

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 666**

51 Int. Cl.:

B01J 13/02 (2006.01)

B01J 13/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2017 PCT/EP2017/054096**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.08.2017 WO17144551**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2017 E 17706504 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3419748**

54 Título: **Producción de nanopartículas**

30 Prioridad:

26.02.2016 GB 201603358

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

04.06.2020

73 Titular/es:

**MIDATECH LTD. (50.0%)
65 Innovation Drive, Milton Park
Abingdon, Oxfordshire OX14 4RQ, GB y
MIDATECH PHARMA (WALES) LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PALMER, DANIEL;
GROVES, RHIAN;
SEAMAN, PAUL;
CAVALIER-HIRTH, VICTORIA y
PACE, ALESSANDRO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 764 666 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

Producción de nanopartículas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a procesos para la producción de nanopartículas, particularmente nanopartículas que tienen un núcleo de metal o semiconductor, cuyo núcleo está unido covalentemente por una pluralidad de ligandos. Las nanopartículas pueden tener una o más cargas útiles, unidas covalentemente o no covalentemente a ellas, por ejemplo, actuando como vehículos farmacéuticos.

Antecedentes de la invención

La presente invención está dirigida a métodos para la producción de nanopartículas. Se conocen nanopartículas para su uso en aplicaciones médicas y de diagnóstico, y métodos para su producción. El documento WO 02/32404 describe la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro funcionalizadas con ligandos de carbohidratos derivados de tiol (gluconanopartículas). Se añadió una solución de los ligandos (en forma de disulfuro) en metanol a una solución de ácido tetracloroaúrico en agua. Se añadió borohidruro de sodio en agua en pequeñas porciones con agitación rápida al recipiente que contenía los ligandos y la sal de oro. Se formó una suspensión negra como resultado del autoensamblaje de las nanopartículas.

El documento WO 2016/075211 A1 describe nanopartículas encapsuladas de liberación sostenida y métodos para su producción.

El documento WO 2014/122444 A1 describe nanopartículas de transporte activo de permeación mejorada para su uso en medicina y los métodos para la producción de dichas nanopartículas.

El documento WO 2011/156711 A1 describe un sistema de administración de película terapéutica que incluye nanopartículas que tienen compuestos activos unidos o asociados a las nanopartículas, así como métodos para formar las nanopartículas y la película que comprende las nanopartículas.

El documento WO 2010/052503 A1 describe el uso de nanopartículas de núcleo metálico para obtener imágenes de un tumor en un mamífero mediante tomografía de impedancia eléctrica. También se describen métodos para formar las nanopartículas.

El documento WO 2012/170828 A1 describe nanopartículas que tienen un núcleo y una corona de ligandos unidos covalentemente al núcleo, en el que diferentes especies de péptidos se unen a las nanopartículas y se incorporan a diversas formas de dosificación, incluidas películas. También se describen métodos para producir las nanopartículas, unir péptidos a las mismas e incorporar las nanopartículas a la película.

La patente CN 104 028 778 A desvela un proceso para producir nanopartículas de cobre, que comprende 1) proporcionar una primera solución acuosa de etanol que comprende una sal de cobre y un dispersante de polivinilpirrolidona; 2) proporcionar una segunda solución acuosa de etanol que comprende un agente reductor; 3) hacer gotear dicha primera solución sobre dicha segunda solución.

El desarrollo posterior de las nanopartículas de oro glicosiladas, por ejemplo en aplicaciones médicas y de diagnóstico, ha creado la necesidad de métodos de síntesis a mayor escala que permitan la producción controlada de nanopartículas monodispersas en cantidades que excedan las técnicas de síntesis de laboratorio tradicionales. Un problema particular con el método de síntesis mencionado anteriormente (por ejemplo, descrito en el documento WO 02/32404) es que la uniformidad de las propiedades de las nanopartículas resultantes (incluido el tamaño) depende en gran medida de lograr una mezcla casi instantánea del borohidruro de sodio añadido con la sal de oro y los ligandos derivados de tiol. Además, el borohidruro de sodio es una fuente de gas hidrógeno potencialmente inflamable, que por lo tanto requiere condiciones cuidadosamente controladas, especialmente para los métodos de reacción a gran escala. Controlar la formación de espuma causada por la producción de gas hidrógeno dentro del reactor es un problema. A mayor escala, se observa una importante formación de espuma al añadir NaBH_4 , y esto a veces requiere la adición de un agente antiespumante. Sería deseable minimizar la necesidad de, o incluso evitar, la adición de un agente antiespumante durante la síntesis de nanopartículas. Sigue habiendo una necesidad insatisfecha de métodos para producir nanopartículas que contengan metales de propiedades uniformes a escala de forma controlada y sin espuma indeseable. La presente invención aborda esta y otras necesidades.

Breve descripción de la invención

En términos generales, la presente invención se refiere a métodos de producción de nanopartículas en los que se añade gota a gota una solución que comprende reactivos de nanopartículas (por ejemplo, sales metálicas y ligandos derivados) a una solución que contiene un agente reductor (por ejemplo, borohidruro de sodio). El tamaño relativamente pequeño de las gotas que contienen los reactivos de nanopartículas tiende a garantizar una mezcla

rápida y, en consecuencia, propiedades cada vez más uniformes de las nanopartículas producidas (como una distribución de tamaños más ajustada). La solución que contiene los reactivos de nanopartículas se puede expulsar convenientemente como gotas desde un generador de gotas para pasar a través de un gas a la solución que contiene el agente reductor. La solución que contiene el agente reductor puede proporcionarse en forma de una reserva de líquido agitada continuamente en un recipiente o en forma de una corriente líquida (por ejemplo en un canal o como un chorro del líquido que pasa a través de un gas). Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que las nanopartículas producidas de esta manera exhiben una buena uniformidad. Además, este método de producción de nanopartículas es más propicio para una mayor escala, sobre todo porque con el método de la presente invención se evitan en gran medida las limitaciones impuestas por los métodos de producción previamente conocidos (por ejemplo, la velocidad de mezcla del agente reductor y los cambios en la concentración del agente reductor con el tiempo).

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un proceso para producir nanopartículas, que comprende:

proporcionar un primer líquido que comprende un material formador de núcleo (habitualmente una sal metálica) y al menos una especie de ligandos que tienen un grupo funcional capaz de unirse a una superficie metálica (por ejemplo, un compuesto orgánico polar que contiene tiol),
 proporcionar un segundo líquido que comprende un agente reductor (por ejemplo, una solución que contiene borohidruro de sodio);
 proporcionar al menos un generador de gotas de líquido operable para generar gotas de líquido,
 dicho generador de gotas de líquido que comprende un componente piezoeléctrico,
 hacer que al menos un generador de gotas de líquido forme gotas de líquido del primer líquido,
 hacer pasar las gotas de líquido a través de un gas para que entre en contacto con el segundo líquido a fin de causar el material de formación de núcleo (por ejemplo, el sal metálica) y que al menos una especie de ligando entre en contacto con el agente reductor, provocando de este modo el autoensamblaje de nanopartículas, teniendo dichas nanopartículas un núcleo (por ejemplo, metal reducido de dicha sal metálica) y una corona que comprende una pluralidad de dichos ligandos unidos covalentemente al núcleo.

En algunos casos, la sal metálica comprende una sal de Au, Ag, Cu, Pt, Pd, Fe, Co, Gd, Eu y/o Zn. En particular, la sal metálica puede ser HAuCl_4 . La concentración de la sal metálica (por ejemplo, HAuCl_4) en el primer líquido puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 100 mg/ml, por ejemplo, de 1 a 30 mg/ml.

Las nanopartículas que tienen un núcleo semiconductor (punto cuántico), como ZnS, CdS y CdSe, se han descrito anteriormente (de la Fuente y Penadés, Tetrahedron: Asymmetry, 2005, Vol. 16, pp. 387-391). Se contempla en el presente documento que el primer líquido pueda comprender, por ejemplo, nitrato de cadmio y carbohidratos derivados de disulfuro y el segundo líquido pueda comprender sulfuro de sodio, formando así un punto cuántico glicosilado que tiene un núcleo de CdS.

De acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, la al menos una especie de ligando puede comprender un sulfuro, un tiol o puede proporcionarse como dímeros de ligando unidos por un puente disulfuro.

La concentración de los ligandos en el primer líquido puede ser, por ejemplo, en exceso molar en relación con la concentración de sal metálica. En algunos casos, los ligandos están presentes en el primer líquido en una relación con la sal metálica de entre 1,1:1 a 5:1, por ejemplo, de 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1 o 5:1. En ciertos casos, los ligandos están presentes en el primer líquido a 3 equivalentes de la sal metálica (por ejemplo, disulfuro C2-glucosa: Au^{3+} a una relación molar de 3:1).

En algunos casos, la al menos una especie de ligando comprende uno o más de un resto de carbohidrato, una cadena de alquilo, una cadena de glicol y glutatión. El glutatión posee naturalmente un tiol en forma del aminoácido cisteína, que facilita el enlace covalente a la superficie del núcleo de metal (por ejemplo, oro). El ligando, por ejemplo, puede adoptar la forma de un conjugado, tal como tiol-alquilo C_{2-12} -sacárido.

En algunos casos, el resto de carbohidrato es un monosacárido (por ejemplo, un monosacárido de cinco carbonos como la ribosa, o un monosacárido de seis carbonos como la glucosa), un disacárido (por ejemplo, lactosa o maltosa), un oligosacárido o un polisacárido. En casos particulares, el resto de carbohidrato comprende glucosa, galactosa, glucosamina, N-acetilglucosamina, manosa, fucosa y/o lactosa, o un glucósido de los mismos.

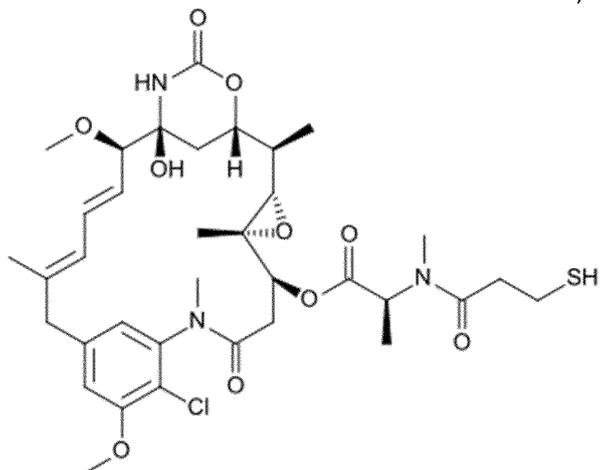
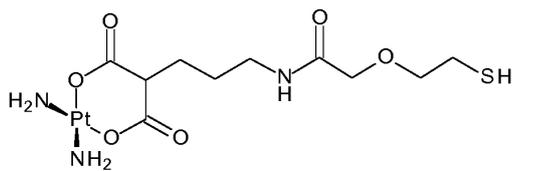
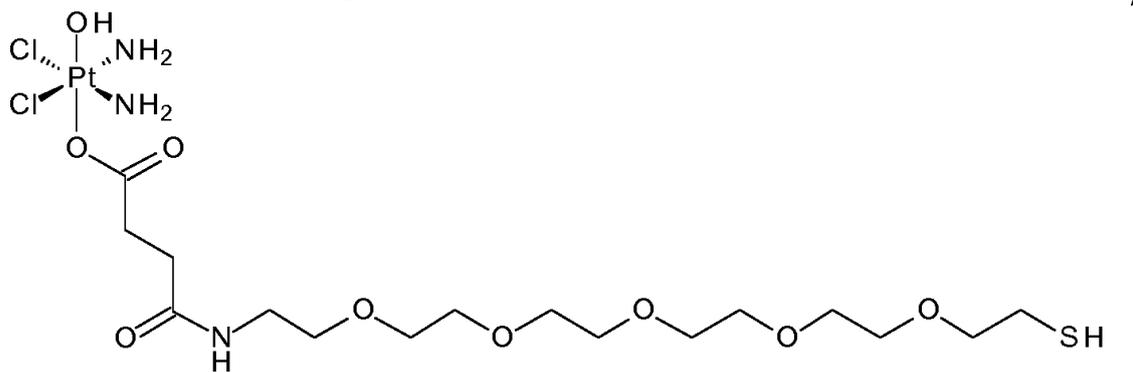
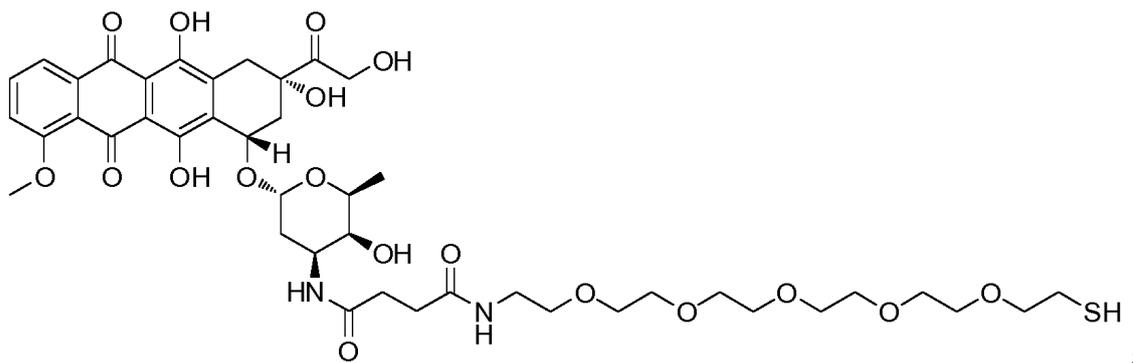
En algunos casos, la al menos una especie de ligando comprende un oligoetilenglicol o un polietilenglicol. En casos particulares, la al menos una especie de ligando puede comprender un hexaetilenglicol. En ciertos casos, la al menos una especie de ligando comprende 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol. En ciertos casos, el ligando puede comprender un grupo final con carga negativa o un grupo final capaz de tener carga negativa a pH fisiológico. El ligando de dilución puede tener un grupo terminal de ácido carboxílico. En particular, el ligando de dilución puede comprender SH-PEG-COOH. En ciertos casos, el al menos un ligando de dilución comprende: $\text{HS}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{-COOH}$, donde m está entre 2 y 30, opcionalmente entre 6 y 10. En ciertos casos, m

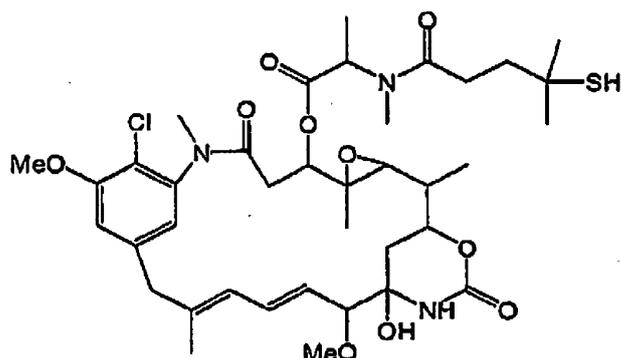
puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20.

En algunos casos, la al menos una especie de ligando comprende un agente terapéutico y/o bioafectante. Una clase a modo de ejemplo de agente terapéutico es un agente anticancerígeno, tal como un compuesto citotóxico, un agente antiproliferativo o un agente antiangiogénico. En particular, la al menos una especie de ligando puede comprender un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: doxorrubicina, irinotecán, platino (II), platino (IV), temozolomida, clorotoxina, carmustina, camptotecina, docetaxel, sorafenib, maytansina, un maytansinoide (por ejemplo, maytansinoide DM1 o maytansinoide DM4), monometil auristatina E (MMAE) y un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) (por ejemplo, panobinostat).

10

En ciertos casos, la al menos una especie de ligando se selecciona entre:





5 En algunos casos, el agente terapéutico o agente bioafectante comprende un péptido, un polipéptido y/o un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN, como ARNip, miARN o ARNsh). El péptido o polipéptido, en algunos casos, puede tener una o más modificaciones postraduccionales, por ejemplo, puede estar glicosilado. El agente terapéutico o agente bioafectante (por ejemplo, el péptido o polipéptido) puede comprender o presentar uno o más epítomos. En particular, el agente, por ejemplo, el péptido o polipéptido, puede ser un antígeno. En ciertos casos, el antígeno puede ser un autoantígeno implicado en una enfermedad autoinmune humana, por ejemplo, un péptido autoantígeno. Se conocen numerosos ejemplos de péptido autoantígeno. En ciertos casos, el péptido autoantígeno puede ser un autoantígeno implicado en la diabetes mellitus tipo 1 (por ejemplo, proinsulina, ácido glutámico descarboxilasa (GAD), IA2, antígenos de células de los islotes, cromogranina A o un fragmento de cualquiera de los mencionados anteriormente). Alternativamente, el péptido o polipéptido puede ser una secuencia sintética o híbrida derivada de una o más secuencias peptídicas naturales.

10 En algunos casos, la al menos una especie de ligando comprende un marcador detectable, como un marcador fluorescente o un colorante optoacústico.

15 En algunos casos, la al menos una especie de ligando comprende un resto de direccionamiento. El resto de direccionamiento se dirige, se une o es absorbido selectivamente por un receptor particular, tipo de célula, tejido, tumor u órgano. El resto de direccionamiento puede facilitar el direccionamiento de las nanopartículas resultantes a ciertos sitios de interés, por ejemplo, sitios de tumor o tejido enfermo, tipos de órganos o tipos de células particulares.

20 En ciertos casos, el resto de direccionamiento puede seleccionarse del grupo que consiste en: ácido fólico, lactosa, albúmina, glutamina, un péptido, un polipéptido, un ligando que se une a un receptor de superficie celular (por ejemplo, un ligando EGFR como Gefitinib), un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, Fab, scFv y similares), y un aptámero. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento del mismo, se une selectivamente a un antígeno asociado a tumor.

25 En algunos casos, la al menos una especie de ligando comprende al menos 2, 3, 4 o al menos 5 especies diferentes de ligando. En particular, las diferentes especies de ligando pueden incluir 2, 3, 4, 5 o más de los diferentes ligandos analizados en el presente documento. Las diferentes especies de ligando pueden proporcionarse en el primer líquido en una relación particular (por ejemplo, entre 1:40 y 40:1). Se contempla que la proporción de especies de ligando en el primer líquido se reflejará en gran medida en la relación de ligandos unidos covalentemente que forman la corona de las nanopartículas resultantes. La proporción de ligandos unidos covalentemente se puede determinar después de la síntesis usando varias técnicas bien conocidas. Por ejemplo, la presencia y las proporciones relativas de ligandos pueden determinarse usando RMN.

30 En casos particulares, las al menos 2 especies de ligando comprenden:

- 40 (i) 2'-tioetil- α -D-galactopiranosido y
(ii) 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol.

45 Las dos especies de ligando (i) y (ii) pueden proporcionarse en el primer líquido en una relación en el intervalo de 10:90 a 90:10, por ejemplo, de 40:60 a 60:40.

50 En algunos casos, el diámetro promedio del núcleo de las nanopartículas formadas por el proceso de la presente invención está en el intervalo de 1 nm a 5 nm. El diámetro de la nanopartícula, incluidos sus ligandos, puede estar en algunos casos en el intervalo de 2 nm a 50 nm, o de 3 nm a 30 nm, o de 4 nm a 20 nm, o de 5 nm a 15 nm.

En algunos casos, dicho primer líquido comprende además dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO es bien conocido como un adyuvante de solubilidad y se ha encontrado que ayuda a la generación de gotas, por ejemplo, a partir de un generador de gotas piezoeléctrico. En algunos casos, dicho primer líquido comprende además un alcohol, por

ejemplo metanol y/o agua.

En algunos casos de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, dicho agente reductor puede seleccionarse del grupo que consiste en: NaBH_4 , hidrato de hidrazina, NaBH_3CN (cianoborohidruro) y DIBAL (hidruro de diisobutil aluminio). En ciertos casos, el agente reductor puede ser NaBH_4 . La concentración del agente reductor (por ejemplo, NaBH_4) en el segundo líquido puede ser, por ejemplo, de 0,01 a 0,1 M, por ejemplo, 0,05 M.

El al menos un generador de gotas de líquido comprende un componente piezoeléctrico.

El proceso de eyección de gotas utiliza el efecto piezoeléctrico, por el cual un cristal piezoeléctrico sufre distorsión cuando se aplica un pulso eléctrico. Esta distorsión da como resultado un pulso de presión, lo que obliga a expulsar una gota de una boquilla y también crea presión negativa para extraer más fluido una vez que la gota ha sido expulsada. Muchos dispositivos listos para usar hacen uso de este principio para generar gotas, particularmente dentro de la industria de la impresión.

En algunos casos, el generador o generadores de gotas operan en modo de caída bajo demanda. En algunos casos, un generador de señal suministra un campo eléctrico al componente piezoeléctrico.

En algunos casos, el al menos un generador de gotas de líquido comprende una pluralidad de salidas del generador de gotas y en el que las salidas del generador de gotas están en una línea o una matriz. En algunos casos, el al menos un generador de gotas de líquido tiene la forma de un cabezal de impresión de inyección de tinta.

El segundo líquido puede proporcionarse en cualquier configuración que permita que las gotas del primer líquido, después de ser dispensado desde el generador o generadores de gotas de líquido y pasar a través de un gas, hagan o entren en contacto con una superficie del segundo líquido. En ciertos casos, el segundo líquido puede proporcionarse en un recipiente con la parte superior abierta, una película delgada o un reactor de disco giratorio. En ciertos casos, el recipiente puede ser un matraz o baño agitado. La agitación facilita la distribución del agente reductor y ayuda a mantener una concentración uniforme del agente reductor en el segundo líquido. Esto ayuda a prevenir áreas locales de concentración reducida de agente reductor en el sitio de entrada de las gotas de líquido del primer líquido.

En otros casos, el segundo líquido puede proporcionarse como al menos una corriente en uno o más canales.

En otros casos, el segundo líquido puede proporcionarse como un chorro que pasa a través de un gas (por ejemplo, aire). En particular, se genera el chorro del segundo líquido proporcionando un flujo continuo y sin pulsos de dicho segundo líquido y pasando dicho flujo del segundo líquido a través de una boquilla que provoca una reducción en el área de sección transversal disponible para el flujo y, por lo tanto, aumenta la velocidad del flujo del segundo líquido, dicha boquilla que termina en un orificio del que emerge el chorro del segundo líquido. En algunos casos, el chorro del segundo líquido no está en contacto con ninguna pared o canal durante al menos parte de su longitud. En realizaciones particulares, la parte de la longitud del chorro que no está en contacto con ninguna pared o canal comprende una zona de contacto, siendo dicha zona de contacto la zona del chorro en el que dichas gotas de líquido hacen contacto con dicho chorro.

Una ventaja particular de proporcionar el segundo líquido como un flujo en un canal o como un chorro es que la concentración del agente reductor puede mantenerse fácilmente a un nivel constante. Cuando los reactivos de nanopartículas (sal metálica y ligandos) se añaden a un recipiente que contiene agente reductor a una concentración particular, la concentración del agente reductor se agotará con el tiempo a medida que se añadan más y más gotas del primer líquido. Este no será el caso cuando el segundo líquido se proporciona como flujo o chorro porque la concentración de agente reductor en el segundo líquido en el sitio de contacto inicial de las gotas del primer líquido será constante a lo largo del tiempo. Esto a su vez ayuda a garantizar la consistencia de las propiedades (por ejemplo, el tamaño) dentro de un lote de producción. En algunos casos, el enfoque por chorro garantiza condiciones de reacción constantes sin mermas de concentración significativas en el primer o segundo líquido.

En algunos casos, las gotas de líquido de dicho primer líquido pasan a través del gas (por ejemplo, aire) durante una distancia de 1 a 100 mm, opcionalmente de 2 a 10 mm antes de contactar dicho segundo líquido.

En algunos casos, el flujo o chorro del segundo líquido fluye sustancialmente perpendicular a la dirección de expulsión de gotas y sustancialmente paralela al eje longitudinal de la pluralidad de salidas del generador de gotas de líquido.

En algunos casos, el al menos un generador de gotas de líquido se coloca por encima del segundo líquido y dichas gotas de líquido se expulsan hacia abajo hacia el segundo líquido con una velocidad inicial y/o bajo la acción de la gravedad.

En algunos casos, se dispensan una pluralidad de gotas de líquido de dicho primer líquido desde las salidas respectivas del generador de gotas de líquido de manera sustancialmente simultánea y las gotas de líquido pasan a

través del gas (por ejemplo, aire) en paralelo antes de entrar en contacto con dicho segundo líquido.

En algunos casos, el número de salidas del generador de gotas de líquido está en el intervalo de 5 a 2500, opcionalmente 256, 512 o 1024.

5 En algunos casos, la frecuencia de generación de gotas de líquido está en el intervalo de 0,1 a 100 kHz, opcionalmente de 1 a 10 kHz, en el que la frecuencia establecida es por salida del generador de gotas (por ejemplo, por boquilla). La frecuencia total en conjunto a través de todas las boquillas puede ser considerablemente más alta, por ejemplo, en el intervalo de MHz (ver, por ejemplo, el Ejemplo 1 que describe una frecuencia agregada de 2,05 MHz).

En algunos casos, las gotas de líquido tienen un volumen de gotas individual en el intervalo de 1 a 100 pl, opcionalmente de 20 a 60 pl.

15 En algunos casos de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, el proceso sirve para producir nanopartículas metaestables. En este contexto, una nanopartícula "meta-estable" o "metaestable" es una nanopartícula que tiene uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) átomos expuestos en la superficie (por ejemplo, átomos de oro) del núcleo de nanopartículas que está o no está cubierto con un ligando. El porcentaje de átomos expuestos en la superficie del núcleo de nanopartículas que no están unidos covalentemente a un ligando (es decir, no están cubiertos) en algunos casos puede ser de al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %. En ciertas realizaciones, la relación de ligandos a material de formación de núcleo (por ejemplo, sal metálica) puede seleccionarse de modo que las nanopartículas formadas no estén completamente cubiertas o pasivadas con ligandos.

25 En algunos casos, de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, el proceso comprende además una etapa de añadir ligandos adicionales a una solución que comprende las nanopartículas. Se ha encontrado que las nanopartículas pueden formarse inicialmente en un estado metaestable, si se desea. Alternativamente, se puede añadir un mayor exceso de ligandos, en la síntesis o post-síntesis, para producir nanopartículas completamente estables. Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, los presentes inventores creen que las nanopartículas formadas inicialmente en un estado metaestable tienen un núcleo que no está completamente pasivado (es decir, cubierto) con ligandos. Con el tiempo, las nanopartículas metaestables pueden estar sometidas a reacciones de desplazamiento de ligando y/o coalescencia del núcleo, que alteran propiedades tales como el tamaño de las nanopartículas. En particular, los átomos de oro pueden desplazarse si están expuestos, es decir, estarán disponibles para fusionarse con otras superficies de oro expuestas, y estas se reorganizarían para formar nanopartículas más grandes. Como se demuestra en los Ejemplos, se completó la adición del exceso de ligandos sin reaccionar (por ejemplo, un exceso molar 3x de disulfuro C2 de glucosa) 20 minutos después de la expulsión del primer líquido de los generadores de gotas de líquido al segundo líquido, y la agitación posterior de la mezcla, dio como resultado una agitación completa nanopartículas estables que tienen una distribución de tamaño estrecha y ausencia casi completa de una banda de resonancia de plasmón.

40 En algunos casos, los ligandos añadidos adicionales son los mismos que al menos una especie de ligando en el primer líquido. De esta manera, la unión posterior del ligando a los átomos de la superficie del núcleo sin encapsular o el desplazamiento competitivo de los ligandos existentes tiende a resultar en la adición de "más de lo mismo" o reemplazo de ligandos equiparables, y por lo tanto estabiliza la composición de nanopartículas (cambio de meta-estable a completamente estable).

50 En algunos casos, los ligandos añadidos adicionales son diferentes de al menos una especie de ligando en el primer líquido. De esta manera, la unión posterior del ligando a los átomos de la superficie del núcleo sin cubrir o el desplazamiento competitivo de los ligandos existentes tiende a dar como resultado la adición de diferentes ligandos, produciendo así una nanopartícula que tiene una corona mixta. Una ventaja particular prevista para la adición de ligandos que son diferentes de la al menos una especie de ligando en el primer líquido es la capacidad de unir ligandos a la nanopartícula que no sería estable en contacto con el agente reductor. Por ejemplo, el proceso puede emplear un primer ligando "A" en el primer líquido para formar inicialmente una nanopartícula metaestable que tenga una corona de ligandos "A". A la solución que contiene estas nanopartículas se le puede añadir una cantidad, como un exceso, de un segundo ligando "B". El segundo ligando puede poblar sitios no cubiertos en la superficie del núcleo de la nanopartícula y/o puede desplazar una porción de los ligandos "A". El resultado sería una nanopartícula con una corona mixta de ligandos "A" y "B". En este ejemplo, "B" no requiere ser estable en presencia del agente reductor y/o no necesita proporcionarse en el primer líquido. Por lo tanto, este enfoque libera la posible elección de "B" para incluir ligandos que no son adecuados para las condiciones de síntesis iniciales (por ejemplo, exposición al agente reductor). Un ejemplo particular de este enfoque está en la síntesis de nanopartículas que tienen al menos un ligando maytansinoide (por ejemplo, maytansinoide DM1 o DM4). Se ha encontrado que los maytansinoides son sensibles a un entorno reductor. Por ejemplo, el maytansinoide DM1 forma varios productos de reacción cuando se trata con borohidruro de sodio. Por lo tanto, ventajosamente, se puede formar una nanopartícula metaestable usando el proceso de la presente invención y una primera especie de ligando que sea estable en un entorno reductor (por ejemplo, glucosa-C2-tiol). Una vez que se ha formado la nanopartícula metaestable, se añade un exceso del ligando sensible al agente reductor (por ejemplo, maytansinoide DM1 o maytansinoide DM4) a la solución

que comprende las nanopartículas metaestables. El ligando sensible al agente reductor (por ejemplo, maytansinoide DM1 o maytansinoide DM4) a continuación llena los sitios sin cubrir en la superficie del núcleo de la nanopartícula para formar nanopartículas estables que tienen una corona mixta (en este ejemplo, una mezcla de ligandos de glucosa-C2 y maytansinoide DM1 o ligandos maytansinoides DM4).

5 En algunos casos, los ligandos adicionales se añaden en exceso, opcionalmente en exceso estequiométrico, en relación con la cantidad de dicha al menos una especie de ligando en dicho primer líquido.

10 En ciertos casos, al menos una parte de los ligandos adicionales reaccionan con las nanopartículas y, por lo tanto, se unen covalentemente al núcleo de la nanopartícula.

15 En algunos casos de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, el proceso comprende además recoger las nanopartículas separando las nanopartículas del segundo líquido. Las nanopartículas pueden someterse a una o más etapas de tratamiento de postproducción seleccionadas del grupo que consiste en: dialización, lavado, secado, centrifugación (por ejemplo, ultracentrifugación) y esterilización.

20 En algunos casos, el proceso del primer aspecto de la presente invención comprende además poner en contacto las nanopartículas con al menos una especie de péptido, por lo que la al menos una especie de péptido se une de forma no covalente a la corona de las nanopartículas para formar nanopartículas ligadas a péptido. Esto se puede lograr, por ejemplo, mezclando una solución (por ejemplo, una solución acuosa) que comprende las nanopartículas con una solución (por ejemplo, una solución acuosa) que comprende al menos una especie de péptido y durante un tiempo y a una temperatura que permita a las moléculas de péptido unirse no covalentemente (por ejemplo, electrostáticamente) a la corona de la nanopartícula. Los péptidos adecuados incluyen agentes terapéuticamente activos tales como: insulina, GLP-1, exenatida, amilina, octreótido, teriparatida, una citocina y un anticuerpo (véase también, por ejemplo, el documento WO2011/154711).

25 En algunos casos, el proceso del primer aspecto de la presente invención comprende además formular o empaquetar las nanopartículas en una composición farmacéutica o forma de administración. En particular, las nanopartículas formadas por el proceso de la presente invención pueden combinarse con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

30 En ciertos casos, la composición farmacéutica puede formularse para la administración por vía inyectable. En algunos casos, las nanopartículas pueden incorporarse en una película polimérica, por ejemplo, para administración transbucal.

35 La presente invención incluye la combinación de los aspectos y características preferidas descritas, excepto cuando dicha combinación sea claramente inadmisibles o se afirma que se evita expresamente. Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se describen con más detalle a continuación y con referencia a los ejemplos y figuras que se acompañan.

40 **Breve descripción de las figuras.**

45 La **Figura 1** muestra una representación esquemática de una realización de la presente invención. Se añade gota a gota una solución que comprende sal de oro (Au^{3+}) y ligandos a un recipiente que contiene un exceso de agente reductor (BH_4^-). Como el Au^{3+} se añade gota a gota se encuentra con un exceso de BH_4^- , por lo tanto, todos los átomos de oro en la gota deberían reducirse al terminar (sin la necesidad de mezclar). Siempre que los ligandos estén disponibles a una concentración adecuada, se producen nanopartículas.

50 La **Figura 2** muestra una representación esquemática de una realización de la presente invención que emplea un generador de gotas piezoeléctrico. El panel de inserción muestra una fotografía de alta velocidad de las gotas expulsadas del orificio del generador de gotas piezoeléctrico. Una solución de dímero de Au^{3+} y Glucosa-C2 (2'-tioetil- β -D-glucopiranosido proporcionado como dímero disulfuro) en DMSO se expulsó del generador de gotas piezoeléctrico como una corriente estable de gotas (condiciones de eyección: 44 V, pulso de 13 μs , 50 °C, $v = 4000\text{Hz}$) en una solución que contiene NaBH_4 .

55 La **Figura 3** muestra el espectro de absorbancia de nanopartículas de oro que tienen una corona de ligandos de glucosa-C2, producidos por el método de la presente invención. La densidad óptica (eje y) se representa frente a la longitud de onda en nm (eje x). El espectro de absorbancia muestra poca o ninguna evidencia de una banda de resonancia de plasmón superficial.

60 La **Figura 4** muestra cuatro trazas de distribución de tamaño determinadas por dispersión dinámica de la luz (DLS), en las que se representa el porcentaje (eje y) por volumen de nanopartículas en la población frente al diámetro de nanopartículas en nm (eje x). Se encontró que el diámetro promedio era de 2,7 nm. Las nanopartículas para cada una de las cuatro trazas se produjeron mediante un método de realización de la presente invención en el que se añadió un exceso (3x equivalentes molares) de disulfuro de glucosa-C2 a la solución que contenía las nanopartículas después de que se completó la eyección de gotas (20 minutos) y la

mezcla resultante se agitó durante 1 hora.

La **Figura 5** muestra una ilustración esquemática de una realización de flujo reductor continuo del método de la presente invención. De izquierda a derecha se muestra un chorro horizontal de una solución que contiene borohidruro de sodio. Se expulsa una solución de sal de oro (Au^{3+}) y ligandos desde el generador de gotas piezoeléctrico para formar una corriente descendente de gotas que pasan a través del aire antes de hacer contacto con el chorro que contiene borohidruro de sodio. La reducción de la sal de oro y la formación de nanopartículas de oro con una corona de ligandos se produce rápidamente, y la corriente a chorro de líquido, que ahora contiene nanopartículas formadas, ingresa a una sección del tubo del codo (que se muestra en el extremo derecho del chorro) y se dirige hacia abajo a un recipiente colector.

La **Figura 6** muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas producidas según el proceso de la presente invención. Se muestra una barra de escala de 50 nm. Las manchas oscuras generalmente muestran nanopartículas esféricas con núcleo de oro. El lote de nanopartículas se produjo a través del generador de gotas piezoeléctrico que expulsaba gotas de una solución de Au^{3+} y dímero de glucosa-C2 en DMSO en una solución que contenía NaBH_4 .

Descripción detallada de la invención

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan como se indica a continuación.

Nanopartículas

Como se usa en este documento, "nanopartícula" se refiere a una partícula que tiene una escala nanométrica, y no pretende transmitir ninguna limitación de forma específica. En particular, "nanopartículas" abarca nanoesferas, nanotubos, nanocajas, nanoagrupamientos, nanobarras y similares. En ciertas realizaciones, las nanopartículas y/o núcleos de nanopartículas contemplados en el presente documento tienen una geometría generalmente poliédrica o esférica.

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 encontrar uso de acuerdo con la presente invención.

Como se usa en el presente documento, "corona" se refiere a una capa o recubrimiento, que puede cubrir parcial o completamente la superficie expuesta del núcleo de nanopartículas. La corona incluye una pluralidad de ligandos que generalmente incluyen al menos un resto carbohidrato, un resto tensioactivo y/o un resto glutatión. Por lo tanto, se puede considerar que la corona es una capa orgánica que rodea o rodea parcialmente el núcleo metálico. En ciertas realizaciones, la corona proporciona y/o participa en la pasivación del núcleo de la nanopartícula. Por lo tanto, en ciertos casos la corona puede incluir una capa de recubrimiento suficientemente completa para estabilizar el semiconductor o el núcleo que contiene metal. Sin embargo, en el presente documento se contempla específicamente que ciertas nanopartículas que tienen núcleos, por ejemplo, que incluyen un núcleo interno que contiene óxido de metal recubierto con un metal noble pueda incluir una corona que recubre solo parcialmente la superficie del núcleo. En ciertos casos, la corona facilita la solubilidad, como la solubilidad en agua, de las nanopartículas de la presente invención.

Las nanopartículas son partículas pequeñas, por ejemplo, grupos de átomos de metal o de semiconductores, que se pueden usar como sustrato para inmovilizar ligandos.

Preferiblemente, las nanopartículas tienen núcleos que tienen diámetros medios entre 0,5 y 50 nm, más preferiblemente entre 0,5 y 10 nm, más preferiblemente entre 0,5 y 5 nm, más preferiblemente entre 0,5 y 3 nm y aún más preferiblemente entre 0,5 y 2,5 nm. Cuando se consideran los ligandos además de los núcleos, preferiblemente el diámetro medio global de las partículas está entre 2,0 y 20 nm, más preferiblemente entre 3 y 10 nm y lo más preferiblemente entre 4 y 5 nm. El diámetro medio se puede medir utilizando técnicas bien conocidas en la materia, como la microscopía electrónica de transmisión.

El material del núcleo puede ser un metal o un semiconductor (dicho semiconductor opcionalmente comprende átomos metálicos o ser un semiconductor orgánico) y puede estar formado por más de un tipo de átomo. Preferiblemente, el material del núcleo es un metal seleccionado entre Au, Fe o Cu. Los núcleos de nanopartículas también pueden formarse a partir de aleaciones que incluyen Au/Fe, Au/Cu, Au/Gd, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd y Au/Fe/Cu/Gd, y pueden usarse en la presente invención. Los materiales centrales preferidos son Au y Fe, siendo el material más preferido Au. Los núcleos de las nanopartículas comprenden preferiblemente entre aproximadamente 100 y 500 átomos (por ejemplo, átomos de oro) para proporcionar diámetros de núcleo en el intervalo de nanómetros. Otros materiales del núcleo particularmente útiles se dopan con uno o más átomos que son activos por RMN, lo que permite detectar las nanopartículas utilizando RMN, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los ejemplos de átomos activos de RMN incluyen Mn^{+2} , Gd^{+3} , Eu^{+2} , Cu^{+2} , V^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} y lantánidos⁺³, o puntos cuánticos.

Los núcleos de nanopartículas que comprenden compuestos semiconductores se pueden detectar a medida que los cristales semiconductores a escala nanométrica son capaces de actuar como puntos cuánticos, es decir, pueden absorber la luz y, por lo tanto, excitar electrones en los materiales a niveles de energía más altos, liberando posteriormente fotones de luz en frecuencias características del material. Un ejemplo de material de núcleo semiconductor es seleniuro de cadmio, sulfuro de cadmio, telurio de cadmio. También se incluyen los compuestos de zinc como el sulfuro de zinc.

En algunas realizaciones, la nanopartícula o su ligando comprende un marcador detectable. El marcador puede ser un elemento del núcleo de la nanopartícula o el ligando. El marcador puede ser detectable debido a una propiedad intrínseca de ese elemento de la nanopartícula o al estar unido, conjugado o asociado con un resto adicional que es detectable. Los ejemplos preferidos de marcadores incluyen un marcador que es un grupo fluorescente, un radionúclido, un marcador magnético o un colorante. Los grupos fluorescentes incluyen fluoresceína, rodamina o tetrametil rodamina, Texas-Red, Cy3, Cy5, etc., y pueden detectarse mediante la excitación del marcador fluorescente y la detección de la luz emitida mediante espectroscopía de dispersión Raman (Y.C. Cao, R. Jin, C.A. Mirkin, Science 2002, 297: 1536-1539). En algunos casos, el marcador detectable puede comprender isotiocianato de fluoresceína (FITC). En ciertos casos, el marcador detectable (por ejemplo, FITC) puede estar unido covalentemente al núcleo de la nanopartícula, por ejemplo, a través de un conector.

En algunas realizaciones, las nanopartículas pueden comprender un radionúclido para usar en la detección de la nanopartícula usando la radioactividad emitida por el radionúclido, por ejemplo, usando PET, SPECT o para terapia, es decir, para matar células diana. Los ejemplos de radionúclidos comúnmente utilizados en la técnica que podrían adaptarse fácilmente para su uso en la presente invención incluyen ^{99m}Tc , que existe en varios estados de oxidación, aunque el más estable es TcO_4^- ; ^{32}P o ^{33}P ; ^{57}Co ; ^{59}Fe ; ^{67}Cu , que a menudo se usa como sales de Cu^{2+} ; ^{67}Ga que se usa comúnmente como una sal de Ga^{3+} , por ejemplo, citrato de galio; ^{68}Ge ; ^{82}Sr ; ^{99}Mo ; ^{103}Pd ; ^{111}In que generalmente se usa como sales de In^{3+} ; ^{125}I o ^{131}I que generalmente se usa como yoduro de sodio; ^{137}Cs ; ^{153}Gd ; ^{153}Sm ; ^{158}Au ; ^{186}Re ; ^{201}Tl generalmente usado como una sal de Tl^+ tal como cloruro de talio; $^{39}\text{Y}^{3+}$; $^{71}\text{Lu}^{3+}$; y $^{24}\text{Cr}^{2+}$. El uso general de radionúclidos como marcadores y trazadores es bien conocido en la técnica y podría ser adaptado fácilmente por la persona experta para su uso en los aspectos de la presente invención. Los radionúclidos pueden emplearse más fácilmente al dopar los núcleos de las nanopartículas o incluirlos como marcadores presentes como parte de los ligandos inmovilizados sobre las nanopartículas.

Compuestos activos

Como se usa en el presente documento, el término "agente bioafectante" pretende abarcar fármacos y profármacos que ejercen un efecto sobre un sistema biológico, preferiblemente un efecto terapéutico. La clase de agente activo contemplado en el presente documento incluye compuestos orgánicos de moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos y ácidos nucleicos. Los ejemplos particulares incluyen: agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, temozolomida, irinotecán, clorotoxina, carmustina, platino (IV), platino (II), camptotecina, doxorubicina, docetaxel maytansina, maytansinoides (por ejemplo, DM1 y DM4), monometil auristatina E (MMAE) y/o inhibidores de histona desacetilasa (HDAC) tales como Panobinostat, Vorinostat, Romidepsin y Chidamide); péptidos o polipéptidos (por ejemplo, insulina, GLP-1, amilina, exenatida, octreotida, teriparatida, glucagón, una citocina y/o un anticuerpo); ADN o ARN (incluido, por ejemplo, ARNip).

Lo siguiente se presenta a modo de ejemplo y no debe interpretarse como una limitación del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo

50 **Ejemplo 1 - Síntesis basada en la eyección piezoeléctrica de nanopartículas de oro**

Una solución que contenía HAuCl_4 ($[\text{Au}^{3+}]$ de 1 mg/ml), disulfuro C2-glucosa (Au^{3+} : disulfuro C2-glucosa, relación molar 1:3) en DMSO se expulsó de un único generador de gotas piezoeléctrico utilizando las siguientes condiciones de expulsión: 44V, pulso de 13 μs , 50 °C, $n = 4000$ Hz. Las gotas se expulsaron a un vial de 12 ml que contenía 8 ml de una solución acuosa de NaBH_4 a una concentración de 0,05 M.

Las nanopartículas resultantes se aislaron por ultracentrifugación de Amicon después de que se completó la expulsión de gotas. Se produjeron nanopartículas metaestables de tamaño apropiado (demostrado por una banda de plasmón muy pequeña). Se descubrió que estas nanopartículas "maduraron" durante la noche con el tamaño que aumenta a un diámetro de >8 nm (color rojo observado). Los presentes inventores creen que esto indica que el núcleo de nanopartículas de oro no estaba completamente cubierto con ligando en el momento en que las nanopartículas estaban aisladas (es decir, las nanopartículas eran inicialmente metaestables).

A continuación se produjo un lote adicional de nanopartículas de oro usando las concentraciones de reactivo y las condiciones de eyección de gotas descritas anteriormente. Una vez completada la eyección (20 minutos), se añadieron 3x equivalentes molares adicionales de disulfuro C2 de glucosa a la solución que contenía las

nanopartículas. La mezcla se agitó durante 1 hora.

Se produjeron nanopartículas estables de tamaño apropiado (diámetro promedio de 2,7 nm por dispersión dinámica de la luz (DLS) – véanse Figuras 3 y 4. Se visualizaron por microscopía electrónica de transmisión – véase Figura 6.

5 Posteriormente se llevaron a cabo experimentos para investigar la escalabilidad del proceso. En particular, el incremento de la concentración de Au^{3+} y ligando en el primer líquido aumenta el rendimiento de $\text{Au}_{(s)}$ por unidad de tiempo. Se encontró que las concentraciones de Au^{3+} de 5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml y 30 mg/ml (y el aumento correspondiente de las concentraciones de ligando para mantener una relación de Au:ligando de 1:3) produjeron nanopartículas de oro estables esencialmente sin banda de resonancia de plasmón observable. El siguiente cálculo proporciona un rendimiento estimado que se puede lograr utilizando una matriz de cabezales de impresión de 512 inyectores a una frecuencia de generación de gotas de 4 kHz:

$$\begin{aligned}
 4000 \text{ Hz} \times 512 \text{ boquillas} &= 2,05 \text{ MHz} \\
 \text{Volumen de la gota} &= 42 \text{ pl} \\
 &= 0,086 \text{ ml/s} \\
 &= 5,16 \text{ ml/min} \\
 &= 309 \text{ ml/hora}
 \end{aligned}$$

20 A $[\text{Au}^{3+}] = 30 \text{ mg/ml}$ (y suponiendo un rendimiento de $\sim 90 \%$), esto daría 8,34 g de $\text{Au}_{(s)}/\text{h}$.

Sin embargo, debe observarse que el cálculo anterior proporciona cifras representativas y no debe tomarse como rendimiento máximo para el proceso de la presente invención.

25 Las realizaciones específicas descritas en el presente documento se ofrecen a modo de ejemplo, no a modo de limitación. Cualquier subtítulo en este documento se incluye solo por conveniencia, y no debe interpretarse como que limita la divulgación de ninguna manera.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir nanopartículas, que comprende:
 - 5 proporcionar un primer líquido, que comprende una sal metálica, y al menos una especie de ligando, que tiene un grupo funcional capaz de unirse a una superficie metálica, proporcionar un segundo líquido, que comprende un agente reductor; proporcionar al menos un generador de gotas de líquido operable para generar gotas de líquido, comprendiendo dicho generador de gotas de líquido un componente piezoeléctrico,
 - 10 hacer que al menos un generador de gotas de líquido forme gotas de líquido del primer líquido, hacer pasar las gotas de líquido a través de un gas para contactar el segundo líquido a fin de hacer que la sal metálica y la al menos una especie de ligando entren en contacto con el agente reductor, provocando así el autoensamblaje de nanopartículas, teniendo dichas nanopartículas un núcleo de dicho metal y una corona que comprende una pluralidad de dichos ligandos, unidos covalentemente al núcleo.
 - 15
 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la al menos una especie de ligando comprende un sulfuro, un tiol o se proporciona como dímeros de ligando, unidos por un puente disulfuro.
 3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o con la reivindicación 2, en el que la al menos una especie de ligando comprende un agente terapéutico o un bioafectante, opcionalmente, un compuesto citotóxico.
 - 20
 4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agente terapéutico o el agente bioafectante comprende un péptido, un polipéptido o un ácido nucleico.
 - 25
 5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la al menos una especie de ligando comprende un resto de direccionamiento.
 6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el resto de direccionamiento se dirige, se une o es absorbido selectivamente por un receptor, un tipo de célula, un tejido, un tumor o un órgano particulares.
 - 30
 7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5 o con la reivindicación 6, en el que dicho resto dirigido se selecciona del grupo que consiste en: ácido fólico, lactosa, albúmina, glutamina, un péptido, un polipéptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y un aptámero.
 - 35
 8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho primer líquido comprende, además, dimetil sulfóxido (DMSO) y/o en donde se selecciona dicho agente reductor del grupo que consiste en: NaBH_4 , hidrato de hidrazina, NaBH_3CN (cianoborohidruro) y DIBAL (hidruro de diisobutil aluminio).
 - 40
 9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el al menos un generador de gotas de líquido comprende una pluralidad de salidas del generador de gotas, y en donde las salidas del generador de gotas están en una línea o una matriz, opcionalmente, en donde el al menos un generador de gotas de líquido se encuentra en forma de cabezal de impresión de inyección de tinta.
 - 45
 10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el segundo líquido se proporciona como un chorro que pasa a través de un gas, y, opcionalmente, en donde se dispensan una pluralidad de gotas de dicho primer líquido desde las respectivas salidas del generador de gotas de líquido de manera sustancialmente simultánea, y en donde dichas gotas de líquido pasan a través del gas en paralelo antes de entrar en contacto con dicho chorro del segundo líquido.
 - 50
 11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
 - (a) el número de salidas del generador de gotas de líquido está en el intervalo de 5 a 2500, opcionalmente 256, 512 o 1024;
 - (b) la frecuencia de generación de gotas de líquido por salida del generador de gotas de líquido está en el intervalo de 0,1 a 100 kHz, opcionalmente de 1 a 10 kHz; y/o
 - (c) dichas gotas de líquido tienen un volumen de gotas individual en el intervalo de 1 a 100 pl, opcionalmente de 20 a 60 pl.
 - 55
 12. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, una etapa de añadir ligandos adicionales a una solución que comprende las nanopartículas.
 - 60
 13. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, recoger las nanopartículas separando las nanopartículas del segundo líquido.
 - 65
 14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende, además, someter las nanopartículas a una o más etapas de tratamiento de postproducción, seleccionadas del grupo que consiste en: dialización, lavado, secado,

centrifugación y esterilización.

15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13 o con la reivindicación 14, que comprende, además, formular o empaquetar las nanopartículas en una composición farmacéutica o en una forma de administración.

5

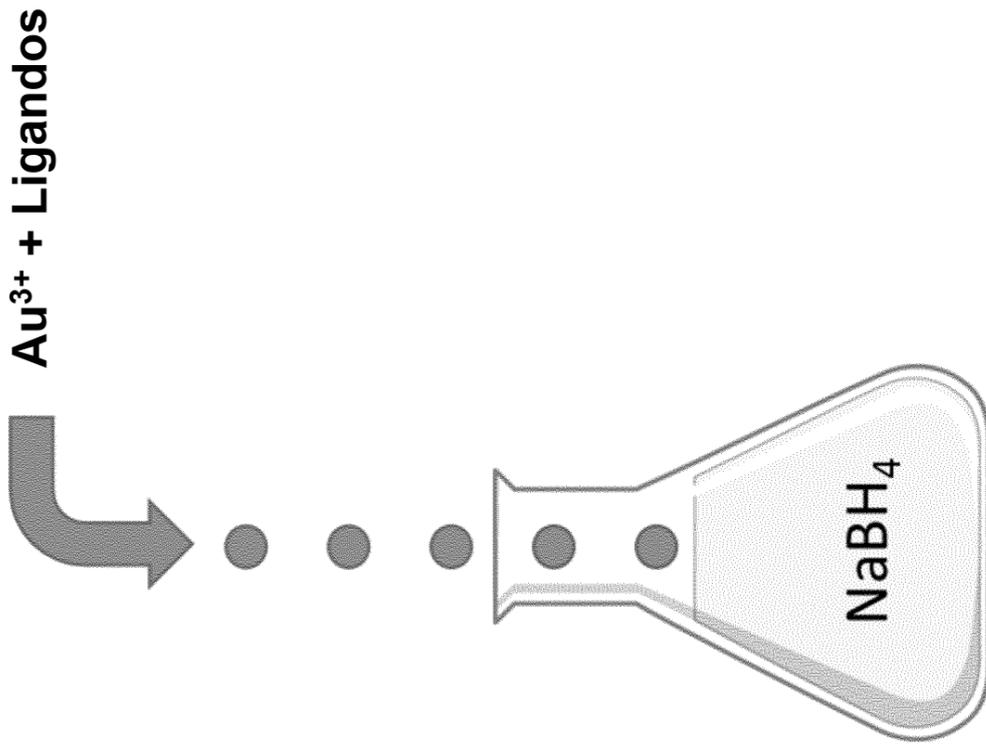


Figura 1

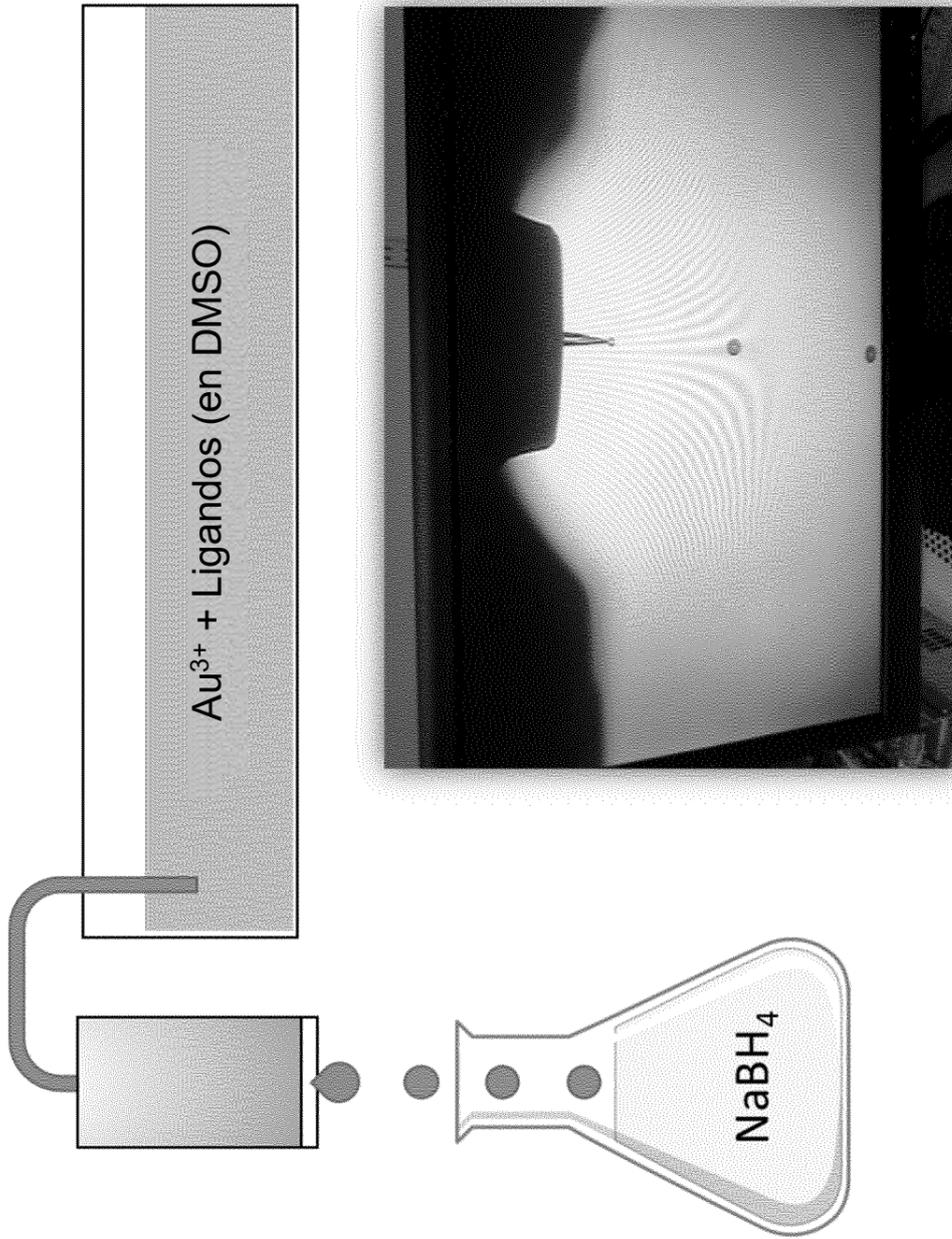


Figura 2

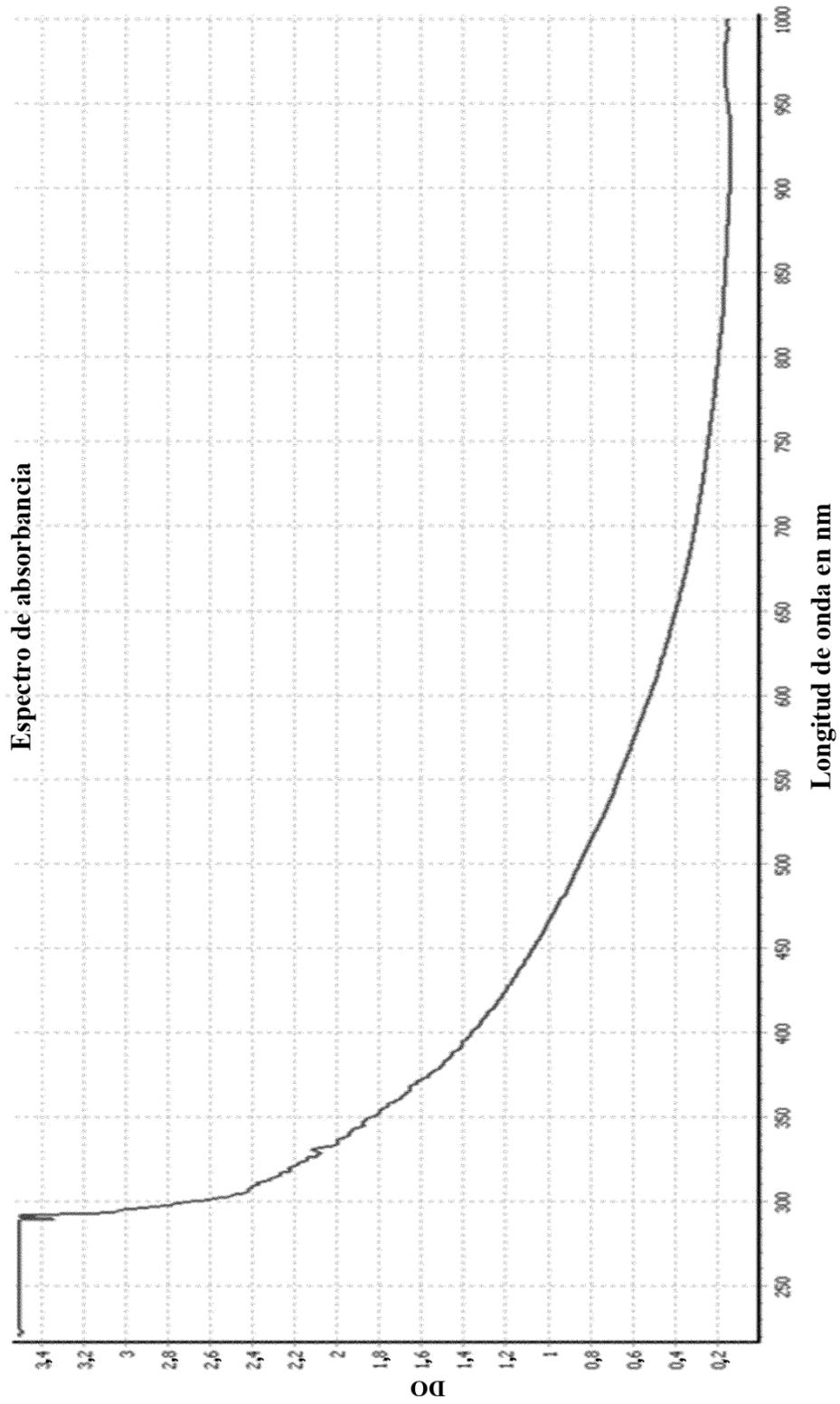


Figura 3

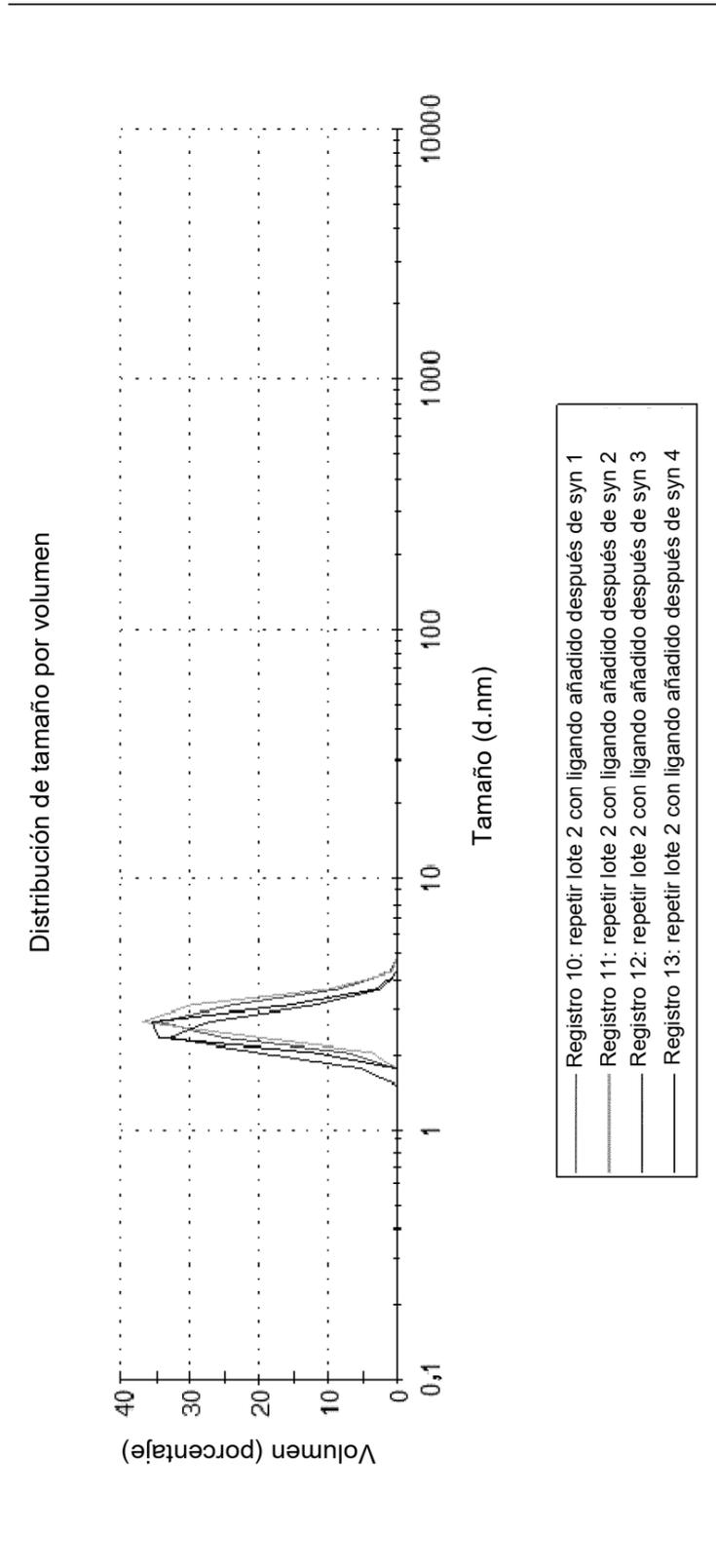


Figura 4

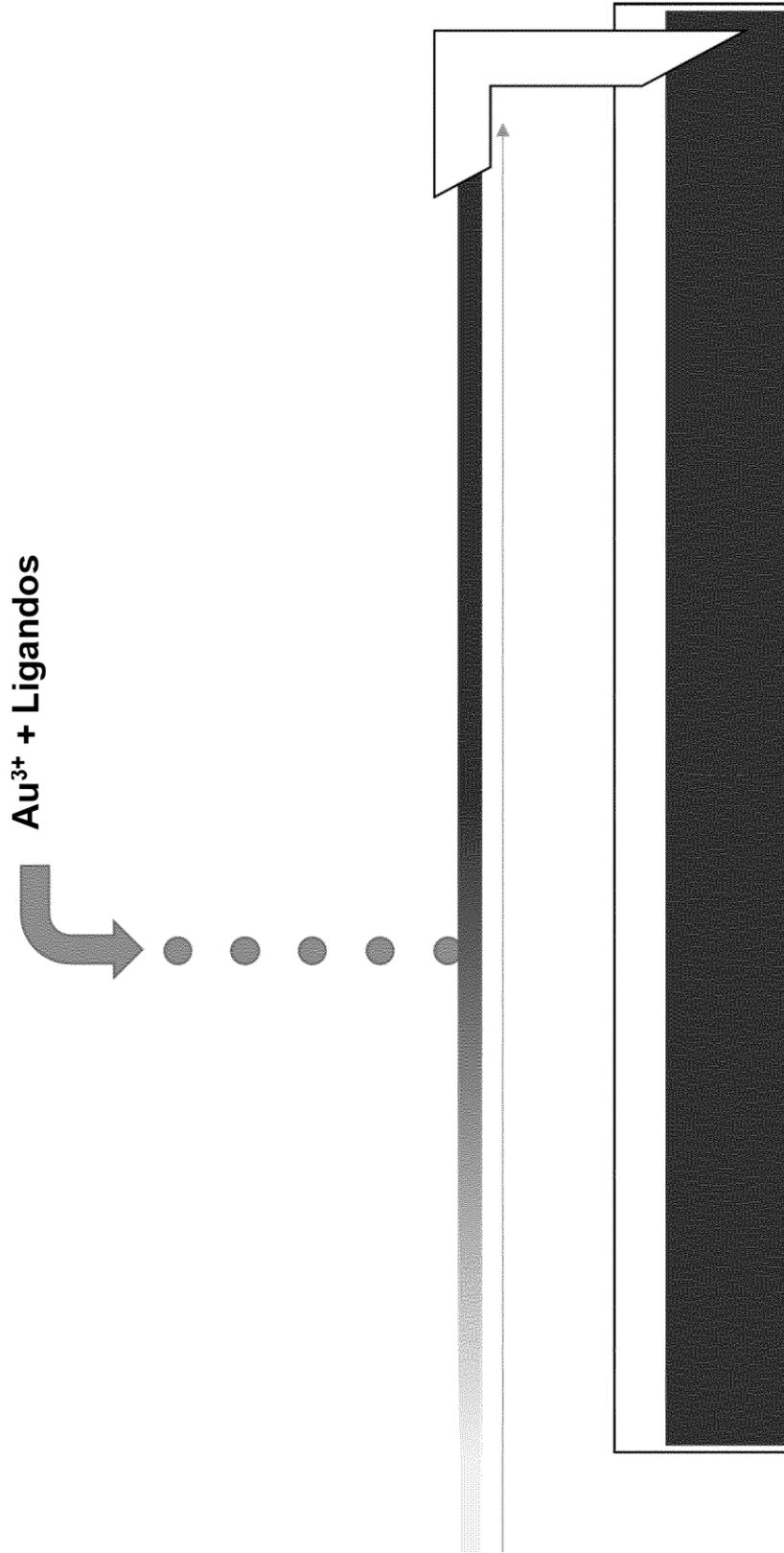


Figura 5

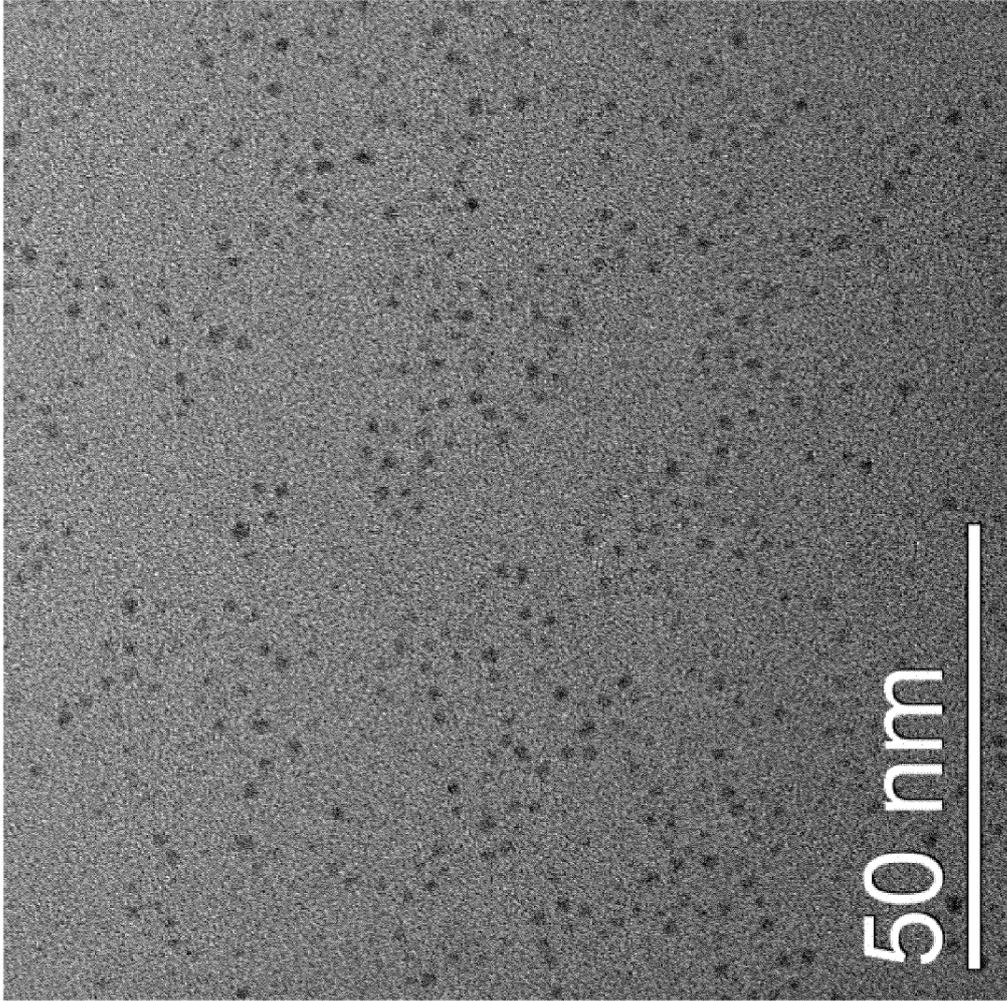


Figura 6