

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 780 387**

51 Int. Cl.:

C08B 1/12	(2006.01)
A61K 47/36	(2006.01)
A61K 9/51	(2006.01)
C08B 37/00	(2006.01)
C08B 37/02	(2006.01)
C08B 37/08	(2006.01)
C08L 1/28	(2006.01)
C08L 5/02	(2006.01)
C08L 5/08	(2006.01)
C08B 11/12	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2013 PCT/PL2013/000030**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13137755**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2013 E 13712947 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020 EP 2825563**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de nanopartículas de polisacáridos**

30 Prioridad:

14.03.2012 PL 39845012

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

25.08.2020

73 Titular/es:

**NANOVELO S.A. (100.0%)
ul. Rakowiecka 36
02-532 Warszawa, PL**

72 Inventor/es:

**CIACH, TOMASZ y
WASIAK, IGA**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 780 387 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

Procedimiento para la preparación de nanopartículas de polisacáridos

5 La invención proporciona un procedimiento para la preparación de nanopartículas de polisacáridos y derivados de los mismos mediante la oxidación específica de cadenas de polisacáridos y la unión de compuestos hidrófobos, incluyendo medicamentos.

10 Se conocen conjugados de compuestos del grupo de polisacáridos y sustancias químicas que muestran actividad terapéutica e incluyen grupos amino. Por ejemplo, el documento WO 2012/004007 da a conocer conjugados de derivado hidroxietilado de almidón y diversos medicamentos. El documento WO 03/000738 da a conocer conjugados antibiótico/almidón, en los que el antibiótico se une al extremo reductor de un polisacárido a través de un enlace peptídico. La unión se obtiene mediante la oxidación del derivado de almidón con I₂ en su extremo reductor, en una disolución acuosa alcalina, seguido por el acoplamiento del derivado oxidado con el antibiótico en una disolución orgánica. Además, a partir de la solicitud internacional WO03/15826 se conoce una composición farmacéutica para inhibir metástasis o prevenir la recidiva de un cáncer maligno, que comprende como principio activo un polisacárido con un grupo carboxilo unido a una sustancia activa con actividad anticancerígena a través de un aminoácido o un péptido que se compone de 2 a 8 aminoácidos. La solicitud WO03/074087 se refiere al acoplamiento de proteínas con un polisacárido modificado con un derivado de almidón, con la interacción de unión entre el polisacárido modificado y la proteína que comprende un enlace covalente que da como resultado una reacción de acoplamiento entre un grupo aldehído terminal del polisacárido modificado y un grupo funcional de la proteína que puede reaccionar con dicho grupo aldehído. La invención también proporciona formulaciones farmacéuticas que incluyen compuestos acoplados preparados por acoplamiento y el uso de dichos compuestos para el tratamiento preventivo o terapéutico de seres humanos o animales.

25 A partir de la solicitud internacional n.º WO 2011/069475 se conoce un procedimiento para la preparación de derivados oxidados de ácido hialurónico y un procedimiento para modificar tales derivados. Según el procedimiento de esta solicitud, se oxida ácido hialurónico con un agente oxidante específico TEMPO, para obtener un derivado ácido con grupos aldehído. Luego se usa el derivado para unirlos con aminos, diaminas, aminoácidos, péptidos y otros compuestos que contienen grupos amino. Dicha unión se pone en práctica mediante aminación reductora con NaBH₃CN, en agua o una mezcla de agua y un disolvente orgánico.

35 Las invenciones mencionadas anteriormente proporcionan acoplamientos (conjugados) de polisacáridos y diversas clases de sustancias terapéuticas, sin embargo, cualquiera de las disoluciones se dirigió a la obtención de nanopartículas de polisacáridos. Mientras, las nanopartículas se estudian de manera intensiva actualmente como posibles portadores para medicamentos, debido a varias propiedades novedosas deseadas [Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed *in vivo* delivery of drugs and vaccines, Mahapatra A., Singh K., Journal of Nanobiotechnology, 9, 2011]. Las nanopartículas con diámetros de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 200 nm, que tienen propiedades superficiales adecuadas, podrían circular durante mucho tiempo en la sangre evitando la eliminación mediante la filtración por los riñones, el hígado y el bazo (partículas de circulación prolongada, partículas furtivas). La superficie de tales nanopartículas no debe inducir ni una respuesta del sistema inmunitario ni agregación de pequeñas proteínas plasmáticas, opsoninas. En ese caso, es particularmente deseable una superficie de propiedades de hidrogel, tal como se crea por polímeros muy hidrófilos tales como polietilenglicol, polisacáridos, poli(alcohol vinílico). Los polisacáridos son especialmente deseados debido a su origen frecuentemente natural, biodegradabilidad y similitud con sustancias que se producen en el cuerpo. Tales nanopartículas de circulación prolongada tienden a acumularse en áreas de tumores o inflamaciones (direccionamiento pasivo) [Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer, Kwangjae Cho, Xu Wang, Shuming Nie, Zhuo Chen, Dong M. Shin, Clin. Cancer Res., 2008 14; 1310]. El efecto es debido al hecho de que las membranas celulares de células endoteliales que rellenan el aparato circulatorio se sellan de forma estanca por proteínas adecuadas y un hueco entre ellas es de varios nanómetros de ancho. En el área del tumor o la inflamación, los huecos son mucho más anchos y alcanzan varios cientos de nanómetros. Esto hace que las nanopartículas se acumulen en los huecos y “se derramen” desde la circulación hacia el tejido afectado circundante, incluyendo el tumor. Tal acumulación pasiva de nanopartículas en el área afectada por la enfermedad permite aumentar la concentración de fármaco en las áreas, potencia la eficacia del tratamiento y reduce los efectos secundarios. La característica adicional de las nanopartículas es su capacidad para modificarse en la superficie con proteínas, metabolitos o anticuerpos adecuados para mostrar afinidad activa hacia tipos de células específicas, incluyendo células tumorales. Esto permite administrar medicamentos principalmente a las células afectadas. Es deseable preparar la superficie de las nanopartículas de los polisacáridos debido al hecho de que las células tumorales muestran una demanda significativamente aumentada por la glucosa (el efecto Warburg) que a su vez permite obtener afinidad aumentada de nanopartículas de polisacáridos hacia las células tumorales. Tales nanopartículas de polisacáridos con un fármaco penetrarían de manera más eficiente en las células cancerosas y las destruiría, y cuando se etiqueta con un marcador fluorescente, se convierten en una herramienta de diagnóstico eficaz. Otra aplicación importante de las nanopartículas es la terapia génica. Una nanopartícula que contiene un fragmento de ARN o ADN puede penetrar en una célula e influir en los procesos de lectura de genes que se producen en la célula. Surge la esperanza para curar enfermedades genéticas.

Existen numerosos métodos para la preparación de nanopartículas, pero desafortunadamente la mayoría de ellos son muy complejos y requieren la aplicación de condiciones drásticas (ultrasonidos, altas temperaturas), compuestos químicos agresivos, disolventes orgánicos tóxicos o compuestos tensioactivos [Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed *in vivo* delivery of drugs and vaccines, Mahapatra A., Singh K., Journal of Nanobiotechnology, 9, 2011]. Las nanopartículas para uso terapéutico no deben ser tóxicas y lo más preferiblemente biodegradables. Los polisacáridos son un muy buen material para la preparación de tales nanopartículas, debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad [Lemarchand C., R. Gref, P. Couvreur, Polysaccharide-decorated nanoparticles, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 58, 2004]. Sin embargo, los métodos conocidos para la preparación de nanopartículas a partir de polisacáridos uniendo grupos hidrófobos son complejos y requieren el uso de materiales tensioactivos o productos químicos agresivos [Nanoparticles of hydrophobically modified dextrans as potential drug carrier system, Aumelas A., Serrero A., Durand, E., Dellacherie E., Leonard M., Colloids and Surfaces B, 59, 2007]. Las nanopartículas preparadas de ese modo deben purificarse adicionalmente durante un largo periodo de tiempo como consecuencia de las propiedades tóxicas de los compuestos.

La invención se refirió a un procedimiento para la preparación de nanopartículas de polisacáridos en condiciones suaves, para permitir la unión covalente de compuestos terapéuticos que son sensibles a un entorno agresivo.

El procedimiento para la preparación de nanopartículas de polisacáridos y derivados de los mismos, mediante su oxidación parcial específica para producir grupos aldehído y unir compuestos con grupo amino u otro con el enlace R-NH₂ que reacciona con grupos aldehído de la invención, se caracteriza porque el polisacárido o derivado del mismo se oxida mediante un método conocido para dar grupos aldehído hasta que se obtiene el grado de oxidación del 0,1% al 80% de los anillos de azúcar, y entonces se añaden a la disolución del polisacárido oxidado en agua o una mezcla de agua y un disolvente orgánico:

(i) al menos un agente de formación de nanopartículas, que después de la unión del grupo aldehído muestra propiedades hidrófobas, seleccionado de un grupo que comprende: aminas orgánicas alifáticas o aromáticas que comprenden desde 4 hasta 20 átomos de carbono, amidas e hidrazidas de ácidos orgánicos alifáticos y aromáticos que comprenden desde 4 hasta 20 átomos de carbono, aminoácidos hidrófobos, fosfatidiletanolamina

(ii) y al menos una sustancia activa que contiene al menos un grupo amino, amido o hidrazida,

y la reacción se realiza al pH de la disolución de 1 a 9, a la temperatura de 10 a 100°C, lo más preferiblemente 20-60°C, en el que la razón molar total de grupos amina con respecto a grupos aldehído es de desde 20 hasta 0,5.

El agente de formación de nanopartículas puede añadirse simultáneamente con la sustancia activa o se añade después de la sustancia activa. Es preferible añadir la sustancia activa en primer lugar, ya que la reacción se produce más lentamente después de que se pliegan las nanopartículas dando como resultado posiblemente una adición incompleta de la sustancia activa y la pérdida de la misma en la purificación del producto. Algunas veces, la sustancia activa podría acumularse en las nanopartículas en formas de nanocristal precipitadas en áreas hidrófobas creadas por el agente de plegamiento, y luego no se une covalentemente sino físicamente y podría añadirse en grandes cantidades. Este es el caso en el que es poco soluble en agua alrededor de pH neutro, y bien soluble a pH menor de 7.

Tanto el agente de formación como la sustancia activa se introducen preferiblemente en forma de sales que son fácilmente solubles en agua, por ejemplo, clorhidratos. Si la amina se introduce como la sal más fácilmente soluble (por ejemplo, clorhidrato), el pH se reduce en el transcurso de la reacción, y entonces la disolución se neutraliza lentamente con la disolución básica acuosa. El pH óptimo depende de la alcalinidad de la amina empleada. Generalmente, el aumento en la concentración de iones de hidrógeno activa el grupo aldehído, pero también da como resultado la bajada de la concentración de la amina no protonada libre; el pH óptimo de la reacción de primer orden está entre 4 y 6, un aumento adicional en el pH permite completar el procedimiento disminuyendo la concentración de cationes de amina.

El procedimiento para la preparación de nanopartículas también podría realizarse en disolventes orgánicos o mixtos, tales como agua/DMSO, agua/acetónitrilo, agua/éter. Para aumentar la resistencia a la hidrólisis de las nanopartículas obtenidas, se utiliza reducción de los enlaces formados con NaBH₄ o NaBH₃CN, también en la disolución acuosa y en condiciones suaves.

Preferiblemente, como agente de formación de nanopartículas se emplean los siguientes: butilamina, pentilamina, hexilamina, octilamina, decilamina, dodecilamina, tetradecilamina, hexadecilamina, ciclohexilamina, bencilamina, etilfenilamina, esfingosinas, amida de ácido oleico, amida de ácido palmítico, hidrazida de ácido esteárico, hidrazida de ácido palmítico, hidrazida de ácido oleico, leucina, isoleucina, valina, metionina, alanina, fenilalanina o cefalina (fosfatidiletanolamina). Es preferible añadir el agente de formación como una disolución acuosa de una sal de amina, por ejemplo, clorhidrato, nitrato o sulfato, ya que las sales de las aminas actuales son habitualmente más solubles en agua.

Preferiblemente, como sustancia activa que comprende grupos amino, amido o hidrazida se usan fármacos que contienen tales grupos, tales como daunorrubicina, doxorrubicina, aminoacridina y derivados de la misma (como amsacrina), cisplatino y derivados del mismo, metotrexato, citarabina, gemcitabina, dapsona, aciclovir, azidotimidina, 5-fluorouracilo, mercaptopurina, imatinib, sunitinib, bleomicina, actinomicina, mitomicina, dactinomicina, melfalán, temozolomida, celecoxib, nelarabina, cladribina, isoniazida o medicamentos derivados, en la que se convirtió un grupo carboxilo en amida o hidrazida; fragmentos de ARN o ADN adecuados para terapia génica, o derivados de los mismos; colorantes puros y fluorescentes tales como 9-aminoacridina y otros colorantes de acridina, DAPI, rodamina y derivados de la misma, rojo neutro, azul tripano. Es preferible añadir la sustancia activa en el medio de reacción como una disolución acuosa de una sal de amina, por ejemplo, clorhidrato, nitrato o sulfato, las sales de las aminas actuales son habitualmente más solubles en agua. Si una sustancia activa de este tipo se disuelve en agua en entorno ácido, pero es poco soluble en entorno neutro, dicha sustancia podría unirse dentro de nanopartículas sólo mediante interacciones físicas. Al aumentar el pH, se precipitará dentro de áreas hidrófobas de nanopartículas como nanocristales.

Preferiblemente, como polisacárido, se usa el polisacárido que es soluble en agua u otros disolventes, de un peso molecular de hasta 1000 kDa, lo más preferiblemente dextrano, almidón y derivados del mismo (hidroxietilalmidón), amilosa y derivados de la misma, derivados de celulosa (hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa), glucógeno, ácido hialurónico, heparina, ácido alginico, carragenano.

Preferiblemente, la oxidación se lleva a cabo hasta el grado de oxidación del 0,5% al 80% de los anillos de azúcar oxidados en el polisacárido.

Preferiblemente, la oxidación se lleva a cabo con la participación del agente de oxidación, que comprende iones peryodato (por ejemplo, peryodato de sodio o potasio), sales de plomo con el número de oxidación de 4, compuestos de cobre con el número de oxidación de 2 o agua oxidada en presencia de catalizadores adecuados tales como, por ejemplo, óxidos de vanadio.

Además, las nanopartículas obtenidas podrían modificarse con anticuerpos o péptidos, o proteínas, también mediante la reacción de grupos aldehído del polisacárido oxidado con grupos amina de péptidos.

La suspensión acuosa de nanopartículas obtenida de ese modo se purifica mediante diálisis, precipitación, centrifugación, o se emplea directamente. La disolución de nanopartículas obtenida podría liofilizarse. Para la liofilización, podría añadirse una sustancia que desempeña el papel de agente protector (crioprotector), tal como un polisacárido no modificado, por ejemplo dextrano. Las nanopartículas obtenidas muestran capacidades autoorganizativas, si se liofilizan hasta un polvo seco, después de suspenderlas en agua o solución salina, forman nanopartículas en varios minutos.

Según la invención, se oxida previamente un polisacárido en una disolución acuosa añadiendo una cantidad predeterminada de un agente oxidante. En el transcurso de la oxidación específica, se escinden anillos de monosacárido, por ejemplo glucosa, en vez de la cadena de polisacárido, y los anillos oxidados forman grupos aldehído. Esta es una de las reacciones de oxidación específica típicas empleadas en química orgánica, tal como se ejemplifica mediante un procedimiento de oxidación de mono o polisacáridos con peryodatos. [Jeanes, Allene y Wilham, C.A. Periodate Oxidation of Dextrane, Journal of American Chemical Society 72,6, (1950): 2655 - 2657]. En el procedimiento de oxidación, se escinde un enlace carbono-carbono, que tiene grupos -OH en los carbonos adyacentes y se forman grupos aldehído en ambos extremos formados. También podrían emplearse otros métodos de oxidación parcial, que conducen a la formación de grupos aldehído a lo largo de la cadena de polisacárido mediante la escisión de anillos de monosacáridos (glucosa) y que se realiza sin escisión de la cadena de polisacárido. El grado de oxidación, el número de grupos aldehído puede determinarse de una manera conocida; por ejemplo, haciendo reaccionar aldehídos con clorhidrato de hidroxilamina y valorando el ácido clorhídrico liberado [Zhao, Huiru, Heindel, Ned D., Determination of Degree of Substitution of Formyl groups in Polyaldehyde Dextrane by the Hydroxylamine Hydrochloride Method, Pharmaceutical Research, 8,3(1991):400-402]. A las moléculas de polisacárido preparadas se unen compuestos de formación haciendo reaccionar grupos aldehído con grupos amino, lo que conduce a la formación espontánea de nanopartículas.

Según la invención, el polisacárido oxidado se modifica simultáneamente por al menos dos clases de sustancias con la naturaleza de amina: agente(s) de formación de nanopartículas hidrófobo(s) por naturaleza, siendo las sustancias restantes agentes terapéuticos o colorantes, mientras que es posible usar en una nanopartícula al mismo tiempo varias sustancias activas diferentes. Esto permite obtener un efecto sinérgico de actividades combinadas de varios medicamentos. El uso simultáneo de varios medicamentos disminuye significativamente la posibilidad de desarrollar resistencia al tratamiento con los fármacos por el tumor y permite la destrucción activa de una célula independientemente de la fase del ciclo celular. En el procedimiento de la invención, debido a las interacciones hidrófobas-hidrófilas, se forma la nanopartícula de polisacáridos que contiene la sustancia activa y el agente de plegamiento hidrófobo en su interior, y su capa exterior comprende componentes hidrófilos, principalmente el polisacárido. También es posible modificar simultáneamente el polisacárido con el agente de formación, el/los fármaco(s) y componente reactivo al grupo aldehído que potencia la afinidad hacia tipos de células específicas, tales como anticuerpos, bases nucleotídicas o metabolitos, por ejemplo, ácido fólico. En la formación de nanopartículas,

los agentes hidrófobos entran, y los hidrófilos se posicionan fuera de las nanopartículas.

La reacción de la invención se realiza en un entorno acuoso, en condiciones suaves de temperatura y sin disolventes orgánicos o tensioactivos. Las nanopartículas obtenidas no son tóxicas como tales (si se preparan sin un fármaco tóxico) y podrían usarse como portadores para medicamentos e indicadores de color o fluorescentes, en la terapia y el diagnóstico de tumores en particular. Las nanopartículas pueden contener uno o más agentes de formación o varios fármacos en diversas combinaciones, y también pueden contener adyuvantes (diindolimetano), que mejoran su eficacia como medicamentos.

La estabilidad de las macromoléculas preparadas es habitualmente suficiente y alcanza desde varias hasta por encima de una docena de semanas en un entorno acuoso. La estabilidad en seco después de la liofilización es notablemente mayor y supera un año con un almacenamiento apropiado. La estabilidad del enlace formado entre los grupos amino y aldehído podría potenciarse de manera adicional reduciendo el enlace aldehído - amina.

El procedimiento de la invención se ilustró en más detalle en los ejemplos de realización.

Ejemplo 1.

Se oxidó dextrano de peso molecular de 70 kDa con peryodato de sodio para oxidar aproximadamente el 5% de los anillos de glucosa, y se purificó. Para realizarlo, se preparó una disolución acuosa de dextrano y se le añadió peryodato de sodio. La estequiometría de la reacción depende de las condiciones de oxidación, del peso molecular y, frecuentemente, del origen del dextrano, y equivale a desde 1 hasta 2 moles de peryodato por mol de glucosa oxidada (dos grupos aldehído formados), y debe verificarse experimentalmente. El procedimiento de oxidación de dextrano se realizó a temperatura ambiente en un recipiente fabricado con vidrio oscuro durante una hora. Luego, se neutralizó la disolución y se purificó mediante diálisis frente a agua destilada, seguido por separación de agua a vacío. Se determinó el número de grupos aldehído mediante el método conocido de valoración de hidroxilamina. Se preparó una disolución al 5% de dicho dextrano en agua destilada. Luego, se añadió clorhidrato de daunorrubicina al 15% en moles basándose en el número de moles de grupos aldehído en la cantidad usada de dextrano oxidado. Se agitó la disolución durante 20 minutos a 30°C. Luego, se añadió la disolución acuosa de clorhidrato de dodecilamina al 5% al 85% en moles basándose en el número inicial de moles de grupos aldehído en la cantidad usada de dextrano oxidado y se elevó la temperatura hasta 35°C, y se continuó la reacción durante 60 minutos. La reacción en marcha produce una reducción del pH del entorno de reacción. Luego, se inició el aumento del pH añadiendo disolución acuosa de NaOH al 5%. Se realizó la adición de una manera para elevar el pH a un pH 9 en 30 minutos. Después de alcanzar pH=9, se continuó la reacción durante 30 minutos adicionales. Luego se añadió alanina al 15% en moles basándose en el número inicial de moles de grupos aldehído en la cantidad usada de dextrano oxidado, para unir todos los grupos aldehído sin reaccionar. Después de 15 minutos de agitación, se neutralizó la disolución con ácido clorhídrico al 5% a pH=7 y se purificó mediante diálisis durante 24 horas. Luego, se añadió el 20% en peso (basándose en el peso inicial de dextrano oxidado) de dextrano no oxidado puro como crioprotector y se liofilizó la disolución. Se resuspendió el polvo en agua para dar una suspensión de nanopartículas. Se midió la distribución de diámetros de las nanopartículas obtenidas con el aparato Malvern Zeta Sizer mostrado la figura 1. Las mediciones realizadas con el aparato NanoSight con un láser de 405 nm laser revelaron un diámetro de partícula medio ligeramente menor y una distribución de diámetros más estrecha.

Ejemplo 2.

Se oxidó dextrano de peso molecular de 40 kDa con peryodato de sodio para oxidar aproximadamente el 20% de los anillos de glucosa, y se purificó. Se preparó una disolución al 10% de tal dextrano en agua destilada. Luego, se añadió clorhidrato de doxorubicina al 20% en moles basándose en el número de moles de grupos aldehído en la cantidad usada de dextrano oxidado. Se agitó la disolución durante 20 minutos a 30°C. Luego, se añadió la disolución acuosa de clorhidrato de octilamina al 5% al 80% en moles basándose en el número inicial de moles de grupos aldehído en la cantidad usada de dextrano oxidado, y se elevó la temperatura hasta 40°C, y se continuó la reacción durante 60 minutos. La reacción en marcha produce una reducción del pH. Luego, se inició el aumento del pH añadiendo disolución acuosa de NaOH al 5%. Se realizó la adición de una manera para elevar el pH a pH 8 en 30 minutos. Después de alcanzar pH=8, se continuó la reacción durante 30 minutos adicionales. Luego se añadió alanina al 10% en moles basándose en el número inicial de moles de grupos aldehído en la cantidad usada de dextrano oxidado. Después de 15 minutos de agitación, se neutralizó la disolución con ácido clorhídrico al 5% a pH=7 y se añadió NaBH₃CN en un exceso del 10% en moles basándose en la cantidad inicial de grupos aldehído. Luego, se llevó a cabo la reacción durante 12 horas. Se neutralizó la disolución y se purificó mediante diálisis extensiva durante 48 horas, luego se añadió dextrano al 50% en peso basándose en el peso inicial de dextrano y se liofilizó la disolución. Después de la resuspensión en agua, se midió la distribución de diámetros de las nanopartículas obtenidas con el aparato NanoSight con un láser de 405 nm y se mostró en la figura 2.

Ejemplo 3.

Se preparó una disolución acuosa de carboximetilcelulosa al 4% de peso molecular de aproximadamente 100 kDa y el número de oxidación del 5%, y se ajustó el pH a pH 5. Luego, se añadió 9-aminoacridina como su disolución

acuosa de clorhidrato al 50% en moles basándose en la cantidad inicial de grupos aldehído del derivado de celulosa usado. Luego, se añadió octilamina acuosa al 55% en moles basándose en el número inicial de moles de grupos aldehído. Se llevó a cabo la reacción a 40°C durante una hora. Luego se neutralizó la disolución elevando el pH a pH 9 en 15 minutos, se dejó durante 30 minutos y se sometió a diálisis. Se obtuvieron las nanopartículas fluorescentes con el diámetro medio de 150 nm.

Ejemplo 4.

Se oxidó dextrano de peso molecular de 70 kDa con peryodato de sodio para oxidar aproximadamente el 15% de los anillos de glucosa, y se purificó. Se preparó una disolución al 10% de tal dextrano en agua destilada. Luego, se añadió clorhidrato de doxorubicina al 25% en moles basándose en el número de moles de grupos aldehído en la cantidad usada de dextrano oxidado. Se agitó la disolución durante 20 minutos a 35°C. Luego, se añadió ácido fólico al 5% en moles basándose en la cantidad inicial de grupos aldehído para potenciar la afinidad de las nanopartículas hacia células tumorales. Después de 15 minutos, se añadió la disolución acuosa de isoleucina al 5% al 80% en moles basándose en el número inicial de moles de grupos aldehído en la cantidad usada de dextrano oxidado, y se elevó la temperatura hasta 40°C, y se realizó la reacción durante 60 minutos. Luego, se inició el aumento del pH añadiendo la disolución acuosa de NaOH al 5%. Se realizó la adición de una manera para elevar el pH a pH 9,5 en 30 minutos. Se continuó la reacción durante 30 minutos adicionales. Luego se neutralizó la disolución y se purificó mediante diálisis durante 24 horas. El diámetro medio de las nanopartículas obtenidas fue de 140 nm.

Ejemplo 5

Se oxidó la sal sódica de carboximetilcelulosa en la disolución acuosa con peróxido de hidrógeno en presencia de catalizador de tetrasulfohierro-ftalocianina [Weber, J.H. *et al*, Complexes derived from strong field ligands..., Inorganic Chemistry, 1965, 4, 469-471]. Se realizó el procedimiento durante 12 horas a 40°C, luego se purificó el producto mediante filtración, seguido por diálisis. Se determinó la cantidad de grupos aldehído en el derivado de carboximetilcelulosa de aldehído obtenido mediante el método conocido de valoración de hidroxilamina. Se preparó la disolución al 5% del derivado obtenido en agua destilada. Luego, se añadió clorhidrato de doxorubicina al 10% en moles basándose en el número de moles de grupos aldehído en la cantidad usada de dextrano oxidado. Se agitó la disolución durante 20 minutos a 30°C. Luego, se añadió la disolución acuosa de clorhidrato de dodecilamina al 5% al 90% en moles basándose en el número inicial de moles de grupos aldehído en la cantidad usada de dextrano oxidado y se elevó la temperatura hasta 35°C, y se continuó la reacción durante 60 minutos. Luego, se inició el aumento del pH añadiendo disolución acuosa de NaOH al 5%. Se realizó la adición de una manera para elevar el pH a pH 9 en 30 minutos. Después de alcanzar pH=9, se continuó la reacción durante 30 minutos adicionales. Luego se añadió alanina al 30% en moles basándose en el número inicial de moles de grupos aldehído en la cantidad usada de dextrano oxidado, para unir todos los grupos aldehído sin reaccionar. Después de 15 minutos de agitación, se neutralizó la disolución con ácido clorhídrico al 5% a pH=7 y se purificó mediante diálisis durante 24 horas. El diámetro medio de las nanopartículas obtenidas tal como se midió con el aparato Malvern Zeta Sizer fue de 110 nm.

Ejemplo 6

Se preparó la disolución acuosa de la sal sódica de ácido hialurónico al 1% y se oxidó con peryodato de sodio hasta el grado de oxidación del 5% como en el ejemplo 1. Se ajustó el pH a pH 5, se añadieron clorhidrato de daunorrubicina y clorhidrato de citarabina para cada uno de los fármacos que comprendían el 10% en moles de todos los grupos aldehído de ácido hialurónico oxidado, y se llevó a cabo la reacción durante 15 minutos a 30°C. Luego, se añadió disolución acuosa de clorhidrato de decilamina al 85% en moles basándose en el número inicial de moles de grupos aldehído. Se llevó a cabo la reacción a 40°C durante una hora. Luego, se elevó el pH a pH 9 en un plazo de 20 minutos, se neutralizó la disolución y se sometió a diálisis. Se obtuvo una suspensión acuosa de nanopartículas de polisacáridos que comprendían dos fármacos con distintos mecanismos de acción.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de nanopartículas de polisacáridos y derivados de los mismos, mediante su oxidación parcial específica para producir grupos aldehído y unir compuestos con un grupo amino u otro con el enlace R-NH₂ que reacciona con grupos aldehído, caracterizado porque el polisacárido o derivado del mismo se oxida mediante un método conocido para obtener grupos aldehído hasta que se obtiene el grado de oxidación del 0,1% al 80% de los anillos de azúcar, y luego se añaden a la disolución del polisacárido oxidado en agua o una mezcla de agua y un disolvente orgánico:
- (i) al menos un agente de formación de nanopartículas que después de la unión del grupo aldehído muestra propiedades hidrófobas, seleccionado del grupo que comprende: aminas orgánicas alifáticas o aromáticas que contienen desde 4 hasta 20 átomos de carbono, amidas e hidrazidas de ácidos orgánicos alifáticos y aromáticos que contienen desde 4 hasta 20 átomos de carbono, aminoácidos hidrófobos, fosfatidiletanolamina, y
- (ii) al menos una sustancia activa que contiene al menos un grupo amino, amido o hidrazida,
- y la reacción se realiza a un pH de la disolución de desde 1 hasta 9, a la temperatura de desde 10 hasta 100°C, en el que la razón molar total de grupos amino con respecto a grupos aldehído es de desde 20 hasta 0,5.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de formación de nanopartículas se añade de manera simultánea con la sustancia activa.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el agente de formación de nanopartículas se añade después de añadir la sustancia activa.
4. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 4, caracterizado porque el agente de formación de nanopartículas se selecciona del grupo que comprende: butilamina, pentilamina, hexilamina, octilamina, decilamina, dodecilamina, tetradecilamina, hexadecilamina, ciclohexilamina, bencilamina, etilfenilamina, esfingosinas, amida de ácido oleico, amida de ácido palmítico, hidrazida de ácido esteárico, hidrazida de ácido palmítico, hidrazida de ácido oleico, leucina, isoleucina, valina, metionina, alanina, fenilalanina, cefalina.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque como sustancia activa, se usan los fármacos que comprenden grupos amino, amido o hidrazida o fármacos derivados en el que un grupo carboxilo se modificó por amida o hidrazida, fragmentos de ARN o ADN adecuados para terapia génica, o derivados de los mismos, colorantes puros y fluorescentes.
6. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 6, caracterizado porque la sustancia activa se selecciona del grupo que comprende: daunorrubicina, doxorubicina, aminoacridinas y derivados de las mismas, cisplatino y derivados del mismo, metotrexato, citarabina, gemcitabina, dapsona, aciclovir, azidotimidina, 5-fluorouracilo, mercaptopurina, imatinib, sunitinib, bleomicina, actinomicina, mitomicina, dactinomicina, melfalán, temozolomida, celecoxib, nelarabina, cladribina, isoniazida, 9-aminoacridina y otros colorantes de acridina, DAPI, rodamina y derivados de la misma, rojo neutro, azul trípano.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque tanto el agente de formación como la sustancia activa se añaden a la reacción en forma de sales fácilmente solubles.
8. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque se usan clorhidratos, nitratos o sulfatos como sales.
9. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se usan dextrano, almidón y derivados del mismo, amilosa y derivados de la misma, derivados de celulosa, glucógeno, ácido hialurónico, heparina, ácido algínico, carragenano como polisacáridos.
10. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el procedimiento se lleva a cabo en las mezclas de disolventes agua/DMSO, agua/acetonitrilo, agua/éter.
11. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la oxidación se lleva a cabo hasta que se obtiene el grado de oxidación del 0,1% al 80% de los anillos de azúcar en el polisacárido.
12. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la oxidación se lleva a cabo en presencia de un agente oxidante que comprende iones peryodato, sales de plomo con el número de oxidación de 4, compuestos de cobre con el número de oxidación de 2 o agua oxidada en presencia de catalizadores adecuados.
13. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque después de completarse la reacción, se lleva

a cabo la reducción de los enlaces formados.

- 5
14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque la reducción se lleva a cabo con NaBH_4 o NaBH_3CN en la disolución acuosa.
15. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la suspensión acuosa de nanopartículas se purifica mediante diálisis, precipitación, centrifugación, o se usa directamente.
- 10
16. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las nanopartículas obtenidas se modifican con anticuerpos, péptidos o proteínas, también por reacción de grupos aldehído del polisacárido oxidado con grupos amino peptídicos.
17. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la disolución de las nanopartículas obtenidas se liofiliza.
- 15
18. Procedimiento según la reivindicación 17, caracterizado porque la liofilización se lleva a cabo con una sustancia crioprotectora añadida.
- 20
19. Procedimiento según la reivindicación 18, caracterizado porque el crioprotector es un polisacárido no modificado.

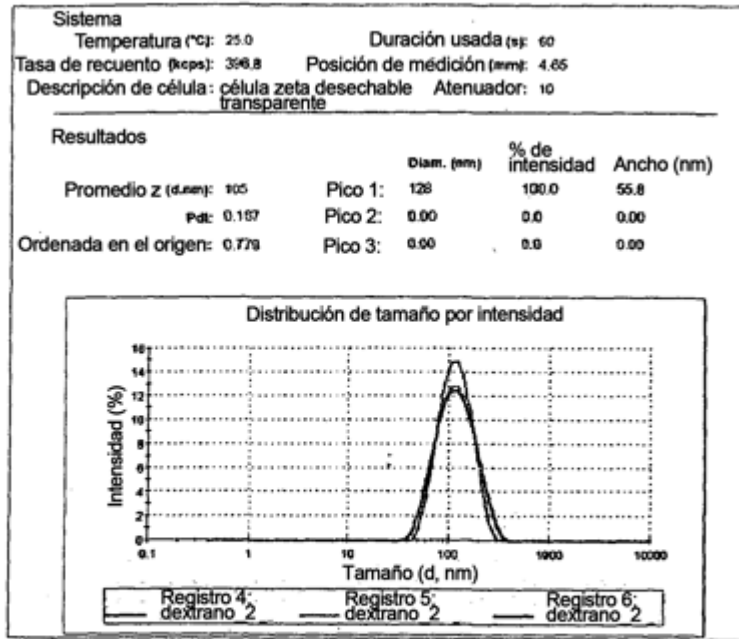


Fig. 1

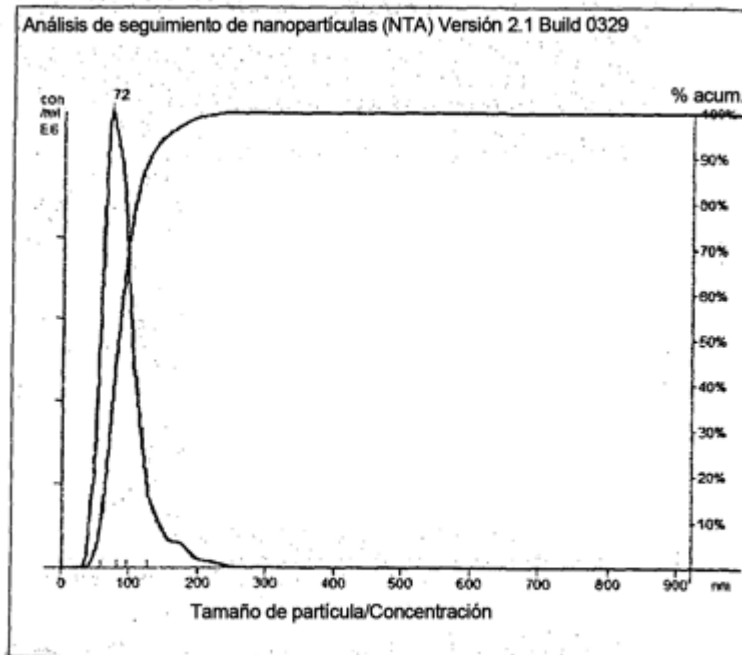


Fig. 2