

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 882**

51 Int. Cl.:

H01F 1/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
B82Y 15/00 (2011.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
B82Y 40/00 (2011.01)
A61K 49/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2013** **PCT/EP2013/063456**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014** **WO14001424**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2013** **E 13734371 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018** **EP 2866841**

54 Título: **Preparaciones de nanopartículas estables al calor y métodos asociados**

30 Prioridad:

29.06.2012 US 201213538493

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
07.11.2018

73 Titular/es:

GENERAL ELECTRIC COMPANY (100.0%)
1 River Road
Schenectady, NY 12345, US

72 Inventor/es:

BALES, BRIAN, CHRISTOPHER;
GRIMMOND, BRIAN, JAMES;
MEYER, DANIEL, EUGENE;
HAY, BRUCE, ALLEN y
LUTTRELL, MICHAEL, TODD

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 688 882 T3

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

DESCRIPCIÓN

Preparaciones de nanopartículas estables al calor y métodos asociados

Campo.

5 Esta invención se refiere en general a métodos para estabilizar una preparación de nanopartículas. Dichas preparaciones de nanopartículas son útiles para una variedad de aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

Antecedentes.

10 Las nanopartículas, es decir, partículas cuyos diámetros se miden apropiadamente en nanómetros, se han considerado para una amplia variedad de usos finales. Las nanopartículas con propiedades de formación de imagen adecuadas se basan típicamente en óxidos de metales de transición y se utilizan como agentes de contraste para la obtención de imágenes por resonancia magnética y/o rayos X. Las nanopartículas de óxido de hierro se usan en diversas aplicaciones terapéuticas, como la terapia de reemplazo de hierro, la formación de imágenes de partículas magnéticas (MPI), la selección de fármacos o la administración de genes. Las preparaciones que contienen composiciones de nanopartículas para ser utilizadas para aplicaciones *in vivo* en individuos humanos se requieren típicamente para purificarse y esterilizarse para evitar contaminación biológica, y a menudo se desea que muestren una estabilidad de suspensión firme en medios acuosos isotónicos.

15 Existen varios métodos para la esterilización de nanopartículas, que incluyen irradiación UV, tratamiento con óxido de etileno, tratamiento con formaldehído, filtración estéril, irradiación gamma y esterilización en autoclave. La esterilización en autoclave para agentes de contraste inyectables se considera una de las técnicas de esterilización más confiables y económicas.

20 Las composiciones de nanopartículas en suspensión acuosa a menudo están sometidas a aglomeración y precipitación durante el uso de técnicas de esterilización por calor, tales como autoclave. Esto se ve en el método descrito en la patente WO 2012/080290 A1 que incluye purificar una composición para formar una composición purificada, donde la composición purificada comprende al menos una nanopartícula (por ejemplo, nanopartícula SPIO) dispuesta en un fluido portador (por ejemplo, hexano), la nanopartícula que comprende un núcleo y una cubierta unida al núcleo, la cubierta comprende una especie ligando (por ejemplo, PEG2000 monofosfato) y esterilizar la preparación. Se han realizado esfuerzos para modificar las propiedades superficiales de tales nanopartículas para mejorar la estabilidad de las suspensiones acuosas de tales nanopartículas mediante la adición de diversos modificadores de superficie. El uso de un modificador de punto de turbidez para alterar la temperatura a la que se produce la agregación de nanopartículas, que permite la esterilización en autoclave, es un enfoque alternativo. Sin embargo, en algunos casos los modificadores del punto de turbidez son moléculas cargadas y son diferentes a las moléculas que constituyen la cubierta de las nanopartículas, y eso introduce un riesgo de modificación de la química superficial de la cubierta así como de la composición de las nanopartículas.

30 Los métodos para estabilizar una composición de nanopartículas a temperaturas elevadas durante esterilización en autoclave sin alterar la química de la superficie de las nanopartículas son altamente deseables. Una preparación de la composición de nanopartículas que incluye estabilidad mejorada, esterilidad, seguridad mejorada y resistencia a la agregación durante la esterilización por calor, es ventajosa para diversas aplicaciones.

Breve descripción.

40 Una o más realizaciones de un método comprenden purificar una composición para formar una composición purificada, en la que la composición purificada comprende al menos una nanopartícula dispuesta en un fluido portador, la nanopartícula que comprende un núcleo y una cubierta unida al núcleo, la cubierta comprende una especie ligando, en la que dicha especie ligando comprende un fosfato, un fosfonato o una combinación de los mismos y un grupo funcional poli (etilenglicol) (PEG) y en el que dicha purificación elimina especies ligando no unidas al núcleo, añadiendo una cantidad de la especie ligando a la composición purificada para formar una preparación, en la que al menos una parte de la cantidad añadida de la especie ligando permanece desunida al núcleo, y esterilizar de la preparación.

Breve descripción de los dibujos.

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se comprenderán mejor cuando se lea la siguiente descripción detallada con referencia a los dibujos adjuntos en los que caracteres similares representan partes similares a lo largo de los dibujos, en los que:

50 La figura 1 es un diagrama de flujo que representa un método ejemplar para preparar una preparación de nanopartículas estabilizadas, según una realización de la presente invención.

La figura 2 es un diagrama de flujo esquemático que representa un método ejemplar para preparar una preparación de nanopartículas estabilizadas, que incluye configuraciones de la vista en sección transversal idealizada de las nanopartículas de núcleo y cubierta, según una realización de la presente invención.

Descripción detallada.

En la siguiente especificación y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos, que se definirán con los siguientes significados.

5 Las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

El lenguaje aproximativo, tal como se usa en la presente memoria a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se puede aplicar para modificar cualquier representación cuantitativa que podría variar permisiblemente sin producir un cambio en la función básica con la que está relacionada. En consecuencia, un valor modificado por un término o términos, como "aproximadamente", no debe limitarse al valor preciso especificado. En algunos casos, el lenguaje aproximativo puede corresponder a la precisión de un instrumento para medir el valor.

10 Las realizaciones de la presente invención comprenden un método que comprende purificar una composición para formar una composición purificada, en el que la composición purificada comprende al menos una nanopartícula dispuesta en un fluido portador, comprendiendo la nanopartícula un núcleo y una carcasa unida al núcleo, comprendiendo la cubierta un especie ligando que comprende un fosfato, un fosfonato o una combinación de los mismos y un grupo funcional de poli (etilenglicol) (PEG) y en el que dicha purificación elimina especies ligando no unidas al núcleo. La purificación sigue añadiendo una cantidad de la especie ligando a la composición purificada para formar una preparación, en la que al menos una parte de la cantidad añadida de la especie ligando permanece desunida al núcleo. La preparación luego se somete a esterilización.

20 Más específicamente, en una o más realizaciones, un método comprende proporcionar al menos una nanopartícula que comprende al menos un núcleo y una cubierta y la cubierta comprende una especie ligando unida al núcleo. La composición de nanopartículas se purifica para formar una composición de nanopartículas purificada, y se forma una preparación que usa la composición de nanopartículas purificada añadiendo una cantidad de la especie ligando, cuya adición puede ayudar a estabilizar la preparación durante la esterilización en autoclave a alta temperatura. La purificación se realiza para eliminar especies extrañas indeseables presentes en la composición que incluyen, por ejemplo, material de partida en exceso o cualquier impureza. La purificación elimina incidentalmente cualquier especie ligando en exceso, es decir, especies ligando no unidas a los núcleos de nanopartículas, presentes en la composición de nanopartículas. En un ejemplo, la purificación de nanopartículas puede emplear filtración basada en la separación por peso molecular, en el que el tamaño de poro de la membrana de filtro limita el paso de las moléculas de un peso molecular particular a través de los poros. En otro ejemplo, la purificación de nanopartículas puede emplear lavado por centrifugación seguido de resuspensión en un fluido portador. Debido a la diferencia de tamaño de las especies ligando y la composición de nanopartículas (núcleo-corteza), la purificación facilita la eliminación del exceso de especies ligando de la composición de nanopartículas. Se añade un exceso de la especie ligando a una composición de nanopartículas purificada para formar una preparación seguida de esterilización. La esterilización de la preparación produce una preparación esterilizada.

35 Como se observa, la preparación comprende una composición de nanopartículas purificada. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas comprende al menos un núcleo y una cubierta. La cubierta comprende una especie ligando, en donde la especie ligando está unida al núcleo. Una especie ligando que está unida al núcleo se puede denominar aquí "especie ligando unida".

40 En una realización, la composición de nanopartículas comprende una estructura núcleo-cubierta, en la que el núcleo comprende un metal de transición, tal como un núcleo que comprende un óxido de metal de transición. Ejemplos específicos incluyen óxidos de tungsteno, tántalo, hafnio, zirconio, zinc, molibdeno, plata, hierro, manganeso, cobre, cobalto, níquel o combinaciones de dos o más de los óxidos de metales de transición anteriores. En una realización, el núcleo comprende un óxido de hierro súper paramagnético. En una o más realizaciones, el contenido de metal de la pluralidad de nanopartículas en la preparación está en el intervalo de 0,5 a 300 mg/ml. La estructura y composición del núcleo se describe con mayor detalle más adelante, más específicamente con referencia a la figura 2.

45 La cubierta de nanopartículas comprende una o más especies ligando, en donde la especie ligando comprende un fosfato, un fosfonato o una combinación de los mismos. El fosfato puede comprender un monofosfato, un bis (fosfato), un polifosfato o una combinación de los mismos. El fosfonato puede comprender un alfa-hidroxifosfonato, un mono-fosfonato, un bis-fosfonato, un polifosfonato o una combinación de los mismos. La especie ligando comprende además un grupo funcional poli (etilenglicol) (PEG). En algunas realizaciones, la cubierta comprende fosfatos funcionalizados con poli (etilenglicol) (PEG), monofosfatos funcionalizados con PEG, α -hidroxifosfonatos funcionalizados con PEG, bis (fosfatos) funcionalizados con PEG o combinaciones de los mismos. PEG es un polímero hidrófilo, y la cubierta hecha de especies ligando funcionalizadas con PEG mejora en gran medida la hidratación de la superficie, mejorando así la solubilidad y la compatibilidad in vivo de las partículas. La estructura y composición de la carcasa se describe con mayor detalle más adelante, más específicamente con referencia a la figura 2.

El método incluye añadir una cantidad de especies ligando a la composición purificada para formar una preparación que incluye un exceso de especies ligando no unidos al núcleo. La especie ligando añadida a la composición de nanopartículas purificada para preparar la preparación es estructuralmente idéntica a la especie ligando presente en la cubierta que está unida al núcleo de la nanopartícula. Como se indicó, el término "al menos una parte de la cantidad añadida de la especie ligando permanece desunida al núcleo" se usa indistintamente aquí como "especie ligando libre" o "especie ligando libre en exceso". Las especies ligando libres también son estructuralmente idénticas a las especies ligando unidas al núcleo de nanopartículas.

A temperatura elevada, la especie ligando unida se puede disociar del núcleo, lo que aumenta la probabilidad de agregación de las nanopartículas. La agregación de las nanopartículas se puede reducir en presencia de la especie ligando libre en la preparación. Sin estar limitados por la teoría, se sugiere que la especie ligando disociada del núcleo se puede reemplazar por la especie ligando libre, en donde el mecanismo se denomina aquí "intercambio de ligando". La presencia de especies ligando libres en la preparación mantiene la integridad de la estructura núcleo-cubierta de las nanopartículas, incluso a temperatura elevada.

En una o más realizaciones, la especie ligando libre presente en la preparación puede reemplazar a la especie ligando disociado del núcleo, y como las especies ligando libres y unidas son estructuralmente idénticas, la química de superficie de las nanopartículas permanece sin cambios. En una o más realizaciones, la especie ligando libre comprende monofosfatos funcionalizados con poli (etilenglicol) (PEG), alfa-hidroxifosfonatos funcionalizados con PEG, bis (fosfatos) funcionalizados con PEG o combinaciones de los mismos. En un ejemplo, si la especie ligando unido de una composición de nanopartículas es alfa-hidroxifosfonato funcionalizado con PEG, la especie ligando libre presente en la preparación también es alfa-hidroxifosfonato funcionalizado con PEG, que mantiene las propiedades superficiales de la nanopartícula durante la esterilización. La concentración de la especie ligando libre cambia con un cambio en la concentración de las nanopartículas en la preparación. En una o más realizaciones, la cantidad de la especie ligando libre añadida a la preparación está en un intervalo de aproximadamente 0,005 a 2 moles de ligando con relación a los moles de metal presentes en el núcleo de nanopartículas.

Como se observa, la preparación comprende además un fluido portador. En una o más realizaciones, el fluido portador comprende agua, etanol o combinaciones de los mismos. La estructura núcleo-cubierta de la nanopartícula permanece estabilizada, es decir, suspendida sin agregación indebida en el fluido portador. En una o más realizaciones, la adición de compuestos adicionales al fluido portador puede aumentar la fuerza iónica de la preparación de nanopartículas. En una o más realizaciones, los compuestos adicionales comprenden sacáridos tales como manitol, dextrosa, sacarosa, lactosa, sorbitol, xilitol y maltitol; alcoholes tales como propilenglicol; polímeros sintéticos tales como PEG no modificados y polivinilpirrolidona; tensioactivos tales como Tweens, Cremaphors y Labasols; y cualesquiera sales fisiológicamente compatibles (por ejemplo, cloruro de sodio, bromuro de sodio, sulfato de sodio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de potasio, bromuro de potasio, sulfato de potasio, acetato de potasio, bicarbonato de potasio) o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el fluido portador se puede usar para preparar la suspensión de nanopartículas. En un ejemplo, se usa etanol como un fluido portador, en el que el etanol se puede evaporar en la última etapa de preparar la preparación para formar una suspensión acuosa de nanopartículas. En una o más realizaciones, el fluido portador se puede usar como un diluyente. El fluido portador también se puede usar para optimizar o modificar la concentración de las nanopartículas o especies ligando en exceso en la preparación. En algunas realizaciones, cuando la preparación se usa como un agente de contraste, el fluido portador se usa en un medio inyectable que comprende la preparación de nanopartículas. En una o más realizaciones, el fluido portador puede funcionar como un excipiente farmacéutico. Cuando la preparación se usa como un portador de fármaco farmacéutico, el fluido se puede usar como un medio para el portador de fármaco.

En algunas realizaciones, el método comprende además añadir una cantidad de fluido al fluido portador. La cantidad de fluido se agrega a la composición para ajustar la concentración del metal dentro de un intervalo especificado. La cantidad agregada de fluido puede comprender etanol, agua o una combinación de los mismos. En algunas otras realizaciones, el método comprende además añadir una cantidad de excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como tampones, azúcares, sales o combinación de dos o más excipientes. Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables comprenden cloruro de sodio, bromuro de sodio, sulfato de sodio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de potasio, bromuro de potasio, sulfato de potasio, acetato de potasio, bicarbonato de potasio. Para algunos otros ejemplos, los azúcares farmacéuticamente aceptables pueden comprender manitol, dextrosa, sacarosa, lactosa, sorbitol, xilitol y maltitol.

La preparación se puede esterilizar mediante esterilización por calor, en la que la esterilización con calor se puede clasificar como esterilización por calor seco y esterilización por calor húmedo. La preparación se puede esterilizar por calor mediante autoclave.

La preparación se puede esterilizar en autoclave a alta temperatura. La esterilización en autoclave se puede realizar según las normas para los métodos de esterilización en autoclave estándar. El término "temperatura alta" o "temperatura elevada" se puede referir aquí como una temperatura que es adecuada para el tratamiento en autoclave, tal como más de 100°C. En la esterilización por calor, la esterilización depende de la temperatura de incubación y del tiempo de incubación. Las bacterias, virus, hongos o esporas se pueden destruir mediante

autoclave típico a 134°C durante al menos 3 minutos o 121°C durante al menos 15 minutos. En una o más realizaciones de la esterilización con vapor o calor húmedo, la preparación de nanopartículas se esteriliza a una temperatura de aproximadamente 121°C durante un período de tiempo de al menos aproximadamente 15 minutos. En algunas realizaciones, el estado de 121°C durante un período de tiempo de aproximadamente 15 minutos se logra usando vapor a una presión de 1,02 atm (15 libras por pulgada cuadrada (psi)) por encima de la presión atmosférica, en altitudes cercanas al nivel del mar. La esterilización por calor seco también se puede realizar, aunque las temperaturas utilizadas para la esterilización por calor seco son típicamente 160°C durante 1 a 2 horas. En una o más realizaciones del método, la preparación se esteriliza en autoclave. En algunas realizaciones, para autoclave, la temperatura se mantiene a 121°C durante 15 minutos. En algunas otras realizaciones, la preparación se esteriliza a una temperatura de aproximadamente 256°C durante al menos 5 minutos.

A diferencia de otros procesos de esterilización por calor en los que las nanopartículas forman típicamente agregados, las nanopartículas son resistentes a la agregación durante la esterilización por calor en realizaciones de la presente invención. En una o más realizaciones, el método puede evitar la agregación de las nanopartículas debido al intercambio de una o más de las especies ligando libres en exceso con la una o más especies ligando unidas al núcleo durante la esterilización. Las especies ligando forman una cubierta alrededor del núcleo de las nanopartículas para estabilizar el núcleo.

Como se observa, el método comprende proporcionar una composición que comprende al menos una nanopartícula que comprende un núcleo y una cubierta unida al núcleo. La composición se purifica luego para formar una composición purificada que comprende al menos una nanopartícula dispuesta en un fluido portador. También se agrega una cantidad de la especie ligando a la composición purificada para formar una preparación seguida por la esterilización de la preparación. Una realización ejemplar del método que proporciona una preparación estabilizada de nanopartículas se describe con mayor detalle con referencia a la figura 1.

Particularmente, la figura 1 ilustra un diagrama de flujo que representa un método ejemplar para preparar preparaciones de nanopartículas estabilizadas que son estables a alta temperatura. Una pluralidad de nanopartículas 8 núcleo-cubierta se forman combinando al menos un núcleo y una cubierta. En general, el método para preparar una composición de nanopartículas comprende poner en contacto un núcleo de óxido de metal nanoparticulado con una composición de cubierta de la presente invención, donde la cubierta comprende una especie ligando que comprende un fosfato o fosfonato orgánico y uno o más grupos hidrófilos. Típicamente, el contacto se lleva a cabo en una mezcla que comprende al menos un disolvente orgánico y agua. La purificación de nanopartículas genera nanopartículas 10 núcleo-cubierta purificadas que eliminan cualquier especie extraña presente en los precursores de caparazón central, cualquier especie ligando en exceso después de intercambio de especies ligando para formar nanopartículas núcleo-cubierta u otros materiales no específicamente unidos a las partículas. En uno o más ejemplos, las nanopartículas se purifican por filtración en base al principio de corte del peso molecular, seguido del lavado por centrifugación y posterior resuspensión de las nanopartículas purificadas en un fluido portador. Se añade un exceso de especies ligando del mismo material de cubierta y un fluido portador a las nanopartículas purificadas para formar una preparación de nanopartículas, 12. La preparación 12 se somete a continuación, por ejemplo, a esterilización por calor.

En algunas realizaciones del método, la preparación estabilizada puede tener un equilibrio entre la especie ligando unida al núcleo de nanopartícula y la especie ligando libre. A temperatura ambiente, la composición de las nanopartículas puede estar en equilibrio, de modo que la gran mayoría de las especies ligando unidas (moléculas de cubierta) interactúan con el núcleo de nanopartículas, proporcionando una estructura núcleo/cubierta bien recubierta y evitando la agregación de nanopartículas.

Como se observa, en algunas realizaciones durante la esterilización a temperatura más alta, la especie ligando unida se disocia del núcleo, lo que puede desestabilizar la estructura núcleo-cubierta de la nanopartícula e incrementar la probabilidad de agregación. La especie ligando unida puede estar en un estado de equilibrio con las moléculas de agua de la suspensión acuosa de las nanopartículas. La velocidad esperada de intercambio de especies ligando con moléculas de agua o con otras especies ligando puede ser más rápida a mayor temperatura. En base a una estimación teórica, la especie ligando unida se puede disociar del núcleo a una velocidad más rápida a temperatura elevada y las moléculas de agua pueden sustituir a la especie ligando disociado en ausencia del exceso de especies ligando libres. Las nanopartículas con una cobertura de cubierta insuficiente pueden formar agregados. En base a otra suposición teórica, la adición de especies ligando en exceso a la preparación puede ajustar el equilibrio de tal manera que la especie ligando unida al núcleo mantenga la integridad de la estructura núcleo-cubierta a temperaturas elevadas. En una suposición, la adición de la especie ligando como especie ligando libre a la composición purificada de nanopartículas de núcleo y cubierta durante la esterilización en autoclave (típicamente 121°C) da como resultado un mayor aumento de la proporción entre especies ligando no unidas y especies ligando unidas y ayuda a asegurar que la especie ligando unida al núcleo mantenga la integridad de la estructura núcleo-cubierta a temperaturas elevadas.

Con referencia a la figura 2, un método ejemplar ilustra la formación de preparaciones de nanopartículas estabilizadas durante la esterilización en autoclave, en el que las vistas en sección transversal idealizadas de las nanopartículas que comprenden la estructura núcleo-cubierta se representan en la presente memoria. La figura 2

- ilustra en detalle una representación esquemática de una serie de etapas empleadas en un método ejemplar, en el que la pluralidad de nanopartículas núcleo-cubierta 8 se forman combinando al menos un núcleo 6 y una cubierta 4. La cubierta 4 comprende una especie ligando 5 unida al núcleo 6. La nanopartícula 8 comprende un exceso de especies ligando 9 y otras impurezas 2 que se eliminan por purificación, dando como resultado la formación de una composición de nanopartículas purificada 10. La composición de nanopartículas comprende al menos una nanopartícula dispuesta en un fluido portador. Después de la purificación, las nanopartículas se pueden someter a esterilización en autoclave con o sin la adición de una cantidad de especies ligando que son las mismas que el material de la cubierta. Si la composición 10 de nanopartículas purificadas se somete a esterilización en autoclave en ausencia de la cantidad añadida de especies ligando, se puede producir la agregación de las nanopartículas 16.
- Otra ruta ilustra una cantidad de especies ligando 18 añadidas a la composición purificada 10 para formar una preparación de nanopartículas 12, en donde la cantidad añadida de la especie ligando es estructuralmente idéntica a la especie ligando del material de cubierta. La preparación 12 se somete luego a esterilización en autoclave para formar una preparación 14 de nanopartículas estabilizadas, en donde la preparación 14 es resistente a la agregación a una temperatura más alta durante la esterilización en autoclave.
- Las nanopartículas núcleo-cubierta se pueden hacer con procedimientos estándar conocidos en la técnica. La suspensión de nanopartículas núcleo-cubierta se lava para eliminar el exceso de especies ligando u otras impurezas no específicamente unidas a las nanopartículas, seguido por la concentración de la suspensión de nanopartículas para su uso posterior. La composición de nanopartículas purificadas se usa a continuación para preparar una preparación que comprende la composición de nanopartículas purificadas, especies ligando en exceso que son estructuralmente idénticas a las del material de cubierta, y un fluido portador. La preparación se somete a esterilización en autoclave. La sección experimental de la presente descripción proporciona orientación adicional sobre la preparación de la composición de nanopartículas.
- La composición de nanopartículas 10 puede tener una estructura núcleo-cubierta idealizada mostrada en la figura 2. La composición de nanopartículas 10 comprende un núcleo de óxido de metal nanoparticulado 6 y una cubierta 4 como se describe en la figura 2. La composición de nanopartículas se caracteriza por su capacidad para formar una suspensión acuosa que muestra una estabilidad significativa frente a la esterilización por calor a alta temperatura.
- Como se señaló, la preparación comprende nanopartículas constituyentes, la forma y el tamaño de las nanopartículas pueden variar dependiendo del método de fabricación de las nanopartículas. Las geometrías de sección transversal de las nanopartículas pueden ser diferentes, que incluyen, pero no se limitan a, una esfera, una varilla, un tubo, una escama, una fibra, una placa, un cable, un cubo y una patilla. En una realización, una geometría de sección transversal de la partícula puede ser una o más de forma circular, elipsoidal, triangular, rectangular, poligonal o irregular. Las nanopartículas no esféricas alternativamente pueden tener la forma de conos o varillas alargadas. En una realización, las nanopartículas tienen forma esférica.
- Típicamente, las nanopartículas tienen un tamaño medio de partícula de menos de 1 micrómetro. Como se usa en la presente memoria, el término "tamaño" se refiere al diámetro hidrodinámico (D_H) de las nanopartículas medido por dispersión de luz dinámica. La composición de nanopartículas puede tener un D_H en un intervalo de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 500 nm, de aproximadamente 10 nm a 25 nm, menos de 50 nm, menos de 10 nm o menos de 5 nm. Un tamaño de partícula pequeño puede ser ventajoso en, por ejemplo, facilitar el aclaramiento de la composición de nanopartículas de los riñones y otros órganos de un sujeto después de un procedimiento de formación de imágenes médicas que emplea la composición de nanopartículas como agente de contraste.
- La preparación puede comprender nanopartículas en diversas formas, tales como forma cristalina o forma amorfa. La preparación puede comprender nanopartículas como una mezcla de ambas formas cristalinas y amorfas.
- La preparación puede comprender una mezcla de nanopartículas, en donde la distribución de las nanopartículas es homogénea. Por ejemplo, la preparación puede comprender un único tipo de nanopartículas, en el que la forma y el tamaño de cada una de las nanopartículas son aproximadamente iguales. La preparación puede comprender una mezcla de nanopartículas, en donde la distribución de las nanopartículas no es homogénea. La preparación puede comprender una mezcla de diferentes tipos de nanopartículas, en donde el tamaño de las nanopartículas o la forma de las nanopartículas puede ser diferente.
- La dispersión relativamente fácil de las nanopartículas en la preparación puede evitar la aglomeración y/o agregación a temperatura ambiente. Un agregado puede incluir más de una nanopartícula en contacto físico entre sí, mientras que los aglomerados pueden incluir más de un agregado en contacto físico entre sí.
- El núcleo de óxido metálico de la composición de nanopartículas tiene dimensiones medidas apropiadamente en nanómetros. El núcleo de óxido de metal nanoparticulado se puede preparar como una suspensión en un diluyente y se puede medir el diámetro hidrodinámico de las partículas de núcleo de óxido de metal nanoparticulado en suspensión, por ejemplo mediante dispersión de luz dinámica. El tamaño del núcleo de óxido de metal nanoparticulado se mide mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). El diámetro del núcleo de óxido de metal nanoparticulado está en un intervalo de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm.

El núcleo de óxido de metal nanoparticulado puede tener un diámetro de aproximadamente 1 a 30 nm. El núcleo de óxido de metal nanoparticulado puede comprender un óxido de hierro súper paramagnético nanoparticulado (SPIO) y tiene un diámetro medido por TEM de menos de aproximadamente 25 nm.

- 5 El núcleo puede comprender un metal de transición o uno o más derivados de elementos de metal de transición, tales como óxidos, carburos, sulfuros, nitruros, fosfuros, boruros, haluros, seleniuros y telururos que contienen uno o más de estos elementos de metal de transición. El término "metal" significa la presencia de un material metálico o no metálico que contiene un elemento de metal de transición como constituyente.

- 10 Como se señaló anteriormente, el núcleo de óxido de metal nanoparticulado comprende un óxido de metal de transición que comprende óxidos de tungsteno, tantalio, hafnio, circonio, zinc, molibdeno, plata, hierro, manganeso, cobre, cobalto, níquel o combinaciones de dos o más de la transición anterior óxidos metálicos. El núcleo de óxido metálico puede comprender un metal de transición, que exhibe un comportamiento magnético, que incluye, por ejemplo, un comportamiento súper paramagnético. El núcleo de óxido metálico puede comprender un metal paramagnético, seleccionado del grupo que consiste en hierro, manganeso, cobre, cobalto, níquel o combinaciones de los mismos. El núcleo de óxido metálico puede comprender óxido de hierro súper paramagnético (SPIO), que puede estar dopado con otro metal. El núcleo de la nanopartícula puede comprender óxido de hierro súper paramagnético y la nanopartícula puede tener un tamaño de partícula de hasta aproximadamente 50 nm.

- 15 El núcleo de óxido de metal nanoparticulado puede consistir en un único óxido de metal de transición, por ejemplo óxido de tantalio, óxido de hafnio u óxido de hierro solo o dos o más óxidos de metal de transición. Por lo tanto, el núcleo de óxido de metal nanoparticulado puede comprender tanto óxido de tantalio como óxido de hafnio u óxido de tantalio y óxido de hierro. El núcleo de óxido de metal nanoparticulado puede comprender solo óxido de hierro.

- 20 Típicamente, el núcleo de óxido de metal nanoparticulado comprende al menos 30% en peso del componente de metal de transición del óxido de metal de transición. Un contenido de metal de transición relativamente alto en el núcleo de óxido de metal nanoparticulado puede proporcionar composiciones de nanopartículas con un grado relativamente mayor de radiopacidad por unidad de volumen, impartiendo así un rendimiento más eficaz como agente de contraste. El contenido de metal de transición relativamente alto proporciona potencialmente la utilidad de las partículas como agentes de contraste en aplicaciones de imágenes de rayos X, como la tomografía computarizada (TC). Ejemplos de elementos de metal de transición que pueden proporcionar esta propiedad incluyen tungsteno, tantalio, hafnio, circonio, molibdeno, plata y zinc.

- 25 La preparación de nanopartículas se puede usar como agente de contraste de resonancia magnética (MR). Para su uso como agentes de contraste de MR, la composición de nanopartículas comprende ventajosamente una especie de metal paramagnético, siendo de particular interés aquellas composiciones que comprenden una especie metálica superparamagnética. Los ejemplos de posibles materiales paramagnéticos y superparamagnéticos incluyen materiales que comprenden uno o más de hierro, manganeso, cobre, cobalto, níquel o zinc. Un grupo de materiales particularmente interesante son aquellos basados en óxido de hierro, especialmente SPIO, que típicamente comprenden de aproximadamente 65% a aproximadamente 75% de hierro en peso para el núcleo. En una realización, el núcleo de óxido de metal nanoparticulado comprende un compuesto de hierro que tiene la fórmula general $[\text{Fe}^{2+}\text{O}^3] \times [\text{Fe}^{2+}\text{O}^3 (\text{M}^{2+}\text{O})]_{1-x}$ donde $1 \geq x \geq 0$ y M^{2+} es un catión metálico tal como cationes de hierro, manganeso, níquel, cobalto, magnesio, cobre, zinc y una combinación de tales cationes. Los ejemplos de compuestos de hierro que caen dentro del alcance de esta fórmula general incluyen magnetita (Fe_3O_4) cuando el catión metálico (M^{2+}) es ion ferroso (Fe^{2+}) y $x = 0$; y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) cuando $x = 1$.

- 30 La composición de nanopartículas 10 comprende una cubierta 4 que cubre completamente el núcleo de óxido de metal nanoparticulado 6, como se muestra en la figura 2. La composición de nanopartículas puede comprender una cubierta que cubre sustancialmente el núcleo. El término "cubre sustancialmente" significa que un porcentaje de cobertura superficial del núcleo por la cubierta es mayor que aproximadamente 20% en comparación con un núcleo sin un caparazón sobre él. Como se usa en el presente documento, la expresión "cobertura de superficie porcentual" se refiere a la relación de la superficie del núcleo cubierta por la carcasa a la superficie del núcleo no cubierta por la carcasa. El porcentaje de cobertura de superficie de la nanopartícula puede ser mayor de aproximadamente 40%.

- 35 La cobertura 4 puede facilitar una solubilidad en agua mejorada, reducir la formación de agregados, evitar la oxidación de nanopartículas, mantener la uniformidad de la entidad núcleo-envoltura, y/o proporcionar biocompatibilidad para las composiciones de nanopartículas.

- 40 El espesor medio de la cubierta 4 está típicamente en un intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 nm. La cubierta puede tener un espesor medio inferior a 50 nm, menos de 8 nm, o menos de 5 nm.

- 45 Las composiciones de nanopartículas pueden comprender más de una cubierta de envoltura dispuesta en el núcleo de óxido de metal nanoparticulado. Mediante una selección juiciosa de condiciones de procesamiento, se puede preparar una especie de núcleo de óxido de metal nanoparticulado como una suspensión en un diluyente y posteriormente tratarla en un primer conjunto de condiciones con una o más sustancias estabilizadoras para generar una primera composición de nanopartículas que comprende una primera cubierta, y posteriormente la primera composición de nanopartículas se trata en un segundo conjunto de condiciones con una o más sustancias

estabilizadoras diferentes que generan una segunda composición de nanopartículas que comprende tanto la primera cubierta como la segunda cubierta.

Las composiciones de nanopartículas no pretenden sugerir una estequiometría 1:1 entre el núcleo de óxido de metal nanoparticulado y la cubierta que comprende especies ligando, sino más bien para identificar la composición de nanopartículas que comprende un núcleo de óxido de metal nanoparticulado y cubierta que comprende especies ligando. La especie ligando comprende al menos un resto estructural que comprende grupos fosfato o fosfonato orgánicos que comprenden uno o más grupos hidrófilos. Como se indicó, el fosfato orgánico o fosfonato que comprende uno o más grupos hidrófilos puede estar en una forma totalmente protonada, o en una forma ionizada. Típicamente, una pluralidad de fosfato orgánico o fosfonato que comprende uno o más grupos hidrófilos se puede asociar con la superficie de una partícula de núcleo de óxido de metal nanoparticulada dada. En algunas realizaciones, la especie ligando se une al núcleo de óxido de metal nanoparticulado a través de enlaces de hidrógeno. En algunas realizaciones, la especie ligando está unida al núcleo de óxido de metal nanoparticulado a través de al menos un enlace covalente. En otras realizaciones, la especie ligando puede estar unida al núcleo de óxido de metal nanoparticulado a través de enlaces iónicos.

Como se observa, las nanopartículas comprenden una especie ligando que comprende un fosfato o fosfonato orgánico y uno o más grupos hidrófilos. El grupo (o grupos) hidrófilos se selecciona de los restos de polietileno-éter. Los restos de polietileno-éter se definen como restos que comprenden unidades estructurales oxietileno $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ y/o unidades estructurales oxietileno sustituidas. Por conveniencia y debido a la estrecha asociación estructural con el término polietilenglicol (PEG), dichos restos se pueden denominar a veces grupos PEG, o restos PEG, y se caracterizan por un resto de peso molecular. De forma similar, las fracciones de polipropilenoéter se definen como restos que comprenden unidades estructurales oxipropileno $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ y/o unidades estructurales oxipropileno sustituidas. Por conveniencia, los restos de éter de polipropileno se pueden referir a veces en la presente memoria como grupos o restos de polipropilenglicol. De forma similar, las fracciones de polibutilenoéter se definen como restos que comprenden unidades estructurales de oxibutileno $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ y/o unidades estructurales de oxibutileno sustituidas. Por conveniencia, los restos de polibutileno éter a veces se denominan restos de poli-THF.

En algunas realizaciones, la cubierta comprende una especie ligando que comprende un grupo fosfato, alternativamente indicado aquí como monofosfato. En una o más realizaciones, el fosfato está unido al resto PEG, en donde el peso molecular del PEG puede ser 350, 440, 750, 2.000 o 5.000 daltons. Por consiguiente, las especies ligando se denominan aquí mPP350, en donde mPP350 representa monofosfato unido a PEG 350. Más específicamente, mPP350 se define como una molécula de PEG con un peso molecular ~350 g/m, con un grupo hidroxilo terminal metoxilado y el otro grupo hidroxilo terminal convertido en un monoéster de fosfato. De forma similar, mPP440, mPP750, mPP2000 o mPP5000 también se pueden usar para preparaciones de nanopartículas.

En realizaciones en las que la cubierta comprende una especie ligando que comprende al menos dos grupos fosfato, los dos grupos fosfato pueden ocupar posiciones que constituyen un 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; o 1,6 relación espacial entre sí. Una relación espacial de 1,2 de los al menos dos grupos fosfato incluye realizaciones que son 1,2-bisfosfatos; 2,3-bisfosfatos; 3,4-bisfosfatos; 4,5-bisfosfatos, 5,6-bisfosfatos, etc. Los expertos en la técnica comprenderán completamente la extensión de este principio a 1,3; 1,4; 1,5; y 1,6 relaciones espaciales de al menos dos grupos fosfato. Como se usa aquí, las composiciones de nanopartículas que comprenden dichos ligando, la designación "1,2-BPP350" se refiere a un resto estructural que comprende dos grupos fosfato configurados en una relación espacial 1,2 y un resto éter de polietileno que tiene un peso molecular de 350 daltons. De forma similar, la designación "1,2-BPP440" se refiere a una especie ligando que comprende dos grupos fosfato configurados en una relación espacial 1,2 y un resto de éter de polietileno que tiene un peso molecular de resto de 440 daltons.

En una o más realizaciones, la cubierta comprende una especie ligando, en la que la especie ligando comprende un mono fosfonato, bis fosfonato o α -hidroxifosfonato. En una realización, la cubierta de nanopartículas comprende un fosfonato y PEG como resto hidrofílico, lo que da como resultado una especie ligando que es un fosfonato funcionalizado con PEG. En algunas realizaciones, la cubierta de nanopartículas comprende α -hidroxifosfonato y un resto hidrofílico que está unido a través de un átomo de carbono que porta el grupo α -hidroxi. En una o más realizaciones, el α -hidroxifosfonato está unido al resto PEG, en donde el peso molecular PEG puede ser 350, 440, 750, 2.000, 5.000, 10.000 o 30.000 daltons. Por consiguiente, las especies ligando se denominan en la presente memoria como α -HmPP350, en donde α -HmPP350 representa α -hidroxifosfonato unido a PEG 350. Del mismo modo, α -HmPP440, α -HmPP750, α -HmPP2000, α -HmPP5000, α -HmPP10000 o α -HmPP30000 también puede usarse para preparaciones de nanopartículas. Nanopartículas consideradas para uso en tratamiento *in vivo* para sujetos humanos, el enlace entre el α -hidroxifosfonato y un resto hidrofílico puede ser un hidrato de carbono, que minimiza la probabilidad de cualquier interacción entre tales nanopartículas tratadas y tejido humano.

Como se observa, la especie ligando comprende uno o más grupos hidrófilos que comprenden restos de polietileno éter. Se ha encontrado que la efectividad de la especie ligando para estabilizar el núcleo de óxido de metal nanoparticulado (y la composición de nanopartículas como un todo) depende de su estructura. En diversas realizaciones, la eficacia de la especie ligando para estabilizar el núcleo de óxido de metal nanoparticulado depende del tamaño del resto hidrofílico que a veces se puede describir en términos del peso molecular del grupo hidrofílico.

En general, la estructura de la especie ligando se puede adaptar para que sea eficaz para estabilizar un núcleo de óxido de metal nanoparticulado particular, y el grupo hidrófilo presente en la especie ligando puede tener un peso molecular de grupo relativamente bajo (por ejemplo, menos de 100 gramos por "mol") o un peso molecular de grupo relativamente alto (por ejemplo, más de 10.000 gramos por "mol"). Como el grupo hidrofílico comprende uno o más restos de polietileno éter, el tamaño y los pesos moleculares de estos restos, en ocasiones denominados en la presente memoria como peso molecular del resto, contribuyen al peso molecular del grupo hidrófilo como un todo. En una realización, el grupo hidrófilo comprende un resto de éter de polietileno que tiene un peso molecular de resto en un intervalo de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 20.000 daltons. En una realización alternativa, el grupo hidrofílico comprende un resto de éter de polietileno que tiene un peso molecular de aproximadamente 2.000 daltons. En otra realización más, el grupo hidrófilo comprende un resto de éter de polietileno que tiene un peso molecular de fracción de menos de 20.000 daltons. Todavía en otra realización, el grupo hidrófilo comprende un resto de éter de polietileno que tiene un peso molecular de fracción de menos de 2.000 daltons. En otra realización más, el grupo hidrófilo comprende un resto de éter de polietileno que tiene un peso molecular de fracción de menos de 350 daltons. Como se usa en el presente documento, "daltons" y "gramos por mol" se pueden usar como términos intercambiables que se aplican al peso molecular del grupo hidrofílico o al peso molecular del resto de un resto de polietiléneter y variantes sustituidas de dicho resto, y expresa el peso en gramos de ese grupo o resto presente en un mol de la especie ligando que lo contiene.

En una o más realizaciones, la especie ligando de la composición de nanopartículas puede comprender, en ciertas realizaciones, un grupo hidrófilo que contiene grupos además de los enlaces éter (-O-) encontrados en restos de polialquilen éter. Así, una amplia variedad de grupos funcionales además de grupos éter pueden estar presentes en las especies ligando, por ejemplo, grupos éster, grupos amina, grupos amida, grupos carbamato, grupos urea, grupos carbonato, grupos tioéter, grupos selenoéter, grupos siloxano, grupos sulfinilo, grupos sulfonilo y combinaciones de dos o más de los grupos anteriores. En algunas realizaciones, dichos grupos funcionales pueden ser constituyentes del propio grupo hidrofílico o pueden constituir una parte de la especie ligando que no se identifica como el grupo hidrofílico. El uso final previsto de las composiciones de nanopartículas puede afectar la elección de tales grupos funcionales.

El uso final previsto de la composición de nanopartículas puede afectar la selección de los grupos hidrófilos usados en la especie ligando. Por ejemplo, cuando las composiciones de nanopartículas se van a usar in vivo, particularmente en sujetos humanos, puede ser deseable evitar grupos hidrófilos que puedan unirse fuertemente a componentes de tejidos tales como proteínas. Para el uso in vivo, los grupos hidrófilos que no tienen esencialmente una carga neta, tales como polialquilenéteres, son de particular interés. Además, para su uso en sujetos humanos, son particularmente deseables los grupos hidrófilos que permiten que la composición de nanopartículas se caracterice fácil y reproduciblemente para la evaluación de la seguridad. La composición de nanopartículas proporcionada por la presente invención típicamente tiene un potencial zeta en un intervalo de aproximadamente -40 mV y +40 mV.

Como se observa, la composición de nanopartículas comprende típicamente un núcleo de óxido de metal de transición y una cubierta compuesta por una especie ligando dispuesta en un fluido portador. En la composición de nanopartículas, la relación de la corteza al núcleo puede determinarse por análisis elemental. A partir del conocimiento de la composición química de las nanopartículas de óxido metálico y su tamaño medio antes del tratamiento con la especie ligando, se puede hacer un cálculo de la cantidad de la especie ligando por partícula de núcleo de óxido de metal nanoparticulado.

La composición de nanopartículas puede comprender un núcleo de óxido de hierro nanoparticulado y una cubierta que comprende una especie ligando, en la que la relación molar de la especie ligando respecto al hierro está en un intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,25.

Como se observa, las composiciones de nanopartículas se pueden usar como agentes de contraste para la formación de imágenes de diagnóstico. En una aplicación de este tipo, estas composiciones de nanopartículas se administran a un sujeto, en algunas realizaciones un sujeto mamífero, y luego el sujeto se somete posteriormente a formación de imágenes. Las composiciones de nanopartículas pueden ser particularmente útiles en la formación de imágenes de MR, aunque también pueden encontrar utilidad como agentes de contraste en la formación de imágenes de ultrasonidos o trazadores radiactivos. Además, las composiciones de nanopartículas pueden ser útiles en otras áreas tales como infusión de cultivo celular. Las nanopartículas pueden comprender uno o más agentes terapéuticos o agentes de diagnóstico. Las preparaciones esterilizadas se pueden usar como un agente de contraste, o para aplicaciones terapéuticas; los ejemplos incluyen imágenes de resonancia magnética (MRI), administración de fármacos, administración de genes, terapia de reemplazo u otros.

Se puede suministrar una composición de agente de diagnóstico al sitio de administración como una suspensión coloidal acuosa estable con la osmolaridad y pH adecuados, como una suspensión coloidal acuosa concentrada adecuada para la dilución antes de la administración a un sujeto. Se puede proporcionar una composición de agente de diagnóstico como un polvo, tal como el obtenido por liofilización, adecuado para reconstitución.

Una preparación esterilizada se puede usar como una composición de agente de diagnóstico adecuada para inyección en un sujeto mamífero. La composición de agente de diagnóstico comprende una preparación de

nanopartículas de la presente invención y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, el excipiente es un componente opcional de la composición de agente de diagnóstico. Los excipientes adecuados se ilustran, pero no se limitan a, uno o más de sales, disgregantes, aglutinantes, cargas y lubricantes. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser sustancialmente agua.

- 5 Las composiciones de agente de diagnóstico se pueden preparar poniendo en contacto una composición de nanopartículas preparada por la presente invención con un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Cuando se usan en imágenes de diagnóstico, particularmente de sujetos mamíferos y más particularmente de sujetos humanos, las composiciones de agentes de diagnóstico se administran típicamente como una suspensión en un portador farmacéuticamente aceptable que puede comprender (pero no se requiere que lo haga) uno o más excipientes. Si la administración va a ser mediante inyección, particularmente inyección parenteral, el portador es típicamente un medio acuoso que se ha vuelto isotónico mediante la adición de aproximadamente 150 mM de NaCl, 5% de dextrosa, manitol o combinaciones de los mismos. Típicamente también tiene un pH apropiado (fisiológico) de entre aproximadamente 7,3 y 7,4. La administración puede ser intravascular (IM), subcutánea (SQ) o más comúnmente intravenosa (IV). Sin embargo, la administración también puede ser a través de la implantación de un depósito que luego libera lentamente las nanopartículas en la sangre o el tejido del sujeto. Alternativamente, la administración puede ser por ingestión para obtener imágenes del tracto GI o por inhalación para obtener imágenes de los pulmones y las vías respiratorias.

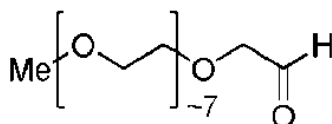
20 La administración a sujetos humanos, particularmente administración intravenosa, requiere que la composición del agente de diagnóstico pueda ser no tóxica en las cantidades usadas y libre de cualquier agente infeccioso tal como bacterias y virus y también libre de cualquier pirógeno. Por lo tanto, la composición de nanopartículas presente en la composición del agente de diagnóstico debe ser estable a los procedimientos de purificación necesarios y no sufrir degradación en su hidrofobicidad o cambio en el tamaño de las nanopartículas constituyentes.

Sección experimental.

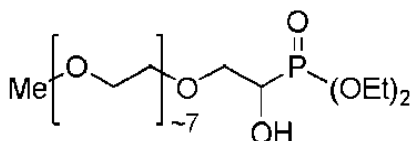
25 Las nanopartículas núcleo-cubierta se sintetizaron y purificaron usando los procedimientos conocidos en la técnica. Las especies ligando en exceso se sintetizaron para producir una preparación de la invención y se usaron en los siguientes ejemplos. La fabricación de tales especies ligando y nanopartículas de núcleo-cubierta se puede encontrar en la publicación de solicitud de patente nº EEUU 20110104072 A1 y en la solicitud de patente nº 12/968645. En la presente memoria se describe un método típico para sintetizar una especie ligando, tal como α -hidroxí PEG-350 mono (metil éter) fosfonato. Ejemplos de la síntesis de PEG350 con α -hidroxifosfonato, PEG5000 con α -hidroxifosfonato, PEG5000 con bis fosfonato y la síntesis de SPIO purificado recubierto con PEG5000 con α -hidroxifosfonato se describen en la presente memoria.

Ejemplo 1: síntesis de especies ligando en exceso, tales como PEG350 α hidroxifosfonato.

Síntesis de un conjugado de PEG-350.

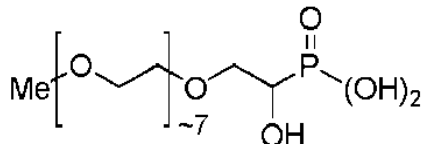


35 Síntesis de PEG-350 mono (metil éter) acetaldehído: a una disolución que contiene PEG-350 mono (metil éter) (3,438 g, 9,82 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (98 ml) se le añadió periodinano Dess-Martin (5,00 g, 11,79 mmol) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Durante la reacción se formó un precipitado blanco fino y se eliminó al final de la reacción por filtración a través de una almohadilla de Celite. El disolvente se eliminó del filtrado a vacío para dejar un sólido blanco suspendido en un aceite amarillo. El sólido se trituró con dietil éter y el sólido se eliminó por filtración a través de una almohadilla de Celite. La eliminación del disolvente del filtrado al vacío dejó el producto PEG-350 mono (metil éter) acetaldehído (3,42 g, 100%) como un aceite amarillo. ^1H RMN (CDCl_3) δ 9,73 (t, J = 4 Hz, 1H), 4,16 (d, J = 4 Hz, 2H), 3,65 (m, 24H), 3,38 (s, 3H) ppm. IR (puro) 2.873, 1.732, 1.455, 1.350, 1.109, 1.040, 948, 851, 749 cm^{-1} .



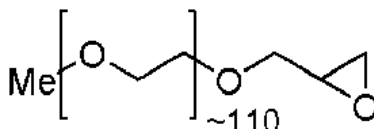
45 Síntesis de dietil- α -hidroxí PEG-350 mono (metil éter) fosfonato: A una disolución que contiene PEG-350 mono (metil éter) acetaldehído (3,71 g, 10,7 mmol) disuelto en tetrahidrofurano (53 ml) se añadió fosfito de dietilo (1,77 g, 12,8 mmol). La disolución se enfrió a 0°C , y 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (1,94 g, 12,8 mmol). Después de agitar a 0°C durante 10 minutos, la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 24 h adicionales. El disolvente se eliminó a vacío para dejar un aceite amarillo oscuro que se purificó por cromatografía en columna

(100% de CH_2Cl_2 a 15% de MeOH/ 85% de CH_2Cl_2) para dar 3,30 g (64%) del deseado dietil α -hidroxi PEG-350 mono (metil éter) fosfonato como un aceite amarillo. ^1H RMN (CDCl_3) δ 4,19 (m, 6H), 3,65 (m, 24H), 3,38 (s, 3H), 1,34 (m, 6H) ppm. ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 23,1 ppm. IR (puro) 3.343, 2.872, 1.725, 1.453, 1.248, 1.105, 965, 850, 791 cm^{-1} .

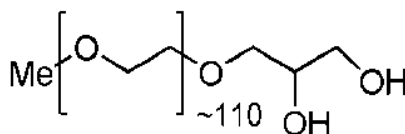


Síntesis de ácido α -hidroxi PEG-350 mono (metil éter) fosfónico: a una disolución que contiene dietil α -hidroxi PEG-350 mono (metil éter) fosfonato (3,61 g, 7,43 mmol) disuelto en cloruro de metileno (74 ml) se añadió bromuro de trimetilsililo (3,41 g, 22,3 mmol) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente se eliminó a vacío para dejar un aceite marrón. El aceite resultante se disolvió en acetona (74 ml) y agua (0,5 ml) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó a continuación al vacío para dejar el producto ácido α -hidroxi PEG-350 mono (metiléter) fosfónico deseado (2,66 g, 84%) como un aceite dorado. ^1H RMN (CDCl_3) δ 3,65 (m, 24H), 3,38 (s, 3H). ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 24,0 ppm. IR (puro) 3.460, 2.870, 1.727, 1.456, 1.351, 945, 849 cm^{-1} .

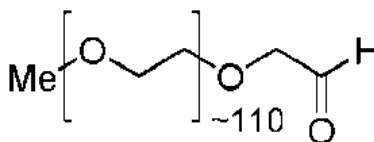
Ejemplo 2: Síntesis de especies de ligando en exceso, tales como PEG5000 alfa hidroxifosfonato.



Síntesis de mPEG5000-epóxido: se suspendió agua (4,32 ml) en epiclorohidrina (84,68 ml, 1,080 mol) y se añadió NaOH (43,20 g, 1,080 mmol) seguido de hidrocloreto de trietilamonio (1,18 g, 0,009 mol). La disolución se agitó y se calentó a 70°C, tiempo durante el cual se añadió PEG5000 mono (metil éter) (500 g, 0,100 mol) en porciones a medida que aumentaba la temperatura. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y luego se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió agua (500 ml) y el producto se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 1.000 ml). El CH_2Cl_2 se eliminó a vacío (no a sequedad, sino solo a un aceite espeso) y el aceite resultante se recristalizó en THF (400 ml)/hexanos (200 ml) (agregar THF, caliente y luego agregar hexanos, agitar hasta que desaparezca la nubosidad ~30 s) para dar 499,93 g (99% de la masa teórica) del producto deseado como un sólido blanco apagado: ^1H RMN (CDCl_3) δ 3,81 (m, 2 H), 3,64 (m, 422 H), 3,46 (m, 2 H), 3,38 (s, 3 H), 3,17 (m, 1 H), 2,79 (m, 1 H), 2,61 (m, 1 H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 71,97, 71,89, 70,53, 59,00, 50,76, 44,22.

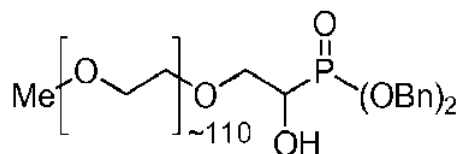


Síntesis de mPEG5000-diol: se disolvió mPEG5000-epóxido (499,93 g, 98,88 mmol) en H_2SO_4 0,5 M (2.000 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h (~ 30 minutos para disolver completamente el material y la reacción de 1 hora adicional). La reacción se extrajo luego con CH_2Cl_2 (2 x 1.000 ml). El CH_2Cl_2 se eliminó a vacío (no a sequedad, sino solo a un aceite espeso) y el aceite resultante se recristalizó en THF/hexanos (400 ml:200 ml) (agregar THF, caliente y luego agregar hexanos, agitar hasta que desaparezca la nubosidad ~ 30 s) para dar 411,88 g (82% de masa teórica) del producto deseado como un polvo blanco apagado: ^1H RMN (CDCl_3) δ 3,75 (m, 2 H), 3,57 (m, 422H), 3,39 (m, 2H), 3,31 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 72,88, 71,91, 70,55, 63,93, 59,02.

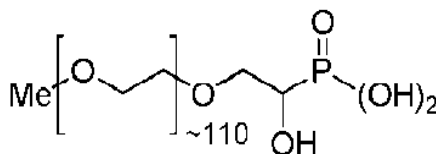


Síntesis de mPEG5000-aldehído: mPEG5000-diol (208 g, 40,99 mmol) se disolvió en agua (320 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante ~45 min. A esta disolución turbia se añadió una disolución previamente disuelta de NaIO_4 (10,7 g, 50 mmol) en agua (90 ml) a partes iguales durante ~ 30 minutos. La nubosidad se aclaró después de ~1,5 - 2 h después de la adición final del oxidante. La reacción después se agitó durante 16 h y se inactivó mediante la adición de propilenglicol (1,20 ml). La mezcla de reacción acuosa después se extrajo con CH_2Cl_2 (1 x 1.000 ml, 1 x 500 ml). Las capas orgánicas se combinaron y el CH_2Cl_2 se eliminó a vacío (no a sequedad, sino solo a un aceite espeso). El aceite dorado resultante se recristalizó en THF/hexanos (400 ml:200 ml) (se agrega THF, se calienta y luego se agregan hexanos, se agita hasta que la turbidez se aclara -30 s) para dar 183,77 g (89% de la masa

teórica) del producto deseado como un sólido blanco: ^1H RMN (CDCl_3) δ 9,66 (m, 1H), 4,10 (m, 2H), 3,75 (m, 2H), 3,58 (m, 422H), 3,39 (m, 2H), 3,31 (s, 3H). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 200,94, 71,90, 71,18, 70,54, 59,01, 53,56.

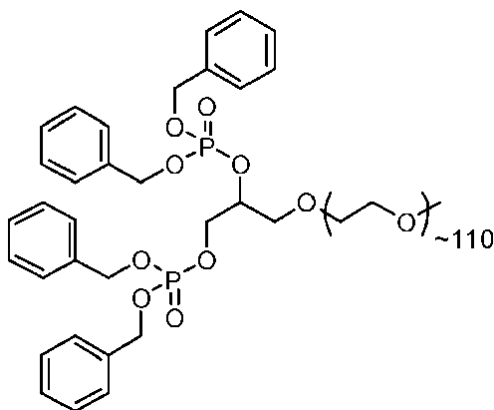


Síntesis de dibencil- α HmPP5000: mPEG5000-aldehído (181,453 g, 35,97 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (850 ml) y se añadió trietilamina (5,01 ml, 35,97 mmol) y se dejó en agitación durante ~30 min. A esto siguió una adición lenta de fosfito de dibencilo (9,43 g, 35,97 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 48 h, el disolvente se eliminó a vacío (no a sequedad, sino solo a un aceite espeso) y el aceite resultante se recrystalizó en THF/hexanos (350 ml:175 ml) (agregar THF, calentar y luego agregar hexanos, agitar hasta que la nubosidad desaparezca ~30 s) para dar 175,59 g (92% de la masa teórica) del producto deseado como un sólido blanco: ^1H NMR (CDCl_3) δ 7,34 (m, 10H), 5,10 (m, 4H), 3,79 (m, 1H), 3,75 (m, 2H), 3,64 (m, 460H), 3,53 (m, 4H), 3,37 (s, 3H). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 136,40, 136,27, 128,74, 128,60, 128,43, 127,99, 71,98, 71,17, 70,61, 68,67, 68,13, 64,85, 67,59, 59,08. ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 23,92.

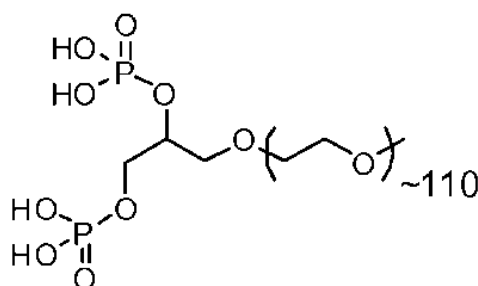


Síntesis de α HmPP5000: se suspendió dibencil- α HmPP5000 seco (122,80 g, 23,15 mmol) en etanol absoluto (500 ml) y se añadió lentamente agua (25 ml) y Pd al 10% sobre carbono (4,0 g). La reacción se agitó después en una atmósfera de H_2 (presión del balón) hasta que se completó la absorción. El Pd sobre carbono se eliminó mediante filtración a través de una almohadilla de Celite, y el disolvente se eliminó del filtrado a vacío (no a sequedad, sino solo a un aceite espeso). El aceite resultante se recrystalizó en THF/hexanos (300 ml:150 ml) para dar 109,7 g (94% de masa teórica) del producto deseado como un polvo blanco: ^1H NMR (CDCl_3) δ 3,81 (m, 4H), 3,64 (m, 366H), 3,47 (m, 2H), 3,38 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 72,00, 71,04, 70,54, 59,11 ppm. ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 22,85 ppm.

Ejemplo 4: Síntesis de PEG5k bis fosfato (BPP5000).



Síntesis de mPEG5000 - 1,2 - bis (bibencil fosfato): se disolvió dibencil N, N-diisopropilfosforamidita (16,34 g, 97,3 mmol) en CH_2Cl_2 (600 ml). Se añadió tetrazol (0,45 M en acetonitrilo, 47,3 mmol) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se añadió mPEG5000-diol (60,0 g, 11,8 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (100 ml) y la disolución resultante se agitó a 50°C durante 48 h. La reacción se enfrió luego a temperatura ambiente y se añadió hidroperóxido de t-butilo (4,26 g, 47,3 mmol) a la mezcla de reacción. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4,5 h y luego se lavó con una disolución al 10% (p/v) de sulfito sódico (200 ml). La capa acuosa resultante se extrajo luego con CH_2Cl_2 (500 ml). Las capas orgánicas se combinaron y el disolvente se eliminó a vacío para dar un sólido blanquecino que se purificó por cromatografía en columna (100% de CH_2Cl_2 a 20% de MeOH/80% de CH_2Cl_2) en gel de sílice para dar 47,47 g (72%) del producto deseado como un sólido blanco. ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,31 (m, 20H), 5,04 (m, 8H), 4,63 (m, 1H), 4,14 (m, 2H), 3,74 (m, 3H), 3,65 (m, 440H), 3,38 (s, 3H) ppm. ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 0,03, -0,75 ppm.



Síntesis de fosfato de PEG5k (BPP5000): se disolvió mPEG5000 -1,2-bis (fosfato de bibencilo) (46,46 g, 8,33 mmol) en etanol (300 ml). A continuación, se añadió Pd al 10% sobre carbono (2 g) y la suspensión resultante se agitó en H₂ (1 atm) durante 48 h. El catalizador se eliminó por filtración a través de una almohadilla de Celite y la eliminación del disolvente del filtrado dejó un aceite transparente. El aceite se cristalizó en THF/hexanos 2:1 (300 ml). Los cristales se recogieron por filtración a vacío y se lavaron con hexanos (2 x 50 ml) para dar 40,4 g (74%) del producto deseado como un sólido blanco. ¹H RMN (CDCl₃) δ 4,71 (m, 1H), 4,20 (m, 2H), 3,65 (m, 440H), 3,38 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃) δ 74,90, 71,70, 70,34, 65,86, 58,81 ppm. ³¹P NMR (CDCl₃) δ 1,18, 0,53 ppm.

Ejemplo 5: síntesis de nanopartículas de SPIO purificadas recubiertas con alfa-hidroxifosfonato de PEG5000 (aHmPP5000).

Se pesaron 9,177 g de especies ligando de aHmPP5000 en un matraz Erlenmeyer de 1 l que contenía una barra de agitación magnética. Se añadieron 8,955 ml de disolución de NaOH (0,2 M) junto con 104 ml de agua desionizada y EtOH absoluto (200 ml). El matraz se cubrió con un cristal de reloj y se agitó con agitación magnética y calentamiento suave hasta que se obtuvo una disolución transparente incolora. La disolución anterior se añadió al reactor con camisa de 2 l con agitador mecánico, agitador de anclaje de teflón, termopar, entrada de nitrógeno y burbujeador, y un condensador de reflujo. El matraz se enjuagó con EtOH absoluto (2 x 25 ml) y el enjuague se añadió al reactor. La disolución clara incolora se agitó a 100 rpm. Se añadieron 330,6 ml de disolución de núcleo de nanopartículas de óxido de hierro en alcohol bencílico (6,05 g de Fe/ml) a la mezcla de reacción a través de un cilindro graduado secado en horno, lavado con agua DI, lavado con agua a través del embudo de polvo. El cilindro graduado se enjuagó con EtOH absoluto (2 x 25 ml) y el enjuague se añadió al reactor. Se observó una disolución monofásica de color rojo oscuro. La velocidad de agitación se aumentó a 200 rpm y el reactor se tapó y se calentó en nitrógeno con agitación durante 18 h a 50°C (temperatura interna). Después de calentar durante 18 h, el reactor se enfrió a 25°C. Se añadió EtOAc (660 ml) y agua desionizada (320 ml) al reactor y se insertaron los deflectores para una mejor mezcla. La mezcla de reacción se agitó a 500 rpm durante 10 minutos. La agitación se detuvo y las fases se dejaron separar. La mezcla turbia comenzó a separarse por fases en <10 min y se observó una división de fase limpia después de ~30 min. La fase acuosa inferior (que contiene las partículas de SPIO), que consta de 247 gramos de disolución de color rojo pardo oscuro, se drenó del reactor a un matraz de fondo redondo de 2 l 24/40. La disolución se diluyó con agua hasta 800 ml (teoría ~ 2,5 mg de Fe/ml) y se evaporó rotativamente brevemente para eliminar cualquier residuo orgánico volátil. La disolución se filtró después estéril (0,22 µm) y se purificó por filtración de flujo tangencial (TFF) usando una membrana de PES Millipore de 0,1 m² de 50 kDa. El producto se lavó con 24 l de agua desionizada durante ~ 3 horas a ~ 0,68 atm (10 psi) mientras se mantenía un volumen de 2,5 l en el depósito del producto retenido. Una vez que se completó el lavado, el producto retenido se concentró a ~ 120 gramos (~16 mg de Fe/ml). Las partículas finales tenían un diámetro hidrodinámico de 19,2 nm medido en una disolución de cloruro de sodio 150 mM mediante dispersión de luz dinámica.

Ejemplo 6: esterilización en autoclave con exceso de especies ligando.

La especie ligando, como la sal monosódica (0,01 a 0,25 equivalentes molares frente a Fe), se disolvió en una disolución acuosa que contenía nanopartículas SPIO recubiertas con especies ligando. Se añadió agua adicional para dar una disolución con una concentración final de hierro de 1-30 mg Fe/ml. La disolución resultante se sometió a autoclave en un recipiente de vidrio sellado usando un autoclave Tuttnauer 2340EA o Steris SV-148H durante 15 minutos a 121°C.

Ejemplo 7: esterilización en autoclave con especies ligando en exceso y otros aditivos.

La especie ligando, como la sal monosódica (0,01 a 0,25 molar eq frente a Fe), se disolvió en una disolución acuosa que contenía nanopartículas de SPIO recubiertas con especies ligando. Se añadieron agua adicional y otros aditivos (EtOH, 10% en volumen final o d-manitol, 5% en volumen final) para dar una disolución con una concentración final de hierro de 1-30 mg Fe/ml. La disolución resultante se sometió a autoclave en un recipiente de vidrio sellado usando un autoclave Tuttnauer 2340EA o Steris SV-148H durante 15 minutos a 121°C.

Ejemplo 8: esterilización en autoclave sin especies ligando en exceso.

Una nanopartícula SPIO recubierta con una especie ligando se diluyó con agua adicional para dar una disolución con una concentración final de hierro de 1-30 mg Fe/mL. La disolución resultante se sometió a autoclave en un recipiente de vidrio sellado usando un autoclave Tuttnauer 2340EA o Steris SV-148H durante 15 minutos a 121°C.

Ejemplo 9: esterilización en autoclave con otros aditivos y sin especies ligando en exceso.

- 5 Una disolución acuosa que contenía nanopartículas de SPIO recubiertas con especies ligando se diluyó con agua adicional y otros aditivos (EtOH: 10% en volumen final o D-manitol, 5% en volumen final) para dar una disolución con una concentración final de hierro de 1-30 mg Fe/mL. La disolución resultante se sometió a autoclave en un recipiente de vidrio sellado usando un autoclave Tuttnauer 2340EA o Steris SV-148H durante 15 minutos a 121°C.

- 10 Ejemplo 10: procedimiento general para la medición de tamaño de nanopartículas SPIO mediante dispersión dinámica de la luz.

- 15 Una alícuota de la disolución de SPIO (pre o post autoclave) se diluyó entre 0,1 y 0,3 mg de Fe/ml en NaCl acuoso 150 mM. La disolución resultante se pasó a través de un filtro de jeringa Whatman Anotop 10 de 0,2 µm y el filtrado se recogió en una cubeta DLS de poliestireno libre de polvo. El tamaño se midió usando un instrumento ZetaPALS de Brookhaven Instruments Inc. equipado con un detector de dispersión de luz a 90° y se informó el diámetro efectivo.

- 20 Los datos presentados en la tabla 1 muestran el tamaño de las nanopartículas SPIO antes y después de la esterilización en autoclave en presencia y ausencia de especies ligando en exceso. Las nanopartículas de SPIO que comprenden especies ligando de alfa hidroxil monofosfato, tales como aHmPP350, aHmPP750, aHmPP2000, aHmPP5000 y aHmPP30000, ilustran casi el mismo tamaño antes y después de la esterilización en autoclave en presencia de especies ligando en exceso y aditivos. Tales como el tamaño de cada una de las nanopartículas es 10,9, 11,2, 15,3, 20,8 y 29,2 nm respectivamente después de la esterilización en autoclave en presencia de especies ligando en exceso, mientras que las nanopartículas forman un agregado con un diámetro mayor a 200 nm en ausencia de especies ligando en exceso en todas estas preparaciones.

- 25 Las nanopartículas SPIO con mPP2000 y mPP5000 también muestran un perfil de agregación similar en ausencia de aditivos. De forma similar, las nanopartículas SPIO que comprenden especies ligando de monofosfato, tales como mPP2000, ilustran casi el mismo tamaño de aproximadamente 23,5 y 24 nm antes y después de la esterilización en autoclave respectivamente en presencia de especies ligando en exceso y en ausencia de aditivos, mientras que las nanopartículas forman un agregado de diámetro mayor que 200 nm en ausencia de especies ligando en exceso en la preparación.

- 30 También se observó una observación similar para las nanopartículas SPIO que comprenden especies ligando bisfosfato, tales como BPP5000 que ilustra casi el mismo tamaño de aproximadamente 26,4 y 26,6 nm antes y después de la esterilización en autoclave respectivamente en presencia de especies ligando en exceso y aditivos de etanol, mientras que las nanopartículas forman una partícula con un diámetro de aproximadamente 47,8 nm que es mayor que una composición de nanopartícula única en ausencia de especies ligando en exceso en la preparación.

- 35 Tabla: 1 Agregación de nanopartículas en autoclave con o sin el uso de especies ligando en exceso.

Especies ligando	Equivalente especies ligando en exceso frente a Fe	[Fe] (mg/mL)	Aditivo adicional	Tamaño antes del autoclave (nm)	Tamaño después del autoclave (nm)
aHmPP350	0,25	2,0	5% D-manitol	9,4	10,9
aHmPP350	0	2,0	5% D-manitol	9,4	> 200 ^a
aHmPP750	0,25	10,0	5% D-manitol	10,4	11,2
aHmPP750	0	10,0	5% D-manitol	10,4	> 200 ^a
aHmPP2000	0,25	10,0	5% D-manitol	13,7	15,3
aHmPP2000	0	10,0	5% D-manitol	13,7	> 200 ^a

Especies ligando	Equivalente especies ligando en exceso frente a Fe	[Fe] (mg/mL)	Aditivo adicional	Tamaño antes del autoclave (nm)	Tamaño después del autoclave (nm)
aHmPP2000	0,125	20,0	Ninguno	17,0	16,9
aHmPP2000	0	20,0	Ninguno	15,3	> 200 ^a
aHmPP5000	0,25	10,0	5% D-manitol	20,6	20,8
aHmPP5000	0	20,0	Ninguno	15,9	> 200 ^a
aHmPP5000	0,125	20,0	Ninguno	19,4	24,1
aHmPP5000	0,01	30,0	10% etanol	20,6	22,6
aHmPP30000	0,01	2,0	10% etanol	28,5	29,2
aHmPP30000	0	2,0	10% etanol	28,5	> 200 ^a
mPP2000	0,25	1,0	Ninguno	23,5	24,2
mPP2000	0	1,0	Ninguno	23,5	> 200 ^a
BPP5000	0,01	30,0	10% etanol	26,4	26,6
BPP5000	0	27,0	10% etanol	25,2	47,8

Aunque solo se han ilustrado y descrito aquí algunas características de la invención, los expertos en la técnica podrán realizar muchas modificaciones y cambios.

REIVINDICACIONES

1. Un método para estabilizar una preparación de nanopartículas que comprende las etapas de:
 - 5 (a) purificar una composición para formar una composición purificada, donde la composición purificada comprende al menos una nanopartícula dispuesta en un fluido portador, comprendiendo la nanopartícula un núcleo y una cubierta unida al núcleo, comprendiendo la cubierta una especie ligando en la que dicha especie ligando comprende un fosfato, un fosfonato o una combinación de los mismos y además comprende un grupo funcional de poli (etilenglicol) (PEG) y en el que dicha purificación elimina las especies ligando no unidas al núcleo;
 - 10 (b) añadir una cantidad de la especie ligando a la composición purificada para formar una preparación, en la que al menos una parte de la cantidad añadida de la especie ligando permanece desunida al núcleo; y
 - (c) esterilización de la preparación;en el que las especies ligando de la cubierta y las especies ligando añadidas a la composición purificada son estructuralmente idénticas.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, donde el núcleo comprende óxidos de tungsteno, tántalo, hafnio, circonio, zinc, molibdeno, plata, hierro, manganeso, cobre, cobalto, níquel o combinaciones de dos o más de los óxidos de metales de transición anteriores.
- 20 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el núcleo comprende un metal paramagnético que comprende hierro, manganeso, cobre, cobalto, níquel o combinaciones de los mismos.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la especie ligando de fosfato comprende un monofosfato, un bis (fosfato), un polifosfato o una combinación de los mismos.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en el que la especie ligando de fosfonato comprende un monofosfonato, un alfa-hidroxifosfonato, un bisfosfonato, un polifosfonato o una combinación de los mismos.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la especie ligando comprende poli (etilenglicol) (PEG) fosfato funcionalizado, fosfonato funcionalizado con PEG, monofosfato funcionalizado con PEG, bis (fosfato) funcionalizado con PEG, alfa-hidroxifosfonato funcionalizado con PEG o combinaciones de los mismos.
- 30 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la especie ligando comprende alfa-hidroxifosfonato funcionalizado con PEG.
- 35 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las nanopartículas tienen un diámetro hidrodinámico en un intervalo de 1 nm a 100 nm.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el fluido portador comprende agua, etanol o una combinación de los mismos.
- 40 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además añadir una cantidad de fluido al fluido portador, en el que el fluido comprende etanol, agua o una combinación de los mismos.
- 45 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además la adición de uno o más compuestos que comprenden manitol, dextrosa, propilenglicol, una sal fisiológicamente compatible o combinaciones de los mismos.
- 50 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además añadir uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables al fluido portador, en el que los excipientes farmacéuticamente aceptables comprenden una sal farmacéuticamente aceptable, un resto de azúcar farmacéuticamente aceptable o una combinación de los mismos.

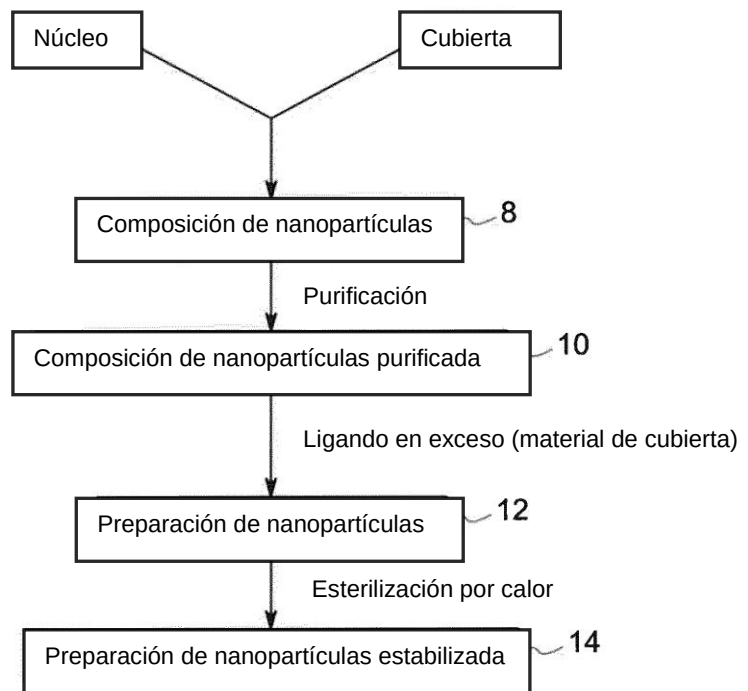


FIG. 1

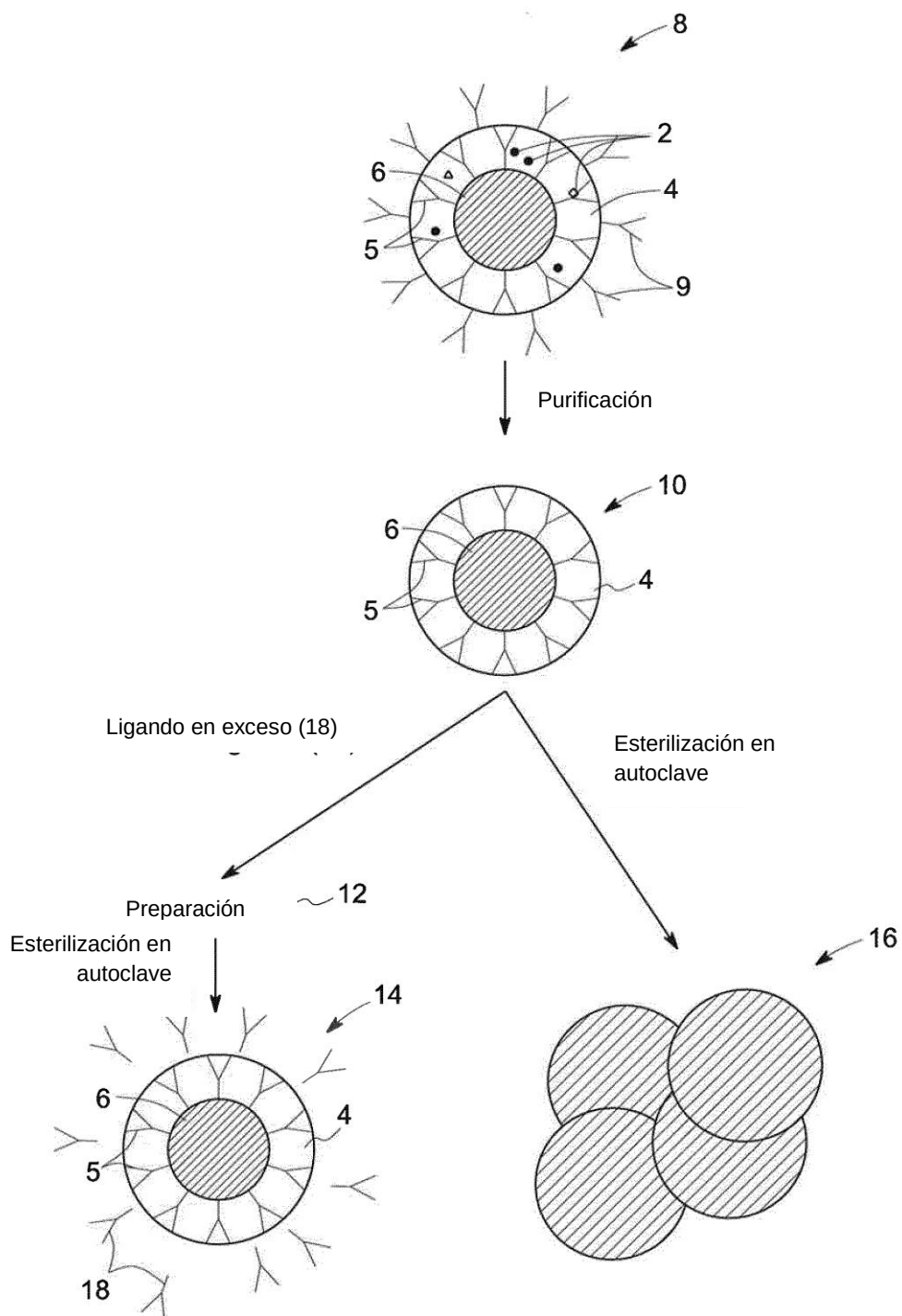


FIG. 2