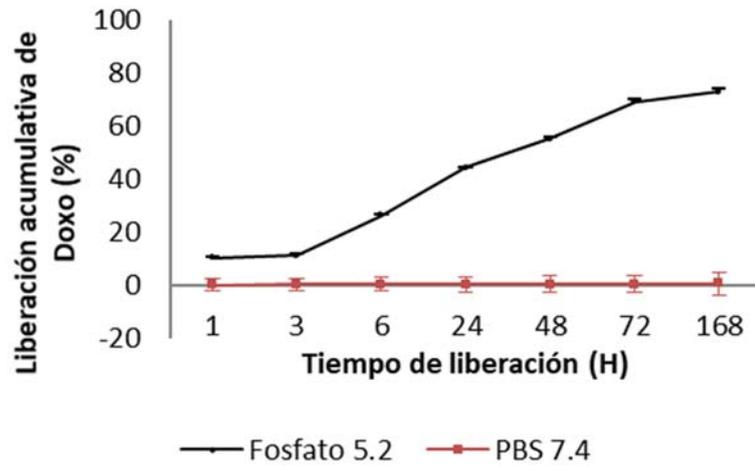
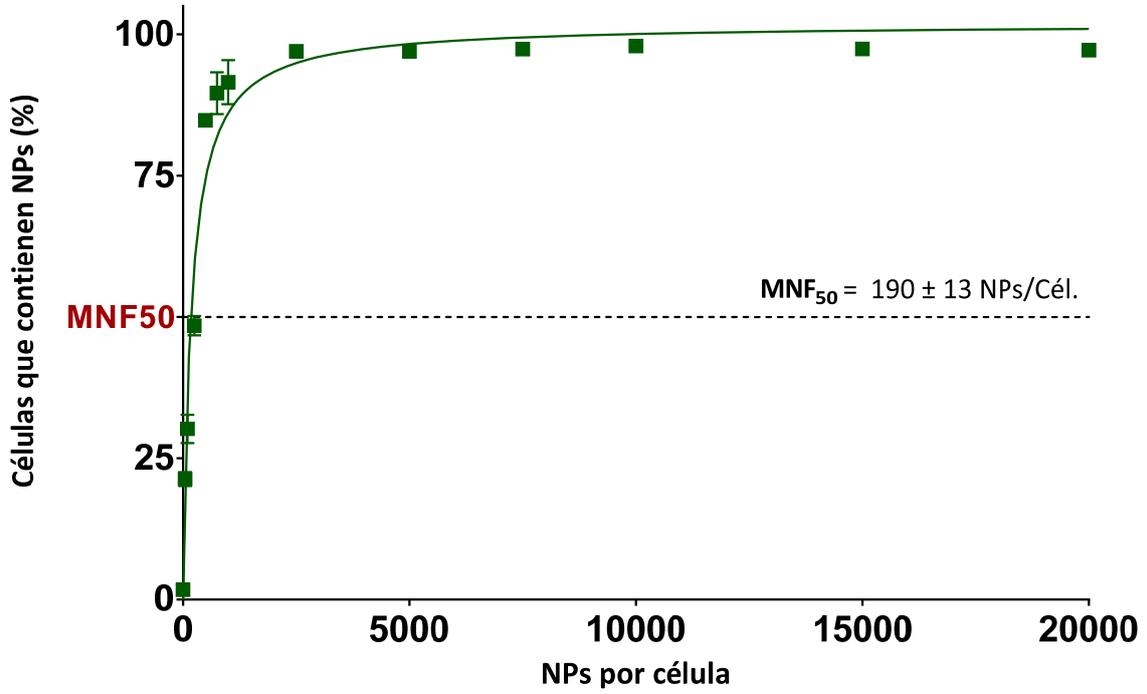


Fig 6.

a)



b)

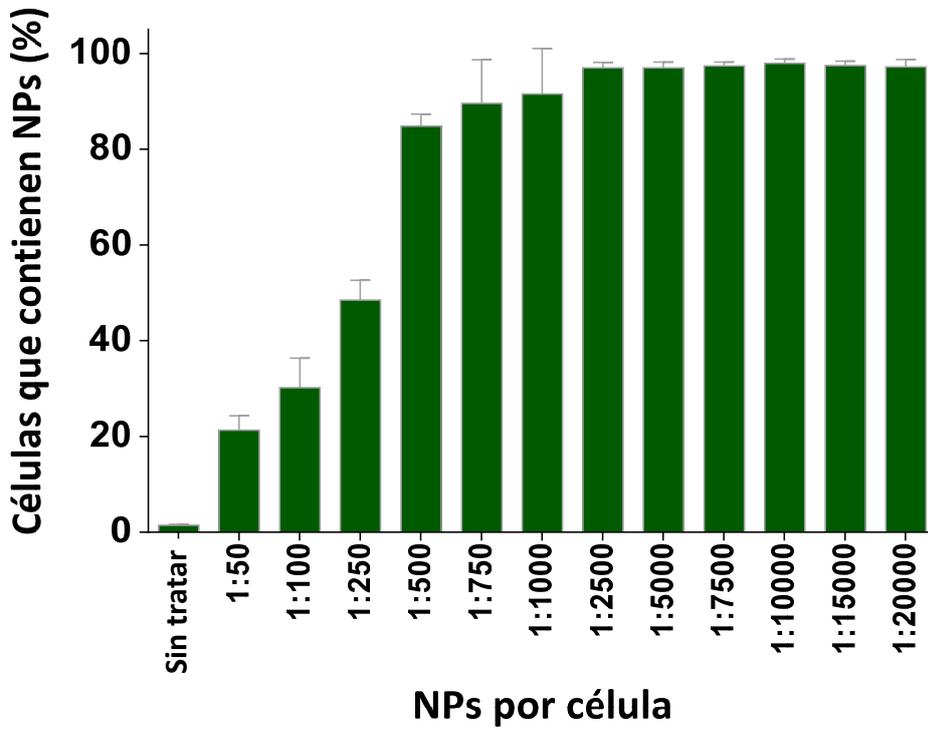


Fig 7.

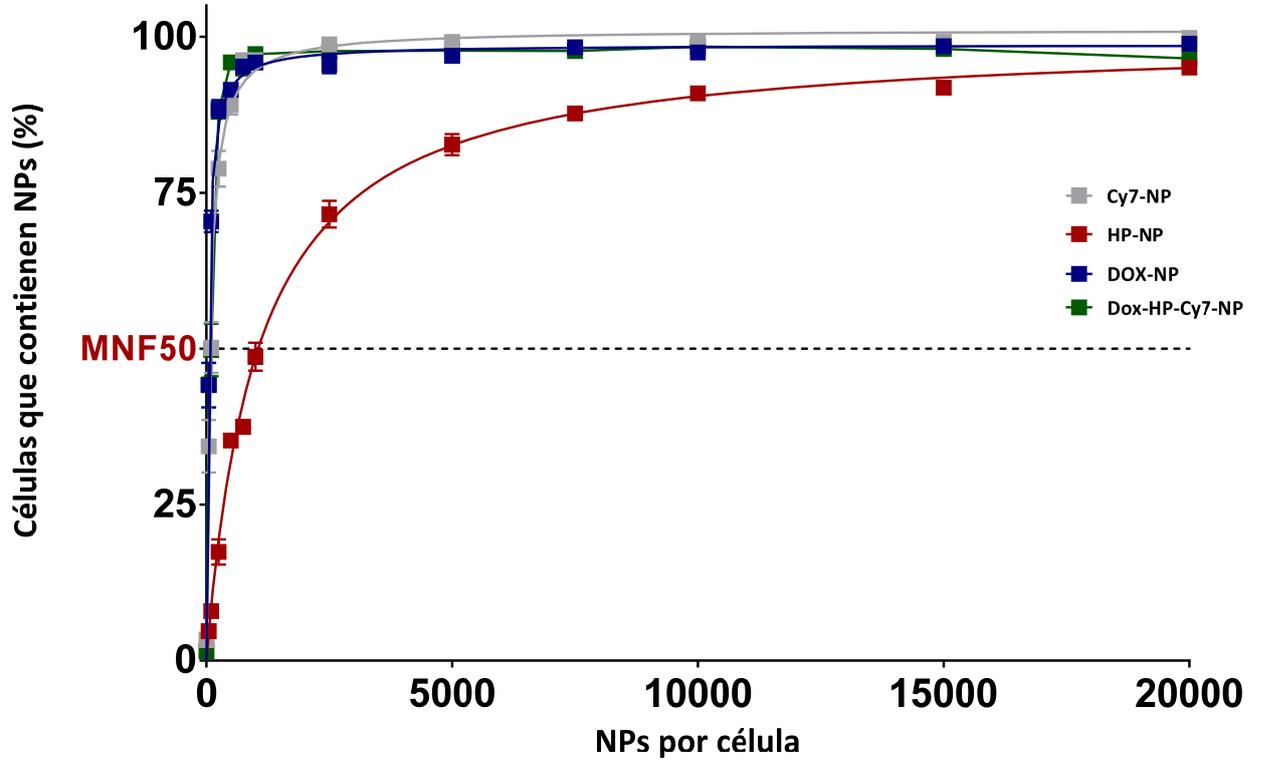


Fig 8.

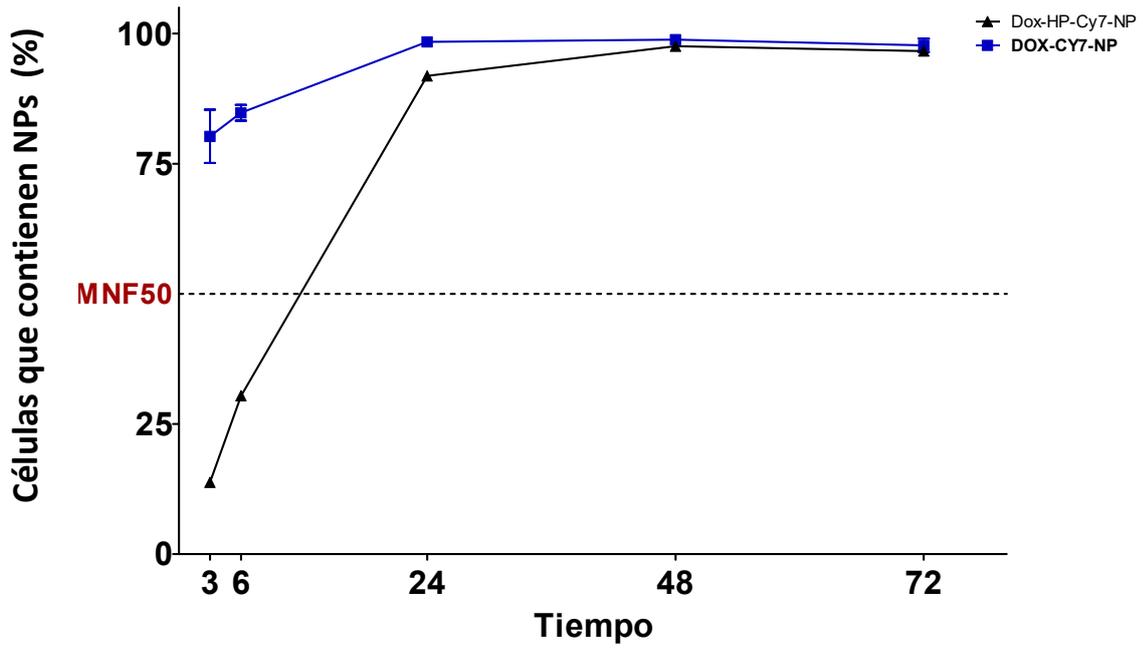


Fig 9.

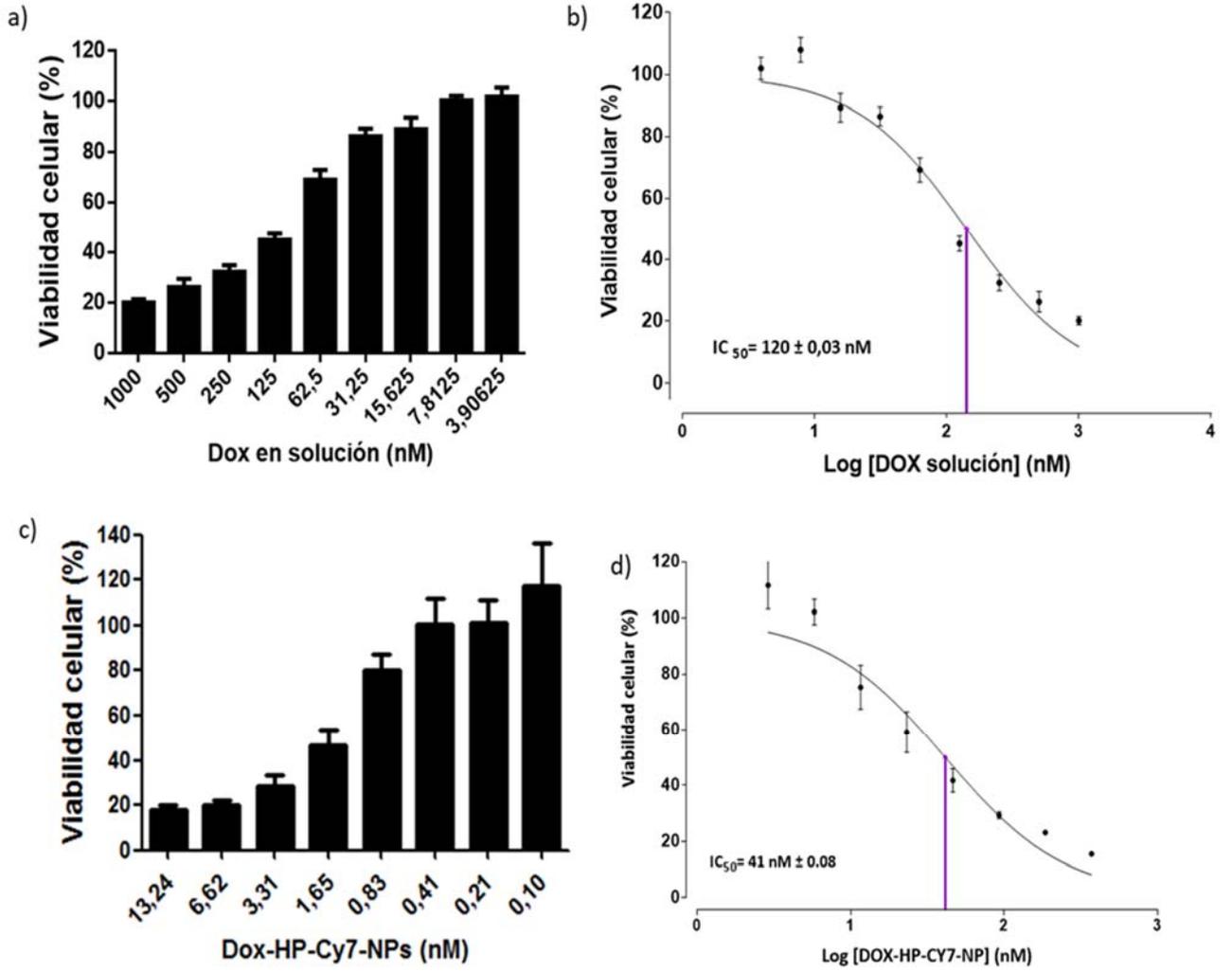


Fig 10.

