

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 528**

21 Número de solicitud: 201031971

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.12.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.12.2012

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:

11.12.2012

71 Solicitantes:

ENDOR NANOTECHNOLOGIES, S.L.
Edificio Helix C/ Baldiri Reixac, 15
08028 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

VIVERO SÁNCHEZ, Laura;
SENDRA CUADAL, Judith;
PARKKOLA, Hanna;
QUEROL SASTRE, Joaquín y
RAMIS CASTELLTORT, Marc

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **SISTEMA DE LIBERACIÓN DE AGENTE TERAPÉUTICO, COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LO CONTIENEN, SU PREPARACIÓN Y SU USO MÉDICO.**

57 Resumen:

Sistema de liberación de agente terapéutico, composiciones farmacéuticas que lo contienen, su preparación y su uso médico.

La presente invención describe un nuevo sistema de liberación selectiva y controlada de un agente terapéutico que comprende: (i) un vehículo que comprende: a) una nanopartícula metálica y b) un recubrimiento hidrofílico de HA unido a la nanopartícula metálica a través de al menos un primer ligando, y (ii) al menos un agente terapéutico unido a la nanopartícula, al HA o encapsulado en el recubrimiento de HA. La invención describe asimismo composiciones farmacéuticas que contienen el sistema de liberación, su empleo en el tratamiento de enfermedades como el cáncer y un procedimiento para su obtención.

ES 2 392 528 A1

DESCRIPCIÓN**SISTEMA DE LIBERACIÓN DE AGENTE TERAPÉUTICO, COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LO CONTIENEN, SU PREPARACIÓN Y SU USO MÉDICO****CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un nuevo sistema de liberación selectivo y controlado de un agente terapéutico, que comprende una nanopartícula metálica, ácido hialurónico y un agente terapéutico. La invención se refiere asimismo a composiciones que lo contienen y al su uso de dicho sistema y dichas composiciones en tratamientos terapéuticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los agentes terapéuticos administrados al cuerpo humano o animal se distribuyen por el organismo según sus propiedades físico-químicas. En general los agentes terapéuticos que se utilizan actualmente no tienen propiedades específicas para actuar selectivamente sobre las células seleccionadas objeto del tratamiento. Estos agentes provocan por tanto un efecto sobre las células de nuestro organismo aleatoriamente, tanto sobre las células seleccionadas objeto de la aplicación, como también sobre distintos tipos de células no objeto de la aplicación médica causando efectos secundarios no deseados.

En la actualidad, el desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada y selectiva de agentes terapéuticos es un ámbito tecnológico y científico de gran actividad. El objetivo de un sistema de liberación es hacer llegar la cantidad deseada del agente terapéutico deseado a las células seleccionadas para obtener un efecto terapéutico deseado, minimizando con ello la indeseable exposición del resto del organismo al agente. Para que la cantidad necesaria sea la mínima posible y a la vez terapéuticamente eficaz, es deseable que el sistema de liberación mejore la efectividad del agente terapéutico.

En particular, muchos de los agentes terapéuticos que se utilizan actualmente por ejemplo en tratamientos oncológicos son específicos a nivel molecular pero no a nivel celular. Por tanto, en unos casos solo una pequeña fracción del agente llega al tumor, mientras que el restante actúa en otros tejidos del organismo o, en otros casos, es rápidamente eliminado del organismo, antes de poder producir efecto en los tejidos diana, o si por el contrario presenta un elevado tiempo de circulación, puede actuar en

otros tejidos del organismo produciendo efectos no deseados.

Una propiedad que deberían presentar los sistemas de liberación de agentes terapéuticos es la de permanecer el tiempo necesario en el sistema circulatorio para acceder de forma pasiva y con la máxima probabilidad posible a las células objetivo. Sin embargo, si el sistema de liberación no se protege adecuadamente, las células fagocíticas del sistema mononuclear fagocítico (SMF), lo pueden eliminar rápidamente.

Una de las técnicas más utilizadas para proteger el sistema de liberación del SMF es recubrirlo con un tipo de agente hidrofílico que le aporte una cubierta acuosa que lo proteja. Las unidades que componen el sistema de liberación, incluido el agente terapéutico, quedan protegidas y resultan menos susceptibles a ser internalizados por las células del SMF, lo cual revierte en un mayor tiempo de circulación en sangre. Un ejemplo de agente hidrofílico ampliamente utilizado es el polietilenglicol (PEG).

Además un sistema de liberación de agente terapéutico debería ejercer una acción selectiva sobre las células objetivo. En este sentido para dirigir el sistema de liberación a una célula objetivo del organismo es necesario disponer de moléculas con afinidad hacia dicha célula objetivo. Concretamente, en el caso de tumores se utilizan algunos anticuerpos monoclonales que reconocen marcadores tumorales debido a su capacidad para unirse selectivamente a células tumorales (por ejemplo la Herceptina (trastuzumab) es un anticuerpo ampliamente utilizado en el cáncer de mama). La unión al sistema de liberación del anticuerpo que realiza las funciones de vector puede dotarle de selectividad pero sigue siendo necesaria la protección del sistema de liberación para evitar que éste sea internalizado por las células del SMF.

Por lo tanto para que un sistema de liberación sea eficaz, es deseable que presente esta doble funcionalidad de protección y selectividad. Concretamente, el sistema de liberación debe estar compuesto por un agente hidrofílico (por ejemplo, PEG) para permanecer el tiempo necesario en sangre y por una molécula vector que confiera selectividad (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) y libere el agente selectivamente sobre las células objetivo. En muchos casos, el agente hidrofílico y la molécula vector interfieren en sus funciones de modo que se pierde tanto la capacidad hidrofílica como la selectividad del sistema de liberación. Este efecto limita la aplicación de estos sistemas y en muchos casos es necesario escoger entre un alto tiempo de circulación

en sangre o una óptima selectividad sobre las células objetivo.

Una forma de resolver este problema es la de disponer de un sistema de liberación compuesto por una única molécula que realice las funciones de protección y selectividad. Dicha molécula debe mantener el sistema con el agente protegido durante su circulación por el organismo y hasta su liberación en las células objetivo; debe conseguir llegar a las células objetivo en el menor tiempo de circulación posible de modo que el sistema de liberación no circule más tiempo del necesario produciendo efectos secundarios no deseados y su acumulación en otros órganos. Además dicha molécula debe tener una selectividad y afinidad óptima para internalizarse en las células objetivo de forma que pueda realizar las funciones de vector.

Finalmente, la liberación del agente terapéutico por parte del sistema de liberación es un factor decisivo para determinar la efectividad del sistema. El objetivo en este caso es que el sistema conserve el agente de manera estable hasta llegar a la célula objetivo y una vez allí lo libere sin que la estructura molecular del agente sea alterada.

Durante la última década se han diseñado diversas estrategias para controlar la cinética y liberación de agentes. Una de las estrategias más extendidas es la utilización de liposomas sintetizados a partir de materiales biodegradables que almacenan el agente terapéutico en su interior y que a medida que se degradan van liberando el agente. Un sistema de liberación compuesto por liposomas para ser eficaz debe también incluir un agente hidrofílico protector del SMF en la superficie del liposoma y una molécula vector que dirija el agente preferentemente a las células objetivo del tratamiento. Este tipo de sistemas de liberación presentan algunas desventajas como la progresiva degradación descontrolada del liposoma en medio biológico que hace que el agente se vaya liberando a medida que el liposoma se degrada comprometiendo la llegada y la liberación del agente en la célula objetivo. Otro factor a tener en cuenta en este tipo de sistemas es el tamaño de partícula. En este sentido los liposomas sintetizados suelen tener un tamaño comprendido entre centenares de nanómetros y micras que disminuyen sensiblemente su capacidad para ser internalizados a nivel celular y por tanto para proporcionar la liberación intracelular del agente.

Tanto los liposomas como otros materiales nano-estructurados (polímeros,

dendrimeros, micelas, nanotubos de carbono, etc.) son objeto de estudio como candidatos a sistemas de liberación de agentes para diferentes aplicaciones médicas.

Una alternativa emergente dentro de los nano-sistemas de liberación son las nanopartículas inorgánicas (NP), generalmente de oro (Au-NP). Las Au-NP son utilizadas actualmente como estructura sobre la que se diseñan sistemas de liberación de agentes (Chem Soc Rev. 2009 Jun; 38(6):1759-82). La superficie de las Au-NP es una plataforma muy versátil a la que se pueden unir una gran variedad de moléculas mediante enlaces químicos de estabilidad similar a un enlace covalente. Mediante la conjugación de diferentes moléculas a la misma NP se desarrollan conjugados multifuncionales que pueden realizar la función de sistema de liberación selectiva de agentes.

Actualmente se están realizando diferentes estudios utilizando Au-NP como sistemas de liberación (Nanomed. 2009 Jun; 4(4):401-10). La superficie de las Au-NP se modifica con la unión de agentes hidrofílicos, como por ejemplo PEG (J Appl Toxicol. 2009 Nov 9), para proteger las Au-NP de la acción del SMF (Au-NP-Protector). Sobre la superficie de las Au-NP-Protector también se ligan moléculas vector, como anticuerpos monoclonales, que dirigen las Au-NP-Protector preferentemente a las células objetivo (Au-NP-Protector-Vector). Finalmente, la superficie del sistema Au-NP-Protector-Vector es modificada con un agente terapéutico (Au-NP-Protector-Vector-Agente). Para obtener por tanto los efectos de protección, direccionalidad y efecto médico del sistema de liberación es necesario conjugar a la superficie de la Au-NP al menos tres tipos diferentes de moléculas (Protector-Vector-Agente). Este diseño de nano-sistemas presenta varias desventajas que reducen su eficacia como sistema de liberación de agentes: aumenta la probabilidad de que las moléculas interfieran entre sí y se pierdan alguna de sus propiedades; se reduce el espacio disponible para el agente sobre la superficie de la Au-NP por el hecho de utilizar tres tipos de moléculas diferentes (Protector-Vector-Agente).

Por tanto a la vista de todo lo expuesto sigue existiendo la necesidad en el estado de la técnica de proporcionar nuevos sistemas de liberación selectiva y controlada basados en nanopartículas metálicas que superen al menos parte de las desventajas mencionadas y sean capaces de ejercer las funciones deseables en un sistema de liberación de forma eficaz anteriormente comentadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: representa un sistema de liberación del agente terapéutico cisplatino que consta de una nanopartícula metálica a la que se une ácido hialurónico (HA) a través de una molécula ligando (tipo 1) y cisplatino a través de un ligando (tipo 2).

5 **Figura 2:** muestra los resultados de internalización de un vehículo (EDS) que presenta una nanopartícula de oro y HA de 30-50 KDa y su visualización en el interior de células Panc-1 mediante microscopía electrónica (TEM) a 24 h.

Figura 3: muestra la internalización de un vehículo (EDS) que consta de una nanopartícula de oro y HA mediante Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS); se observa la cantidad de oro intracelular (ng/100.000 células).

Figura 4: se muestran imágenes del estudio de internalización en células Panc-1 del vehículo (EDS) (que consta de nanopartícula de oro y HA 30-50 KDa) marcado con fluoróforo mediante Microscopia Confocal, y se observa en a) los núcleos de las células; en b) los núcleos y el vehículo EDS alrededor; y en c) se observan los núcleos y el CD44 receptor diana del EDS.

Figura 5: representa la acumulación de oro (ppm) de un vehículo EDS con una nanopartícula de oro y HA de distintos tamaños: (i) EDS (HA 30-50 KDa), (ii) EDS (HA 15-30 KDa), (iii) EDS (HA 8-15 KDa) y (iv) EDS (HA 5 KDa) en un tumor obtenido a partir de células tumorales de colon humano implantadas en modelo murino.

Figura 6: gráfica que muestra la concentración de oro en sangre de ratón a diferentes tiempos de un vehículo EDS con una nanopartícula de oro y HA de distintos tamaños: (i) EDS (HA 30-50 KDa), (ii) EDS (HA 15-30 KDa), (iii) EDS (HA 8-15 KDa) y (iv) EDS (HA 5 KDa).

25 **Figura 7:** muestra de forma comparativa la proporción entre la cantidad de un vehículo EDS (con una nanopartícula de oro y HA 30-50 KDa) acumulado en tumor y la cantidad en sangre y misma proporción en tumor respecto a sangre para un vehículo que consta de polietilenglicol unido a nanopartícula de oro (PEG-Gold NP).

Figura 8: muestra el espectro UV-vis del sistema de liberación de la invención EDS001. En ordenadas se representa la absorbancia y en abcisas la longitud de onda (nm).

Figura 9: muestra la imagen de microscopía electrónica (TEM) del sistema de liberación EDS001

Figura 10: Muestra la distribución del tamaño por intensidad de difusión de luz dinámica (DLS) del sistema de liberación EDS001; en el eje Y se representa la Intensidad (%) y en el eje X el tamaño.

Figura 11: muestra la distribución del potencial-Z del sistema de liberación EDS001 donde Y representa el conteo total (fotones contados por segundo) y X representa el potencial en mV.

Figura 12: muestra los resultados de un estudio de viabilidad *in vitro* durante 72h (con células tumorales de pulmón humano) de un sistema de liberación EDS001 llevado a cabo utilizando distintas concentraciones del mismo y midiendo la actividad del enzima hexosaminidasa. El estudio se llevó a cabo en un caso con un sistema que consta de nanopartículas de tamaño 4 nm y en otro caso de nanopartículas de tamaño 12 nm, HA de entre 30-50 kDa y cisplatino en ambos casos. En el eje de abcisas vemos el porcentaje de tratamiento añadido a las células.

Figura 13: muestra el espectro UV-vis del sistema de liberación del sistema de la invención EDS002 donde Y representa la absorbancia y X la longitud de onda (nm).

Figura 14: muestra la imagen de microscopía electrónica (TEM) del sistema de liberación EDS002.

Figura 15: Muestra la distribución del tamaño por intensidad de difusión de luz dinámica (DLS) del sistema de liberación EDS001 en Y se representa la Intensidad (%) y en X el tamaño.

Figura 16: muestra la distribución del Potencial Zeta del sistema de liberación EDS002 donde Y representa el conteo total (fotones contados por segundo) y X representa el potencial en mV.

Figura 17: muestra los resultados de un estudio de viabilidad *in vitro* (con células tumorales de pulmón humano, siendo A549 el nombre de la línea tumoral) de un sistema de liberación EDS002 llevado a cabo utilizando distintas concentraciones del mismo y midiendo la actividad del enzima hexosaminidasa; el estudio se llevó a cabo con un sistema que consta de nanopartículas de tamaño 12 nm, HA de entre 30-50 kDa y cisplatino encapsulado. El eje Y representa el porcentaje de viabilidad y X representa la concentración (μM) de cisplatino en el tratamiento.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

En un aspecto la presente invención se refiere a un nuevo sistema de liberación selectiva y controlada de un agente terapéutico que comprende:

(i) un vehículo que comprende:

a) una nanopartícula metálica y

b) un recubrimiento de HA unido a la nanopartícula metálica a través de

al menos un primer ligando, y

(ii) al menos un agente terapéutico unido al vehículo según una de las siguientes alternativas:

- 1) unido a la nanopartícula metálica mediante un segundo ligando;
- 2) unido al recubrimiento de HA mediante un tercer ligando, o
- 3) encapsulado en el recubrimiento de HA,

con la condición de que cuando el agente terapéutico está unido mediante un segundo ligando a la nanopartícula metálica dicho agente es distinto de una proteína, un péptido o un inhibidor de la hidrólisis del HA.

El término ligando tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una molécula capaz de formar al menos dos enlaces químicos, uniendo de este modo al menos dos elementos del sistema de liberación entre sí. Tal y como se utiliza en la presente invención un primer ligando (tipo 1) se refiere a una molécula que forma al menos un enlace químico con el HA y otro enlace químico con la nanopartícula metálica uniendo por tanto ambos elementos. El primer tipo de enlace puede ser de tipo amida, éster, éter, y el segundo es a través de al menos un grupo funcional tioéter (–S–). Tal y como se utiliza en la presente invención segundo ligando (tipo 2) se refiere a una molécula que forma al menos un enlace químico con un agente terapéutico y otro enlace químico con la nanopartícula metálica. Los segundos ligandos (tipo 2) que se unen a la nanopartícula lo hacen generalmente a través de al menos un grupo funcional –S– al igual que los primeros ligandos (tipo 1). Tal y como se utiliza en la presente invención tercer ligando (tipo 3) se refiere a una molécula que forma al menos un enlace químico con un agente terapéutico y otro enlace químico con el HA. Los terceros ligandos (tipo 3) se unen al HA generalmente mediante al menos un enlace tipo éster, amida, o éter, etc., El enlace químico entre el ligando tipo 2 o el ligando tipo 3 y el agente terapéutico puede ser variable dependiendo en cada caso de su estructura química.

El agente terapéutico también puede estar encapsulado en el recubrimiento de HA. En ese caso el agente se une al recubrimiento mediante al menos un enlace químico que puede ser de diversa naturaleza: covalente, puente de hidrogeno, iónico, fuerzas de van de Waals, etc. En este sentido el cisplatino puede encapsularse en HA mediante la formación de un complejo iónico tal y como se divulga en J Pharm Sci. 2008 Mar;97(3):1268-76.. Otro ejemplo es la encapsulación de docetaxel en una malla hidrofílica formada de HA como se divulga en Biomaterials. 2009 Oct;30(30):6076-85.

Cuando el agente es encapsulado en el recubrimiento de HA, éste se libera selectivamente en las células objetivo al degradarse las cadenas de HA mediante la acción de enzimas selectivos (hialuronidasas que se encuentran en la matriz extracelular o en el interior de la células objetivo) en el interior de la célula objetivo.

5

Los primeros, segundos y terceros ligandos, referidos asimismo como ligandos de tipo 1, tipo 2 y tipo 3, respectivamente, son moléculas diferentes.

10

Concretamente, la naturaleza y estabilidad de las moléculas de ligando tipo 2 que unen el agente a la nanopartícula metálica o de ligando tipo 3, que une el agente al HA permiten que el agente permanezca unido y no se libere del sistema de liberación gradualmente mientras se desplaza por el organismo y promueven que dicha liberación tenga lugar una vez que el sistema de liberación se ha internalizado en la célula objetivo, por ejemplo, mediante un cambio de pH. Por ello las moléculas de ligando tipo 2 o tipo 3 pueden presentar estructuras químicas muy variables en función por ejemplo del tipo de agente terapéutico que vaya a unir, y pueden ser fácilmente diseñadas por el experto en la materia en cada caso, para liberar dicho agente selectivamente en la célula objetivo. Un caso particular de lugar objetivo es el interior de células que expresan CD44. Otro lugar particular son células que sobre-expresan CD44. El sistema de liberación de la presente invención actúa selectivamente sobre las células en las que se expresa o sobre-expresa el receptor CD44 debido a la función de vector que realiza el HA. A continuación el sistema es internalizado por dichas células y la liberación del agente en la célula objetivo se produce mediante diversos mecanismos tal como por ejemplo mediante el efecto de cambio de pH ya mencionado, o cambios en el potencial redox o en la concentración de determinados enzimas, etc. La liberación se produce de manera síncrona.

20

25

30

35

La elección para cada realización particular del ligando tipo 2 puede hacerla el experto en la materia de forma sencilla en función del agente de aplicación terapéutica que se seleccione y del mecanismo de liberación que se elija. En la literatura se divulgan casos de agentes unidos a nanopartículas de oro mediante ligandos (tipo 2) (Adv Drug Deliv Rev. 2008 Aug 17;60(11):1307-15). Los mecanismos de acción de estos ligandos de tipo 2 se pueden clasificar en diferentes tipos: (1) por fotoregulación (J Am Chem Soc. 2009 Apr 29;131(16):5728-9) (2) radiación infrarroja (J Mater Sci Mater Med. 2009 Oct;20(10):2091-103) (3) potencial redox (Bioconjug Chem. 2008 Jul;19(7):1342-

5) (4) concentración enzimática (J Am Chem Soc. 2009 Jan 14;131(1):66-8.) o (5) pH (J Biomed Mater Res A. 2008 Jun 1;85(3):787-96). La descripción de dichos mecanismos se incluye en la presente solicitud por referencia. Los ligandos tipo 2 son compuestos asequibles comercialmente o pueden ser seleccionados y preparados según métodos estándar.

La elección en cada caso particular del ligando tipo 3 puede hacerla el experto en la materia de forma sencilla en función del agente terapéutico que se seleccione y del mecanismo de liberación que se elija. En la literatura se divulgan ejemplos de agentes unidos a HA mediante ligandos de tipo 3 (Mol Pharm. 2008 Jul-Aug;5(4):474-86). Un ejemplo es la unión de paclitaxel al grupo carboxilato del HA mediante un ligando tipo 3 (Biomacromolecules. 2000 Summer;1(2):208-18). Otro ejemplo es la unión del grupo amida de la doxorubicina al grupo carboxilato del HA mediante un ligando de tipo 3 (Biotechnol. Bioeng. 2008, 99, 442-454). La descripción de dichos ligandos se incluye en la presente solicitud por referencia.

Los ligandos tipo 1 son moléculas convencionales, asequibles comercialmente u obtenibles mediante métodos de síntesis conocidos por un experto en la materia. Algunos ligandos tipo 1 así como procedimientos para unirlos al HA se encuentran descritos detalladamente en la solicitud de patente WO2009087254 cuyo contenido se incorpora a la presente descripción por referencia. En una realización particular el ligando presenta la fórmula $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2\text{-SH}$.

La nanopartícula metálica del sistema de liberación de la invención puede ser a) una nanopartícula o b) una partícula núcleo-coraza. En el contexto de la presente invención la nanopartícula presenta una composición homogénea de uno o más materiales seleccionados del grupo formado por Au, Ag, Pt, Co, Fe, óxidos de Au, Ag, Pt, Co, Fe, TiO_2 y sus mezclas. La partícula núcleo-coraza consta de al menos dos partes diferenciadas: un núcleo y una coraza que pueden estar independientemente constituidos por uno o más de los mismos materiales mencionados. El tamaño de la nanopartícula metálica puede variar dentro de un amplio intervalo. Típicamente el tamaño está comprendido entre 2 y 100 nm. En una realización particular el tamaño está comprendido entre 4 y 12 nm. La forma de la nanopartícula metálica puede ser cualquiera sin limitaciones. En una realización particular presenta una forma seleccionada de entre esfera, barra, cilindro, cubo, triángulo y estrella.

En otra realización particular la nanopartícula metálica es una partícula núcleo-coraza en la que el núcleo es de Co superparamagnético y la coraza es Au. En una realización preferente la nanopartícula metálica es una nanopartícula de oro, y más preferentemente de tamaño comprendido entre 5 y 30 nm, aún más preferentemente entre 4 y 12 nm.

El HA del recubrimiento está constituido por cadenas de ácido hialurónico (HA) que pueden presentar iguales o diferentes pesos moleculares entre sí. Además las cadenas pueden estar entrecruzadas (cross-linked). El peso molecular de una cadena de HA puede variar entre amplios márgenes. En una realización particular dicho peso molecular está comprendido entre 0,5 KDa y un peso molecular máximo determinado por la propia naturaleza biológica del HA. Más particularmente el peso molecular de los fragmentos de HA que pueden utilizarse para poner en práctica la invención está comprendido entre 1 y 500 KDa, preferiblemente entre 5 y 50 KDa, y más preferiblemente entre 30 y 50 KDa. Estos fragmentos, en adelante también llamados oligómeros de HA, pueden prepararse por ejemplo por hidrólisis enzimática de HA obtenido de una fuente natural o pueden adquirirse comercialmente. Los oligómeros de HA se derivatizan con los ligandos tipo 1 según procedimientos bien conocidos para un experto en la materia. Alternativamente los oligómeros de HA derivatizados con un ligando tipo 1 pueden prepararse de forma asimismo convencional primero derivatizando HA con un ligando tipo 1, y a continuación hidrolizando el producto resultante por ejemplo mediante hidrólisis enzimática. Procedimientos de preparación se describen en la bibliografía por ejemplo en la solicitud WO2009087254.

En el contexto de la presente invención un agente terapéutico se refiere a cualquier compuesto o sustancia que se utiliza para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o condición o un proceso fisiológico no deseado del cuerpo humano o animal. Más particularmente el agente de la presente invención puede ser entre otros cualquier compuesto químico, agente farmacéutico, droga, factor biológico, fragmento de una molécula biológica, tal como por ejemplo de un anticuerpo, de una proteína, de un lípido, de un ácido nucleico o de un carbohidrato, ácido nucleico, anticuerpo, proteína, lípido, nutriente, cofactor, nutracéutico, anestésico, agente de detección, o un agente que tiene efecto en el cuerpo o cualquier combinación de ellos. Algunos ejemplos sin carácter limitativo de agentes terapéuticos que pueden utilizarse según la presente invención son: factores biológicos que incluyen por ejemplo citoquinas,

factores de crecimiento, fragmentos de macromoléculas activos, compuestos neuroquímicos, moléculas de comunicación celular y hormonas. Además puede utilizar cualquier agente farmacéutico entre los que cabe citar por ejemplo agentes anti-inflamatorios, anticuerpos, antibióticos, analgésicos, agentes angiogénicos y antiangiogénicos, inhibidores COX-2, agentes quimioterapéuticos, agentes inmunoterapéuticos, materiales basados en ácido nucleico.

El sistema de la invención puede incluir uno o más agentes terapéuticos diferentes. De este modo es posible el tratamiento y/o la prevención de una determinada enfermedad o condición o proceso fisiológico no deseado de una determinada zona de un organismo humano o animal con más de un agente terapéutico diferente.

En una realización particular el agente terapéutico es cualquier agente antitumoral utilizado en un tratamiento terapéutico del cáncer o de un tumor. Ejemplos de dichos agentes son: Bevacizumab, G-CSF, Cisplatino, RGD Péptido, AFM, Carboplatino, Nedaplatino, Oxaliplatino, Satraplatino, Triplatino, Busulfán, Mannosulfán, Treosulfán, TioTEPA, Ciclofosfamida, Estramustina, Uramustina, Melfalan, Clorambucilo, Ifosfamida, Bendamustina, Carmustina, Estreptozotocina, Dacarbazina, Temozolomida, Actinomicina, Bleomicina, Mitomicina, Plicamicina, Aminopterin, Metotrexato, Pemetrexed, Raltitrexed, Cladribina, Clofarabina, Fludarabina, Mercaptopurina, Pentostatina, Tioguanina, Carmofur, Citarabina, Decitabina, Fluorouracilo, Floxuridina, Gemcitabina, Capecitabina, Enocitabina, Sapacitabina, Camptotecina, Topotecan, Irinotecan, Rubitecan, Belotecan, Etoposida, Teniposida, Mitoxantrona, Pixantrona, Daunorubicina, Doxorubicina, Epirubicina, Idarubicina, Valrubicina, Pirarubicina, Zorubicina, Amrubicina, Vinblastina, Vincristina, Vinorelbina, Vindesina, Docetaxel, Larotaxel, Paclitaxel, Ixabepilona, Tiazofurina, Pegfilgrastim, Interferon B1a, Glatiramer, PEGinterferon alfa2a, Rituximab, Transtuzumab, Imatinib, Cetuximab, Erlotinib, Bortezomib, Anastrozola, Bicalutamida, Leuprolida, Goserelin, Leuprolida, Letrozol, Exemestana, Triptorelin, Fulvestrant, Leuprolida y sus mezclas.

En una realización preferente dicho agente se selecciona de entre cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, doxorubicina, paclitaxel y fluorouracilo, más preferentemente el cisplatino.

En una realización preferente el sistema de liberación de la presente invención comprende un nanopartícula de oro de tamaño medio de diámetro seleccionado entre 4

y 12 nm, un recubrimiento de HA constituido por oligómeros que presentan un peso molecular medio de entre 30-50 KDa unido a través de un ligando tipo 1 a la nanopartícula de oro y cisplatino como agente unido a la nanopartícula a través de un ligando tipo 2. En una realización más preferente el ligando tipo 1 presenta la fórmula –
 5 NH-(CH₂)₂-S- y el ligando tipo 2 la fórmula -S-(CH₂)₂-N[CH₂-COO]⁻]₂.

En otra realización preferente el sistema de liberación de la presente invención comprende a) una nanopartícula de oro, más preferiblemente de un tamaño de diámetro de entre 5-30 nm, más preferiblemente de 12 nm, b) un recubrimiento de HA formado por oligómeros que presenta un peso molecular medio de entre 30-50 KDa unido a
 10 través de al menos un ligando tipo 1 y c) cisplatino encapsulado en el recubrimiento de HA. El ligando tipo 1 presenta en una realización más preferente la fórmula –NH-(CH₂)₂-S-.

15 Otro objeto de la presente invención se refiere a una composición, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende al menos un sistema de liberación selectiva y controlada según la invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. El excipiente puede ser por ejemplo de forma ilustrativa uno o varios seleccionados de entre grasas, cera de abejas, polioles semisólidos o
 20 líquidos, aceites naturales o hidrogenados, etc.; agua (por ejemplo, agua destilada, particularmente agua destilada para inyección, etc.), medio salino fisiológico, alcohol (por ejemplo, etanol), glicerol, polioles, solución de glucosa acuosa, manitol, aceites vegetales, etc.; aditivos tales como, agente ampliador, agente disgregante, aglutinante, lubricante, agente humectante, estabilizador, emulsionante, dispersante, conservante,
 25 edulcorante, colorante, agente aromatizante, diluyente, sustancia tampón, disolvente o agente solubilizante, producto químico para conseguir efecto de almacenamiento, sal para modificar presión osmótica, agente de recubrimiento o antioxidante y similares.

30 Con respecto a cada preparación de la composición farmacéutica y a cada sistema de liberación de la invención, se pueden seleccionar diversas formas de preparación, para su administración a través de cualquier vía de administración de las posibles: oral, parenteral, intravenosa, tópica, bucal, nasal, rectal, etc. En este sentido los excipientes y sus cantidades pueden ser seleccionados fácilmente por el experto en la materia en
 35 cada caso. Ejemplos ilustrativos de preparaciones farmacéuticas son comprimidos, grageas, cápsulas, gránulos o pellets, soluciones, suspensiones, jarabes, y

preparaciones secas reconstituibles inyecciones intramusculares, intravenosas o subcutáneas, preparados para infusión por goteo o intravenosa, etc.

5 La preparación se puede preparar por una persona que tiene habilidad normal en la técnica de acuerdo con técnicas farmacéuticas estándar como las descritas en las Farmacopeas Española o Europea o textos similares.

10 En una realización particular la composición farmacéutica de la invención comprende más de un sistema de liberación diferente cada uno comprendiendo un agente terapéutico diferente. El sistema de liberación de la invención se puede usar opcionalmente en combinación con cualquier otro agente útil para el tratamiento de una enfermedad o condición en cada caso, preferentemente del cáncer. En este sentido en una realización particular la composición farmacéutica de la invención comprende además de al menos un sistema de liberación de la invención, al menos un agente 15 terapéutico libre, en el sentido de que no está unido a un vehículo como el de la presente invención. Dicho agente terapéutico puede ser igual o distinto al unido al sistema de los definidos anteriormente. En el caso del tratamiento del cáncer el sistema de liberación de la invención puede administrarse en combinación con radioterapia. La terapia de radiación significa por sí misma un procedimiento normal en el campo del 20 tratamiento de cáncer. Para terapia de radiación pueden emplearse diversas radiaciones tales como rayos X, rayos- γ , rayos de neutrones, haz de electrones, haz de protones; y fuentes de radiación. El sistema de liberación de la invención combinado con la terapia de radiación puede potenciar el efecto terapéutico del agente liberado en el tratamiento del cáncer.

25 En una realización preferente la composición farmacéutica de la invención comprende una cantidad de sistema de liberación de la invención capaz de liberar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos el agente terapéutico seleccionado en cada caso. En una realización más preferente dicho agente terapéutico es un agente antitumoral, 30 más preferentemente uno de los citados anteriormente.

35 El sistema de liberación de la invención y otro agente terapéutico en su caso se pueden administrar de forma combinada a tiempos diferentes o al mismo tiempo como preparaciones divididas o como una única preparación. De acuerdo con ello, la presente invención debe interpretarse de modo que incluya todos los modos de administración al mismo tiempo o a tiempos diferentes de la combinación del sistema

de liberación de la invención y cualquier otro agente útil para la enfermedad en cada caso, e incluya todas y cada una de las posibles combinaciones de los sistemas de liberación de la invención con todos y cada uno de los agentes farmacéuticos útiles para el tratamiento de la enfermedad en cada caso. En una realización preferente
5 dicha enfermedad es el cáncer.

En un aspecto adicional la invención se refiere al sistema de liberación de la presente invención o a una composición farmacéutica que lo comprende para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o condición. En una realización
10 preferente dicho uso es para el tratamiento del cáncer. El uso del sistema de liberación puede hacerse en combinación con otro agente terapéutico como se ha descrito anteriormente, preferentemente con otro agente terapéutico siendo éste un agente antitumoral.

15 El término "cáncer" como se cita en esta descripción incluye diversos sarcomas y carcinomas e incluye cáncer sólido y cáncer hematopoyético. El cáncer sólido como se cita en este documento incluye, por ejemplo, tumor cerebral, cáncer cervicocerebral, cáncer de esófago, cáncer de tiroides, cáncer de células pequeñas, cáncer de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de
20 estómago, cáncer de vesícula biliar/conducto biliar, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer ovárico, coriocarcinoma, cáncer del cuerpo del útero, cáncer de cuello de útero, cáncer de pelvis renal/uréter, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pene, cáncer de testículos, cáncer fetal, tumor de Wilm, cáncer de piel, melanoma maligno, neuroblastoma, osteosarcoma, tumor de
25 Ewing, sarcoma de partes blandas. Por otro lado, el cáncer hematopoyético incluye, por ejemplo, leucemia aguda, leucemia linfática crónica, leucemia mielocítica crónica, policitemia vera, linfoma maligno, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin. Por último, el término "cancer" también incluye las células madre cancerosas responsables de la reaparición y metastasis de los tumores. El término "tratamiento de
30 cáncer" como se menciona en esta invención significa que un agente anticancerígeno se administra a un caso de cáncer tal como para inhibir el crecimiento de las células cancerosas en el caso. Preferiblemente, el tratamiento da como resultado regresión de crecimiento de cáncer, o es decir, reduce el tamaño de un cáncer detectable. Más preferiblemente, el tratamiento da como resultado desaparición completa de cáncer.

35 En otro aspecto la invención se refiere a un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad o condición en un paciente en necesidad de dicho tratamiento que

comprende la administración de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz un sistema de liberación de un agente terapéutico a un paciente en necesidad de dicho tratamiento. En una realización preferente dicha condición o enfermedad es cáncer. Por cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz se entiende aquella cantidad suficiente para producir un beneficio a un paciente y de inhibir el crecimiento de las células cancerosas en el caso particular de que la enfermedad sea cáncer. El tratamiento con el sistema de liberación de la invención puede ser opcionalmente combinado con otro tratamiento con otro agente terapéutico como se ha mencionada arriba.

En el método de acuerdo con la invención, la unidad terapéutica preferida puede variar de acuerdo con, por ejemplo, la vía de administración del sistema de liberación de la invención, el tipo de sistema de liberación usado; el tipo, vía de administración y forma de dosificación del otro agente terapéutico, preferentemente antitumoral, usado en combinación; y el tipo de células a tratarse, la afección del paciente, y similares. El tratamiento óptimo bajo las condiciones dadas se puede determinar por una persona experta en la técnica. En el método de acuerdo con la invención, la unidad terapéutica para el sistema de liberación de la invención puede variar de acuerdo con, específicamente, el tipo de sistema usado, el tipo de agente terapéutico, la frecuencia de aplicación y el sitio específico a tratarse, gravedad de la enfermedad, edad del paciente, diagnóstico del doctor, o similares.

En otro aspecto la invención se refiere a un procedimiento de preparación del sistema de liberación de la invención. El procedimiento comprende la preparación de las nanopartículas metálicas que puede hacerse utilizando métodos estándar conocidos por un experto en la materia.

Para la preparación del sistema de liberación que comprende el agente terapéutico encapsulado, se prepara una suspensión acuosa de nanopartículas metálicas sobre la que se añaden los oligómeros de HA derivatizados con un ligando tipo 1, obtenidos previamente según se ha descrito anteriormente, y el agente terapéutico seleccionado. Típicamente la solución resultante se incuba a temperatura ambiente o superior con agitación y a oscuras. El sistema de liberación según la invención se purifica mediante membranas de ultrafiltración (MWCO 100 KDa) para eliminar el exceso de reactivos no conjugados a las nanopartículas.

Para la preparación del sistema de liberación que comprende el agente ligado al

vehículo el método varía en función de si el agente se liga al HA (i) o a la nanopartícula metálica (ii).

En el primer caso se prepara típicamente una disolución acuosa que contiene HA derivatizado con un ligando tipo 1, obtenido previamente según se ha descrito anteriormente. A continuación se une el agente con el HA mediante un ligando de tipo 3 que une un grupo funcional (-OH, -NHCOCH₃ o -COOH) de cada oligomero de HA y un grupo funcional del agente terapéutico seleccionado. Posteriormente se incuba la solución resultante a temperatura ambiente o superior con agitación y a oscuras si fuera necesario. Finalmente, la disolución incubada se añade a una disolución acuosa de nanopartículas metálicas. El sistema de liberación según la invención se purifica mediante membranas de ultrafiltración (MWCO 100 KDa) para eliminar el exceso de reactivos no conjugados a las nanopartículas metálicas.

En el segundo caso se adquiere o prepara un ligando tipo 2 según se ha explicado anteriormente seleccionado en función del agente terapéutico. A una solución de nanopartículas metálicas se le incorpora el ligando tipo 2 y se mantiene la mezcla resultante con agitación durante un tiempo determinado en cada caso. Generalmente la mezcla se mantiene a temperatura ambiente. A continuación sobre la mezcla resultante se adicionan oligómeros de HA derivatizados con un ligando tipo 1 y obtenidos según se ha descrito anteriormente, y el agente terapéutico. La reacción se mantiene generalmente a temperatura ambiente con agitación un tiempo a determinar en cada caso, deteniéndose la reacción por disminución de la temperatura. El sistema de liberación resultante se purifica mediante membranas de ultrafiltración (MWCO 100 KDa) para eliminar el exceso de reactivos.

Los inventores de la presente invención han comprobado la utilidad y las ventajas del vehículo del sistema de liberación de la invención en la obtención de un sistema de liberación de un agente terapéutico. En este sentido en otro aspecto la invención se refiere al empleo de un vehículo que comprende:

a) una nanopartícula metálica y

b) un recubrimiento de HA unido a la nanopartícula metálica a través de un primer ligando,

en la obtención del sistema de liberación de un agente terapéutico de la presente invención.

La utilidad del vehículo y las ventajas derivadas de su uso en la fabricación de un sistema de liberación de agente terapéutico se han puesto de manifiesto en una serie de estudios llevados a cabo por los inventores. Por un lado se han llevado a cabo experimentos que han determinado la internalización del vehículo (EDS) por parte de las células tumorales utilizando diversas técnicas. Estos estudios (ver ejemplos 1.4 y Figuras 2, 3 y 4) ponen de manifiesto la entrada del vehículo que consta de una nanopartícula metálica y de HA en las células tumorales. En la Figura 3 en particular se muestra que el grado de internalización del vehículo EDS es mayor en la línea celular CD44 positiva (Panc-1) que en HepG2. Esta evidencia sugiere que la internalización del vehículo EDS del sistema de la invención, está mediada por la interacción específica entre HA y CD44. Estos estudios han puesto de manifiesto que la internalización varía en función del tamaño del oligómero de HA del vehículo, siendo mayor en general cuando el EDS presenta oligómeros de HA de entre 30-50 KDa que cuando los oligómeros son de inferior tamaño, y siendo mayor en células Panc-1 que en células HepG2. Además en la Figura 3 se muestra una comparativa del grado de internalización de un vehículo EDS del sistema de la invención y de nanopartículas de oro unidas a polietilenglicol (PEG) que pone de manifiesto que en las células Panc-1 el grado de internalización del vehículo del sistema de la invención (15.000 ng/100.000 células) es mucho mayor que el de internalización de Au-NP unidas a PEG (2.000 ng/100.000 células).

En la Fig. 4 se observa en a) los núcleos de las células; en b) se observan los núcleos y el vehículo EDS alrededor; y en c) se observan los núcleos y el CD44 receptor diana del EDS.

Los inventores han estudiado además el grado de acumulación del vehículo EDS del sistema de la invención en un tumor obtenido a partir células tumorales de colon humano implantadas en modelo murino (ejemplo 1.5). Los resultados del estudio se muestran en la Figura 5 donde se pone de manifiesto que el vehículo penetra en el interior de las células tumorales y que sorprendentemente la mayor acumulación se produce para vehículos que presentan oligómeros de HA de mayor peso molecular, entre 30-50 KDa.

Además de penetrar en las células un vehículo en general debe presentar un perfil de eliminación en sangre adecuado. Cabe señalar que el tiempo de circulación en sangre es también una característica clave en la aparición de efectos secundarios no deseados.

Mayor tiempo en sangre supone mayor probabilidad de que el sistema de liberación llegue a tejidos no objetivo y el agente produzca efectos secundarios no deseados. Es por ello que el vehículo debe optimizar el tiempo de circulación en sangre del agente para favorecer su acumulación en el tumor pero evitar que el agente esté más tiempo del necesario en sangre para evitar los efectos secundarios.

Los inventores han realizado un estudio de la eliminación del vehículo en sangre a distintos tiempos (Figura 6) que pone de manifiesto que se produce la eliminación del vehículo en el tiempo. Los resultados obtenidos muestran que aquellos vehículos que presentan HA de 30-50 kDa se eliminan de forma más lenta que los vehículos con otros pesos moleculares de HA, permitiendo la circulación en sangre del sistema el tiempo suficiente para alcanzar el tejido diana. Aun así, el tiempo de circulación es inferior al obtenido con otros agentes hidrofílicos, los cuales, por el elevado tiempo de circulación producen efectos secundarios no deseados.

Por otra parte los inventores han estudiado asimismo la relación entre la cantidad de vehículo EDS que se acumula en tumor y la cantidad presente en sangre para determinar exactamente la cantidad de vehículo que ha quedado atrapado en el interior del tumor y que no es circulante en sangre. Así la Figura 7 muestra los resultados de un estudio comparativo entre el vehículo EDS con nanopartícula de oro y HA de entre 30-50 KDa y nanopartículas de oro unidas a polietilenglicol (PEG) que pone de manifiesto que la relación entre cantidad de vehículo acumulado en tumor respecto a la cantidad en sangre es muy superior en el caso del EDS del sistema de la presente invención. Este dato pone de manifiesto que existe una interacción específica entre HA y CD44 que favorece la acumulación selectiva del vehículo EDS en las células tumorales que sobreexpresan CD44.

Por tanto y a la vista de los resultados expuestos queda demostrada la utilidad del vehículo EDS en la obtención de un sistema de liberación de un agente terapéutico.

Los inventores de la presente invención han realizado asimismo estudios de viabilidad o cito-toxicidad de los sistemas de liberación de la invención tanto del EDS001 (Ejemplo 2.4) como del EDS002 (Ejemplo 3.2) que han puesto de manifiesto su eficacia.

Para el estudio del caso EDS001 los inventores utilizaron dos sistemas de liberación

diferentes cuya obtención se describe en los ejemplos (Ejemplo 2), que difieren entre sí en el tamaño de la nanopartícula de oro en este caso: 4 nm y 12 nm respectivamente. Se utilizaron diferentes diluciones (100, 25, 6,3 y 1,6) de una solución al 100% del sistema EDS001 (solución obtenida en el ejemplo 2). Los resultados de este estudio *in vitro* se muestran en la Figura 12 donde se representan las diferentes diluciones a que se sometieron las soluciones del sistema EDS001 obtenidas en el ejemplo 2. Los datos ponen de manifiesto como la capacidad de inducir apoptosis en las células tumorales de pulmón es mayor cuanto mayor es la concentración del sistema EDS001 en el medio y cuanto mayor es en este caso también el tamaño de la nanopartícula de oro (12 nm).

En el segundo estudio los inventores utilizaron el sistema de liberación que se describe en el Ejemplo 3. Se utilizaron soluciones del sistema EDS002 con distintas concentraciones (utilizando el cisplatino como agente patrón). Los resultados de este estudio *in vitro* se muestran en la Figura 17 donde se observa como la toxicidad del cisplatino (Cis) aumenta a mayor concentración del mismo, y como, a igual concentración de Cis libre que Cis encapsulado en el sistema de liberación según la invención EDS002, el cisplatino produce mayor toxicidad en las células cuando es transportado por el sistema de liberación EDS002 que cuando está libre y se libera en el medio sin conjugarse.

Por lo tanto y a la vista de lo expuesto, se demuestra que el sistema de liberación de la presente invención cumple satisfactoriamente con los requisitos funcionales necesarios de un sistema para resultar eficaz, además de resultar más sencillo que otros sistemas del estado de la técnica.

Una de las principales ventajas del sistema de liberación de la presente invención, reside en su gran capacidad hidrofílica debida a la presencia del recubrimiento de HA que actúa como agente hidrofílico creando una capa acuosa alrededor del sistema y protegiéndolo de la acción del SMF (sistema mononuclear fagocítico). La capacidad hidrofílica del HA está relacionada con su peso molecular y con la capacidad de los distintos oligómeros de HA de crear enlaces entre ellos, fenómeno que se conoce como cross-linking. La conjugación a la nanopartícula metálica mejora el cross-linking entre los distintos oligómeros de HA ya que se encuentran unidos a la nanopartícula metálica y por tanto no pueden separarse. Además, la disposición del HA alrededor de la nanopartícula metálica dificulta la degradación de éste debido a la acción de la

hialuronidasa. Por tanto el HA conjugado a la nanopartícula metálica es estable e hidrofílico y cumple satisfactoriamente con la misión de proteger al sistema de liberación de la acción del SMF. De este modo, el sistema de liberación permanece más tiempo en el sistema circulatorio lo que posibilita que el sistema con el agente terapéutico llegue a las células objetivo.

Otra de las ventajas del sistema de liberación de la invención reside en su capacidad de transportar un agente terapéutico selectivamente a una zona determinada de nuestro organismo, potenciando la actividad del mismo mayoritariamente en dicha zona y reduciendo al mismo tiempo los efectos secundarios del agente en el resto de zonas del organismo. Dicha propiedad se basa asimismo en el HA, que además de proteger el sistema de liberación del SMF como se ha comentado anteriormente sirve para vectorizarlo selectivamente a algunas proteínas del organismo. En particular, el sistema de la liberación de la invención tiene como objetivo transportar el agente hasta el receptor CD44 basándose en la afinidad del HA (ligando) por el mismo. CD44 es una glicoproteína transmembrana implicada en la adhesión entre células y diferentes componentes de la matriz extracelular, incluyendo el HA (Curr Pharm Des. 2009; 15(12):1309-17). Diversos estudios han demostrado que el receptor CD44 está presente en células epiteliales, neuronales, hematopoyéticas, así como especialmente también en células cancerígenas de carcinoma, melanoma, linfoma, páncreas, mama, colon, ovario y pulmón. En especial, ciertos tumores sobre-expresan los niveles de CD44 (Semin Cancer Biol. 2008; 18(4):244-50). De hecho, muchos tumores están caracterizados por la producción y acumulación de HA alrededor del receptor CD44 y células neoplásicas suelen exhibir una afinidad alta con HA. También el CD44 está altamente expresado en las células madre tumorales (Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):3983-8). Por todo ello el sistema de liberación de la invención puede dirigirse a cualquier tipo de tejido o células del organismo humano o animal que presente CD44. Además se ha visto que otra propiedad muy interesante de la afinidad HA-CD44 es que el receptor transmembrana CD44 es el responsable de la internalización celular del HA (Matrix Biol. 2002; 21(1):15-23). De acuerdo con lo descrito, el HA es la molécula del sistema de liberación de la invención responsable de la internalización de las nanopartículas metálicas y del agente terapéutico en células que expresan CD44.

La eliminación del sistema de liberación de la presente invención está determinado por

el recubrimiento de HA; una vez el agente se libera intracelularmente, resta la nanopartícula metálica conjugada con oligómeros de HA, el ligando utilizado para conjugar el HA a la nanopartícula y en su caso del ligando o fragmento de ligando utilizado para unir el agente terapéutico al vehículo. El HA es un compuesto generado de manera endógena por el cuerpo humano que está presente en la matriz extracelular de los tejidos y realiza diversas funciones en diferentes procesos biológicos del organismo. Su eliminación está perfectamente definida y es realizada de forma natural por el organismo debido a la presencia de HA endógeno que continuamente debe ser eliminado. Por lo tanto, los procesos para eliminar el sistema de liberación del organismo serán análogos a los que sigue el HA endógeno.

Cuando el agente está encapsulado en el recubrimiento de HA, éste es liberado en las células objetivo al degradarse las cadenas de HA mediante la acción de enzimas selectivos (hialuronidasas).

En resumen, el sistema de la invención presenta una característica única que es la utilización de una única molécula (HA) con la doble funcionalidad de (1) ser la responsable de proteger el agente del sistema SMF manteniendo el agente un tiempo óptimo en sangre (farmacocinética del agente optimizada); y (2) ser la responsable de liberar el agente selectivamente dentro de las células objetivo mediante la afinidad del ligando HA con el receptor CD44. La estabilidad de la unión del HA a la NP así como la estabilidad de la propia NP en medio biológico garantizan que el sistema de liberación no pierda su recubrimiento de HA durante todo el tiempo que permanece en el organismo. Del mismo modo, el recubrimiento del sistema de liberación con HA reduce la citotoxicidad del compuesto en tejidos sanos (Nucl Med Biol. 2009 Jul; 36(5):525-33).

A continuación se presentan ejemplos ilustrativos de la presente invención que se exponen para una mejor comprensión de la invención y en ningún caso deben considerarse una limitación del alcance de la misma.

EJEMPLOS

Las técnicas y aparatos utilizados para la caracterización físico-química fueron: espectro de absorción UV-vis (con espectrofotómetro UV-2501-PC, UV-VIS Shimadzu),

microscopía de transmisión electrónica (TEM) (JEOL 1010 a 80KW), difusión de luz dinámica (DLS) (Nano-Zetasizer Malvern), Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) (Perkin Elmer ELAN 6000) potencial-Z (Z-Pot) (Nano-Zetasizer Malvern) HPLC-MS y RMN.

5

Ejemplo 1: obtención de un nanosistema EDS

1.1 Síntesis de nanopartículas de oro de 4 nm y 12 nm (Au-NP)

10

a) Síntesis de Nanopartículas de oro de 4 nm

15

Una disolución acuosa (200 mL) de citrato de sodio (25 mM) y HAuCl_4 (25 mM) se agitó a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 6 mL de una disolución acuosa (100 mM) de borohidrato sódico frío. La reducción tuvo lugar instantáneamente y se formó una disolución coloidal de nanopartículas de oro, la cual experimentó un cambio de color indicativo de amarillo a rojo intenso. Finalmente, la solución coloidal se concentro 10 veces.

20

b) Síntesis de Nanopartículas de oro de 12 nm

25

Una disolución acuosa (150 mL) de citrato de sodio (2,2 mM) se calentó a ebullición con agitación vigorosa. A continuación se añadió 1 mL de una disolución acuosa (25 mM) de HAuCl_4 sobre la disolución a ebullición. La reducción tuvo lugar en aproximadamente 3 minutos y se formó una disolución de nanopartículas de oro, la cual experimentó un cambio de color indicativo de violáceo a rojo intenso. Finalmente se separó el reactor de la fuente de calor y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Finalmente, la solución coloidal se concentro 10 veces.

30

1.2 Derivatización de ácido hialurónico (30-50 KDa)

35

A 1 g de HA de 30-50 KDa se añadieron 0,57 g de dihidrocloruro de cistamina en 250 ml de un tampón de reacción (el cual se preparó a partir de 1,5 g de H_3BO_3 y 5,85 g de NaCl en 250 ml de agua ajustando el pH a 8,5 con NaOH 1M). La disolución se ajustó a una temperatura de 45°C y se añadieron 3,15 g de cianoborohidrato sódico. La reacción se realizó bajo atmosfera controlada de gas argón y se dejó durante 5 días. Finalmente,

se añadieron 12,5 g de ditioneitol (DTT) y se dejó durante 1h.

Una vez derivatizado (tiolización) el HA, el producto resultante de la unión de HA a un ligando (HA-SH) se purificó mediante una diálisis para extraer el exceso de DTT y de dihidrocloruro de cistamina utilizando membranas de corte de peso molecular de 3,5 KDa por protocolo estándar. Se obtuvo el producto final HA-SH seco, y se liofilizó.

1.3 Conjugación de Au-NP y 30-50 KDa HA-SH

Se obtuvieron 2 nanosistemas EDS diferentes:

- (i) un EDS constituido por nanopartículas de oro (Au-NP) de 4 nm obtenidas en el Ejemplo 1.1 con ácido hialurónico derivatizado HA-SH 30-50 KDa obtenido según el Ejemplo 1.2 y
- (ii) un EDS constituido por nanopartículas de oro (Au-NP) de 12 nm obtenidas en el Ejemplo 1.1 con ácido hialurónico derivatizado HA-SH 30-50 KDa obtenido según el Ejemplo 1.2.

Para ello se adicionaron 5 mg/mL de HA-SH 30-50 KDa (Ejemplo 1.2) a una solución coloidal de 5 mL de nanopartículas de oro de 4 nm y 12 nm respectivamente (Ejemplo 1.1) y la mezcla resultante se mantuvo en cada caso durante 30 minutos a temperatura ambiente. La purificación se hizo por membranas de ultrafiltración (MWCO 100 KDa) para eliminar el exceso de HA-SH 30-50 KDa no conjugado a las nanopartículas de oro.

Los nanosistemas EDS obtenidos se caracterizaron mediante UV-vis, microscopía de transmisión electrónica (TEM), y potencial-Z (Z-Pot) tal y como se ha descrito en la solicitud de patente WO 2009087254.

1.4 Estudio de internalización CD44-EDS

Para este estudio se analizaron diferentes tamaños de HA-SH (5, 8-15, 15-30 y 30-50 KDa) unidos a nanopartículas de oro. Para el análisis de internalización celular del sistema EDS se llevaron a cabo tres técnicas diferentes:

1.4.1 Estudio de internalización EDS mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Células tumorales de páncreas humano (Panc-1) se trataron a una concentración al

30% de EDS obtenido en el Ejemplo 1.3 utilizando en este estudio diferentes tamaños de HA-SH. Tras 24 h, las células se lavaron y fijaron. A continuación fueron procesadas según protocolo estándar para su visualización mediante TEM (Figura 2).

5 **1.4.2 Estudio de internalización EDS mediante Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS)**

Para este análisis se utilizaron dos tipos diferentes de células tumorales: unas con una elevada expresión de CD44 (Panc-1) y otras con una baja expresión de CD44 (HepG2).
 10 Se trataron ambos tipos a una concentración al 30% de EDS obtenido en el Ejemplo 1.3 utilizando en este estudio diferentes tamaños de HA-SH. Tras 24 h de incubación, se recogieron los sobrenadantes del tratamiento y las células se lavaron con PBS-Tween 20 (0,1%) para eliminar el EDS adherido a la membrana celular no internalizado. A continuación se recogieron las células con PBS. Todas las muestras fueron procesadas
 15 según protocolo estándar para su cuantificación por ICP-MS (Figura 3), y los resultados se normalizaron por el número de células presentes.

1.4.3 Estudio de internalización EDS mediante Microscopia Confocal

20 Para este análisis se adherió al sistema EDS un fluoróforo apropiado (Biomaterials. 2008 Dec; 29(35):4709-18): EDS-Hylite. Células tumorales de páncreas (Panc-1) se trataron a una concentración al 30% de EDS-Hylite obtenido en el Ejemplo 1.3 utilizando en este estudio diferentes tamaños de HA-SH. Tras 24 h de incubación, las células se lavaron con PBS, fijaron con formalina 10% durante 15 minutos y la interacción
 25 inespecífica de los anticuerpos fue bloqueada con PBS-BSA 1%. El nivel de CD44 fue analizado mediante incubación con anti-CD44 (Cell Signaling, 156-3C11) y FITC-labeled anti-mouse (anticuerpos contra inmunoglobulinas de ratón marcados con el marcador fluorescente FITC (fluoresceína isotiocianato)) (Sigma, F9384). Los núcleos celulares fueron teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). La internalización de EDS-Hylite y
 30 el CD44 fueron visualizados mediante microscopia confocal (Figura 4).

1.5 Estudio in-vivo Nanopartículas de oro – HA

El estudio se realizó en un modelo animal utilizando cepas de ratón. Células tumorales
 35 humanas de colon (HCT-116) se implantaron vía subcutánea en el lomo del animal y se

dejaron crecer hasta la formación de un tumor de tamaño determinado (mínimo 5 mm). Una vez se obtuvo el tumor con un tamaño suficiente, a cada ratón se le inyectó una solución de EDS con una concentración de oro de 10 mg/Kg (con diferentes tamaños de HA-SH) por vía intravenosa. Tras 24 h de tratamiento, los ratones se sacrificaron siguiendo protocolos establecidos y se estudió la concentración de oro en los tumores (Figura 5). La concentración de oro en la sangre a diferentes tiempos y el ratio de oro tumor/sangre fueron analizados (Figura 6).

Ejemplo 2. Obtención de un sistema de liberación: EDS001

Se obtuvo un sistema de liberación controlada según la invención constituido por Au-NP obtenidas en el Ejemplo 1.1, HA-SH 30-50 KDa obtenidas según el Ejemplo 1.2, y el agente terapéutico cisplatino unido mediante un ligando tipo 2 (L2) a la Au-NP. Para ello se llevaron a cabo las siguientes etapas:

2.1 Síntesis del ligando L2

L2 de fórmula $[\text{CH}_2\text{-COO-}]_2\text{-N-(CH}_2)_2\text{-S-S-(CH}_2)_2\text{-N-[CH}_2\text{-COO-}]_2$ se obtuvo a partir de una solución de dihidrocloruro de cistamina de fórmula: $\text{ClNH}_3\text{-(CH}_2)_2\text{-S-S-(CH}_2)_2\text{-NH}_3\text{Cl}$ (2,25 g) en 200 ml de etanol y 20 ml de trietilamina, donde se añadió bromoacetato de etilo (6,6 ml) y yoduro de potasio (1,04 mg). Después de 6h de agitación a temperatura ambiente, el sólido insoluble resultante se filtró. El filtrado se rotavaporó y se obtuvo el producto intermedio de fórmula: $[\text{CH}_2\text{-COOEt}]_2\text{-N-(CH}_2)_2\text{-S-S-(CH}_2)_2\text{-N-[CH}_2\text{-COOEt}]_2$ el cual se purificó por cromatografía flash (1:1 CH_2Cl_2 : AcEt) y se caracterizó mediante RMN (CDCl_3 , 400MHz).

A continuación el producto se disolvió en metanol (MeOH) (10 ml) y NaOH (5 ml) con agitación durante la noche, se añadió H_2O (5 ml) y se acidificó a pH 3 con HCl 1M. Finalmente, se dejó a 4 °C y apareció un precipitado correspondiente a al producto **L2** que se filtró, purificó con EtOH/ H_2O y caracterizó mediante RMN (DMSO, 400MHz).

2.3 Obtención por conjugación del sistema EDS001 según la presente invención con nanopartículas de oro, HA-SH y cisplatino unido a las nanopartículas de oro mediante un ligando L2

Las nanopartículas de oro (de 4 nm y 12 nm) obtenidas según el Ejemplo 1.1, se

conjugaron con los oligómeros de HA-SH (30-50 KDa) obtenidos en el Ejemplo 1.2, con el ligando L2 obtenido en el Ejemplo 1.3 y con cisplatino (Cis) como agente terapéutico. Para ello:

5 A una solución coloidal de nanopartículas de oro (5 ml de solución de nanopartículas 31,1 nM) se le adicionó el ligando **L2** (392 µl de una solución stock de 2 mg/ml), se ajustó el pH a 11 y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación durante 30 minutos. En concreto se realizó mediante la adición inicial de 0,41 mM de **L2** a una solución coloidal de 5 mL de nanopartículas de oro de 4 nm y a una solución de
10 nanopartículas de oro de 12 nm en dos realizaciones diferentes durante 30 min a temperatura ambiente en cada caso.

Seguidamente se adicionaron simultáneamente en cada caso HA-SH 30-50KDa (Ejemplo 1.2) y Cis en diferentes proporciones y concentraciones (por ejemplo, 620 µl de
15 una disolución 2 mg/ml = 0,83 mM) de Cis en 1 ml de una solución (2,5 mg/ml de HA-SH 30-50KDa = 12,5 mM). Cada reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 12 h. La purificación (y ajuste de pH a 7) se hizo por membranas de ultrafiltración (MWCO 100 KDa) para eliminar el exceso de **L2**, HA-SH y Cis no conjugados a las nanopartículas de oro. Finalmente, el EDS001 (sistema esquematizado en la Figura 1)
20 fue purificado mediante membranas de ultrafiltración y re-disuelto en medio biológico a pH 7.

El sistema resultante EDS001 se caracterizó mediante UV-vis (Figura 8), microscopía de transmisión electrónica (TEM) (Figura 9), difusión de luz dinámica (DLS) (Figura 10),
25 Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) y potencial-Z (Z-Pot) (Figura 11). Los resultados de ICP-MS (µg/g) fueron los siguientes:

Pt	Au
11,73	281,5

30 **2.4 Estudio viabilidad celular EDS001**

Para el estudio de viabilidad del sistema de la invención EDS001 (con nanopartículas de oro de 4 nm y 12 nm) se utilizaron células tumorales de pulmón (A549). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos en medio completos durante 24 h. A continuación se

añadió el tratamiento.

Para este estudio se utilizó como control negativo el medio completo y como control positivo medio completo con 1% de Tween 20. Para estudiar el efecto celular del EDS001 se utilizó la solución stock obtenida en el ejemplo 2.3 de la cual se realizaron tres diluciones diferentes (1:4, 1:16 y 1:64). Este tratamiento se mantuvo durante 72 h tras las cuales las células se procesaron para el estudio de actividad de la hexosaminidasa. Para ello, se retiró el medio de tratamiento que contenía las células y en cada pocillo se añadieron 60 μ L de solución sustrato (7,5 mM de p-nitrofenol-N-acetil-beta-D-glucosaminida y 0,1 M de citrato sódico a pH 5,0 al 50% en una solución 0,5% Triton X-100 en agua). Tras 3 h de incubación, se añadieron en cada pocillo 90 μ L de solución reveladora (50 mM de glicina a pH 10,4 y 5 mM EDTA). A continuación, se midió la absorbancia de cada muestra-pocillo a 410 nm (Figura 12).

Ejemplo 3. Obtención de un sistema de liberación: EDS002

Se obtuvo un sistema de liberación controlada según la invención constituido por Au-NP obtenidas en el Ejemplo 1.1 de 4 y 12 nm de tamaño, HA-SH 30-50 KDa obtenidas según el Ejemplo 1.2, y el agente terapéutico cisplatino encapsulado. Para ello se llevaron a cabo las siguientes etapas:

3.1 Conjugación de nanopartículas de oro, HA-SH y cisplatino (EDS002)

En aproximadamente 3 ml de solución acuosa se añadieron 77,5 mg de HA-SH 30-50 KDa y a continuación cisplatino (150 μ l de una solución stock de 2 mg/ml). La solución resultante se incubó toda la noche a 40 ± 5 °C con agitación y a oscuras. A continuación se añadieron 51,7 ml de una solución de nanopartículas de oro de concentración 9,33 nM y la mezcla resultante se mantuvo con agitación durante 30 minutos. La purificación del sistema de liberación EDS002 se realizó mediante membranas de ultrafiltración (MWCO 100 KDa) para eliminar el exceso de HA-SH y Cis no conjugados a las nanopartículas de oro.

El sistema EDS002 se caracterizó mediante UV-VIS (Figura 13), microscopía de transmisión electrónica (TEM) (Figura 14), difusión de luz dinámica (DLS) (Figura 15), Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) y potencial-Z (Z-Pot) (Figura 16). Los resultados de ICP-MS (μ g/g) fueron los siguientes:

Pt	Au
23,1	770

3.2 Estudio viabilidad celular EDS002

5

Para el estudio de viabilidad del sistema EDS002 (con nanopartículas de oro de 12 nm) se utilizaron células tumorales de pulmón (A549). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos en medio completos durante 24 h. A continuación se añadió el tratamiento.

10

Para este estudio se utilizó como control negativo el medio completo y como control positivo medio completo con 1% de Tween 20. Para estudiar el efecto celular del EDS002 se utilizó la solución stock obtenida en el ejemplo 3.2 de la cual se estudiaron cuatro diluciones diferentes (1:1, 1:4, 1:16 y 1:64). Este tratamiento se mantuvo durante 72 h tras las cuales las células se procesaron para el estudio de actividad de la hexosaminidasa. Para ello, se retiró el medio de tratamiento que contenía las células y en cada pocillo se añadieron 60 µL de solución sustrato (7,5 mM de p-nitrofenol-N-acetil-beta-D-glucosaminida y 0,1 M de citrato sódico a pH 5,0 al 50% en una solución 0,5% Triton X-100 en agua). Tras 3 h de incubación, se añadieron en cada pocillo 90 µL de solución reveladora (50 mM de glicina a pH 10,4 y 5 mM EDTA). A continuación, se midió la absorbancia de cada muestra-pocillo a 410 nm (Figura 17).

15

20

25

REIVINDICACIONES

1. Sistema de liberación selectiva y controlada de un agente terapéutico que comprende:

(i) un vehículo que comprende:

a) una nanopartícula metálica y

b) un recubrimiento de HA unido a la nanopartícula metálica a través de al menos un primer ligando, y

(ii) al menos un agente terapéutico unido al vehículo según una de las siguientes alternativas:

1) unido a la nanopartícula metálica mediante un segundo ligando;

2) unido al recubrimiento de HA mediante un tercer ligando, o

3) encapsulado en el recubrimiento de HA,

con la condición de que cuando el agente terapéutico está unido mediante un segundo ligando a la nanopartícula metálica dicho agente sea distinto de una proteína, un péptido o un inhibidor de la hidrólisis del HA.

2. Sistema de liberación de agente terapéutico según la reivindicación 1, en el que la nanopartícula metálica se selecciona de entre el grupo formado por nanopartículas y partículas núcleo-coraza y en el que la nanopartícula, el núcleo y la coraza pueden estar independientemente constituidos por un material seleccionado del grupo formado por los metales Au, Ag, Pt, Co, Fe, sus óxidos, TiO_2 y sus mezclas.

3. Sistema de liberación de agente terapéutico según la reivindicación 2, en el que la nanopartícula metálica es una partícula núcleo-coraza en la que el núcleo es Co superparamagnético y la coraza es Au.

4. Sistema de liberación de agente terapéutico según la reivindicación 2, en el que la nanopartícula metálica es una nanopartícula de oro, preferiblemente de tamaño comprendido entre 5 y 30 nm, más preferiblemente entre 4 y 12 nm

5. Sistema de liberación de un agente terapéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que recubrimiento de HA está constituido por oligómeros de HA que presentan un peso molecular comprendido 1 y 500 KDa preferiblemente entre 5 y 50 KDa, y más preferentemente entre 30 y 50 KDa.

6. Sistema de liberación de un agente terapéutico según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente terapéutico se selecciona del grupo constituido por compuestos químicos, agentes farmacéuticos, drogas, factores biológicos, fragmentos de anticuerpos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y
5 carbohidratos, ácidos nucleicos, anticuerpos, proteínas, lípidos, nutrientes, cofactores, nutraceuticos, anestésicos, agentes de detección o una combinación de ellos

7. Sistema de liberación de un agente terapéutico según la reivindicación 6, en la que el agente terapéutico es un agente farmacéutico seleccionado del grupo formado por
10 agentes anti-inflamatorios, anticuerpos, antibióticos, analgésicos, agentes angiogénicos y antiangiogénicos, inhibidores COX-2, agentes quimioterapéuticos, agentes inmunoterapéuticos, materiales basados en ácido nucleico y sus combinaciones.

8. Sistema de liberación de un agente terapéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el agente terapéutico se selecciona del grupo
15 constituido por citoquinas, factores de crecimiento, fragmentos de macromoléculas activos, compuestos neuroquímicos, moléculas de comunicación celular, hormonas y mezclas.

9. Sistema de liberación de un agente terapéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el agente terapéutico es un agente antitumoral.

10. Sistema de liberación según la reivindicación 9, donde dicho agente antitumoral se selecciona del grupo formado por Bevacizumab, G-CSF, Cisplatino, RGD Péptido,
25 AFM, Carboplatino, Nedaplatino, Oxaliplatino, Satraplatino, Triplatino, Busulfán, Mannosulfán, Treosulfán, TioTEPA, Ciclofosfamida, Estramustina, Uramustina, Melfalan, Clorambucilo, Ifosfamida, Bendamustina, Carmustina, Estreptozotocina, Dacarbazina, Temozolomida, Actinomicina, Bleomicina, Mitomicina, Plicamicina, Aminopterina, Metotrexato, Pemetrexed, Raltitrexed, Cladribina, Clofarabina,
30 Fludarabina, Mercaptopurina, Pentostatina, Tioguanina, Carmofur, Citarabina, Decitabina, Fluorouracilo, Floxuridina, Gemcitabina, Capecitabina, Enocitabina, Sapacitabina, Camptotecina, Topotecan, Irinotecan, Rubitecan, Belotecan, Etoposida, Teniposida, Mitoxantrona, Pixantrona, Daunorubicina, Doxorubicina, Epirubicina, Idarubicina, Valrubicina, Pirarubicina, Zorubicina, Amrubicina, Vinblastina, Vincristina,
35 Vinorelbina, Vindesina, Docetaxel, Larotaxel, Paclitaxel, Ixabepilona, Tiazofurina,

Pegfilgrastim, Interferon B1a, Glatiramer, PEGinterferon alfa2a, Rituximab, Transtuzumab, Imatinib, Cetuximab, Erlotinib, Bortezomib, Anastrozola, Bicalutamida, Leuprolida, Goserelin, Leuprolida, Letrozol, Exemestana, Triptorelin, Fulvestrant, Leuprolida y sus mezclas.

5

11. Sistema de liberación según la reivindicación 10, donde dicho agente antitumoral se selecciona del grupo formado por cisplatino, oxaplatino, carboplatino, doxorubicina, paclitaxel y fluorouracilo, más preferentemente cisplatino.

10

12. Sistema de liberación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende un nanopartícula de oro de tamaño medio de diámetro seleccionado entre 4 y 12 nm, un recubrimiento de HA constituido por oligómeros que presenta un peso molecular medio de entre 30-50 KDa unido a través de al menos un primer ligando a la nanopartícula de oro y cisplatino unido a la nanopartícula de oro a través de un segundo

15

13. Sistema de liberación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende un nanopartícula de oro de tamaño medio de diámetro de 12 nm, un recubrimiento de HA constituido por oligómeros que presenta un peso molecular medio de entre 30-50 KDa unido a través de un primer ligando a la nanopartícula de oro y cisplatino encapsulado en el recubrimiento de HA.

20

14. Composición farmacéutica terapéutica que comprende al menos un sistema de liberación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

25

15. Sistema de liberación de un agente terapéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para su uso en un tratamiento médico o de prevención.

16. Sistema de liberación de agente terapéutico según la reivindicación 15, para su uso en el tratamiento del cáncer.

30

17. Empleo de un vehículo que comprende:

a) una nanopartícula metálica y

b) un recubrimiento hidrofílico de HA unido a la nanopartícula metálica a

35

través de al menos un primer ligando, para la obtención del sistema de

liberación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

5

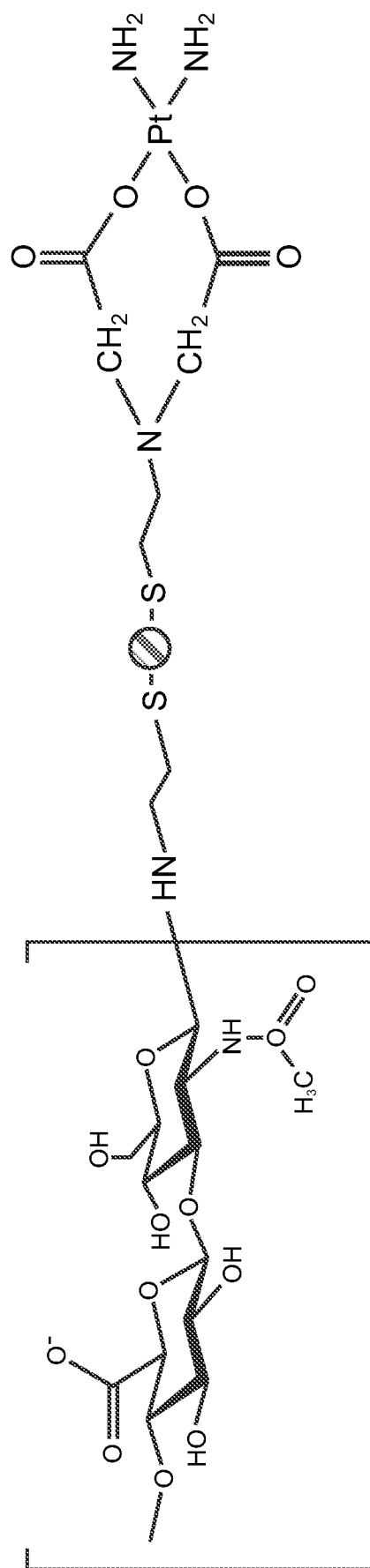
10

15

20

25

30

**FIG. 1**

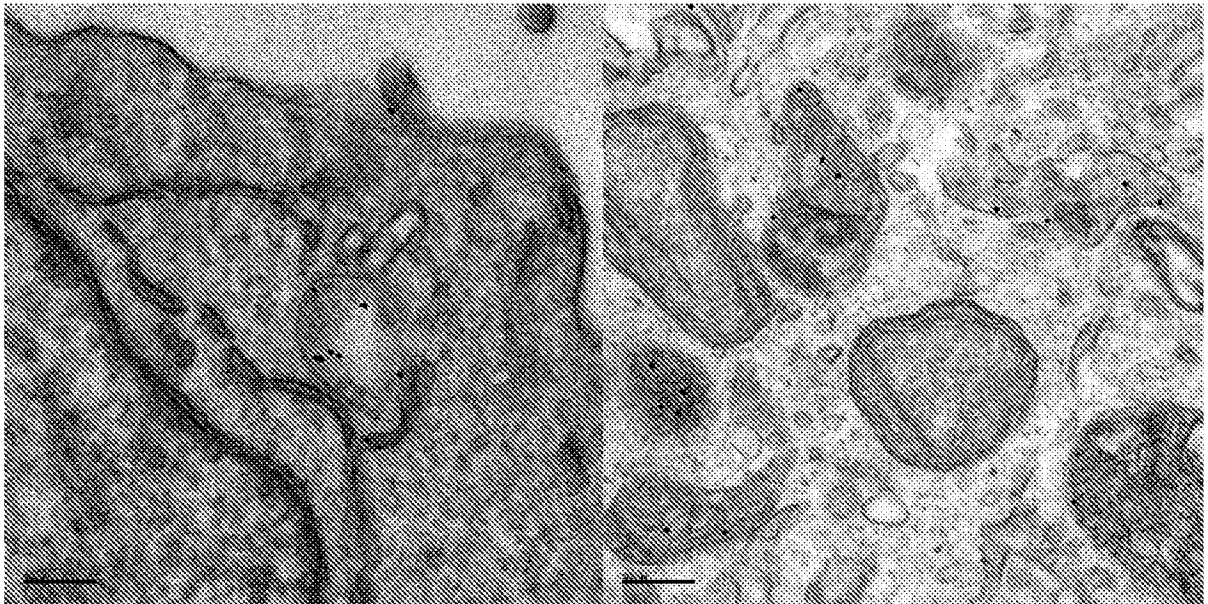


FIG. 2

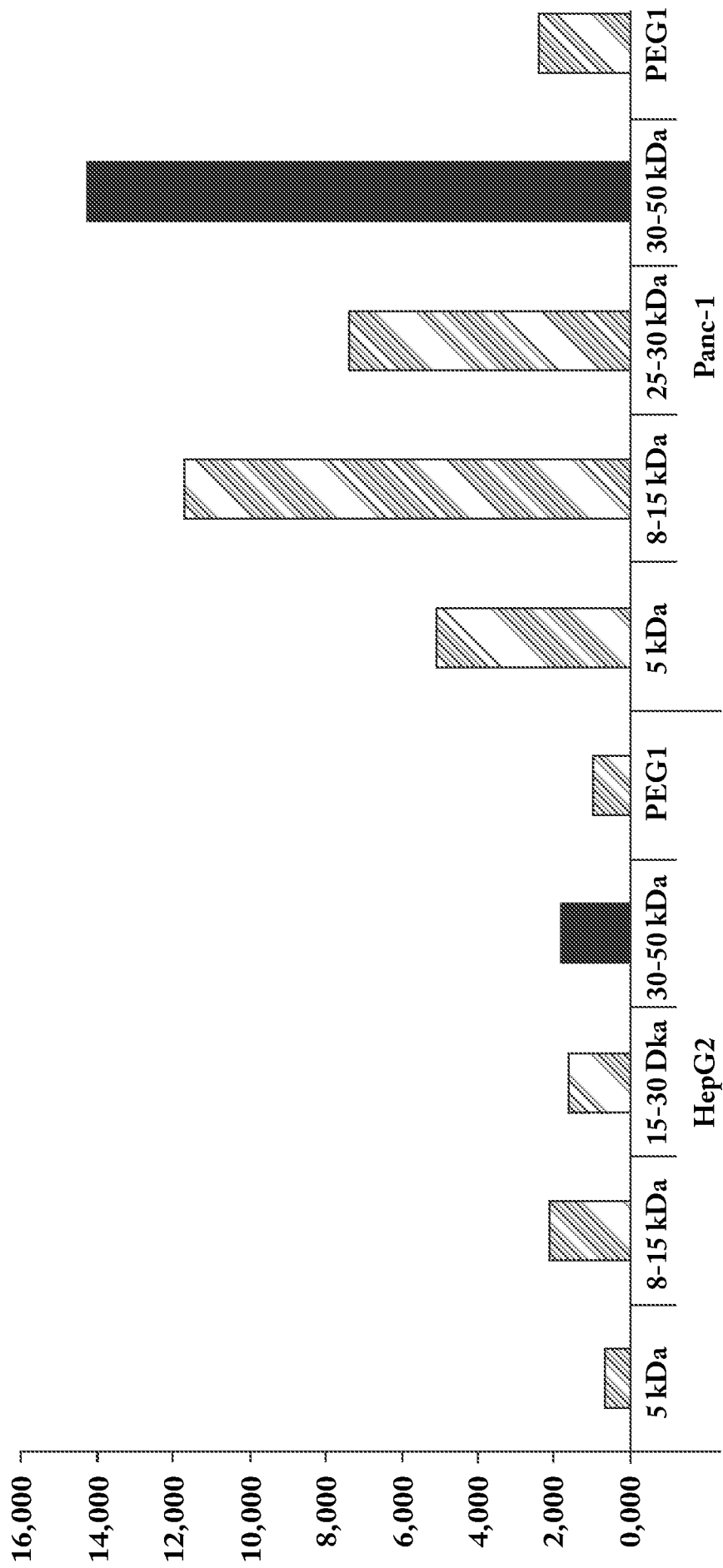


FIG. 3

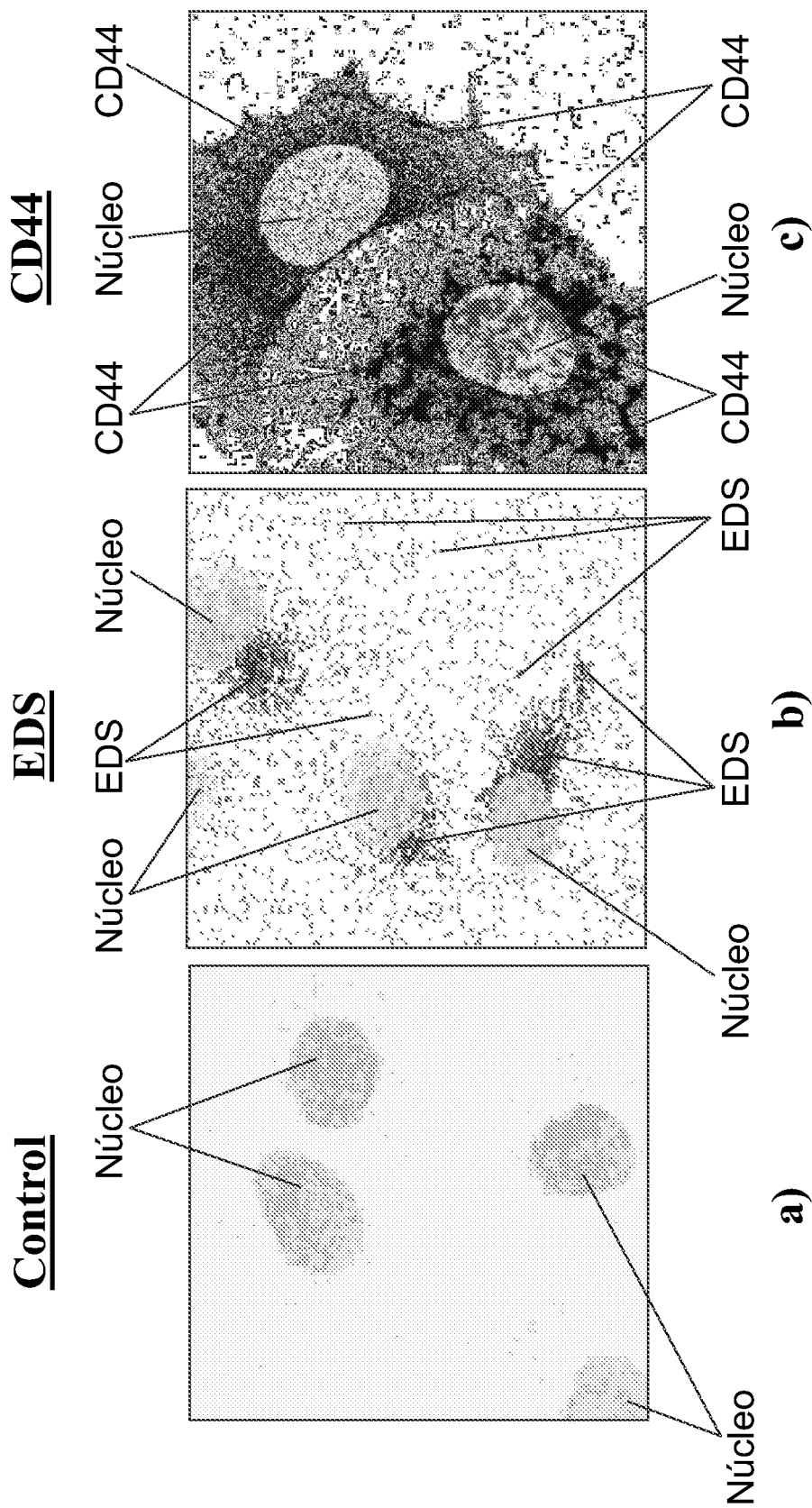


FIG. 4

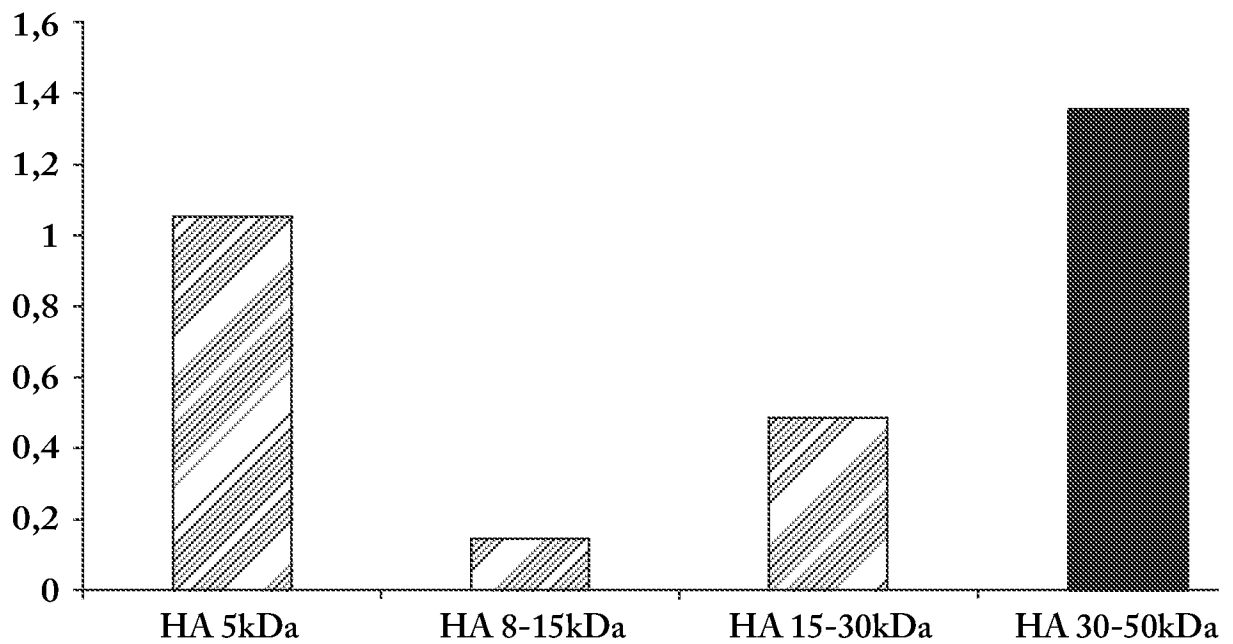


FIG. 5

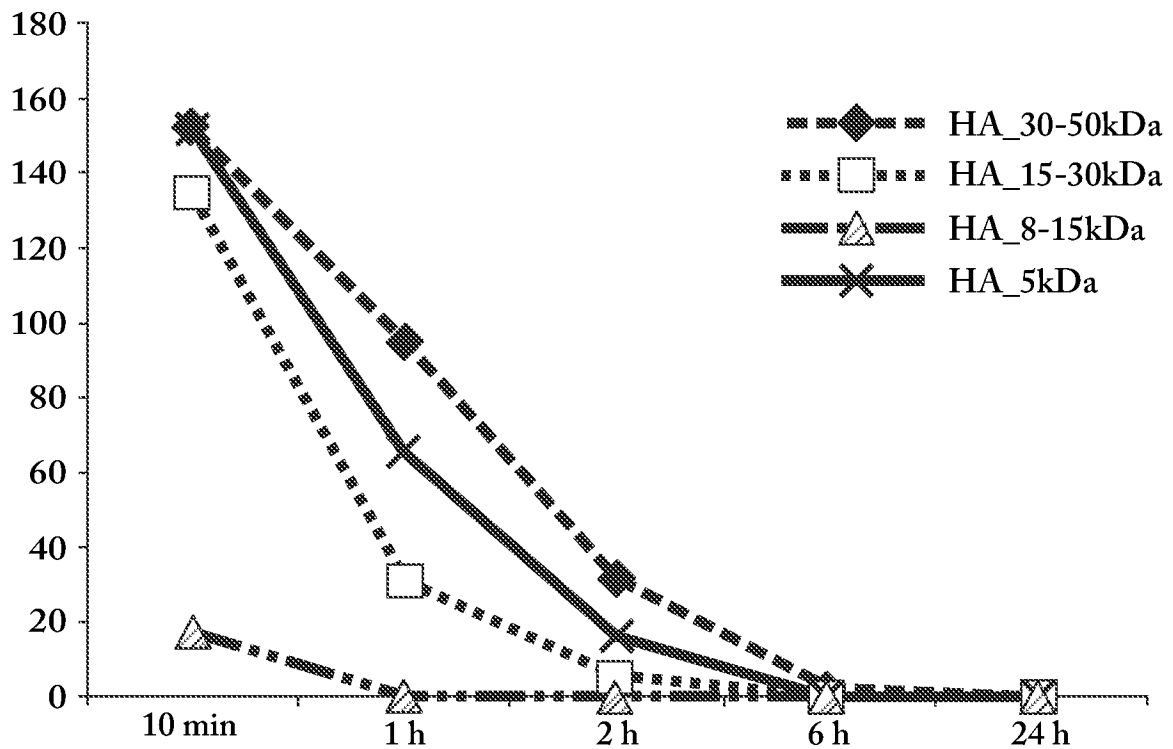


FIG. 6

EDS – HA 30-50KDa	PEG-Gold NP
85	0.04

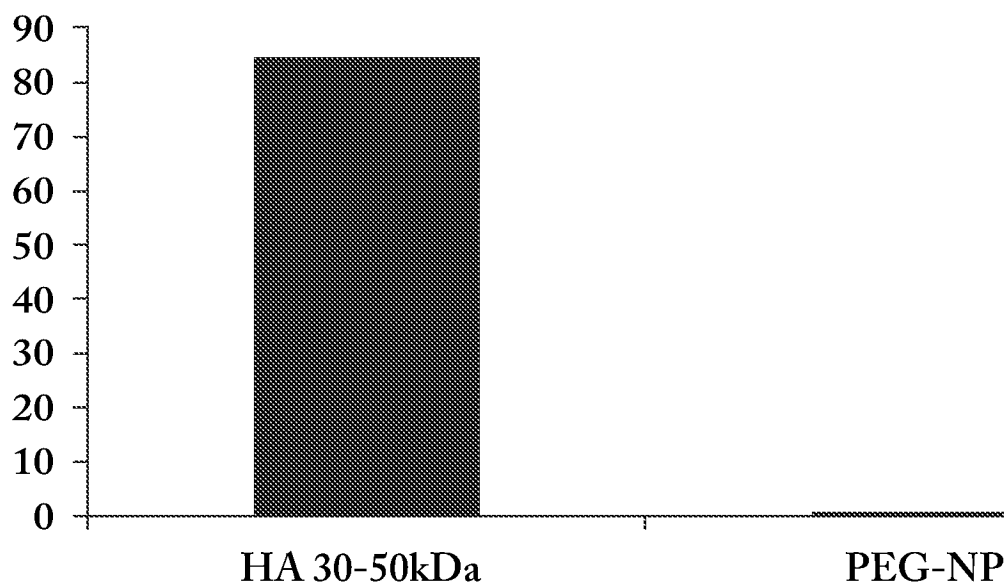


FIG. 7

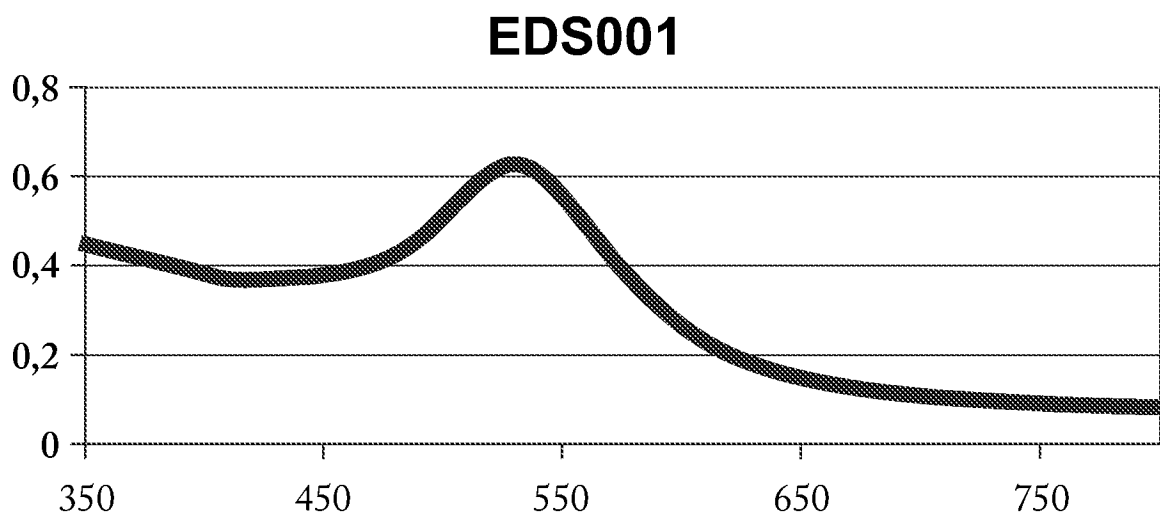


FIG. 8

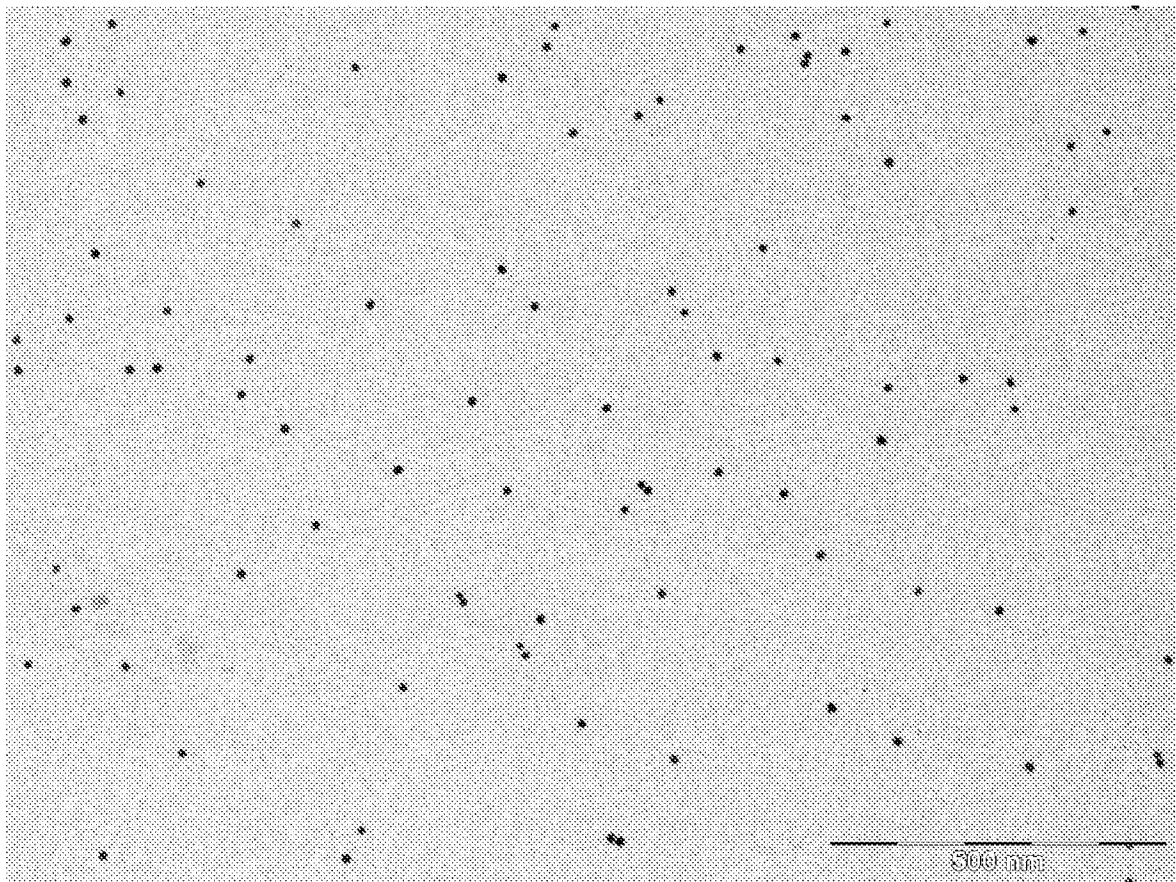


FIG. 9

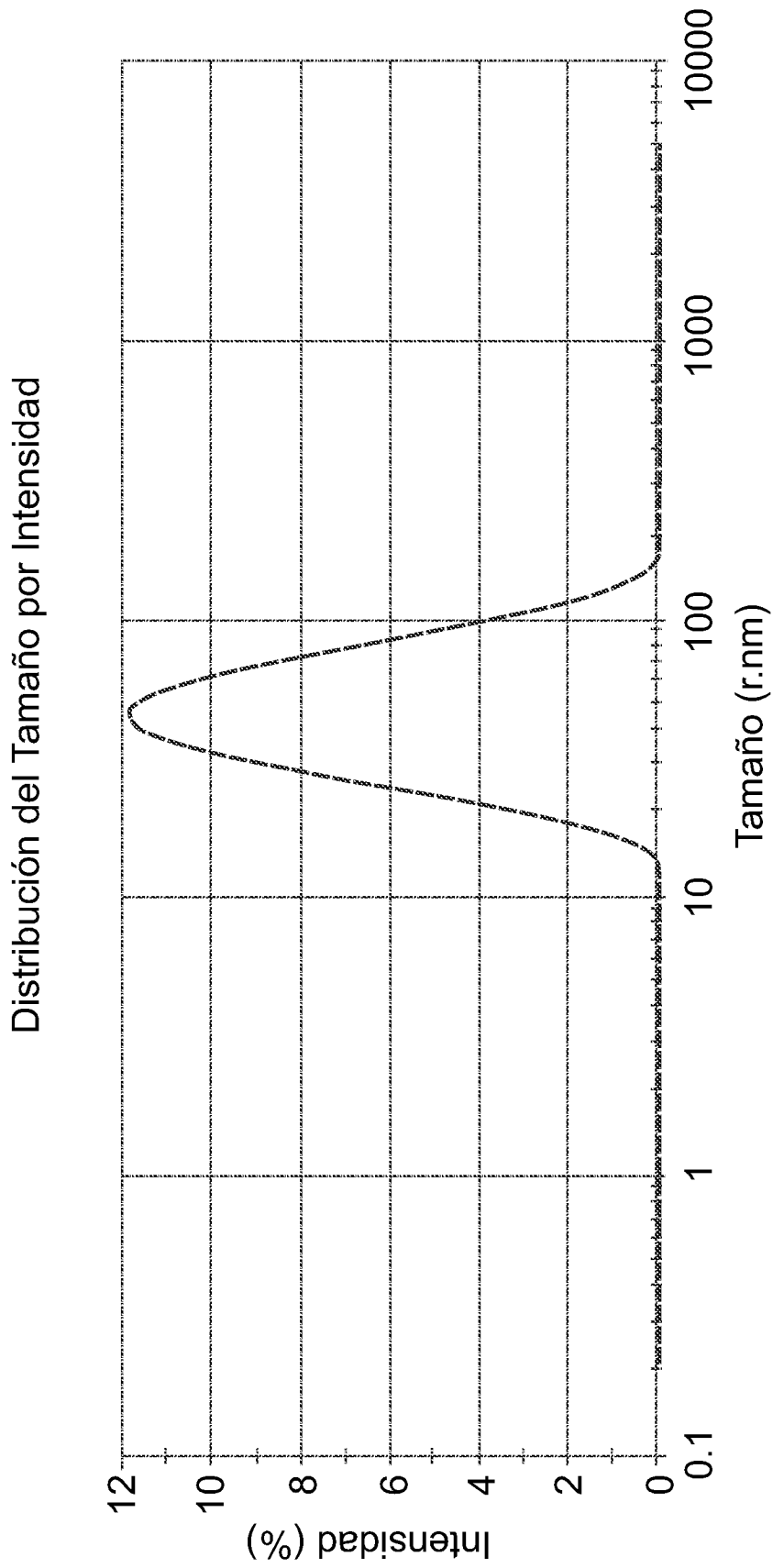


FIG. 10

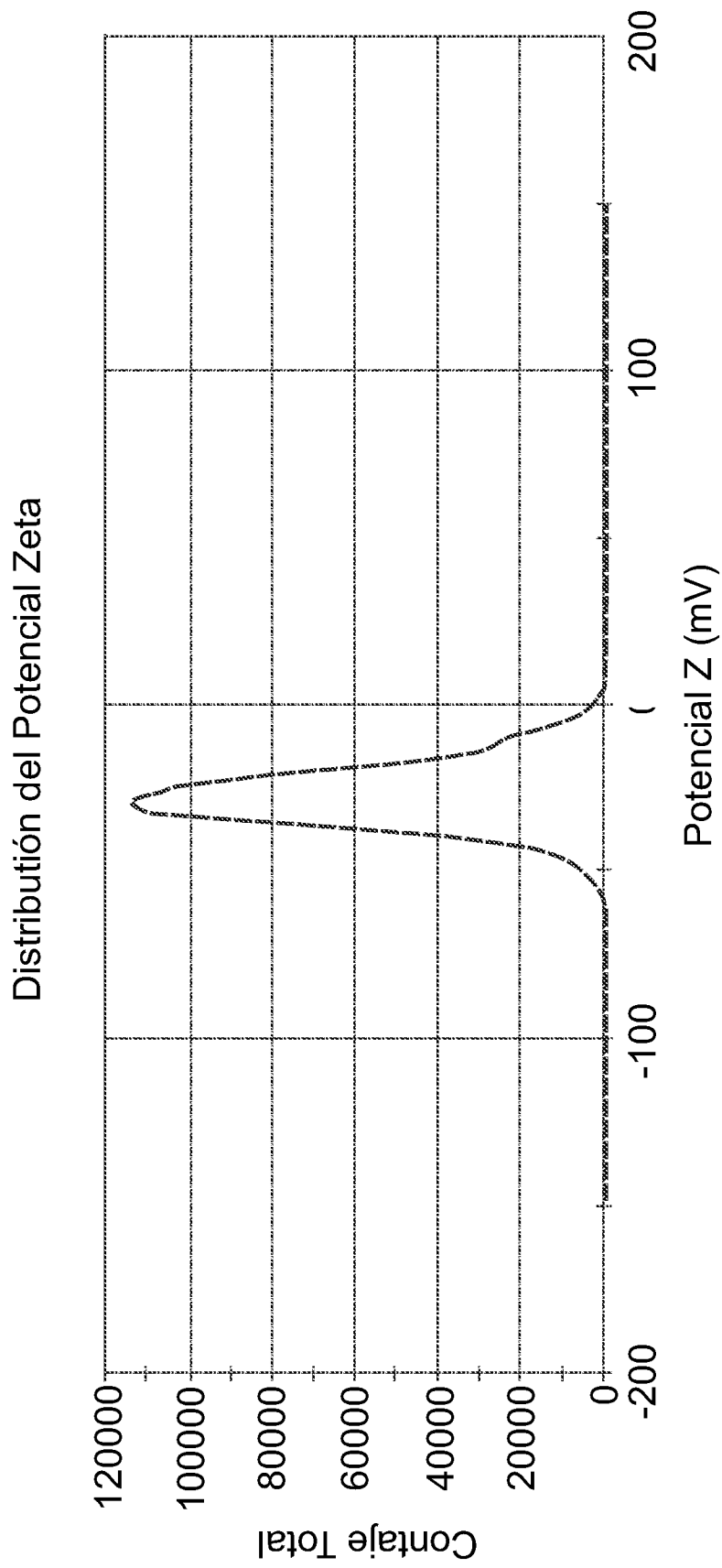


FIG. 11

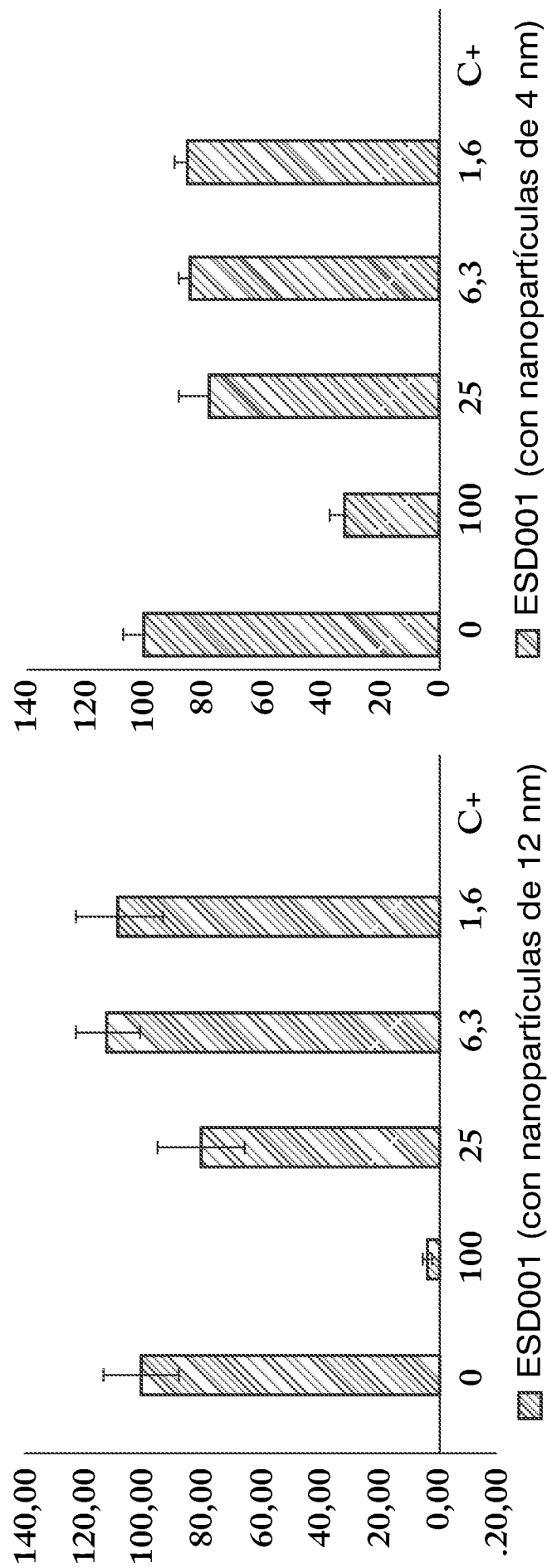


FIG. 12

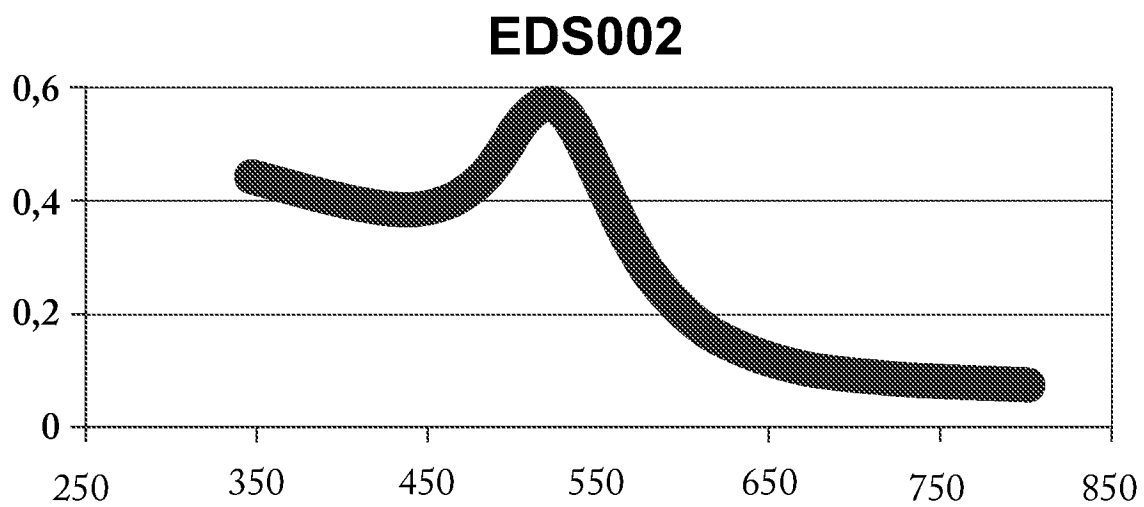


FIG. 13

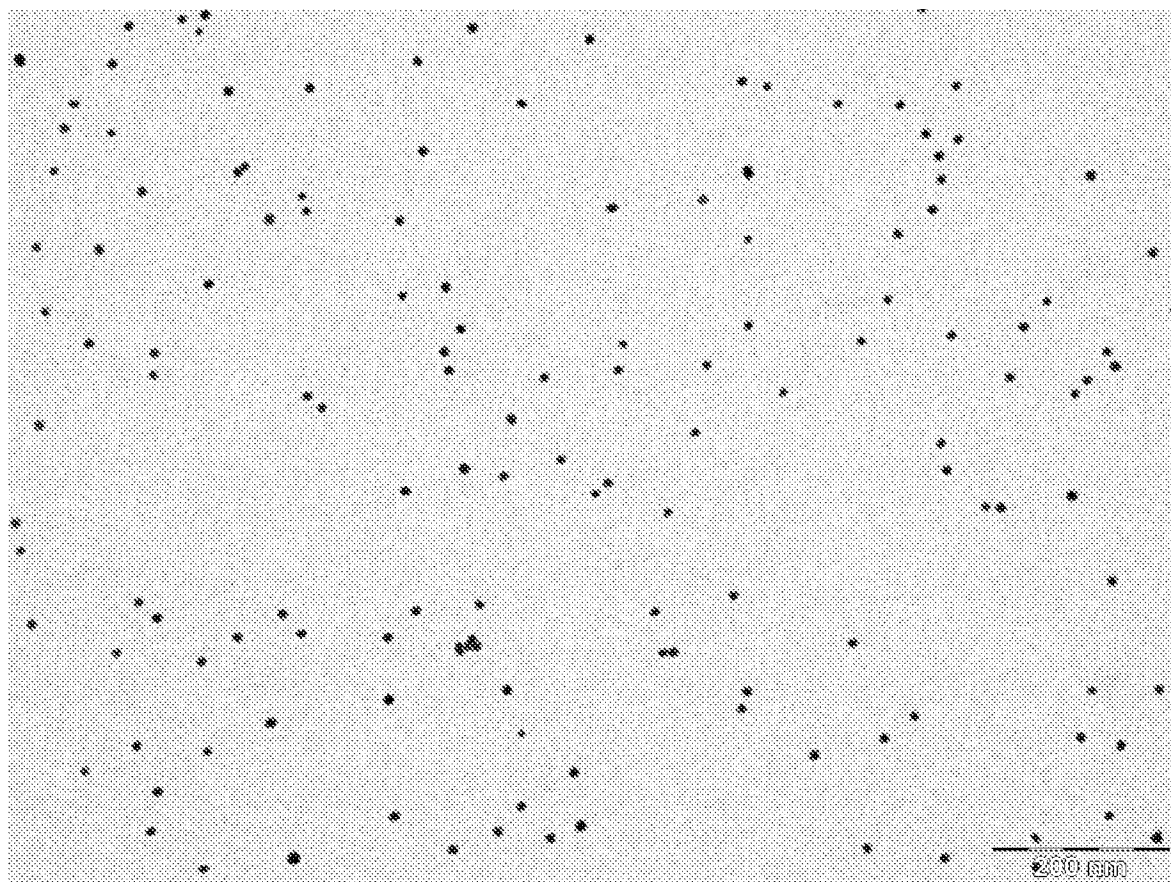


FIG. 14

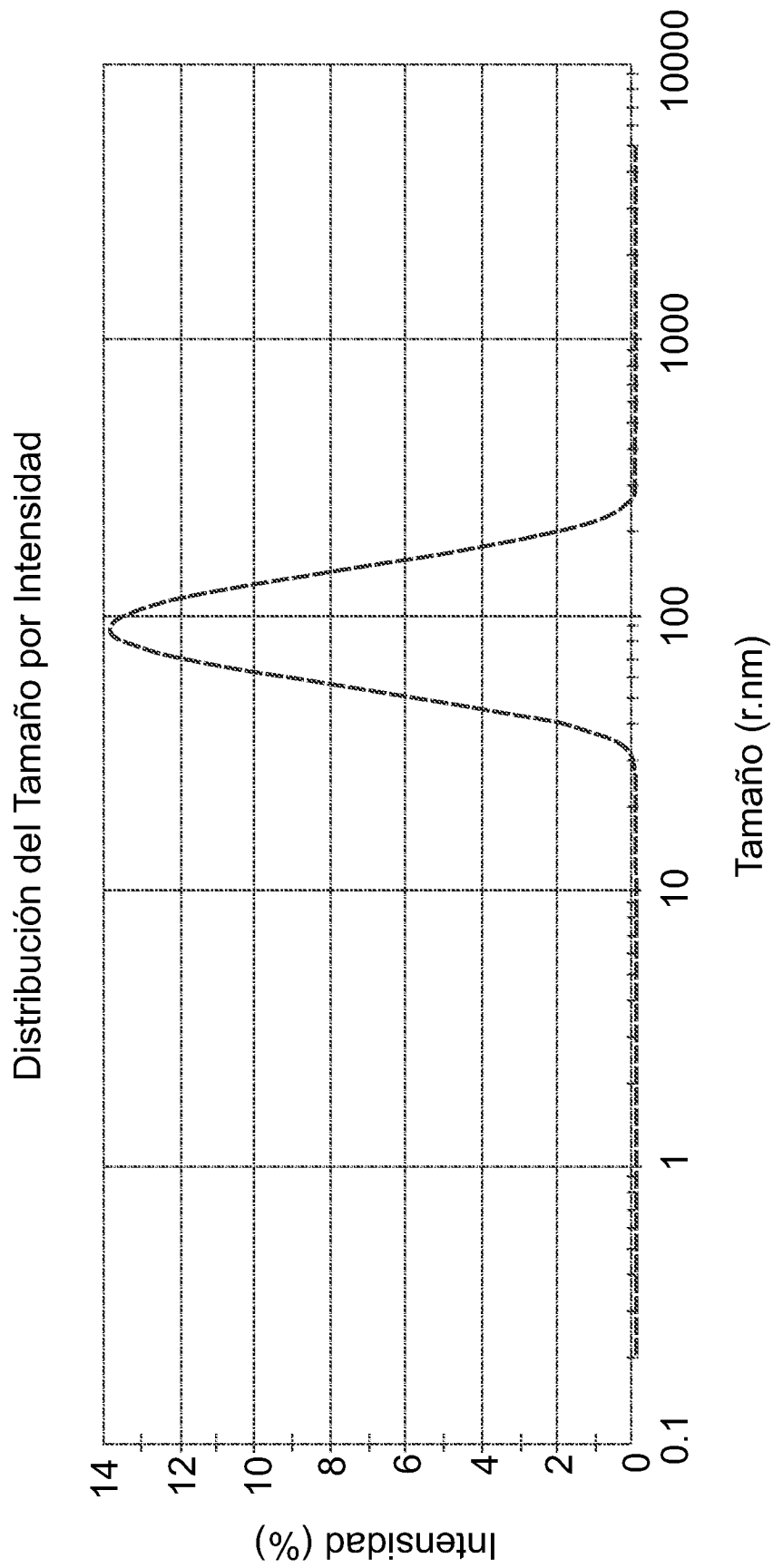


FIG. 15

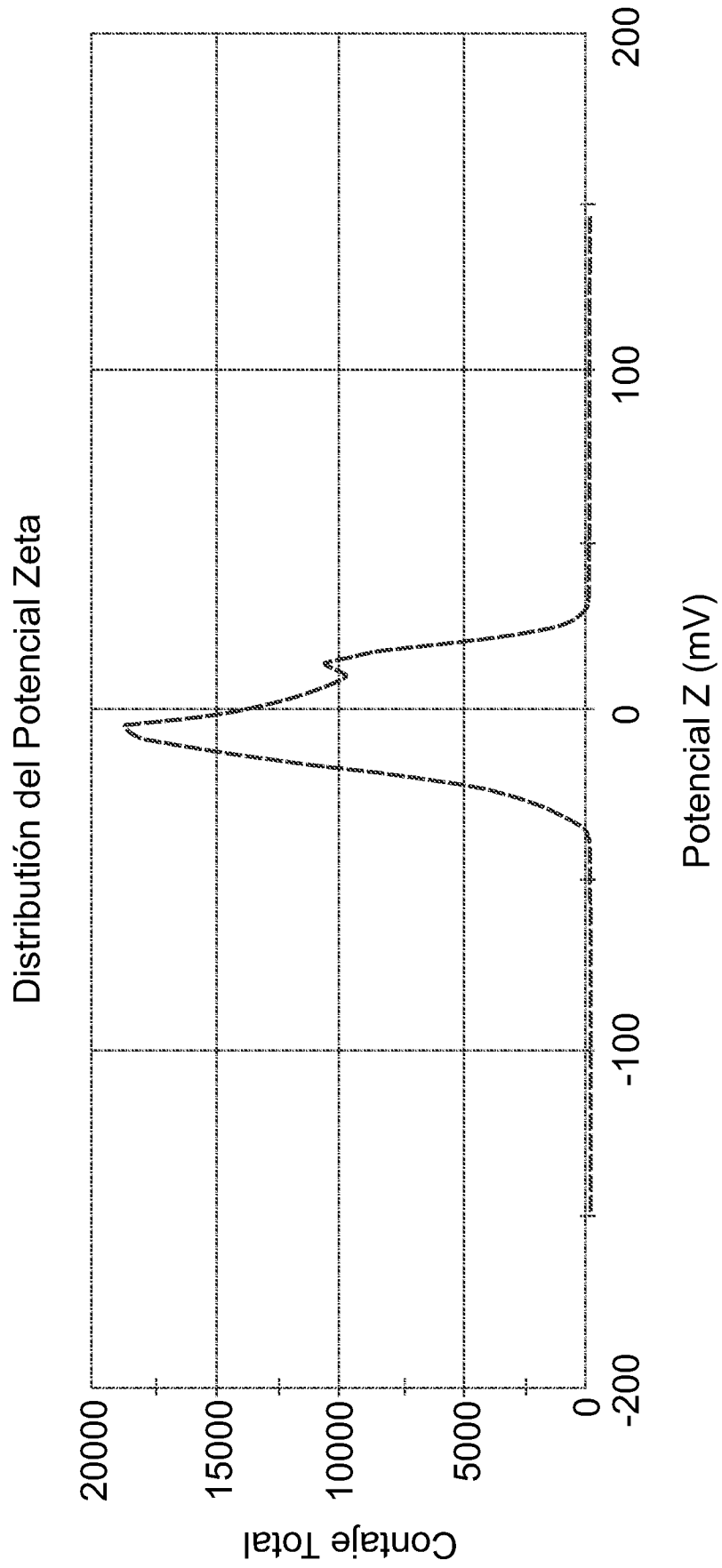


FIG. 16

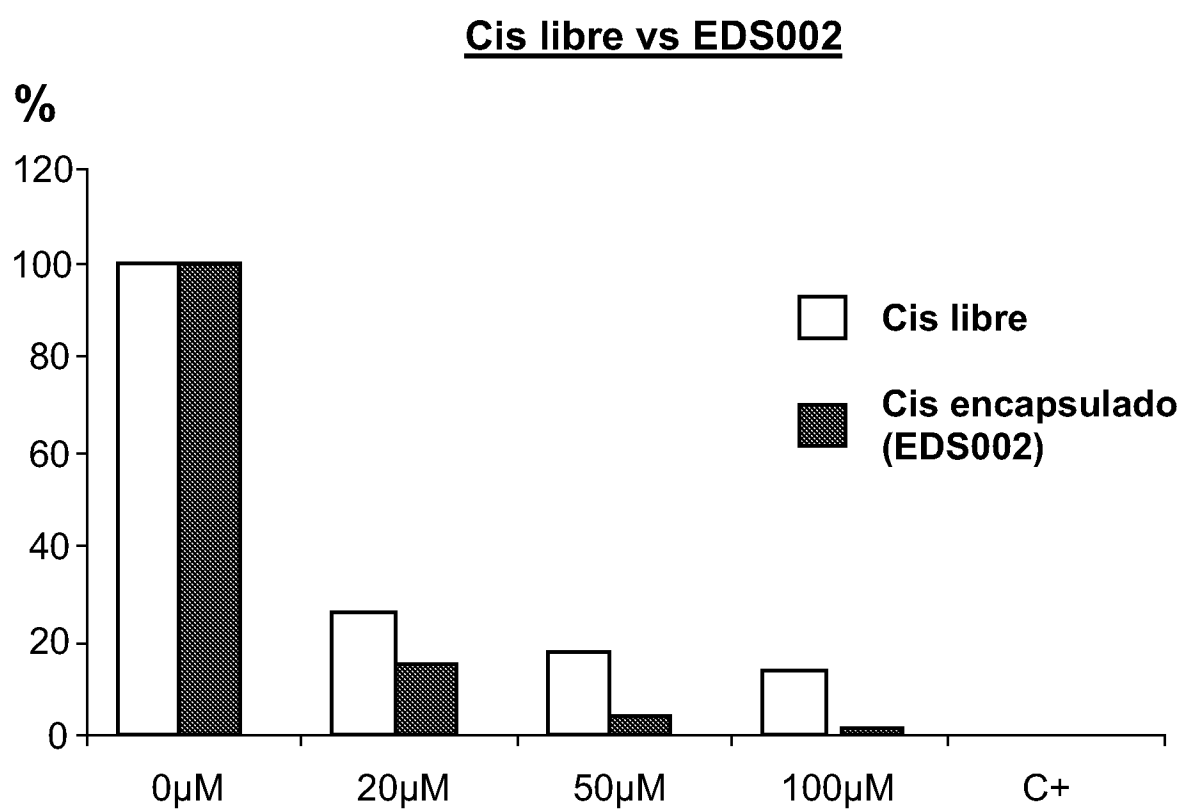


FIG. 17



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031971

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.12.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EKICI E. et al. "Temperature and magnetic field responsive hyaluronic acid particles with tunable physical and chemical properties" Applied Surface Science (16 octubre 2010 "on line") Vol. 257, N.º. 7, páginas 2669-2676; ISSN 0169-4332; DOI 10.1016/j.apsusc.2010.10040; todo el documento.	1,2,6,7,14,15,17
Y	BROWN S.D. et al. "Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin" Journal of the American Chemical Society (12 marzo 2010) Vol. 132, N.º. 13, páginas 4678-4684; ISSN 0002-7863; DOI 10.1021/ja9078117a; todo el documento.	1-11,14-17
Y	LEE H. et al. "Synthesis, characterization, and in vivo diagnostic applications of hyaluronic acid immobilized gold nanopores" Biomaterials (25 septiembre 2008) Vol. 29, N.º. 35, páginas 4709-4718; ISSN 0142-9612; DOI 10.1016/j.biomaterials.2008.08.038; todo el documento.	1-11,14-17
A	WO 2010069941 A1 (FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT CATALÀ DE NANOTECNOLOGÍA; INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS; UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA; UNIVERSITAT DE VALÈNCIA; FUNDACIÓ INSTITUT DE RECERCA DE L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU) 24.06.2010, todo el documento.	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.11.2012

Examinador
M. Á. García Coca

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K47/48 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P, B82Y

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.11.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3-5, 8-13 y 16	SI
	Reivindicaciones 1, 2, 6, 7, 14, 15 y 17	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 12 y 13	SI
	Reivindicaciones 1-11 y 14-17	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EKICI E. et al. "Temperature and magnetic field responsive hyaluronic acid particles with tunable physical and chemical properties" Applied Surface Science (16 octubre 2010 on line) Vol. 257, N°. 7, páginas 2669-2676; ISSN 0169-4332; DOI 10.1016/j.apsusc.2010.10040.	16.10.2010
D02	BROWN S.D. et al. "Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin" Journal of the American Chemical Society (12 marzo 2010) Vol. 132, N°. 13, páginas 4678-4684; ISSN 0002-7863; DOI 10.1021/ja9078117a.	12.03.2010
D03	LEE H. et al. "Synthesis, characterization, and in vivo diagnostic applications of hyaluronic acid immobilized gold nanoprobe" Biomaterials (25 septiembre 2008) Vol. 29, N°. 35, páginas 4709-4718; ISSN 0142-9612; DOI 10.1016/j.biomaterials.2008.08.038.	25.09.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, según se recoge en las reivindicaciones 1-17, es un sistema de liberación selectiva y controlada de un agente terapéutico, formado por un vehículo que comprende una nanopartícula metálica (de oro) con un recubrimiento de ácido hialurónico (unido a la nanopartícula a través de un ligando) y un agente terapéutico (reiv. 1-13). Es también objeto de la invención una composición farmacéutica que comprende el sistema de liberación de la invención para su uso en un tratamiento médico (tratamiento del cáncer) o de prevención (reiv. 14-16). Por último, es también objeto de la invención el uso del vehículo para la obtención del sistema de liberación controlada de la invención (reiv. 17)

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes)

El documento D01 divulga un sistema de liberación guiada de fármacos, genes o proteínas, formado por una nanopartícula de hierro y un recubrimiento de ácido hialurónico al que se le ha unido cisteamina para crear grupos SH y así poderse unir a la nanopartícula (ver apartados 2.4 y 2.6 y fig. 1). En este documento, para unir el fármaco (en este caso el antibiótico sulfametoxazol) a la nanopartícula, se hace de forma que éste queda encapsulado en el recubrimiento de ácido hialurónico (ver apartado 2.8). El tamaño medio de las partículas formadas varía de unos pocos micrómetros a decenas de nanómetros.

Por lo tanto, las características de las reivindicaciones 1, 2, 6, 7, 14, 15 y 17 ya son conocidas del documento D01, donde han sido divulgadas, en consecuencia, el objeto de la invención tal y como se recoge en dichas reivindicaciones, no es nuevo a la vista del estado de la técnica conocido en el sentido del art. 6.1 de la Ley 11/1986 y carece de actividad inventiva en el sentido del art. 8.1 de la Ley 11/1986.

Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D02 es el más cercano del estado de la técnica. En este documento se divulgan nanopartículas de oro funcionalizadas con una monocapa de PEG tiolado y con grupos carboxilato, al que se le añade el componente activo del agente anticancerígeno oxaliplatino. En este documento también se divulga la utilidad de estos sistemas de liberación de fármacos para el tratamiento del cáncer (ver abstract, introduction y página 4680 columna 1 párrafos 2-4).

La diferencia entre el documento D02 y el objeto de la invención, radica en el recubrimiento de la nanopartícula de oro. En el caso del documento D02, el recubrimiento es de PEG tiolado, mientras que en el sistema de liberación de la invención la nanopartícula de oro se une a ácido hialurónico a través de un ligando (cisteamina). Sin embargo, esto ya se encuentra divulgado en el documento D03.

El documento D03 divulga nanopartículas de oro con oligómeros de ácido hialurónico derivatizados con cisteamina y marcados con fluorescencia. En este documento se divulga la utilidad de estos sistemas no solo para unirles agentes de diagnóstico (en este caso compuestos con fluorescencia), sino también para unirles compuestos terapéuticos (como agentes antitumorales), debido a su gran área superficial y la gran versatilidad funcional que presentan las nanopartículas inorgánicas (ver abstract, introduction, página 4710 columna 1 párrafos 3-5 y fig. 1a).

Por lo tanto, según lo divulgado en los documentos D02 y D03, resulta obvio para un experto en la materia utilizar un recubrimiento de ácido hialurónico en vez de PEG para obtener un sistema de liberación de un agente terapéutico a partir de nanopartículas de oro.

En consecuencia, la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-11 y 14-17, de la solicitud, carece de actividad inventiva en el sentido del art. 8.1 de la Ley 11/1986.