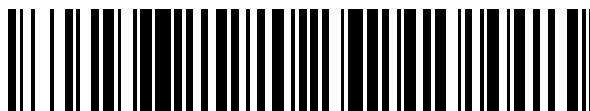


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 303**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/69** (2007.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2011 PCT/GB2011/000882**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2011 WO11154711**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2011 E 11728365 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2579898**

54 Título: **Nanopartículas que portan péptidos**

30 Prioridad:

**10.06.2010 US 353380 P**

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

**01.07.2019**

73 Titular/es:

**MIDATECH LTD. (100.0%)  
4 & 5 Dunmore Court, Wootton Road, Abingdon,  
Oxford  
Oxfordshire OX13 6BH , GB**

72 Inventor/es:

**RADEMACHER, THOMAS;  
WILLIAMS, PHILLIP;  
BACHMANN, CHRISTOF;  
BARRIENTOS, AFRICA, GARCIA;  
DOMINGUEZ, ESTER DE TORRES y  
MENOYO, JAVIER DEL CAMPO**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 718 303 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

Nanopartículas que portan péptidos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nanopartículas que portan péptidos, particularmente para su uso en medicina, y dichas nanopartículas que portan péptidos para su uso en el tratamiento de trastornos, por ejemplo, de la regulación de la glucosa en la sangre.

10

**Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones y productos, y métodos para la producción y administración de dichas composiciones y productos, que incluyen el tratamiento de mamíferos y particularmente seres humanos. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

15

Los agentes bioactivos, tales como los péptidos, tienen frecuentemente una baja estabilidad, particularmente termoestabilidad, que puede limitar las condiciones a las que se pueden someter los agentes durante la preparación, procesamiento, almacenamiento y/o suministro. Por ejemplo, la insulina se utiliza ampliamente para el control y tratamiento de, por ejemplo, la diabetes mellitus Tipo 1 y Tipo 2. Las preparaciones médicas e insulina para su uso humano se formula en general con uno o más conservantes y/o estabilizantes. Además, la estabilidad gastrointestinal limitada presenta normalmente una barrera para la administración oral eficaz de péptidos bioactivos tales como la insulina.

20

25

Ojeda et al., 2007, CARBOHYDRATE RESEARCH, Vol. 342, No. 3-4, páginas 448-459, describe la preparación de gliconanopartículas de oro multifuncionales que incorporan antígenos sialilTn y Lewisy, péptidos de células T auxiliares (TT) y glucosa en proporciones medias bien definidas y con diferentes densidades que se pueden sintetizar en una etapa y caracterizarse utilizando NMR y TEM.

30

El documento WO 2006/037979 A2 describe nanopartículas que comprenden adyuvantes y antígenos tales como antígenos tumorales y patógenos, y su uso en un intervalo de aplicaciones tales como para el tratamiento del cáncer y enfermedades infecciosas.

35

El documento WO 2007/015105 A2 describe nanopartículas unidas a ligandos antibacterianos, que incluyen antibióticos y/o moléculas que se unen a marcadores bacterianos, y el uso de las nanopartículas para el tratamiento de afecciones tratables mediante ligandos antibióticos.

40

Bhumkar et al., 2007, PHARMACEUTICAL RESEARCH, Vol. 24, No. 8, páginas 1415-1426, describe nanopartículas de oro con quitosano reducido como nuevos portadores para el suministro transmucoso de insulina.

Sigue existiendo una necesidad no satisfecha de composiciones capaces de portar y/o estabilizar péptidos bioactivos, incluyendo la insulina, y de métodos de suministro de dichos péptidos bioactivos a un sujeto.

45

**Breve descripción de la invención**

La presente invención afronta las dificultades mencionadas anteriormente proporcionando nanopartículas como se definen en las reivindicaciones.

50

La presente invención proporciona nanopartículas como se definen en la reivindicación 1. Las nanopartículas de la presente invención proporcionan un componente de transporte o suministro de péptidos bioactivos, tales como la insulina, cuyos péptidos se pueden estabilizar de esta manera.

55

En un aspecto de la invención, se proporciona una nanopartícula que comprende:

- (i) un núcleo que incluye un metal; y
- (ii) una corona que incluye una pluralidad de ligandos unidos covalentemente al núcleo, en el que al menos uno de dichos ligandos incluye un resto de carbohidrato; y
- (iii) al menos un péptido unido no covalentemente a la corona.

60

El péptido puede unirse a la corona de manera que al menos una fracción, o más, del péptido unido se libera de la nanopartícula al poner en contacto la nanopartícula con una solución fisiológica, por ejemplo, una solución salina. La liberación puede facilitar los efectos biológicos de un péptido activo, por ejemplo, permitiendo que el péptido interactúe con su receptor.

65

En general, el péptido será un péptido bioactivo, es decir, capaz de estimular una respuesta fisiológica en un sujeto mamífero. En algunos casos, de acuerdo con la presente invención, el péptido se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en insulina, GLP-1, IGF1, IGF2, relaxina, INSL5, INSL6, INSL7, polipéptido pancreático (PP), péptido tirosina tirosina (PTT), neuropéptido Y, oxitocina, vasopresina, GnRH, TRH, CRH, GHRH/somatostatina, FSH, LH, TSH, CGA, prolactina, C1IP, ACTH, MSH, endorfinas, lipotropina, GH, calcitonina, PTH, inhibina, hCG, HPL, glucagones, somatostatina, timosina, thmulina, gastrina, grelina, timopoyetina, CCK, GIP secretina, VIP, entero glucagón, leptina, adiponectina, resistina Osteocalcina, renina, EPO, ANP, BNP, quimiocinas, citocinas y adipocinas. Por lo tanto, en ciertos casos el péptido puede ser capaz de estimular una reducción de los niveles de glucosa en sangre en un sujeto mamífero. Por ejemplo, el péptido puede comprender o consistir en insulina humana monomérica o dimérica. Además, el péptido puede comprender o consistir en GLP-1. Además, el al menos un péptido puede comprender una combinación de dos o más de los péptidos especificados anteriormente, por ejemplo, insulina y GLP-1.

En algunos casos de acuerdo con la presente invención dicho resto de carbohidrato puede comprender un monosacárido y/o un disacárido. El resto de carbohidrato puede ser como se define adicionalmente en el presente documento, incluyendo un mimético de carbohidrato. El resto de carbohidrato se puede unir covalentemente al núcleo mediante un enlazador seleccionado de entre el grupo que consiste en: enlazadores que contienen azufre, enlazadores que contienen amino, enlazadores que contienen fosfato y enlazadores que contienen oxígeno. En algunos casos el enlazador comprende una cadena de alquilo de al menos dos carbonos.

De acuerdo con la presente invención dicho al menos un ligando que comprende un resto de carbohidrato puede seleccionarse en algunos casos de entre el grupo que consiste en 2'-tioetil- $\alpha$ -D-galactopiranosido, 2'-tioetil- $\beta$ -D-glucopiranosido, 2'-tioetil-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido, 5'-tiopentanil-2-desoxi-2-imidazolacetamido- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-glucopiranosido y 2'-tioetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, en el que dicho al menos un ligando comprende un resto de carbohidrato que está unido covalentemente al núcleo mediante su átomo de azufre.

Se contempla específicamente en el presente documento que dicha pluralidad de ligandos unidos covalentemente al núcleo puede comprender al menos un primer ligando y un segundo ligando, en el que el primer y segundo ligandos son diferentes. Por ejemplo, el primer y segundo ligandos pueden ser los siguientes:

- (a) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil- $\alpha$ -D-galactopiranosido y dicho segundo ligando comprende 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol;
- (b) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil- $\beta$ -D-glucopiranosido o 2'-tioetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido y dicho segundo ligando comprende 5'-tiopentanil-2-desoxi-2-imidazolacetamido- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-glucopiranosido;
- (c) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil- $\beta$ -D-glucopiranosido o 2'-tioetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido y dicho segundo ligando comprende 5'-tiopentanil-2-desoxi-2-imidazolacetamido- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-glucopiranosido; o
- (d) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido y dicho segundo ligando comprende 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol,

y en el que dicho primer y segundo ligandos están unidos covalentemente al núcleo mediante sus átomos de azufre respectivos.

En algunos casos el primer ligando puede comprender un resto de carbohidrato y dicho segundo ligando un ligando no carbohidrato. Uno o más de los ligandos puede ser un grupo amino. En particular, el segundo ligando puede comprender 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol unido covalentemente al núcleo mediante su átomo de azufre.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, cuando están presentes diferentes ligandos en la nanopartícula pueden estar presentes, por ejemplo, en ciertas proporciones o intervalos definidos. Por ejemplo, el primer ligando y dicho segundo ligando puede estar presente en la nanopartícula en una relación en el intervalo de 1:40 a 40:1, 1:10 a 10:1 o incluso de 1:2 a 2:1.

Se ha descubierto que las nanopartículas de acuerdo con la presente invención pueden proporcionarse con varios números de ligandos que forman la corona. Por ejemplo, en algunos casos la corona comprende al menos 5 ligandos por núcleo, por ejemplo, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 ligandos por núcleo o 44-106 ligandos por núcleo.

El número de moléculas de péptido unidas por núcleo no está particularmente limitado. Para ciertas aplicaciones, puede ser deseable emplear tan pocos como 1, 2, 3 o 4 péptidos por núcleo, mientras que en otros casos la nanopartícula de la invención puede comprender al menos 5 o más moléculas de péptido unidas por núcleo.

De acuerdo con la presente invención, el núcleo de la nanopartícula puede comprender en algunos casos un metal seleccionado de entre el grupo que consiste en: Au, Ag, Cu, Pt, Pd, Fe, Co, Cd, Gd, Zn o cualquier combinación de

los mismos. Ciertas combinaciones y composiciones de núcleo particulares se describen posteriormente en el presente documento.

5 El núcleo de la nanopartícula de acuerdo con la presente invención puede tener en algunos casos un diámetro en el intervalo de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 50 nm, tal como aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10 nm o aproximadamente 1,5 nm a aproximadamente 2 nm.

10 De acuerdo con la presente invención dicho al menos un péptido puede comprender al menos dos, tres, cuatro, cinco o más especies diferentes de péptido. En particular, la nanopartícula puede comprender insulina y GLP-1 unidos a la corona de la misma nanopartícula. La presencia de más de una especie de péptido unida a la nanopartícula puede preferirse en ciertos escenarios (por ejemplo, ciertos entornos clínicos) en comparación con la unión de una única especie de péptido. En particular, se pueden transportar combinaciones de péptidos en una nanopartícula de manera que los péptidos lleven a cabo funciones beneficiosas o complementarias y/o actúen en conjunto, tal como de una manera sinérgica. La presencia de más de una especie puede utilizarse con el fin de tratar una o más afecciones y para una o más indicaciones terapéuticas.

20 De acuerdo con la presente invención, la nanopartícula de la invención puede comprender un componente que tiene un estado divalente, tal como un metal o un compuesto que tiene un estado divalente, o un óxido o una sal del mismo. Por ejemplo, son particularmente útiles los metales o complejos metálicos que tienen la capacidad de existir en un estado divalente. Dicho componente puede estar en el estado divalente cuando se añade o se puede transformar en un estado divalente después de la adición. Los óxidos y sales del componente divalente también son útiles y se pueden añadir directamente o formarse *in situ* posteriormente a la adición. Entre las sales útiles del componente divalente se incluyen sales de halógenos, tales como cloruro, yoduro, bromuro y fluoruro. Dichos componentes divalentes pueden incluir, por ejemplo, zinc, magnesio, cobre, níquel, cobalto, cadmio o calcio, y sus óxidos y sales de los mismos. El componente está presente deseablemente en una cantidad suficiente para producir un efecto estabilizante y/o en una cantidad suficiente para aumentar la unión del péptido de la corona a un nivel mayor que el nivel de unión del péptido a la corona en ausencia del componente que tiene un estado divalente. En algunos casos, el componente que tiene un estado divalente está presente deseablemente en una cantidad de aproximadamente 0,5 a 2,0 equivalentes del núcleo metálico (por ejemplo, oro), u opcionalmente aproximadamente 30 0,75 a 1,5 equivalentes del núcleo metálico (por ejemplo, oro). En el contexto de la presente invención, "equivalentes" pueden ser equivalentes en moles, por ejemplo 1,0 equivalente de zinc puede tomarse como que significa el mismo número de átomos de zinc o cationes  $Zn^{2+}$  que el número de átomos de oro en el núcleo de la nanopartícula.

35 El componente divalente puede estar presente en algunos casos en la corona de la nanopartícula. Se contempla específicamente en el presente documento que el componente divalente se puede incluir en la nanopartícula, que se incluye en la corona de la nanopartícula como resultado de la inclusión del componente divalente en el proceso de síntesis de la nanopartícula. En algunos casos de acuerdo con la presente invención, el componente divalente, tal como el zinc, puede seleccionarse de entre:  $Zn^{2+}$  y ZnO. Por ejemplo, el zinc puede estar en forma de  $ZnCl_2$ .

40 En un aspecto adicional la invención proporciona una pluralidad de partículas de la invención. Por ejemplo, una pluralidad puede ser 100, 1000, 100000, o más. La pluralidad puede estar como una forma asociada, una suspensión o contenida junta en un único paquete, recipiente o vehículo. En ciertos casos, la pluralidad puede tener forma de una o más dosis (por ejemplo, una cantidad de péptido definida o unidades de actividad peptídica), tal como en forma de una dosis terapéutica o un número definido de dosis.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona una nanopartícula que comprende:

50 (i) un núcleo que comprende un metal;  
(ii) una corona que comprende una pluralidad de ligandos unidos covalentemente al núcleo, cuya pluralidad de ligandos comprende al menos un primer ligando y un segundo ligando, en el que:

55 (a) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil- $\alpha$ -D-galactopiranosido y dicho segundo ligando comprende 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol;

(b) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil- $\beta$ -D-glucopiranosido o 2'-tioetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido y dicho segundo ligando comprende 5'-tiopentanol-2-desoxi-2-imidazolacetamido- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-glucopiranosido;

60 (c) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil- $\beta$ -D-glucopiranosido o 2'-tioetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido y dicho segundo ligando comprende 5'-tiopentanol-2-desoxi-2-imidazolacetamido- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-glucopiranosido; o

(d) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido y dicho segundo ligando comprende 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol,

65 y en el que dicho primer y segundo ligandos están unidos covalentemente al núcleo mediante sus átomos de azufre respectivos.

La nanopartícula de acuerdo con este aspecto de la invención puede comprender un componente divalente, tal como un metal o complejo metálico. Un componente particularmente útil es el zinc. El componente divalente puede estar presente en algunos casos en la corona de la nanopartícula. Se contempla específicamente que el componente divalente se puede incluir en la nanopartícula, que se incluye en la corona de la nanopartícula como resultado de la inclusión de un componente divalente en el proceso de síntesis de la nanopartícula. Adicional o 5 alternativamente, el componente divalente se puede añadir después de la síntesis de la nanopartícula. En algunos casos de acuerdo con la presente invención, se puede utilizar el zinc como el componente divalente, en el que el zinc se puede seleccionar de entre:  $Zn^{2+}$  y ZnO. Por ejemplo, el zinc puede estar en forma de  $ZnCl_2$ . Se pueden utilizar otros materiales divalentes, sales y óxidos de los mismos, como se desvela en el presente documento. El componente está presente deseablemente en una cantidad suficiente para producir un efecto estabilizante y/o en 10 una cantidad suficiente para aumentar la unión del péptido a la corona a un nivel mayor que el nivel de unión del péptido a la corona en ausencia del componente que tiene un estado divalente. En algunos casos, el componente que tiene un estado divalente está presente deseablemente en una cantidad de aproximadamente 0,5 a 2,0 equivalentes del núcleo metálico (por ejemplo, oro), u opcionalmente aproximadamente 0,75 a 1,5 equivalentes del núcleo metálico (por ejemplo, oro). En el contexto de la presente invención "equivalentes" puede ser equivalentes molares, por ejemplo, 1,0 equivalente de zinc puede tomarse como que significa el mismo número de átomos de zinc o de cationes  $Zn^{2+}$  que el número de átomos de oro en el núcleo de la nanopartícula.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de nanopartículas de la invención y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunos casos, la composición farmacéutica puede formularse para la administración a un sujeto mamífero mediante una vía intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), intradérmica (i.d.) o subcutánea (s.c).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de estabilización de al menos un péptido, siendo el método como se define en la reivindicación 10.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una nanopartícula de la invención para su uso en un método de tratamiento médico. La nanopartícula se puede formular para su uso farmacéutico, por ejemplo, combinando uno o, normalmente, una pluralidad de nanopartículas de la invención con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. La nanopartícula de la invención o composición farmacéutica que comprende dicha nanopartícula puede formularse para la administración por cualquier vía adecuada para el suministro a un sujeto. En particular, la nanopartícula de la invención o la composición farmacéutica que comprende dicha nanopartícula se puede formular para la administración intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), intradérmica (i.d.) o subcutánea (s.c).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una nanopartícula de la invención (por ejemplo, una nanopartícula que tiene insulina y/o GLP-1 unidos a la corona) para su uso en un método de disminución de la glucosa sanguínea en un sujeto mamífero que necesita el mismo y/o el tratamiento de diabetes en un sujeto mamífero que necesita el mismo.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para la formación de agrupamientos mesoscópicos polipeptídicos o proteicos, teniendo dichos agrupamientos embebidas en ellos una o más nanopartículas de la invención, comprendiendo dicho método la puesta en contacto de dicho polipéptido o proteína con una o más nanopartículas y una temperatura ambiente de entre 15 °C y 30 °C, tal como entre 20 °C y 25 °C.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para la disociación de uno o más agrupamientos, comprendiendo dichos uno o más agrupamientos un agrupamiento mesoscópico de péptidos o proteínas que tiene embebidas en él una o más nanopartículas de la invención, comprendiendo dicho método someter dichos agrupamientos a una temperatura de desde 35 °C a la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del péptido o proteína produciendo de esta manera que dichos uno o más agrupamientos se disocian en floculantes individuales nanopartícula-péptido.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para la liberación de péptido monoméricos a partir de uno o más floculantes nanopartícula-péptido en una solución, comprendiendo dicho método el aumento de la fuerza iónica del disolvente, en el que dichos floculantes nanopartícula-péptido comprende una o más nanopartículas de la invención. En algunos casos, el método comprende la disolución de dicho uno o más floculantes nanopartícula-péptido en un fluido biológico, tal como plasma, fluido intersticial o saliva.

La presente invención incluye la combinación de los aspectos y características preferidas descritas excepto donde dicha combinación no se permite claramente o se establece expresamente que se evite. Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se describen con más detalle posteriormente y con referencia a los ejemplos y figuras adjuntas.

#### Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos

en la relación 9:1 de GlcC2:GlcNAc “*NP-GlcC2 (9) GlcNAc (1)*”;

La **Figura 2** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 4:1 de GlcC2:GlcNAc “*NP-GlcC2 (4) GlcNAc (1)*”;

5 La **Figura 3** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcC2:GlcNAc “*NP-GlcC2 (1) GlcNAc (1)*”;

10 La **Figura 4** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:9 de GlcC2:GlcNAc “*NP-GlcC2 (1) GlcNAc (9)*”;

La **Figura 5** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcC2:alfa-Gal “*NP-GlcC2 (1) alfa-Gal (1)*”;

15 La **Figura 6** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de betaGlcC2:EG6NH2 “*NP-betaGlcC2 (1) EG6NH2 (1)*”;

20 La **Figura 7** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcNHAc:EG6NH2 “*NP-GlcNHAc (1) EG6NH2 (1)*”;

La **Figura 8** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de alfa-Glc:EG6NH2 “*NP-alfa-Glc (1) EG6NH2 (1)*”;

25 La **Figura 9** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos de alfa-Glc “*NP-alfa-Glc*”;

La **Figura 10** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcC2:GlcNH IAA “*NP-GlcC2 (1) GlcNH\_IAA (1)*”;

30 La **Figura 11** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de alfa-Gal:EG6NH2 “*NP-alfa-Gal (1) EG6NH2(1)*”. En ciertos ejemplos, se hace referencia a las nanopartículas NP-alfa-Gal (1) EG6NH2(1) en el presente documento como lote NP10;

35 La **Figura 12** muestra las curvas de unión de insulina de la insulina humana unida (en nmoles) por cantidad de oro (en nmoles) para 11 diferentes composiciones de la corona de la nanopartícula;

La **Figura 13** muestra una imagen de nanopartículas NP-alfa-Gal (1) EG6NH2(1) {Lote nº NP10} por microscopía de transmisión de electrones (TEM);

40 La **Figura 14** muestra los gráficos de distribución por tamaño determinada por dispersión dinámica de luz (DLS) para MI-NP-10-amina-gal (es decir, nanopartículas NP-alfa-Gal (1) EG6NH2(1) por, A) número y B) volumen;

45 La **Figura 15** muestra los gráficos de distribución por tamaño determinada por dispersión dinámica de la luz (DLS) para la insulina unida a MI-NP-10 amina-gal (es decir, nanopartículas NP-alfa-Gal(1) EG6NH2(1) por, A) número y B) volumen;

La **Figura 16** muestra los datos del análisis termogravimétrico experimental (TGA) para una nanopartícula de galactosa-EG-amina-Au con picos de temperatura que se indican {lote nº NP10};

50 La **Figura 17** muestra un gráfico de la insulina unida a nanopartículas de oro, en el que los rombos indican las nanopartículas en ausencia de zinc; los triángulos indican las nanopartículas sintetizadas en presencia de 1,33 equivalentes de zinc, y los círculos indican las nanopartículas sintetizadas en ausencia de zinc a los que se ha añadido 1,33 equivalentes de zinc después de la síntesis;

55 La **Figura 18** muestra la unión de GLP-1 a nanopartículas de oro con cantidades de nanopartículas de oro variables;

La **Figura 19** muestra el trazado MALDI que muestra el GLP-1 e insulina de una preparación de nanopartículas que comprende tanto GLP-1 como insulina;

60 La **Figura 20** muestra un trazado HPLC que muestra el GLP-1 e insulina de una preparación de nanopartículas que comprende tanto GLP como insulina.

#### Descripción detallada de la invención

65 En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se tiene la intención de definirse

como se indica posteriormente.

Como se utiliza en el presente documento, "nanopartícula" se refiere a una partícula que tiene una escala nanométrica, y no tiene la intención de expresar cualquier limitación de forma específica. En particular, "nanopartícula" engloba nanoesferas, nanotubos, nanocajas, nanoagrupamientos, nanobarras y similares. En ciertas realizaciones las nanopartículas y/o núcleos de nanopartículas que se contemplan en el presente documento tienen una geometría poliédrica o esférica en general.

Las nanopartículas que comprenden una pluralidad de ligandos que contienen carbohidratos se han descrito, por ejemplo, en los documentos WO 2002/032404, WO 2004/108165, WO 2005/116226, WO 2006/037979, WO 2007/015105, WO 2007/122388, WO 2005/091704 y dichas nanopartículas pueden ser útiles de acuerdo con la presente invención. Además, se describen nanopartículas revestidas de oro que comprenden un núcleo magnético de ferritas de óxido de hierro (que tienen la fórmula  $XFe_2O_4$ , donde  $X = Fe, Mn$  o  $Co$ ) funcionalizados con compuestos orgánicos (por ejemplo, mediante un enlace tiol-oro) en el documento EP 2305310 A1 y se contemplan específicamente para su uso como nanopartículas/núcleos de nanopartículas de acuerdo con la presente invención.

Como se utiliza en el presente documento, "corona" se refiere a una capa o revestimiento, que puede cubrir parcial o completamente la superficie expuesta de un núcleo de nanopartícula. La corona incluye una pluralidad de ligandos que incluye al menos un resto de carbohidrato. Por lo tanto, la corona se puede considerar como una capa orgánica que rodea o rodea parcialmente el núcleo metálico. En ciertas realizaciones la corona proporciona y/o participa en el pasivado del núcleo de la nanopartícula. Por lo tanto, en ciertos casos, la corona puede incluir una capa de revestimiento suficientemente completa sustancialmente para estabilizar el núcleo que contiene metal. Sin embargo, se contempla específicamente en el presente documento que ciertas nanopartículas tengan núcleos que incluyan, por ejemplo, un núcleo interno que contenga un óxido metálico revestido con un metal noble puede incluir una corona que solo reviste parcialmente la superficie del núcleo.

Como se utiliza en el presente documento, "péptido" tiene la intención de englobar cualquier secuencia de aminoácidos y específicamente incluye péptidos, polipéptidos, proteínas (incluyendo proteínas que tienen una estructura secundaria, terciaria y/o cuaternaria) y fragmentos de los mismos. La expresión un "péptido unido a" tiene la intención específicamente de englobar una parte (pero puede incluir completamente) de la secuencia de aminoácidos del péptido que forma una interacción de enlace con una o más partes (tal como un grupo o resto químico) de una o más pluralidad de ligandos de la nanopartícula. En ciertas realizaciones, el péptido puede tener un peso molecular de  $< 500$  kDa,  $< 100$  kDa,  $< 50$  kDa, tal como hasta de 20 kDa.

En consecuencia, en un aspecto la presente invención proporciona una nanopartícula que comprende:

- (i) un núcleo que incluye un metal;
- (ii) una corona que incluye una pluralidad de ligandos unidos covalentemente al núcleo, en el que al menos uno de dichos ligandos incluye un resto de carbohidrato; y
- (iii) al menos un péptido unido no covalentemente a la corona.

El término "unido" de acuerdo con la presente divulgación pretende incluir una asociación física y/o química entre dos componentes. Este término incluye cualquier forma de enlace, por ejemplo, enlace covalente, iónico, de hidrógeno o fuerzas intermoleculares, tales como las fuerzas de van der Waals o fuerzas electrostáticas. El término incluye el acoplamiento o enlace físico. Esta asociación física y/o química puede pretenderse que sea reversible, es decir, los componentes se pueden separar o desasociar, uno del otro, por ejemplo, para liberar el componente activo del componente vehículo. De acuerdo con la presente invención, el al menos un péptido no está unido covalentemente a la corona.

El péptido puede estar unido reversiblemente a la corona. El péptido está unido a la corona de la nanopartícula no covalentemente. Sin el deseo de quedar unido por teoría alguna, se cree actualmente que un péptido puede participar en una o más interacciones de unión reversibles con uno o más ligandos que proporcionan la corona de la nanopartícula. En particular, una parte de la secuencia de aminoácidos puede participar en un enlace de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y/o interacciones electrostáticas con uno o más ligandos (por ejemplo, interactuando con uno o más grupos funcionales de un ligando expuesto). La unión peptídica puede implicar la adsorción, absorción u otra interacción directa o indirecta con uno o más ligandos de la nanopartícula.

Como se describe en el presente documento con referencia a ciertas realizaciones de la presente invención, el péptido puede unirse de manera que al menos una fracción o parte del péptido unido se libera de la nanopartícula al poner en contacto la nanopartícula con una solución fisiológica. Como se describe en el presente documento, el péptido puede estar unido a la nanopartícula de manera que el péptido esté estabilizado (por ejemplo, termoestabilizado) mientras está unido, pero es liberable y está disponible de forma que sea biológicamente activo (por ejemplo, liberable de manera que el péptido sea detectable mediante ELISA y/o capaz de ejercer al menos una acción biológica en un sistema *in vitro* o *in vivo* que sea característica del péptido libre). En particular, cuando el péptido incluye insulina (humana), el péptido se puede unir a la nanopartícula de manera que una suspensión de las nanopartículas unidas a insulina da un resultado positivo en un ELISA para insulina (humana) o ejerce un efecto en

los niveles de glucosa sanguínea en un sujeto mamífero después de la administración a este.

Se contempla varias cinéticas de liberación para la disociación de moléculas de péptido unidas a partir de la nanopartícula, incluyendo la liberación bi- o multi-fase (tal como una liberación inicial rápida seguido por una fase de liberación posterior más lenta). Por ejemplo, la liberación puede incluir la disociación de las moléculas de péptido unidas de la nanopartícula rápidamente en segundos o minutos seguido por una liberación sostenida adicional durante un periodo de al menos 2, 4, 6, 8 o más horas. Dicha cinética de liberación puede ser ventajosa en ciertas circunstancias, por ejemplo, cuando se desea una acción sostenida, en comparación con, por ejemplo, una inyección de péptido libre.

El péptido (incluyendo sin limitación polipéptidos, proteínas o fragmentos de los mismos) se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en: insulina, GLP-1, IGF1, IGF2, relaxina, INSL5, INSL6, INSL7, polipéptido pancreático (PP), péptido tirosina tirosina (PTT), neuropéptido Y, oxitocina, vasopresina, GnRH, TRH, CRH, GHRH/somatostatina, FSH, LH, TSH, CGA, prolactina, C1IP, ACTH, MSH, endorfinas, lipotropina, GH, calcitonina, PTH, inhibina, hCG, HPL, glucagones, somatostatina, timosina, thmulina, gastrina, grelina, timopoyetina, CCK, GIP secretina, VIP, entero glucagón, leptina, adiponectina, resistina Osteocalcina, renina, EPO, ANP, BNP, quimiocinas, citocinas y adipocinas. En ciertas realizaciones, el péptido es capaz de estimular una reducción de los niveles de glucosa sanguínea en un sujeto mamífero. Por lo tanto, en algunos casos de acuerdo con la presente invención el péptido puede incluir insulina humana monomérica y/o dimérica.

En ciertos casos de acuerdo con la presente invención puede haber al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10 o más moléculas de péptido unido por núcleo de media. Puede haber un único tipo de péptido o dos o más péptidos diferentes. Cuando se une una combinación de dos péptidos diferentes a una nanopartícula, los péptidos diferentes pueden estar presentes en algunos casos en una relación de 1:10 a 10:1, tal como 1:2 a 2:1. Por lo tanto, se contemplan específicamente las combinaciones complementarias de péptidos que se co-administran de manera ventajosa.

Como se utiliza en el presente documento, el término "carbohidrato" tiene la intención de incluir compuestos de fórmula general  $C_n(H_2O)_m$ , donde  $n = m$  y  $n$  es mayor de 3. también, se incluye en la definición de carbohidrato los análogos/miméticos que no se incluyen en la fórmula general  $C_n(H_2O)_m$ . Los análogos/miméticos de carbohidratos incluyen, pero no se limitan a pseudo-azúcares (carba-azúcares), amino-azúcares, imino-azúcares e inositoles. Los aminoazúcares incluyen piperidinas polihidroxiladas, pirrolidinas, pirrolizidinas e indolizidinas.

Como se describe en el presente documento, la nanopartícula de acuerdo con la presente invención incluye una pluralidad de ligandos unidos covalentemente a un núcleo metálico. Los ligandos pueden ser iguales o diferentes. En realizaciones particulares, la pluralidad de ligandos puede incluir una primera clase de ligandos que incluye al menos un resto de carbohidrato y una segunda clase de ligandos no carbohidrato. Como se utiliza en el presente documento el al menos un ligando que incluye un resto de carbohidrato incluirá en general uno o más grupos de azúcares, tal como un monosacárido, un disacárido y/o un polisacárido y/o uno o más grupos pseudo-azúcar (tal como un pseudo-azúcar seleccionado de entre: un carba-azúcar, un aminoazúcar, un imino-azúcar, un inositol una piperidina polihidroxilada, una pirrolidina, una pirrolizidina y una indolizidina). Los ligandos se unen covalentemente al núcleo de la nanopartícula. Por lo tanto, la expresión "resto de carbohidrato" se entiende que incluye derivados químicos de carbohidratos tales como los glicósidos en los que el ligando incluye un grupo azúcar o grupo de pseudo-azúcar (tal como un pseudo azúcar seleccionado de entre: un carba-azúcar, un aminoazúcar, un imino-azúcar, un inositol una piperidina polihidroxilada, una pirrolidina, una pirrolizidina y una indolizidina) unido a un átomo o molécula no azúcar. En casos particulares, el ligando que incluye un resto de carbohidrato de acuerdo con la presente invención puede incluir un glicósido de galactosa, glucosa, glucosamina, N-acetilglucosamina, manosa, fucosa y/o lactosa, por ejemplo, el resto de carbohidrato puede incluir un galactopiranosido y/o un glucopiranosido. El ligando que contiene carbohidrato puede unirse covalentemente al núcleo mediante un enlazador seleccionado de entre enlazadores que contienen azufre, enlazadores que contienen amino, enlazadores que contienen fosfato y enlazadores que contienen oxígeno. También se pueden utilizar combinaciones de enlazadores del núcleo. En algunos casos el enlazador puede incluir una cadena de alquilo de al menos dos carbonos.

El ligando unido al núcleo incluye uno o más grupos de carbohidrato (sacáridos), por ejemplo, que incluyen un polisacárido, un oligosacárido o un grupo sacarídico simple. El ligando puede ser también un glicanoconjugado tal como un glicolípido o una glicoproteína. Además del grupo de carbohidrato, el ligando puede incluir adicionalmente uno o más grupos peptídicos, un dominio proteico, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un segmento de ADN/ARN) y/o una sonda fluorescente.

En ciertos casos las partículas pueden tener más de una especie de ligando inmovilizado en las mismas, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 10, 20 o 100 ligandos diferentes. De manera alternativa o adicionalmente se puede emplear en conjunto una pluralidad de tipos de partículas.

En ciertos casos, el número medio de ligandos unidos a un núcleo metálico individual de la partícula es al menos 5, al menos 10 o al menos 20 ligandos. El número puede estar en el intervalo 10 a 10.000 tal como de 10 a 1.000, más particularmente 20 a 500 o 400 a 106 ligandos por núcleo.



Preferentemente, sustancialmente todos los ligandos están unidos covalentemente al núcleo de las partículas. Los protocolos para llevar esto a cabo son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, los documentos WO 2002/032404, WO 2004/108165, WO 2005/116226, WO 2006/037979, WO 2007/015105, WO 2007/122388, WO 2005/091704). Esto se puede llevar a cabo haciendo reaccionar los ligandos con grupos finales reductores con un metal noble tal como el oro en condiciones reductoras. Un método a modo de ejemplo para la producción de las partículas utiliza restos de carbohidrato derivados con tiol para acoplar los ligandos a las partículas. Por lo tanto, el ligando se deriva como un disulfuro protegido. De manera conveniente, se puede añadir el ligando de disulfuro protegido en metanol a una solución acuosa de ácido tetracloroáurico. Un agente reductor preferido es el borohidruro sódico. En ciertas realizaciones, las nanopartículas son solubles en disolventes orgánicos y en agua y soluciones fisiológicas. Los presentes inventores han descubierto que las nanopartículas descritas en el presente documento son adecuadas para aplicaciones terapéuticas y pueden no ser tóxicas, solubles y/o se excretan por la orina.

En ciertos casos de acuerdo con la presente invención, el al menos un ligando que comprende un resto de carbohidrato se selecciona de entre el grupo de: 2'-tioetil- $\alpha$ -D-galactopiranosido, 2'-tioetil- $\beta$ -D-glucopiranosido, 2'-tioetil-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido, 5'-tiopentanil-2-desoxi-2-imidazolacetamido- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-glucopiranosido y 2'-tioetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, y en el que dicho al menos un ligando que comprende un resto de carbohidrato está unido covalentemente al núcleo mediante el sulfuro de tiol.

De manera adicional o alternativamente, la pluralidad de ligandos puede incluir un grupo amino. Por lo tanto, un ligando que comprende un grupo de carbohidrato puede incluir un grupo amino (por ejemplo, como parte del carbohidrato, tal como una glucosamina, y/o como un grupo constituyente de una parte no carbohidrato del ligando. Además, cuando la pluralidad de ligandos incluye al menos un ligando no carbohidrato, el grupo no carbohidrato puede incluir un grupo amino- El al menos un ligando no carbohidrato puede incluir 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol unido covalentemente al núcleo mediante el sulfuro de tiol.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, la pluralidad de ligandos puede incluir dicho al menos un ligando que incluye un resto de carbohidrato y dicho al menos un ligando no carbohidrato en el que dichos ligandos son diferentes y están presentes en la nanopartícula en una relación de 1:40 a 40:1, tal como una relación de 1:10 a 10:1, más particularmente una relación de 1:2 a 2:1.

El "núcleo" de la nanopartícula incluye un metal. Los núcleos adecuados se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2002/032404, WO 2004/108165, WO 2005/116226, WO 2006/037979, WO 2007/015105, WO 2007/122388, WO 2005/091704 y dichos núcleos de nanopartículas pueden ser útiles de acuerdo con la presente invención. Además, se describen nanopartículas revestidas de oro que incluyen un núcleo magnético de ferritas de óxido de hierro (que tienen la fórmula  $XFe_2O_4$ , donde X = Fe, Mn o Co) en el documento EP 2305310 A1 y pueden ser útiles de acuerdo con la presente invención.

En algunos casos, de acuerdo con la presente invención el núcleo de la nanopartícula incluye un metal seleccionado de entre el grupo de: Au, Ag, Cu, Pt, Pd, Fe, Co, Cd, Gd, Zn o cualquier combinación de los mismos. El núcleo puede incluir un metal de pasivado seleccionado de entre el grupo de: Au, Ag, Pt, Pd y Cu, o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones se puede emplear una combinación específica de metales, tales como una combinación de metales seleccionada de entre el grupo de: Au/Fe, Au/Ag, Au/Cu, Au/Ag/Cu, Au/Pt, Au/Pd, Au/Ag/Cu/Pd, Au/Gd, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd, Au/Fe/Cu/Gd.

En algunos casos de acuerdo con la presente invención, el núcleo de la nanopartícula puede ser magnético. El núcleo puede incluir un átomo activo en NMR, tal como un metal seleccionado de entre el grupo de:  $Mn^{2+}$ ,  $Gd^{3+}$ ,  $Eu^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $V^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  y lantánidos $^{3+}$ .

En algunos casos de acuerdo con la presente invención, el núcleo de la nanopartícula puede incluir un semiconductor, tal como el que selecciona de entre el grupo de: selenido de cadmio, sulfuro de cadmio, telurio de cadmio y sulfuro de zinc.

En algunos casos de acuerdo con la presente invención, el núcleo de la nanopartícula puede incluir un óxido metálico revestido con un metal seleccionado de entre el grupo de Au, Ag, Cu, Pt, Pd, Fe, Co, Cd, Gd, Zn o cualquier combinación de los mismos. El óxido metálico puede ventajosamente tener la fórmula  $XFe_2O_4$ , donde X es un metal seleccionado de entre el grupo de: Fe, Mn y Co.

En algunos casos de acuerdo con la presente invención, el núcleo de la nanopartícula puede tener un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 50 nm, tal como de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10 nm, más específicamente de aproximadamente 1,5 nm a aproximadamente 2 nm.

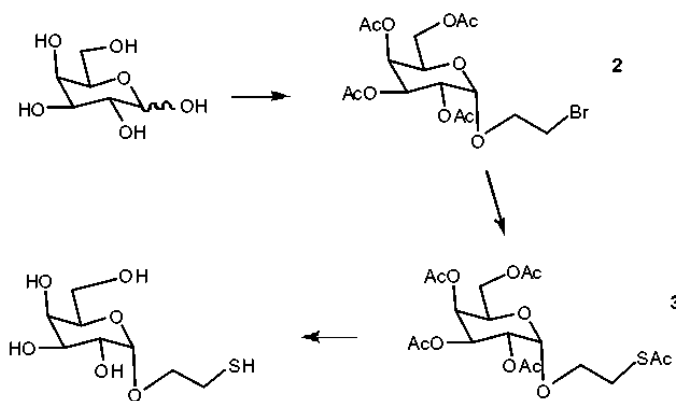
Lo siguiente se presenta por medio de ejemplos.

65

**Ejemplos**

**Ejemplo 1**

5 Preparación de 2'-tioetil- $\alpha$ -D-galactopiranosido, ( $\alpha$ -galactosa C2SH)

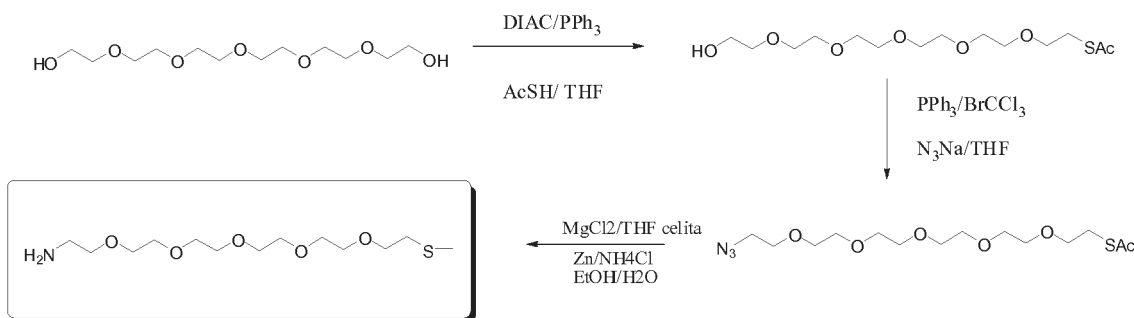


10 Se añade a una suspensión de galactosa (3 g, 16.65 mmol) en 2-bromoetanol (30 ml), resina Amberlite 120-H hasta alcanzar un pH 2. La reacción se agita durante 16 horas a 50-60 °C. La mezcla de reacción se filtra y se lava con MeOH. Se añade trietilamina hasta alcanzar un pH de 8. Lo crudo de la reacción se concentra y evapora tres veces con tolueno. La mezcla de reacción es una piridina disuelta (75 ml) y AC20 (35 ml) y se añaden una cantidad catalítica de DMAP a 0 °C y se agita durante 3 h a ta. La mezcla se diluye con AcOEt y se lava con 1. H<sub>2</sub>O, 2. HCl (al 10 %) 3. NaHCO<sub>3</sub> dis 4. H<sub>2</sub>O. La capa orgánica se recolecta y se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El TLC (Hexano: AcOEt 3:1, 2 eluciones) presenta un producto mayor (lo que es deseado) y una menor minoría de R<sub>f</sub>. El producto se purifica por cromatografía de flash utilizando la mezcla de hexano:acetato de etilo 6:1 como eluyente y se obtiene el 2-bromoetil-alfa-galactósido (2).

20 El producto de la reacción previa, 2 se disuelve en 27 ml de 2-butanona. A esta solución, se añadieron una cantidad catalítica de yoduro de tetrabutilamonio y 4 equivalentes de tioacetato de potasio. La suspensión resultante se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. A lo largo de este periodo la reacción se ensayó por TLC (hexano-AcOEt y se lavó con solución de NaCl saturada. La fase orgánica se seca, se filtra y se evapora al vacío. El producto se purifica en hexano/ACOEt 2:1 → 1:1 para obtener el acetiltio-alfa-galactósido 3.

25 El nuevo producto de la reacción , 3 se disuelve en una mezcla de diclorometano-metanol 2:1. A esta mezcla se añade una solución de metóxido sódico 1 N (1 equivalente) y se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añade resina Amberlite IR-120H hasta alcanzar un pH de 5-6. La mezcla resultante se filtra entonces y se concentra hasta que se seque para obtener el producto final ( $\alpha$ -galactosa C2SH).

30 **Preparación del enlazador amino-tiol**



35 A una solución de PPh<sub>3</sub> (3 g, 11,4 mmol) en 20 ml, se añaden 20 ml de THF seco, DIAC (2,3 G, 11,4 MMOL). La mezcla se deja agitando a 0 °C 15 min hasta la aparición de un producto blanco. A esta mezcla se añade gota a gota una solución de hexaetilenglicol (1,45 ml, 5,7 mmol) y HSAc (510 ul, 8,55 mmol) en THF seco (20 ml) (adición en embudo). Después de 15 min los productos comienzan a aparecer en el TLC a R<sub>f</sub> 0,2. La solución se concentra en

un evaporador. Lo bruto de la reacción se disuelve en 50 ml de diclorometano y se lava con una solución de  $K_2CO_3$  al 10 %. La fase orgánica se seca sobre  $Na_2SO_4$  anhidro, se filtra y se concentra al vacío. La cromatografía de Flash de lo bruto utilizando ACOEt:Hexano 1:1, AcOEt y finalmente DMC:MeOH 4:1 como eluyente daban el derivado acetil-tio-hexaetilenglicol.

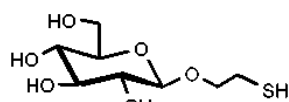
5 El producto de reacción se disuelve en 5 ml de DMF y  $PPh_3$  (2,25 g, 8,55 mmol), se añaden  $NaN_3$  (0,741 g, 11,4 mmol) y  $BrCl_3C$  (0,845 ml, 8,55 mmol) y posteriormente se agita la solución durante 40 min a temperatura ambiente. El producto resultante tiene una  $R_f$  más alta que el producto de partida cuando se lleva a cabo la TLC (DCM:MeOH 25:1). La mezcla de reacción se diluye con 100 ml de dietiléter y se lava tres veces con  $H_2O$ . La fase orgánica se  
10 se seca sobre  $Na_2SO_4$  anhidro, se filtra y se evapora al vacío. El producto se purifica por cromatografía flash utilizando la mezcla de eluyentes DMC/MeOH 200:1 y DCM/MeOH 40:1 para obtener el derivado azido-acetiltio-hexaetilenglicol.

15 Para retirar el óxido de trifenil fosfina, el producto de la reacción se disuelve en 10 ml de THF y se añaden 0,5 g de  $MgCl_2$  a esta solución. La reacción se agita durante 2 h a 80 °C hasta que aparece un precipitado blanco y entonces se filtra a través de celita.

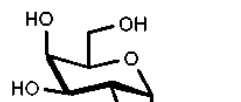
20 El producto se disuelve en una mezcla de etanol: $H_2O$  3:1 y se añade polvo de Zn (0,45 g, 6,84 mmol) y  $NH_4Cl$  (0,6 g, 11,4 mmol). La reacción se agita a reflujo durante 1 h hasta que no se detecta más la presencia de material de partida por TLC (CDM/MeOH 25:1). La reacción se filtra a través de celita y el disolvente se evapora. Lo crudo de la reacción se diluye con AcOEt y se extrae con 5 ml de  $H_2O$ . La fase acuosa se evapora hasta que se seca para obtener el producto amino-tiol-hexaetilenglicol.

### 25 Ejemplo 2 – Preparación de las nanopartículas de oro mezcladas

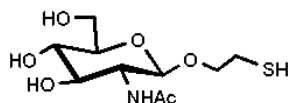
30 El derivado de beta-glucosa C2 1, el derivado de N-acetilglucosamina C2 2, el derivado de alfa-galactosa C2 3, el derivado de alfa glucosa C2 4, el derivado de glucosamina C5 5 y el enlazador de hexaetilenglicol amina 6 se tomaron del inventario de Midatech Biogune. El hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimida (EDC-HC1),  $H AuCl_4$ ,  $NaBH_4$  se adquirieron en Sigma-Aldrich Chemical Company. El imidazol-4-ácido acético monohidrocloreuro se adquirió en Alfa Aesar Company. Se utilizaron MeOH y agua nanopura (18,1 mQ) de alta calidad para todos los experimentos y soluciones.



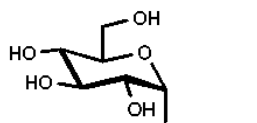
1



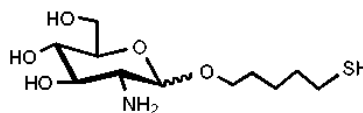
3



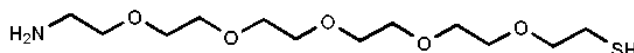
2



4



5

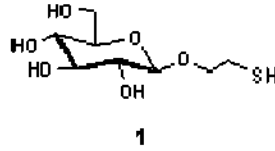


6

35

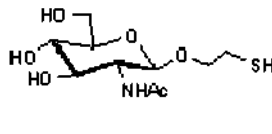
**Nomenclatura de los ligandos**

GlcC2



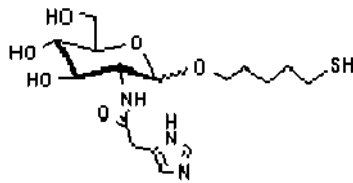
5 il-β-D-glucopiranosido (beta)

GlcNHAcC2



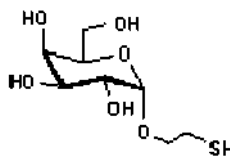
10 2'-tioetil-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (beta)

GlcNH2-IAA-C5



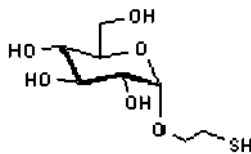
15 5' -tiopentanal-2-desoxi-2-imidazolacetamido-α, β-D-glucopiranosido (alfa, beta, mezcla de isómeros)

α-GalC2 (alfa)



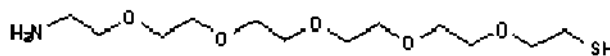
20 2'-tioetil-α-D-galactopiranosido (alfa)

α-GlcC2 (alfa)



25 2'-tioetil-α-D-glucopiranosido

EG6NH2



30 1-amino -17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol o  
1-amino -6-mercapto-hexaetilenglicol (nombre vulgar)

**Preparación de nanopartículas (NP) que tienen una pluralidad de ligandos**NP-GlcC2(9)GlcNAc(1)

5 A una solución de 1 (21,6 mg, 90  $\mu\text{mol}$ ) y 2 (2,8 mg, 10  $\mu\text{mol}$ ) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa de 0,025 M de  $\text{HAuCl}_4$  (1,33 ml, 33  $\mu\text{mol}$ ). La solución se agitó durante 30 segundos y entonces se añadió una solución acuosa de  $\text{NaBH}_4$  1 N (0,67 ml, 0,67 mmol) en varias partes (134  $\mu\text{l}$  x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. La capa de metanol se retiró y el aglomerado se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración con centrifugación (10 kDa AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, se lavó con 2 ml de agua. El resto se disolvió en 7 ml de agua. Se secó por congelación una alícuota para la cuantificación. [NP] = 0,8 mg/ml.

15 Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 9:1 de GlcC2:GlcNAc "*NP-GlcC2 (9) GlcNAc (1)*" se muestra en la Figura 1.

NP-GlcC2(4)GlcNAc(1)

20 A una solución de 1 (19,2 mg, 80  $\mu\text{mol}$ ) y 2 (5,6 mg, 20  $\mu\text{mol}$ ) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa de 0,025 M de  $\text{HAuCl}_4$  (1,33 ml, 33  $\mu\text{mol}$ ). La solución se agitó durante 30 segundos y entonces se añadió una solución acuosa de  $\text{NaBH}_4$  1 N (0,67 ml, 0,67 mmol) en varias partes (134  $\mu\text{l}$  x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. La capa de metanol se retiró y el aglomerado se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración con centrifugación (10 kDa AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, se lavó con 2 ml de agua. El resto se disolvió en 7 ml de agua. Se secó por congelación una alícuota para la cuantificación. [NP] = 0,8 mg/ml.

30 Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 4:1 de GlcC2:GlcNAc "*NP-GlcC2 (4) GlcNAc (1)*" se muestra en la Figura 2.

NP-GlcC2(1)GlcNAc(1)

35 A una solución de 1 (12 mg, 50  $\mu\text{mol}$ ) y 2 (14 mg, 50  $\mu\text{mol}$ ) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa de 0,025 M de  $\text{HAuCl}_4$  (1,33 ml, 33  $\mu\text{mol}$ ). La solución se agitó durante 30 segundos y entonces se añadió una solución acuosa de  $\text{NaBH}_4$  1 N (0,67 ml, 0,67 mmol) en varias partes (134  $\mu\text{l}$  x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. La capa de metanol se retiró y el aglomerado se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración con centrifugación (10 kDa AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, se lavó con 2 ml de agua. El resto se disolvió en 7 ml de agua. Se secó por congelación una alícuota para la cuantificación. [NP] = 0,9 mg/ml.

40 Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcC2:GlcNAc "*NP-GlcC2 (1) GlcNAc (1)*" se muestra en la Figura 3.

NP-GlcC2(1)GlcNAc(9)

45 A una solución de 1 (2,4 mg, 10  $\mu\text{mol}$ ) y 2 (25,3 mg, 90  $\mu\text{mol}$ ) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa de 0,025 M de  $\text{HAuCl}_4$  (1,33 ml, 33  $\mu\text{mol}$ ). La solución se agitó durante 30 segundos y entonces se añadió una solución acuosa de  $\text{NaBH}_4$  1 N (0,67 ml, 0,67 mmol) en varias partes (134  $\mu\text{l}$  x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. La capa de metanol se retiró y el aglomerado se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración con centrifugación (10 kDa AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, se lavó con 2 ml de agua. El resto se disolvió en 7 ml de agua. Se secó por congelación una alícuota para la cuantificación. [NP] = 0,8 mg/ml.

55 Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:9 de GlcC2:GlcNAc "*NP-GlcC2 (1) GlcNAc (9)*" se muestra en la Figura 4.

NP-GlcC2(1)alfa-Gal(1)

60 A una solución de 1 (12 mg, 50  $\mu\text{mol}$ ) y 3 (12 mg, 50  $\mu\text{mol}$ ) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa de 0,025 M de  $\text{HAuCl}_4$  (1,33 ml, 33  $\mu\text{mol}$ ). La solución se agitó durante 30 segundos y entonces se añadió una solución acuosa de  $\text{NaBH}_4$  1 N (0,67 ml, 0,67 mmol) en varias partes (134  $\mu\text{l}$  x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. La capa de metanol se retiró y el aglomerado se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración con centrifugación (10 kDa AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, se lavó con 2 ml de agua. El resto se disolvió en 7 ml de agua. Se secó por congelación una alícuota para la cuantificación. [NP] = 0,7

mg/ml.

Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcC2:alfa-Gal “*NP-GlcC2 (1) alfa-Gal (1)*” se muestra en la Figura 5.

NP-betaGlcC2(1)EG6NH2(1)

A una solución de 1 (12 mg, 50 umol) y 6 (14,85 mg, 50 umol) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa de 0,025 M de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> (1,33 ml, 33 umol). La solución se agitó durante 30 segundos y entonces se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> 1 N (0,67 ml, 0,67 mmol) en varias partes (134 ul x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. La capa de metanol se retiró y el aglomerado se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración con centrifugación (10 kDa AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, se lavó con 2 ml de agua. El resto se disolvió en 7 ml de agua. Se secó por congelación una alícuota para la cuantificación. [NP] = 0,9 mg/ml.

Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de betaGlcC2:EG6NH2 “*NP-betaGlcC2 (1) EG6NH2 (1)*” se muestra en la Figura 6.

NP-GlcNHAc(1)EG6NH2(1)

A una solución de 2 (14 mg, 50 umol) y 6 (14,85 mg, 50 umol) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa de 0,025 M de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> (1,33 ml, 33 umol). La solución se agitó durante 30 segundos y entonces se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> 1 N (0,67 ml, 0,67 mmol) en varias partes (134 ul x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. La capa de metanol se retiró y el aglomerado se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración con centrifugación (10 kDa AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, se lavó con 2 ml de agua. El resto se disolvió en 7 ml de agua. Se secó por congelación una alícuota para la cuantificación. [NP] = 0,6 mg/ml.

Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcNHAc:EG6NH2 “*NP-GlcNHAc (1) EG6NH2 (1)*” se muestra en la Figura 7.

NP-alfa-Glc(1)EG6NH2(1)

A una solución de 4 (12 mg, 50 umol) y 6 (14,85 mg, 50 umol) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa de 0,025 M de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> (1,33 ml, 33 umol). La solución se agitó durante 30 segundos y entonces se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> 1 N (0,67 ml, 0,67 mmol) en varias partes (134 ul x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. La capa de metanol se retiró y el aglomerado se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración con centrifugación (10 kDa AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, se lavó con 2 ml de agua. El resto se disolvió en 7 ml de agua. Se secó por congelación una alícuota para la cuantificación. [NP] = 0,8 mg/ml.

Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de alfa-Glc:EG6NH2 “*NP-alfa-Glc (1) EG6NH2 (1)*” se muestra en la Figura 8.

NP-alfa-Glc

A una solución de 4 (24 mg, 100 umol) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa de 0,025 M de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> (1,33 ml, 33 umol). La solución se agitó durante 30 segundos y entonces se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> 1 N (0,67 ml, 0,67 mmol) en varias partes (134 ul x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. La capa de metanol se retiró y el aglomerado se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración con centrifugación (10 kDa AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, se lavó con 2 ml de agua. El resto se disolvió en 7 ml de agua. Se secó por congelación una alícuota para la cuantificación. [NP] = 1,0 mg/ml.

Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos de “*NP-alfa-Glc*” se muestra en la Figura 9.

NP-GlcC2(1)GlcNH IAA(1)

A una solución de 1 (12 mg, 50 umol) y 5 (12 mg, 50 umol) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa de 0,025 M de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> (1,33 ml, 33 umol). La solución se agitó durante 30 segundos y entonces se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> 1 N (0,67 ml, 0,67 mmol) en varias partes (134 ul x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. La capa de metanol se retiró y el aglomerado se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración con

centrifugación (10 kDa AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, se lavó con 2 ml de agua. El resto se disolvió en 8 ml de MES 100 mM y se trató con EDC (153 mg, 0,8 mmol) e imidazol-4-monohidrocloreuro de ácido acético (81 mg, 0,5 mmol) durante 14 h. La mezcla se purificó por filtración con centrifugación (10 kDa AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). Se secó por congelación una alícuota para la cuantificación. [NP] = 0,9 mg/ml.

Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcC2:GlcNH IAA "NP-GlcC2 (1) GlcNH\_IAA (1)" se muestra en la Figura 10.

#### NP-alfa-Gal(1)EG6NH2(1)

Preparación de nanopartículas de amino alfa-gal oro del lote MI-NP-10-AMINO-GAL: A una mezcla del enlazador amino-mercapto hexaetilenglicol 6 y el ligando alfa-galactosa 3 en una relación 1:1 (0,58 mmol, 3 eq.) en MeOH (49 ml) se añadió una solución acuosa de sal de oro (7,86 ml, 0,19 mmol, 0,025 M). La reacción se agitó durante 30 segundos y entonces se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> (1 N) en varias partes (4,32 ml, 4,32 mmol). La reacción se agitó durante 100 minutos a 900 rpm. Después de este tiempo, la suspensión se centrifugó 1 minuto a 14000 rpm. El sobrenadante se retiró y el precipitado se disolvió en 2 ml de agua. Después, se introdujeron 2 ml de la suspensión en dos filtros (AMICON, 10 kDa, 4 ml) y se centrifugaron 15 min a 4500 g. El resto que quedó en el filtro se lavó dos veces más con agua. El resto final se disolvió con 80 ml de agua.

Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de alfa-Gal:EG6NH2 "NP-alfa-Gal (1) EG6NH2 (1)" se muestra en la Figura 11.

Para la preparación de nanopartículas de oro, la manipulación fue en una cabina de flujo laminar. Todo el material de plástico y cristal (tal como los eppendorf, viales y botellas) y el disolvente (agua, HAc) se esterilizaron primero en un autoclave. Todos los demás desechables (tales como tapones y filtros) venían pre-esterilizados.

#### 30 Ejemplo 3 – Unión de la insulina a las nanopartículas

El siguiente método detalla como se llevó a cabo la unión de la insulina a NP alfaGal(1) EG6NH2(1). El método utilizaba niveles fijos de insulina y variables de NP, se utilizaron niveles más bajos/diferentes de NP para las otras NP ensayadas, pero con esta excepción, el método era el mismo para todas las NP ensayadas.

Preparación de la solución de insulina de reserva; un peso de 20 mg de insulina humana en un vial limpio de cristal y con 8,7 ml de HCl 10 mM añadido se mezcla suavemente hasta disolver la insulina completamente, luego se vuelve a un pH de 7,5 añadiendo 1,3 ml de base Tris 100 mM, la solución se pone turbia brevemente según la insulina pasa su punto isoeléctrico, se comprueba que el pH sea 7,5 y se almacena tapado a 4 °C, esta es la solución de insulina de reserva de 2 mg/ml.

Se añaden cantidades variables de NP alfaGal(1) EG6NH2(1) a un eppendorf o vaso de tamaño adecuado, por ejemplo; NP con 15, 30, 60, 120, 240 y 480 nmoles de contenido de oro hasta hacer un volumen total de 200 ul con agua, después se añadieron 50 ul de insulina humana (2 mg/ml en Tris HCl pH 7,5 – véase anteriormente para la preparación de la solución de insulina de reserva). Se mezcla suavemente y se deja a temperatura ambiente durante 3 h, seguido por una centrifugación de mesa (2000 rpm) para bajar el agregado. Se debería preparar un tubo convencional que tenga justo 200 ul de agua y 50 ul de insulina para dar el valor máximo de sobrenadante, así como se tendría un blanco, es decir, 50 ul de Tris HCl pH 7,5 + 200 ul de agua. Si se necesita una alta precisión, se lleva una muestra que contenga una cantidad conocida de NP alfaGal(1) EG6NH2(1) es decir un contenido de oro de 10 ug hasta 200 ul con agua, y se añaden 50 ul de tampón de insulina (Tris HCl pH 7,5), esto se puede utilizar para corregir el resultado ligeramente positivo que de la NP alfaGal(1) EG6NH2(1) en el ensayo BCA, véase posteriormente\*.

El ensayo de los sobrenadantes, 20 ul por triplicado mediante un ensayo de micro BCA convencional (Kit Pierce 23235), dará los datos que muestran cuánta insulina permanece en el sobrenadante. Restando este valor del valor de la insulina de referencia sola se calcula la cantidad de insulina unida a las NP, también se puede expresar en porcentaje si se necesita. Los datos obtenidos aquí muestran la cantidad de NP alfaGal(1) EG6NH2(1) que se necesita para unir al máximo los 100 ul de insulina utilizada, estas condiciones se pueden subir de escala para producir la cantidad de NP alfaGal(1) EG6NH2(1)-insulina necesarias.

\* Los datos se pueden corregir en cuanto a la ligera interferencia de las NP alfaGal(1) EG6NH2(1) libres en el ensayo BCA. Para hacer esto se lleva a cabo un análisis del oro de todas las muestras finales y se calcula cuanto oro permanece en los distintos sobrenadantes, y se verán altos niveles en las muestras con un exceso de NP respecto a insulina. Se utiliza el valor de BCA para las NP con 10 ul de contenido de oro para corregir el contenido de oro visto según se demuestra en el siguiente ejemplo:

Si las NP con un contenido de oro de 10 ug sin insulina de 0,5 por el BCA y el sobrenadante de NP de ensayo

con 40 ug de Au da un BCA de 1,25, y también muestra un contenido de oro de 5 ug, esto significa que 0,25 del valor de BCA (el 50 % de 0,5) es debido actualmente a las NP libres, por lo tanto el valor corregido para el sobrenadante de NP de ensayo con 40 ug de oro sería de 1,00 en vez de 1,25. Esto es un ejemplo simplificado, ilustrativo, de que el factor de corrección será mínimo cuando el contenido de oro del sobrenadante sea bajo.

5 La cantidad de insulina humana unida (en nmoles) por cantidad de oro (en nmoles) se muestra en la Figura 12, en la que:

10 Glc = 2'-tioetil- $\beta$ -D-glucopiranosido ;

GlcNAc = 2'-tioetil-2-acetamido-2-desoxi-  $\beta$ -D-glucopiranosido;

15 GlcaminelAA = 5'-tiopentanol-2-desoxi-2-imidazolacetamido-  $\alpha$ ,  $\beta$ -D-glucopiranosido (alfa, beta mezcla de isómeros);

AGal = 2'-tioetil-  $\alpha$  -D-galactopiranosido;

*EG6NH2* = 1-amino -17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol;

20 AGlc = 2'-tioetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido; y

Los números de la leyenda se refieren a la estequiometría del ligando

25 Como se puede ver en referencia al a Figura 12, se obtenía un grado relativamente alto de unión a la insulina utilizando nanopartículas que tienen una corona de AGal y *EG6NH2* en una relación aproximada de 1:1. La unión de la insulina también la mostraban partículas que tenían cualquiera de las siguientes composiciones de corona:

30 AGal: *EG6NH2* 1:1 (Trazo 11 Figura 12)

Glc:GlcaminelAA 1:1 (Trazo 10 Figura 12)

AGlc: *EG6NH2* 1:1 (Trazo 8 Figura 12)

BGlc: *EG6NH2* 1:1 (Trazo 6 Figura 12)

GlcNAc: *EG6NH2* 1:1 (Trazo 7 Figura 12).

35 Se descubrió que la insulina unida a las nanopartículas como se describen en el presente documento se podía volver a liberar al contactar con una solución fisiológica (por ejemplo, una solución salina) y se descubrió que se podía detectar de manera que se conseguía un resultado positivo en un ELISA para la insulina (humana). Estos resultados indican que las nanopartículas unidas a insulina de la invención proporcionan la insulina en una forma que es disponible para la interacción con sistemas y/o componentes biológicos. Por lo tanto, las nanopartículas son capaces de actuar como un vehículo/estabilizador de insulina (por ejemplo, para el almacenamiento y/o procesamiento para la incorporación en, por ejemplo, un producto farmacéutico) mientras que también mantiene la capacidad para presentar o poner a disposición la insulina (por ejemplo, la insulina monomérica) para que ejerza sus efectos biológicos, por ejemplo, a continuación del suministro a un sujeto, órgano o célula del mismo.

#### 45 Ejemplo 4 – Caracterización de las nanopartículas

##### I) Caracterización de nanopartículas de oro con insulina del lote MI-NP-10-Ins (NP-alfaGal(1) *EG6NH2*(1))

50 **a) Contenido de oro:** El contenido de oro se determinó utilizando un método basado en la formación de un complejo coloreado entre la etopropazina y el oro después de la oxidación completa a Au(III). La absorbancia de la muestra se mide a 513 nm y se comparó cuantitativamente con soluciones similares que tengan una cantidad conocida de oro.

Se determinó que el contenido de oro era (lote n° NP10): 262,5  $\pm$  56,3 mg/l.

**TEM:** Se muestra una imagen de microscopía de transmisión de electrones (TEM) de la suspensión de nanopartículas en la Figura 13.

55 Se determinó que la muestra tenía las siguientes características del núcleo de oro:

Recuento = 783

Media (de diámetro) = 2,323 nm  $\pm$  0,716 nm

Min. = 1,002 nm

60 Máx. = 4,859 nm

Modo = 2,104 nm

65 **d) Distribución de tamaño por dispersión dinámica de luz:** se determinó la distribución de número y volumen mediante dispersión dinámica de luz (DLS) para las nanopartículas MI-NP10 amina-gal (es decir, nanopartículas NP-alfa-Gal(1)*EG6NH2*(1)), y se muestran en la Figura 14A y B, respectivamente.



El valor del pico para el pico que se muestra en la Figura 14A es el siguiente:  
Pico 1 4,875 nm

5 El valor del pico para el pico que se muestra en la Figura 14B es el siguiente:  
Pico 1 5,289 nm

III) Preparación final de nanopartículas de oro e insulina Lote MI-NP-10-INS.

10 Se llevó una solución de nanopartículas de oro MI-NP-10 (13,041 mg de oro) hasta 49,68 ml de agua. A la solución final se añadió ácido acético hasta obtener un pH = 4,6. Después, se añadieron 55,7 mg de insulina humana en 27,85 ml de Tris HCl pH 7,5. La suspensión se dejó en reposo 234 horas y después de este tiempo se centrifugó 1 minuto a 4500 g. El sobrenadante se retiró y se almacenó para posteriores análisis de contenido de insulina y oro. El precipitado se resuspendió en 3,220 ml de agua para obtener una concentración final de insulina de 500 unidades de insulina/ml.

15 La distribución por tamaño de las nanopartículas de insulina-oro se determinó por análisis de DLS. El contenido de insulina se determinó por un análisis BCA convencional.

20 \*\* La preparación final de NP de oro insulina se fabricó en una cabina de flujo laminar. Todo el material de cristal y plástico (tal como los eppendorf y botellas) y el disolvente (tal como el agua, Tris HCl y HAc) que se utilizaron estaban esterilizados en autoclave. Todos los demás desechables (tales como puntas y filtros) venían pre-esterilizados.

25 **Caracterización:**

a) Distribución de tamaños por Dispersión dinámica de luz se muestra por número y volumen en la Figura 15A y B, respectivamente para las nanopartículas MI-NP-10-INS (nanopartículas amina-gal-INSULINA).

El valor del pico para el pico que se muestra en la Figura 15A es el siguiente:  
Pico 1 68,46 nm

30 El valor del pico para el pico que se muestra en la Figura 15B es el siguiente:  
Pico 1 88,38 nm

b) **Contenido de insulina:**

El % de insulina unida a las nanopartículas se determinó por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ insulina} = \frac{\text{insulina añadida} - \text{insulina en el sobrenadante}}{\text{insulina añadida}} \times 100$$

35

**Tabla 2 – Contenido de insulina**

Muestra	Insulina añadida (mg)	Insulina en el sobrenadante (mg)	Insulina unida (mg)	% de insulina unida
MI-NP-10 insulina	55,700	1,308	54,4	97,65

40 **Concentración de insulina y oro en nanopartículas NP-insulina**

Insulina: 55,7 mg de insulina

Oro: 13,041 mg de oro

Volumen total: 3,32 ml de agua

45 Concentración final de insulina: 17,25 mg de insulina/ml = 500 unidades/ml

Concentración final de oro: 4,037 mg Au/ml.

Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, los presentes inventores consideran lo siguiente:

50 102 átomos de Au/NP, para los cuales el resultado matemático es de 14 moléculas de insulina unidas a 1 NP. Aunque las consideraciones geométricas permiten un espacio para aproximadamente 7 moléculas de insulina en la superficie de la nanopartícula, estos resultados sugieren que cada NP contiene 7 unidades diméricas de insulina.

Una caracterización adicional de las nanopartículas de insulina oro del lote MI-NP-10-INS daba los siguientes resultados.

55

Concentración final de insulina: 17,25 mg de insulina/ml = 500 U/ml, determinada por el ensayo colorimétrico del ácido bicinchonico después de la calibración contra soluciones de insulina convencionalizadas de concentraciones conocidas.

Concentración final de oro: 4,037 mg Au/ml, determinado por un ensayo colorimétrico con el ensayo de etopropazina después de la calibración contra soluciones de oro convencionalizadas de concentraciones conocidas.

Volumen total: 3,23 ml en agua MilliQ.

5 Después de las consideraciones geométricas, una nanopartícula  $\alpha$ -galactosa-EG-amina-Au contiene un núcleo de oro con 102 átomos. Entonces:

$$4,037 \text{ mg} = 2,049 \times 10^{-5} \text{ moles} = 1,234 \times 10^{19} \text{ átomos} = 1,21 \times 10^{17} \text{ nanopartículas}$$

$$10 \quad 17,25 \text{ mg} = 2,97 \times 10^{-6} \text{ moles} = 1,789 \times 10^{18} \text{ moléculas}$$

Por lo tanto, una nanopartícula de  $\alpha$ -galactosa-EG6NH2-Au se une a aproximadamente entre 14 y 15 moléculas de insulina para producir la nanopartícula final.

15 Resultados del análisis termogravimétrico:

20 Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, los presentes inventores consideran que para la NP-insulina tenemos 500  $\mu\text{g}$  de peso seco en el que 410  $\mu\text{g}$  están descompuestos. Por lo tanto, el porcentaje orgánico es del 82 %. Considerando 102 átomos de oro en una nanopartícula  $\alpha$ -galactosa-EG6NH2-Au, el peso del oro sería de 20091 (un 18 %) y una corona orgánica 121223. Por lo tanto, para tener una partícula que sea un 82 % orgánica debe tener un peso de 111616 que es 91525 orgánico. Aunque 12122 de orgánico es la corona que deja aproximadamente 79403 del orgánico como la insulina. Aunque la insulina tiene un PM de 5808 entonces debe tener 14 moles de insulina por partícula.

25 La Figura 16 muestra los datos del análisis termogravimétrico experimental (TGA).

#### Ejemplo 5 – Optimización de Zn de unión a insulina

30 Se prepararon las nanopartículas de oro (NP), NP alfaGal(1)EG6NH2(1), como se ha descrito en el Ejemplo 2 anterior. Con el fin de evaluar la influencia de Zn sobre la unión de insulina a la NP, se sintetizó un primer lote de NP en ausencia de Zn. Se sintetizó un segundo lote de NP en presencia de 1,33 equivalentes de Zn. Se sintetizó un tercer lote de NP en ausencia de Zn, pero tenía 1,33 equivalentes de  $\text{ZnCl}_2$  añadidos a las NP después de la síntesis. La unión de la insulina humana a los tres lotes de NP de oro se midió entonces.

35 Los resultados se muestran en la Figura 17. La Figura 17 presenta un gráfico que muestra la cantidad de 17,2 nmoles fijos de insulina unida a concentraciones variables de NP de oro. La comparación de las NP sintetizadas sin Zn, una NP sintetizada con 1,33 eq, y NP libres de Zn con 1,33 eq de  $\text{ZnCl}_2$ .

40 El gráfico de la Figura 17 muestra que sin zinc presente la unión de insulina es a un nivel muy bajo. Cuando está presente el zinc la unión con insulina es significativamente más alta hasta cuantitativa. Una unión de insulina equivalente se produce si el zinc está presente durante la síntesis de NP o si se añade después de la síntesis.

45 Sin el deseo de estar ligados por teoría alguna, los presentes inventores creen que el catión  $\text{Zn}^{2+}$  proporciona una unión a la insulina mejorada a las NP de oro. Otras formas de Zn, tal como ZnO también pueden mediar una mejor unión a la insulina. En particular, la presencia de ZnO en la muestra de NP de oro que se han almacenado durante un periodo de meses indica que el ZnO puede formar y puede adicional o alternativamente un catión  $\text{Zn}^{2+}$  que media o facilita una unión mejorada de insulina a las NP.

50 La importancia del  $\text{Zn}^{2+}$  en la cristalización, forma y función de la insulina se había expuesto anteriormente. Sin embargo, los datos descritos en el presente documento indican que la insulina unida a las NP, que incluyen la presencia de  $\text{Zn}^{2+}$ , está en forma monomérica o dimérica más que en forma hexamérica más comúnmente asociada a la insulina humana en presencia de  $\text{Zn}^{2+}$  (es decir, insulina no unida a NP). Esto puede presentar una ventaja considerable en relación con la presente invención debido a que se prefiere la insulina monomérica o dimérica en muchos entornos (por ejemplo, entornos clínicos) en comparación con la insulina hexamérica.

55 Los presentes inventores han descubierto que la unión del GLP-1 a NP de oro (descritas en el presente documento) tiene lugar en presencia de Zn (incluyendo, pero sin limitación a  $\text{Zn}^{2+}$  y/o ZnO). La unión de GLP-1 a NP de oro descrita en el presente documento era a NP sintetizadas en presencia de Zn. Se contempla específicamente en el presente documento que el Zn puede estar presente en las composiciones de nanopartículas de oro unidas a GLP-1.

#### Ejemplo 6 – Unión de GLP-1 a nanopartículas de oro

65 Se prepararon nanopartículas (NP) de oro, NP alfaGal(1)EG6NH2(1) como se describe en el Ejemplo 2 anterior. Más que añadir insulina, se añadió GLP-1. Se describió que el GLP-1 se une a las NP. La unión de 29,8 nmoles de un

GLP-1 fijo a concentraciones variables de NP de oro se muestra en la Figura 18. Estos resultados demuestran que un péptido distinto de la insulina se une a las nanopartículas de la invención.

**Ejemplo 7 – Nanopartículas que se unen a más de una proteína: nanopartículas mixtas de insulina/GLP-1**

5 Las nanopartículas de oro (NP), NP alfaGal(1)EG6NH2(1), se prepararon como se describe en el Ejemplo 2 anteriormente. Se unieron Insulina y GLP-1 a la NP. Se sometió una solución acuosa de NP GLP-1/insulina a un análisis MALDI y los resultados se muestran en la Figura 19. Se sometieron las NP de GLP-1/insulina a HPLC y el trazo se muestra en la Figura 20. Los datos de la HPLC muestran que se medían 19,8 mg de insulina y 1,33 mg de  
10 GLP-1.

La reacción de unión se llevó a cabo utilizando una mezcla de 26,2 mg de insulina y 1,8 mg de GLP-1. Los datos de la HPLC demostraban que la relación aproximada de insulina:GLP-1 se mantenía al unirse a las nanopartículas.

15 Los datos de MALDI y HPLC demuestran que la unión mezclada de GLP-1 e insulina a las nanopartículas de oro. Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, los presentes inventores creen que la unión de dos o más especies de péptido a la nanopartícula de la invención puede ser preferida en ciertos entornos (por ejemplo, ciertos entornos clínicos) en comparación con la unión de una única especie de péptido. En particular, se pueden llevar a cabo combinaciones de péptidos en una nanopartícula de manera que los péptidos lleven a cabo mutuamente  
20 funciones beneficiosas y/o actúen en concierto, tal como de una manera sinérgica.

## REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula que comprende:

- 5 (i) un núcleo que comprende un metal; y  
 (ii) una corona que comprende una pluralidad de ligandos unidos covalentemente al núcleo, en donde al menos uno de dichos ligandos comprende un resto de carbohidrato; y  
 (iii) al menos un péptido unido no covalentemente a la corona.

10 2. La nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido se selecciona de entre el grupo que consiste en insulina, GLP-1, IGF1, IGF2, relaxina, INSL5, INSL6, INSL7, polipéptido pancreático (PP), péptido tirosina tirosina (PTT), neuropéptido Y, oxitocina, vasopresina, GnRH, TRH, CRH, GHRH/somatostatina, FSH, LH, TSH, CGA, prolactina, C1IP, ACTH, MSH, endorfinas, lipotropina, GH, calcitonina, PTH, inhibina, hCG, HPL, glucagones, somatostatina, timosina, thmulina, gastrina, grelina, timopoyetina,  
 15 CCK, GIP secretina, VIP, enteroglucagón, leptina, adiponectina, resistina, Osteocalcina, renina, EPO, ANP, BNP, quimiocinas, citocinas y adipocinas.

20 3. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido es insulina humana monomérica y/o dimérica.

4. La nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha pluralidad de ligandos unidos covalentemente al núcleo comprende al menos un primer ligando y un segundo ligando, en donde el primer y el segundo ligandos son diferentes y en donde:

- 25 (a) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil- $\alpha$ -D-galactopiranosido y dicho segundo ligando comprende 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol;  
 (b) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil- $\beta$ -D-glucopiranosido o 2'-tioetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido y dicho segundo ligando comprende 5'-tiopentanil-2-desoxi-2-imidazolacetamido- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-glucopiranosido;  
 30 (c) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil- $\beta$ -D-glucopiranosido o 2'-tioetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido y dicho segundo ligando comprende 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol; o  
 (d) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido y dicho segundo ligando comprende 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol,

35 y en donde dichos primer y segundo ligandos están unidos covalentemente al núcleo mediante sus átomos de azufre respectivos.

5. La nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la nanopartícula comprende un componente divalente, opcionalmente en donde:

- 40 (i) dicho componente divalente está presente en la corona de la nanopartícula; y/o  
 (ii) dicho componente divalente se selecciona de entre el grupo que consiste en zinc, magnesio, cobre, níquel, cobalto, cadmio o calcio, y óxidos y sales de los mismos.

6. La nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que:

- 45 (i) al menos un péptido comprende GLP-1; y/o  
 (ii) la nanopartícula comprende al menos dos especies diferentes de péptido unidos a la corona, opcionalmente en donde dichas al menos dos especies diferentes de péptido comprende insulina y GLP-1.

50 7. Una nanopartícula que comprende:

- (i) un núcleo que comprende un metal;  
 (ii) una corona que comprende una pluralidad de ligandos unidos covalentemente al núcleo, pluralidad de ligandos que comprende al menos un primer y un segundo ligando, en donde:

- 55 (a) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil- $\alpha$ -D-galactopiranosido y dicho segundo ligando comprende 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol;  
 (b) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil- $\beta$ -D-glucopiranosido o 2'-tioetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido y dicho segundo ligando comprende 5'-tiopentanil-2-desoxi-2-imidazolacetamido- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-glucopiranosido;  
 60 (c) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil- $\beta$ -D-glucopiranosido o 2'-tioetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido y dicho segundo ligando comprende 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol; o  
 (d) dicho primer ligando comprende 2'-tioetil-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido y dicho segundo ligando comprende 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol,

65 y en donde dichos primer y segundo ligandos están unidos covalentemente al núcleo mediante sus átomos de azufre respectivos.

8. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la nanopartícula comprende un componente divalente, opcionalmente en donde:

(i) dicho componente divalente está presente en la corona de la nanopartícula; y/o

5 (ii) dicho componente divalente se selecciona de entre el grupo que consiste en zinc, magnesio, cobre, níquel, cobalto, cadmio o calcio, y óxidos y sales de los mismos.

9. Una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de nanopartículas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, opcionalmente en donde la composición está formulada para la administración a un sujeto mamífero por vía intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), intradérmica (i.d.) o subcutánea (s.c).

10

10. Un método para la estabilización de al menos un péptido, que comprende poner en contacto el al menos un péptido con una nanopartícula, comprendiendo dicha nanopartícula: (i) un núcleo que comprende un metal y (ii) una corona que comprende una pluralidad de ligandos unidos covalentemente al núcleo, comprendiendo al menos uno de dichos ligandos un resto de carbohidrato, en condiciones que permitan al menos a un péptido unirse no covalentemente a la corona de la nanopartícula.

15

11. Una nanopartícula según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en un método de tratamiento médico.

20

12. Una nanopartícula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en un método de tratamiento médico, en donde el péptido es como se define en las reivindicaciones 3 o 6, y en donde el método es un método de tratamiento de diabetes en un sujeto mamífero que lo necesita, opcionalmente en donde dicho método comprende la administración de dicha nanopartícula por vía intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), intradérmica (i.d.) o subcutánea (s.c).

25

13. Un método para la formación de agrupamientos mesoscópicos de péptidos, polipéptidos o proteínas, teniendo embebidas dichos agrupamientos en ellos una o más nanopartículas según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo dicho método poner en contacto dichos péptido, polipéptido o proteína con dichas una o más nanopartículas a una temperatura ambiente de entre 15 °C y 30 °C o entre 20 °C y 25 °C.

30

14. Un método para la disociación de uno o más agrupamientos, comprendiendo dichos uno o más agrupamientos un agrupamiento mesoscópico de un péptido, un polipéptido o una proteína que tiene embebidas en él una o más nanopartículas como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo dicho método someter dichos agrupamientos a una temperatura desde 35 °C a la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) del péptido, polipéptido o proteína causando de esta manera que dichos uno o más agrupamientos se disocien en floculantes peptídicos-nanopartículas, floculantes polipeptídicos-nanopartículas o floculantes proteínas-nanopartículas.

35

15. Un método para la liberación de péptidos monoméricos de uno o más floculantes peptídicos-nanopartícula en una solución, comprendiendo dicho método aumentar la fuerza iónica del disolvente, en donde dichos floculantes peptídicos-nanopartículas comprenden una o más nanopartículas como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, opcionalmente en donde el método comprende la disolución de dichos uno o más floculantes peptídicos-nanopartículas en el plasma, el fluido intersticial o la saliva.

40

45

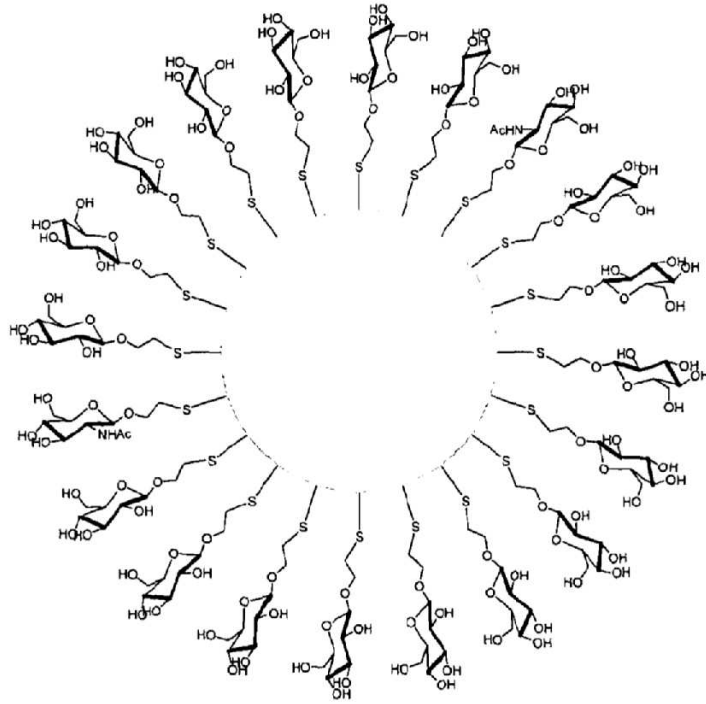


Figura 1

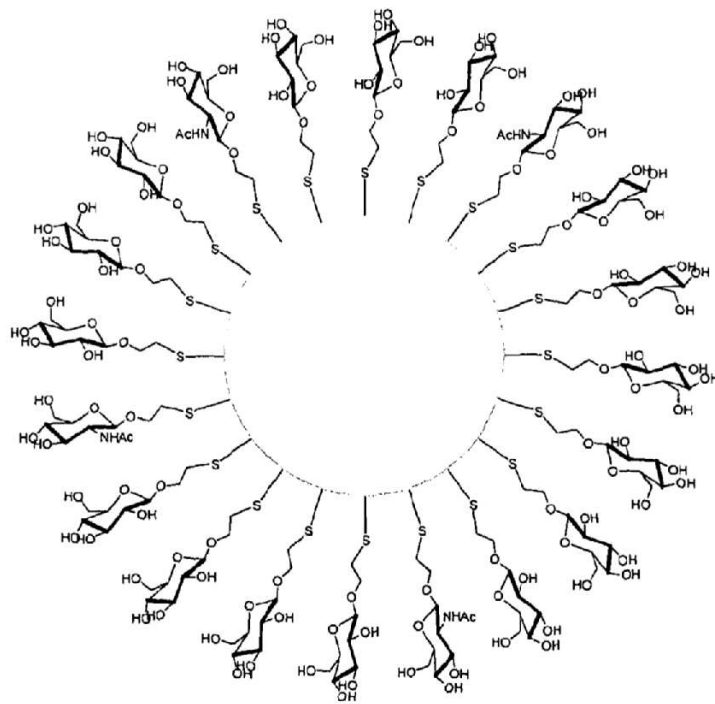


Figura 2

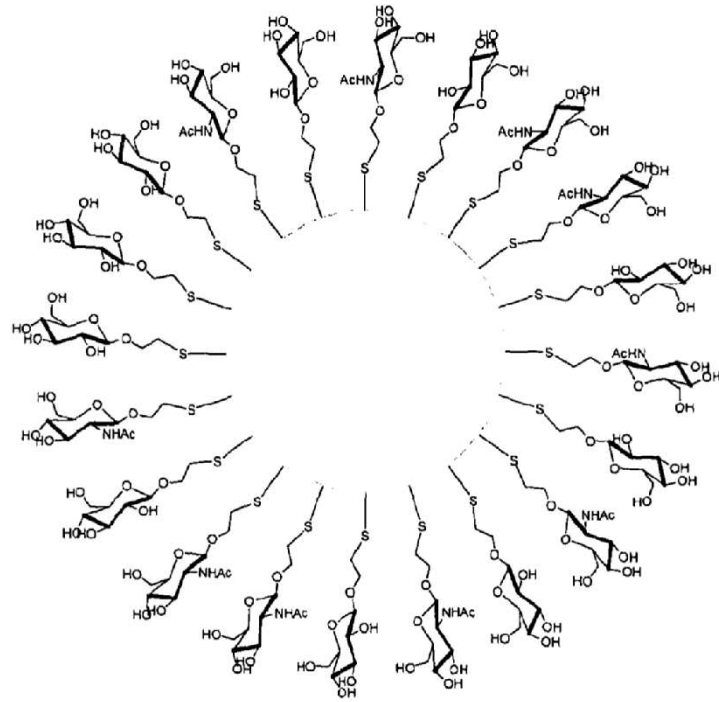


Figura 3

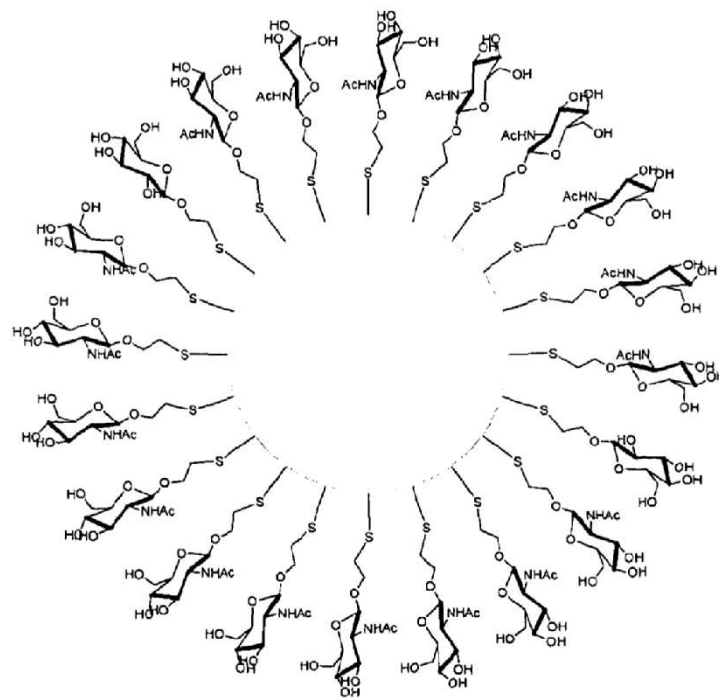


Figura 4

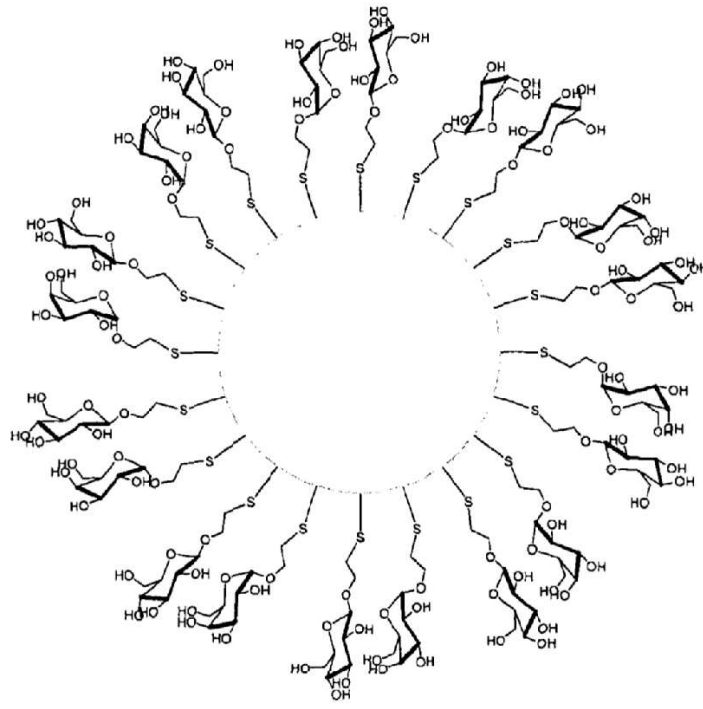


Figura 5

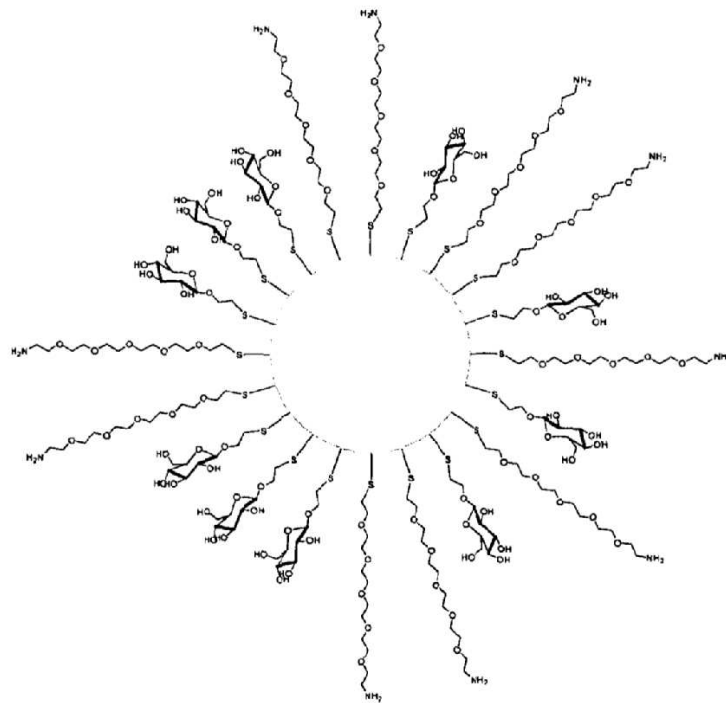


Figura 6



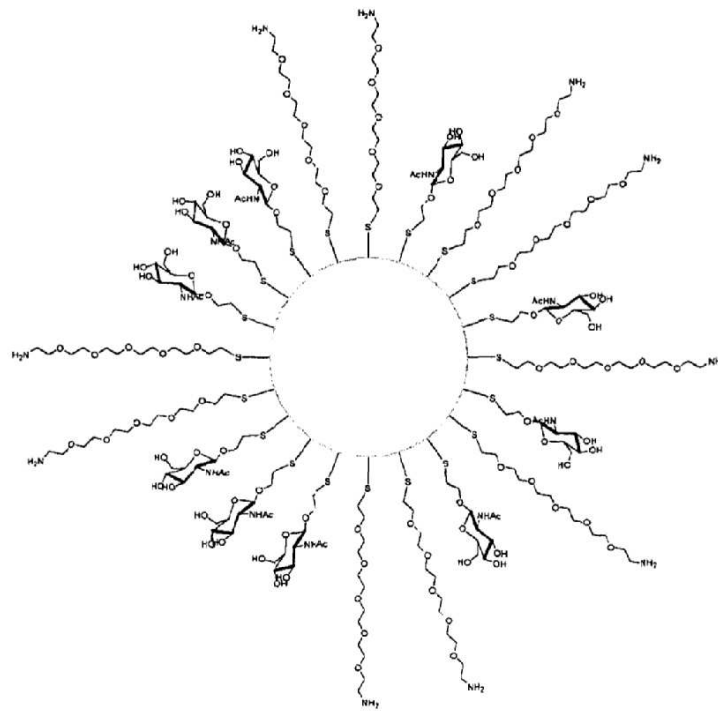


Figura 7

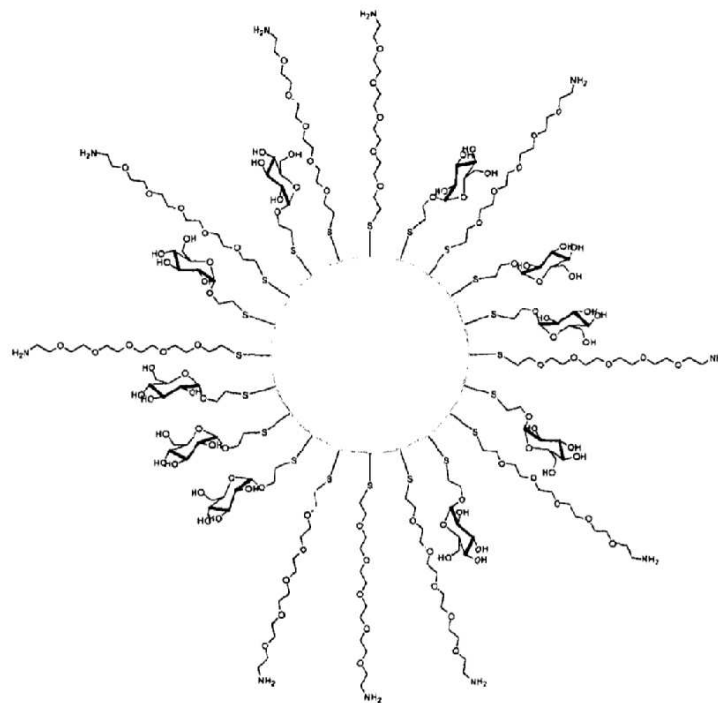


Figura 8

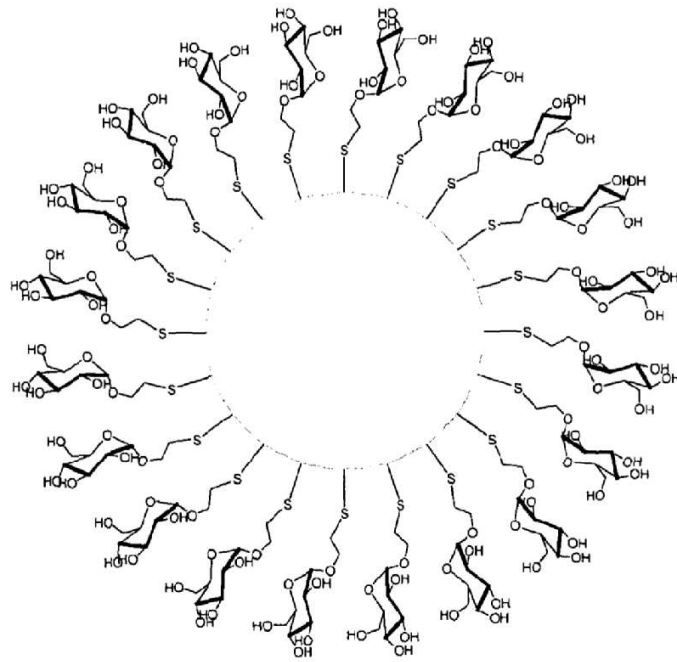


Figura 9

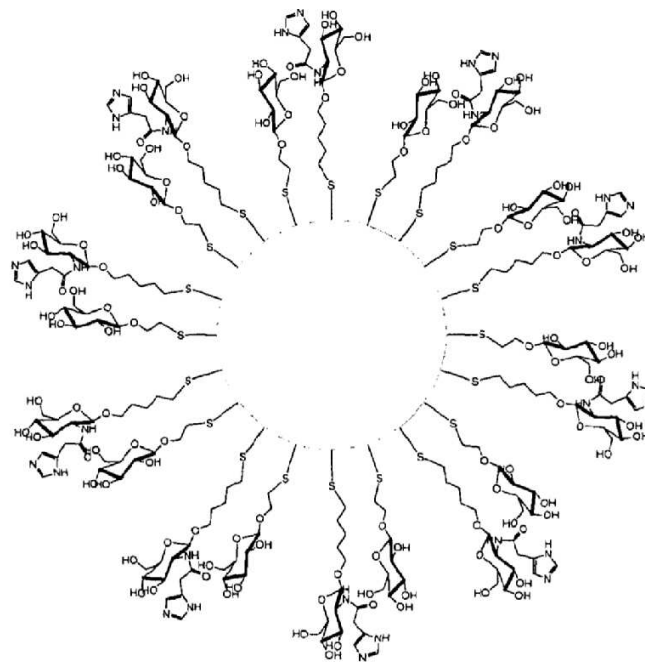


Figura 10

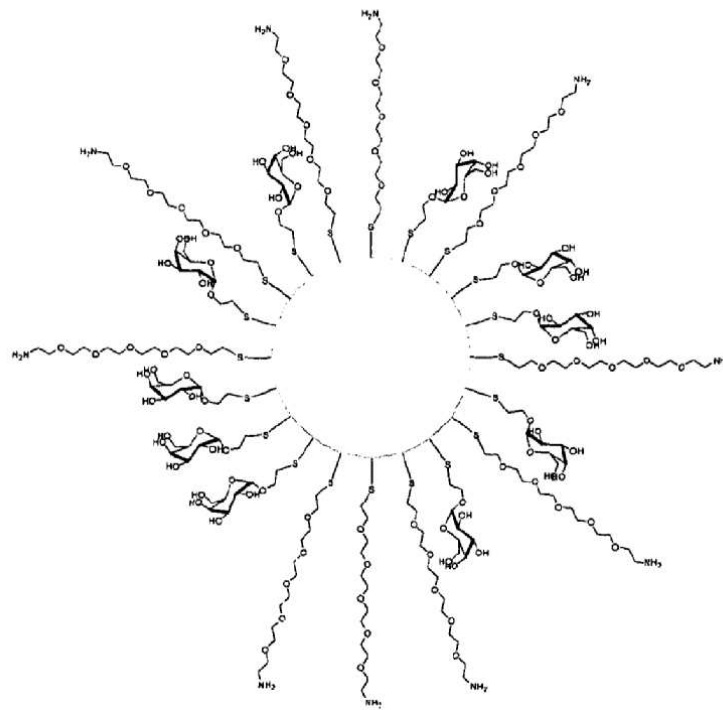


Figura 11

**Unión de insulina a 11 NP diferentes**

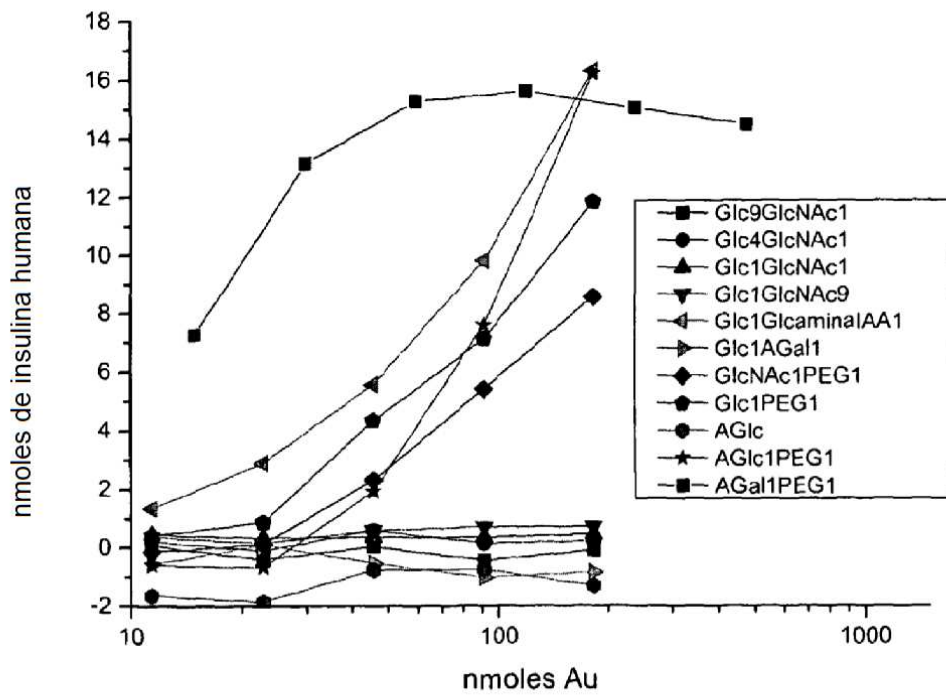
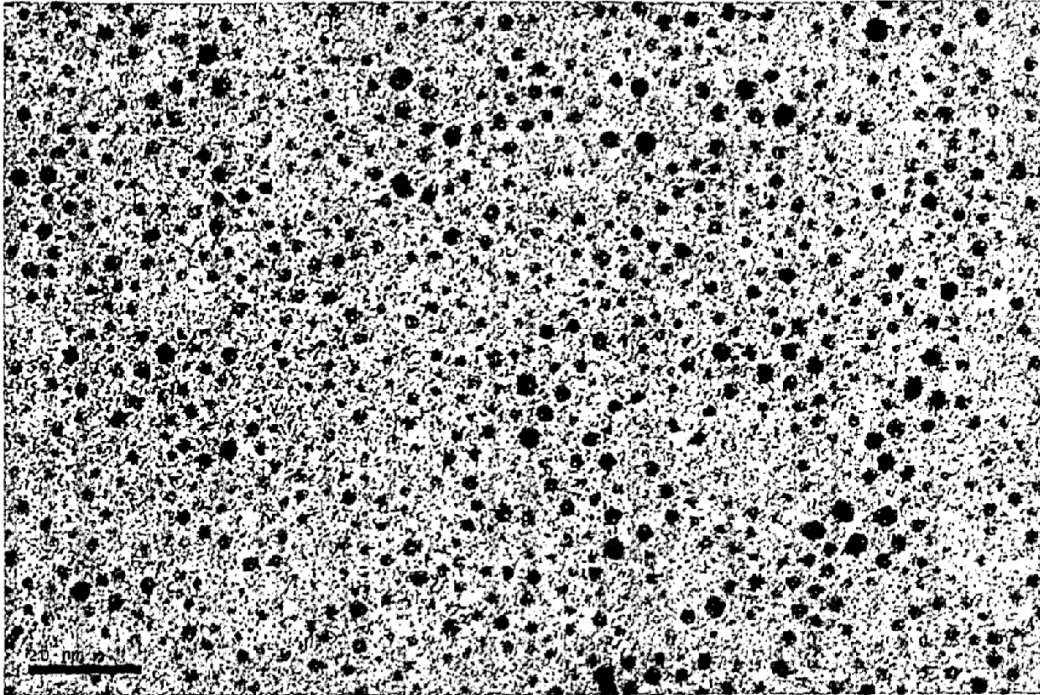
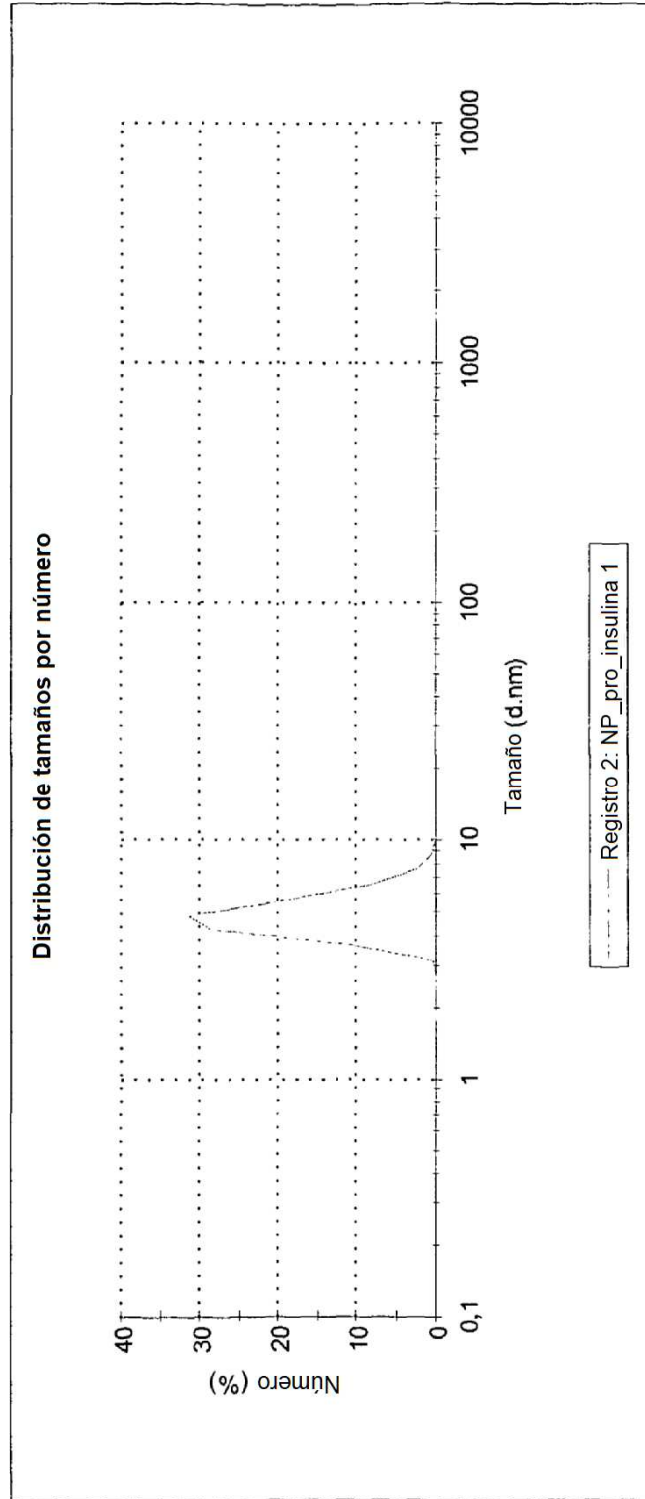


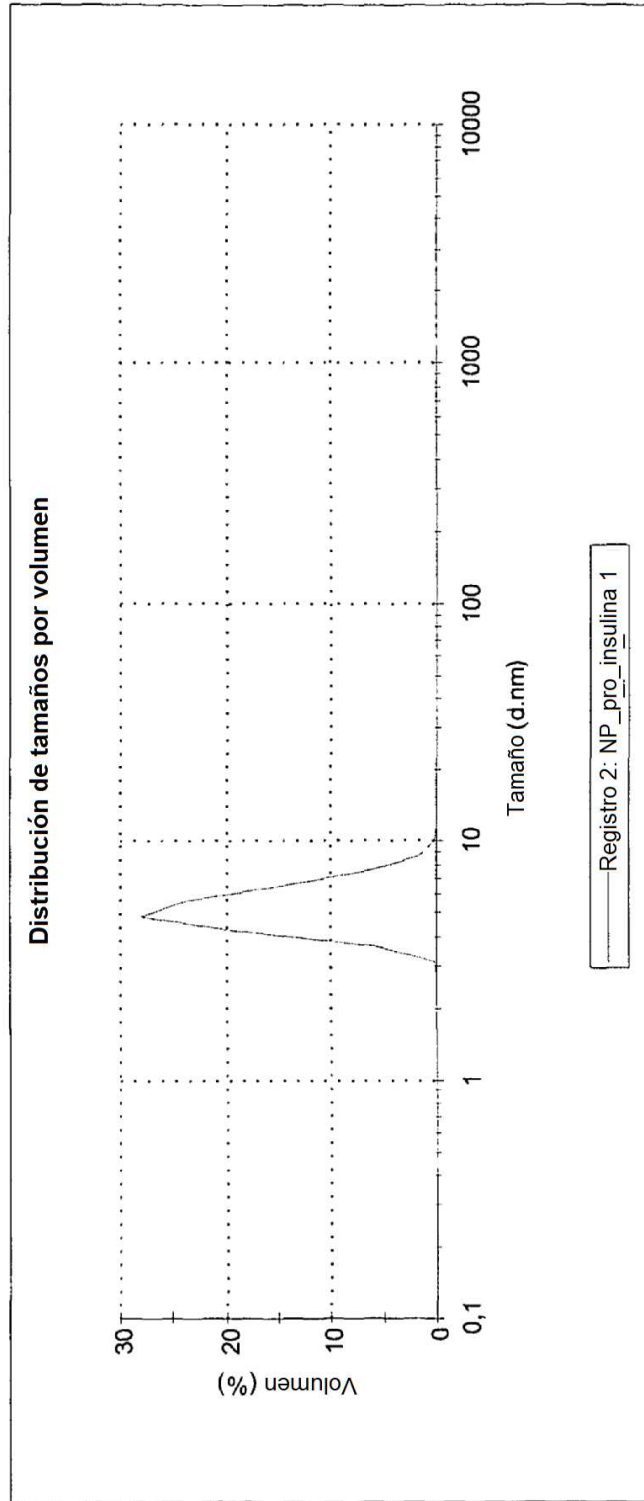
Figura 12



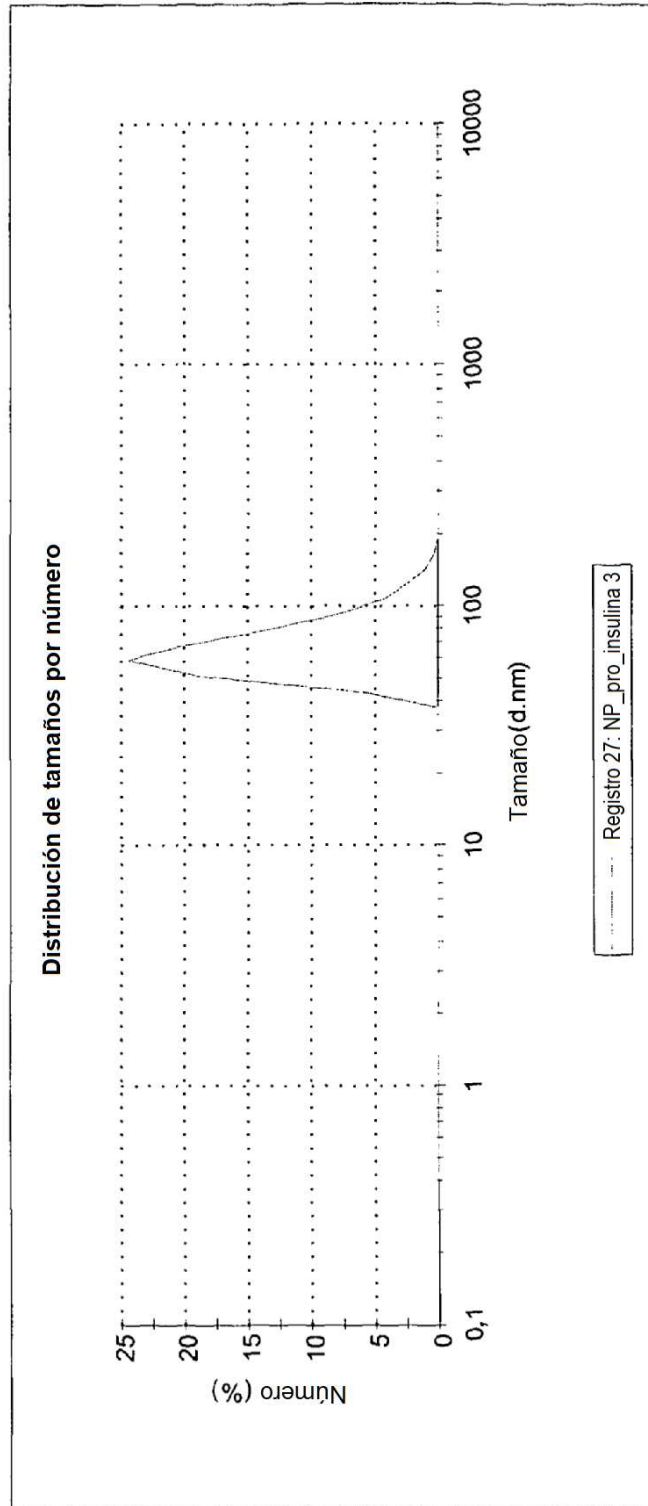
**Figura 13**



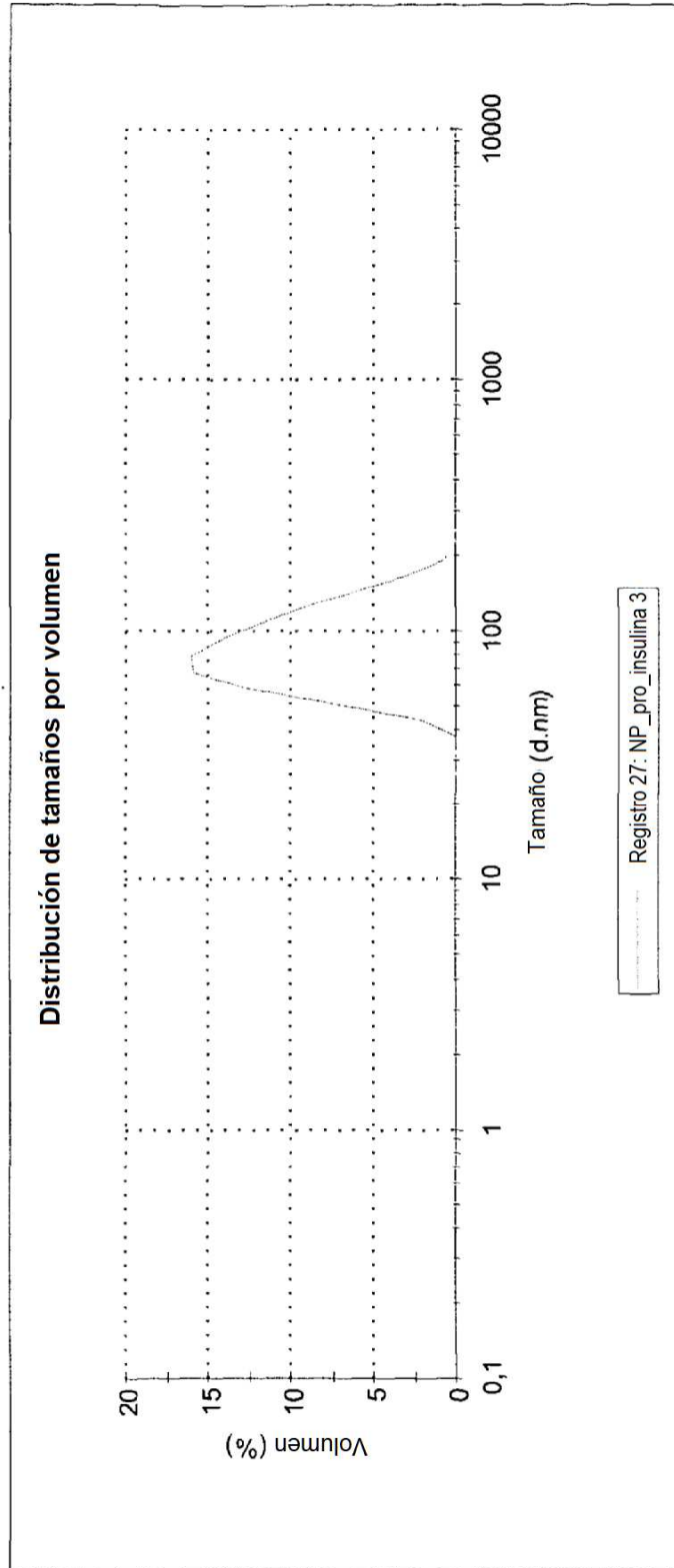
**Figura 14A**



**Figura 14B**



**Figura 15A**



**Figura 15B**



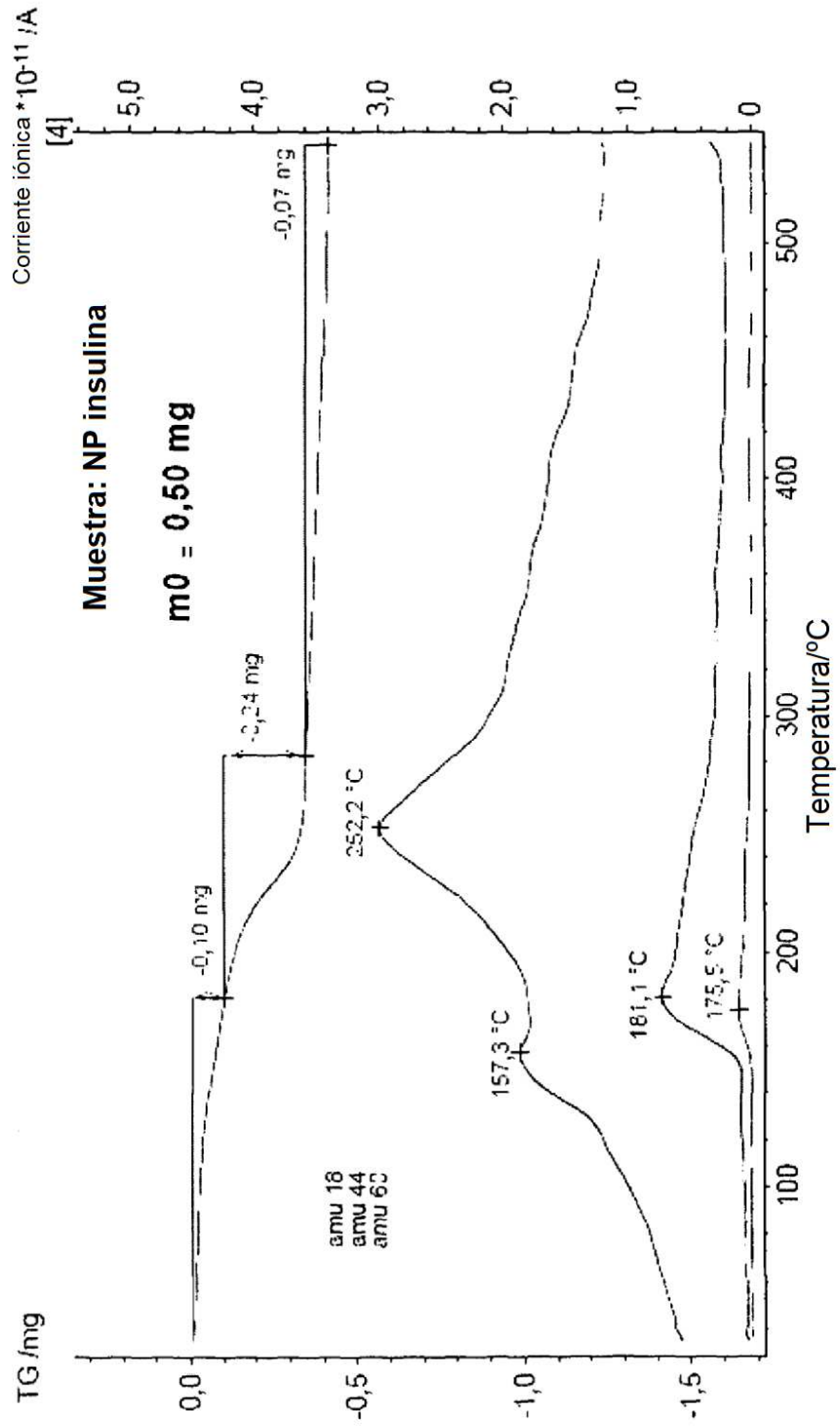


Figura 16

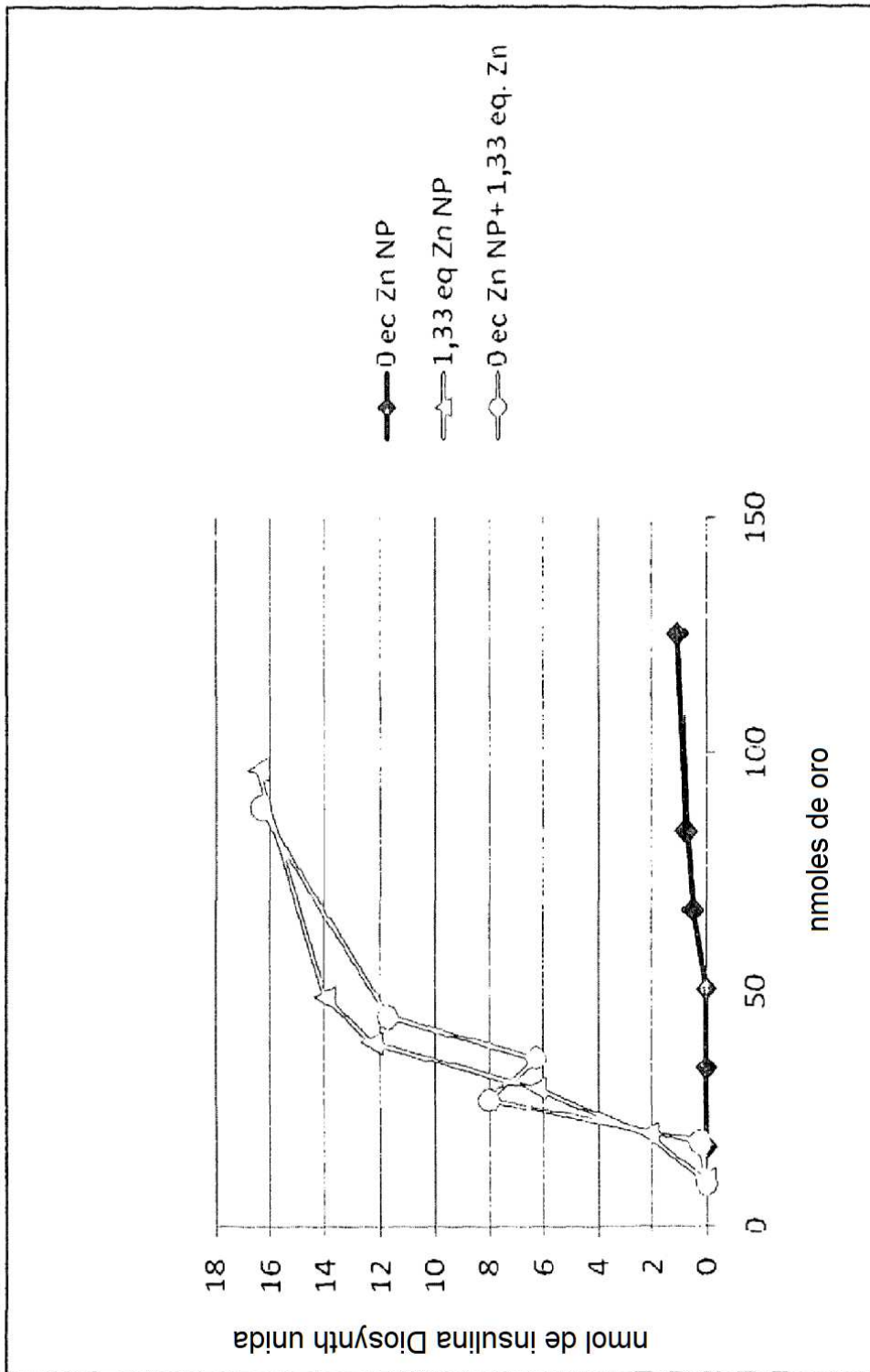


Figura 17

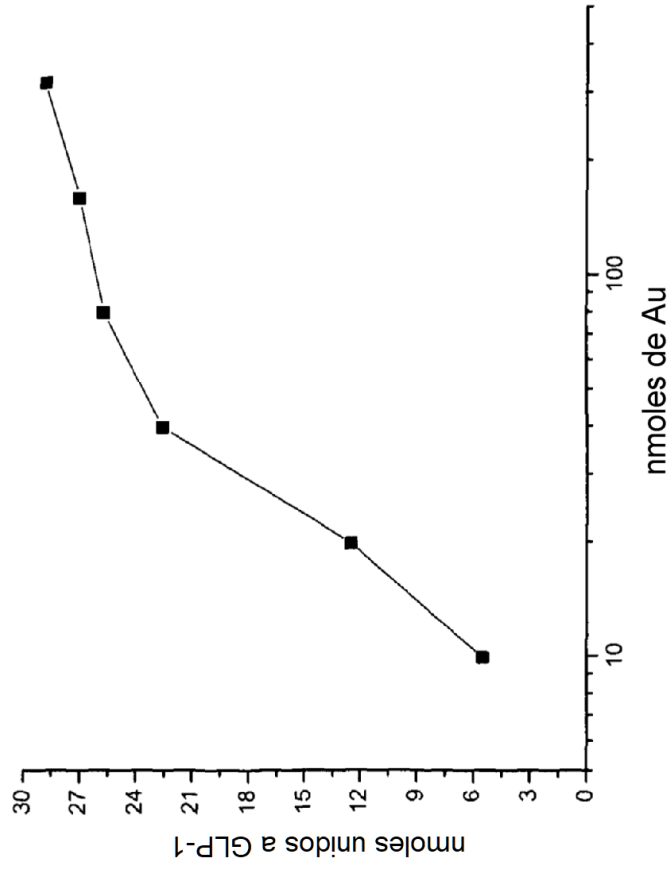


Figura 18

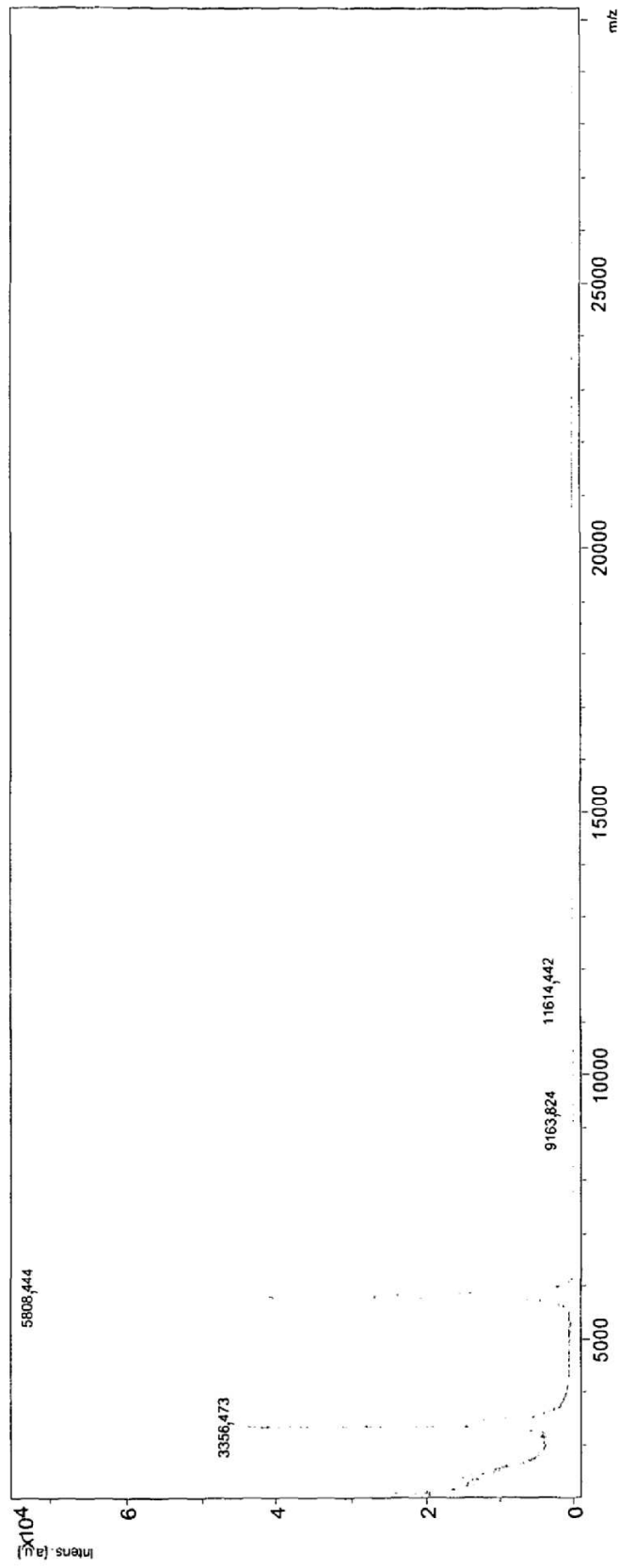


Figura 19

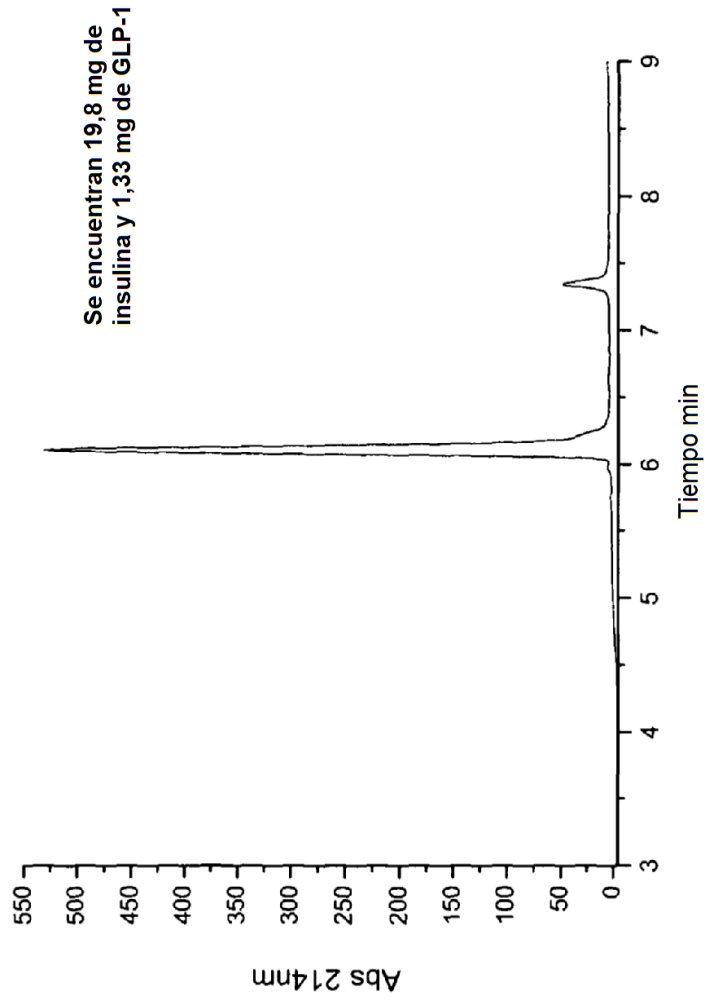


Figura 20