

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 517**

51 Int. Cl.:

A61K 31/495	(2006.01)	A61K 47/34	(2007.01)
A61K 31/4745	(2006.01)	A61K 47/50	(2007.01)
A61K 31/205	(2006.01)	A61P 5/00	(2006.01)
A61K 31/282	(2006.01)	A61P 25/00	(2006.01)
A61K 31/704	(2006.01)	A61P 27/02	(2006.01)
A61K 31/337	(2006.01)		
A61K 38/17	(2006.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		
A61K 9/16	(2006.01)		
A61K 9/51	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2015 PCT/EP2015/076364**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016 WO16075211**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2015 E 15794158 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 3217958**

54 Título: **Nanopartículas encapsuladas de liberación sostenida**

30 Prioridad:

11.11.2014 GB 201420080

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

16.10.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WILLIAMS, PHILLIP;
GROVES, RHIAN y
PALMER, DANIEL**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 787 517 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 encapsuladas de liberación sostenida

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nanopartículas encapsuladas dentro de micropartículas poliméricas, particularmente para su uso en medicina, e incluye métodos para el tratamiento de trastornos. También se desvelan composiciones farmacéuticas, procesos para la producción de las micropartículas y métodos para su uso.

10

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y productos, y a métodos de fabricación y administración de tales composiciones y productos, incluso para el tratamiento de mamíferos y, en particular, seres humanos.

15

La administración de medicamentos plantea varios desafíos importantes, particularmente con respecto al sitio y la duración de la acción. En el caso del tratamiento de ciertos tumores, por ejemplo, sigue existiendo la necesidad de sistemas de administración que puedan dirigir los medicamentos contra el cáncer al sitio del tumor y que puedan mantener una concentración eficaz del medicamento durante un período prolongado idealmente, mientras minimizan la necesidad de repetir la administración frecuente del medicamento.

20

Ren et al., *Micro & Nano Letters*, 2011, vol. 6, N.º 2, pág. 70-74, describen microesferas de polilactida-co-glicólido de liberación sostenida cargadas con nanopartículas de proteína polisacárido pre-formuladas.

25

El documento WO2011/119881 describe sistemas de nanopartículas multicompartimentales para imágenes así como para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la inflamación y/o enfermedad.

El documento WO2010/059135 describe micropartículas que tienen una anchura de al menos aproximadamente 1 micrómetro y que incluyen un polímero biocompatible, una nanopartícula y un agente anticanceroso.

30

El documento US2014/0220135 describe nanopartículas portadoras de principio activo mejoradas por permeación, particularmente para su uso en medicina.

35

El documento WO2020/052503 describe el uso de nanopartículas para obtener imágenes de un tumor en un mamífero mediante tomografía de impedancia eléctrica.

Los documentos WO2012/042273 y WO2012/042274 describen aparatos y procesos para la preparación de perlas sólidas que encapsulan agentes bioactivos y que son adecuados para su uso en liberación sostenida, por ejemplo, mediante inyección depot.

40

El documento WO2013/042125 describe la nanoencapsulación doble para proteger y controlar la liberación de agentes activos, ya sea hidrofóbicos o hidrofílicos, de nanopartículas estables de características opuestas.

45

El documento WO2011/154711 describe nanopartículas de oro glicosiladas que actúan como portadores para la administración de péptidos, tales como insulina.

Los documentos WO 2011/156711 y WO2012/170828 describen sistemas de administración de películas terapéuticas o bioafectantes en las que las nanopartículas que tienen principios activos unidos o asociados con ellas se incorporan dentro de una matriz de película polimérica.

50

El documento WO2014/125256 describe sistemas de administración de nanopartículas para su uso en la orientación de agentes biológicamente activos al sistema nervioso central (SNC), por ejemplo, para el tratamiento de trastornos del SNC.

55

Sigue habiendo una necesidad insatisfecha de más sistemas de administración de nanopartículas y de métodos para administrar dichos agentes bioactivos a un sujeto en el lugar apropiado y/o durante la duración adecuada. La presente invención aborda estas y otras necesidades.

Breve descripción de la invención

60

En términos generales, la presente invención se refiere a conjugados de nanopartículas-fármaco encapsulados en perlas a escala de micrómetros como se define en las reivindicaciones. Los presentes inventores han descubierto, sorprendentemente, que es posible encapsular nanopartículas de núcleo metálico (por ejemplo, oro) dentro de micropartículas poliméricas biocompatibles con alta eficiencia de atrapamiento.

65

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una micropartícula que comprende al

menos un polímero biocompatible, encapsulando la micropartícula al menos una nanopartícula, comprendiendo la nanopartícula:

- 5 (i) un núcleo que comprende un metal y/o un semiconductor;
 (ii) una corona que comprende una pluralidad de ligandos unidos covalentemente al núcleo, en el que dichos ligandos comprenden al menos un carbohidrato y/o glutatión,

en el que la micropartícula tiene un diámetro a lo largo de su dimensión más larga que está dentro del intervalo de 10 μm a 75 μm .

10 De acuerdo con este y otros aspectos de la presente invención, la al menos una nanopartícula comprende, preferentemente, además, al menos un agente biológicamente activo (por ejemplo, un principio activo farmacéutico como "carga útil") y/o un marcador detectable (por ejemplo, un fluoróforo). Sin embargo, se ha descubierto que ciertas nanopartículas exhiben actividad biológica incluso en ausencia de un agente activo adicional. Por lo tanto, se
 15 contempla específicamente en el presente documento que la nanopartícula no necesariamente tiene que tener ningún agente activo añadido. Cuando la nanopartícula comprende dicho agente biológicamente activo, el agente generalmente está asociado con el núcleo y/o la corona de la nanopartícula. Convenientemente, esta asociación puede tener la forma de un enlace covalente, por ejemplo, a través de un grupo enlazador unido al núcleo de la nanopartícula o a uno o más de los ligandos de nanopartículas. Por ejemplo, un enlazador de alquilo y/o glicol puede
 20 conectar un agente, tal como un agente quimioterapéutico, al núcleo de las nanopartículas. En ciertos casos, el agente activo puede estar unido no covalentemente a dicha corona y/o dicho núcleo. Por ejemplo, el agente activo puede comprender un péptido o polipéptido unido no covalentemente (por ejemplo, mediante interacción electrostática o fuerzas de Van der Waals o de otro modo) a los ligandos que forman la corona de la nanopartícula.

25 En ciertos casos, el al menos un agente biológicamente activo puede comprender un agente quimioterapéutico y/o puede estar unido covalentemente a dicho núcleo a través de un enlazador.

En ciertos casos, el al menos un agente biológicamente activo puede estar unido covalentemente a dicho núcleo a través de un enlazador que comprende alquilo C2-C15 y/o glicol C2-C15.

30 En ciertos casos, el agente biológicamente activo comprende un agente quimioterapéutico o "anticanceroso", que puede seleccionarse, preferentemente, del grupo que consiste en: temozolomida, irinotecán, clorotóxina, carmustina, platino (IV), platino (II), camptotecina, doxorubicina, docetaxel, maitansina, maitansinoides, inhibidores de la monometil auristatina E (MMAE) y la histona desacetilasa (HDAC), tales como panobinostat, vorinostat, romidepsina y chidamida.

35 En ciertos casos, la nanopartícula comprende además un resto dirigido a células, tejidos o tumores. Debido a los ventajosos efectos de avidez de los múltiples ligandos presentados por la nanopartícula, se ha descubierto que una serie de restos de direccionamiento son capaces de dirigir las nanopartículas descritas en el presente documento a ciertos sitios de interés, por ejemplo, sitios de tejido tumoral o enfermo, tipos de órganos o tipos de células
 40 particulares. En determinados casos, el resto dirigido puede seleccionarse del grupo que consiste en: ácido fólico, lactosa, albúmina, glutamina, un ligando de unión a receptor de superficie celular (por ejemplo, un ligando de EGFR, tal como gefitinib) y un anticuerpo, particularmente un anticuerpo que se une selectivamente a un antígeno asociado a tumor.

45 En algunos casos, el al menos un agente biológicamente activo comprende al menos un péptido o polipéptido que está unido no covalentemente a la corona. Por ejemplo, el péptido o polipéptido puede seleccionarse del grupo que consiste en: insulina, GLP-1, amilina, exenatida, octreotida, teriparatida, glucagón, una citocina y un anticuerpo.

50 En algunos casos, la corona de la nanopartícula comprende al menos 5, 10, 20 o al menos 50 ligandos por núcleo de nanopartícula. La corona puede, en determinados casos, ser una corona mixta. Por ejemplo, la corona puede comprender dos o más especies diferentes de ligando (por ejemplo, carbohidratos y no carbohidratos, tales como alfa-galactosa y PEGamina; glutatión y carbohidrato; dos sacáridos diferentes, tales como glucosa y galactosa o N-acetil glucosamina y lactosa). La relación entre la primera especie de ligando y la segunda especie de ligando puede
 55 estar en el intervalo de 1:100 a 100:1, preferentemente de 80:20 a 20:80, aún más preferentemente, de 60:40 a 40:60).

En algunos casos, el número de moléculas de dicho agente biológicamente activo por núcleo de nanopartícula se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

60 En algunos casos, el diámetro del núcleo de la nanopartícula está en el intervalo de 1 nm a 5 nm. El diámetro de la nanopartícula que incluye 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.

65 En algunos casos, el núcleo de la nanopartícula comprende un metal seleccionado del grupo que consiste en: Au, Ag, Cu, Pt, Pd, Fe, Co, Gd, Eu y Zn, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos casos, la nanopartícula tiene

un núcleo que comprende o consiste en átomos de oro.

La micropartícula de este y otros aspectos de la presente invención normalmente tiene más de uno, por ejemplo, más de 10, 100, 1.000, 10.000, 100.000, 10^6 , 10^7 o más de 10^8 nanopartículas individuales encapsuladas en la misma.

En ciertos casos, la micropartícula comprende una pluralidad de dichas nanopartículas, en la que al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de las nanopartículas en dicha micropartícula tienen al menos un agente biológicamente activo conjugado o unido a la misma.

En ciertos casos, la micropartícula comprende al menos dos especies diferentes de agente biológicamente activo. Preferentemente, las al menos dos especies diferentes de agentes biológicamente activos trabajan en conjunto para potenciar o mejorar de otro modo la actividad biológica o terapéutica en comparación con una sola especie. Ejemplos específicamente contemplados en el presente documento son insulina y GLP-1, dos o más agentes quimioterapéuticos, un agente quimioterapéutico en combinación con un inhibidor de la resistencia a los medicamentos contra el cáncer.

En ciertos casos, las al menos dos especies diferentes de agente biológicamente activo comprenden un primer y un segundo agente. En algunos casos, el primer agente biológicamente activo se conjuga o se une a una primera nanopartícula y una segunda de dichas al menos dos especies diferentes de agente biológicamente activo se conjuga o se une a una segunda nanopartícula. A continuación, las dos o más nanopartículas pueden estar ventajosamente presentes dentro de una sola micropartícula (es decir, dos nanopartículas diferentes). Como alternativa o de modo adicional, la al menos una nanopartícula puede tener al menos dos especies diferentes de agentes biológicamente activos conjugados o unidos a la misma (es decir, una combinación de nanopartículas de carga útil).

La micropartícula tiene un diámetro a lo largo de su dimensión más larga que está dentro del intervalo de 10 μm a 75 μm . En algunos casos, la morfología de la micropartícula es sustancialmente esférica. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, los presentes inventores creen que la forma esférica ofrece una mayor resistencia estructural, por ejemplo, resistencia a diferenciales de presión. En una forma particularmente contemplada, la micropartícula es esférica y comprende nanopartículas conjugadas con un agente quimioterapéutico, tal como temozolomida o carmustina. Tales micropartículas pueden encontrar uso en el tratamiento de tumores cerebrales, incluyendo tumores secundarios, en los que las micropartículas se implantan después o en el momento de la resección quirúrgica, por ejemplo, para prevenir o inhibir la recurrencia del cáncer. Debido a su forma estructuralmente más robusta, se espera que las micropartículas esféricas superen los inconvenientes que se han visto con *GLIADEL Wafer* en este contexto terapéutico. Sin embargo, otras formas no esféricas se contemplan específicamente en el presente documento. En ciertos casos, la micropartícula de la presente invención puede ser relativamente aplanada o en forma de disco, por ejemplo, la morfología de las micropartículas puede ser lenticular.

En ciertos casos, la porosidad superficial de la micropartícula de la presente invención puede caracterizarse por un tamaño promedio de poro de superficie de <20 nm, <100 nm, <1 μm o <10 μm . Como se describe en el documento WO2012/042274, ciertas condiciones del proceso, tal como la temperatura del segundo líquido y/o el pH del segundo líquido (por ejemplo, pH de 3 a 9).

De acuerdo con este y otros aspectos de la presente invención, el al menos un polímero biocompatible puede ser cualquier polímero desvelado en el documento WO2012/042274. En ciertos casos, el polímero puede seleccionarse del grupo que consiste en: una polilactida, una policaprolactona, un polianhídrido y un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico ("PLGA"). El peso molecular promedio en peso (MW) del polímero puede ser de 4 a 700 kDalton, preferentemente de 4 a 120 kDalton, más preferentemente de 4 a 15 kDalton. Los grupos terminales de polímero y las viscosidades inherentes pueden, en determinados casos, ser como se establece en el documento WO2012/042274. En ciertos casos, el polímero comprende al menos un grupo final o grupo funcional terminal seleccionado del grupo que consiste en: carboxilo, hidroxilo y éster.

Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, los presentes inventores creen que la eficiencia de encapsulación de las nanopartículas dentro de la micropartícula y/o la velocidad o extensión de la liberación de nanopartículas desde la micropartícula, por ejemplo, en uso, puede verse influenciada (aumentada o disminuida) en virtud de las interacciones entre la corona de la nanopartícula y la matriz polimérica, por ejemplo, mediante la selección de un grupo final de polímero que se une a un grupo funcional presente en uno o más de los ligandos que forman la corona de la nanopartícula. Un ejemplo de esto contemplado en el presente documento es una micropartícula en la que el al menos un polímero biocompatible comprende un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico ("PLGA") que tiene un grupo terminal carboxilato y dicha corona de nanopartícula comprende al menos un grupo amina. En particular, la nanopartícula puede comprender una corona de ligandos de PEGamina, tales como 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15, -penta-oxa-heptadecanol y ligandos de alfa-galactosa, tal como 2-tio-etil- α -D-galactósido. Por consiguiente, en ciertos casos de la presente invención, el polímero o copolímero comprende al menos un grupo terminal o grupo funcional terminal que se une a un grupo funcional presente en la corona de dicha nanopartícula.

5 En ciertos casos de acuerdo con la presente invención, el al menos un polímero biocompatible puede tener una relación de lactida a glicólido ("relación L/G") en el intervalo de 1:1 a 1:0, que opcionalmente tiene una relación de lactida a glicólido en el intervalo de 70:30 a 90:10. Se cree que la relación L/G influye en la velocidad de descomposición de las micropartículas *in vivo* y, por lo tanto, influye en la duración de la liberación de nanopartículas y/o principios activos de la micropartícula.

10 En ciertos casos, las nanopartículas se distribuyen de manera sustancialmente homogénea en toda la micropartícula. Por ejemplo, la densidad de nanopartículas medida en términos de número de nanopartículas por unidad de volumen de la micropartícula puede, en determinados casos, no variar en más del 50 %, más del 20 % o más del 10 % sobre la media. La distribución de nanopartículas dentro de la micropartícula puede, por ejemplo, determinarse mediante microscopía electrónica. Las nanopartículas se pueden visualizar y contar, y, si es necesario, aplicar análisis estadísticos para calcular una medida de homogeneidad de la distribución de las nanopartículas.

15 En ciertos casos, las nanopartículas tienen una distribución dentro de la micropartícula que está sesgada hacia la superficie de la micropartícula. Por ejemplo, más del 50 %, más del 80 % o más del 90% de las nanopartículas pueden estar ubicadas más cerca de la superficie de la micropartícula que del centro de la micropartícula. Como en el caso anterior, la distribución de las nanopartículas dentro de la micropartícula puede, por ejemplo, determinarse mediante microscopía electrónica. Las nanopartículas se pueden visualizar y contar, y, si es necesario, aplicar análisis estadísticos para calcular una medida de heterogeneidad de la distribución de las nanopartículas.

20 En determinados casos, la concentración promedio de nanopartículas expresada en términos de % en peso de nanopartículas por peso de polímero de micropartículas (p/p) está dentro del intervalo de 0,01 % a 25 % en p/p, opcionalmente en el intervalo de 0,05 % a 10 % en p/p.

25 En determinados casos, la concentración promedio de agente biológicamente activo, cuando está presente, expresada en términos de % en peso de agente por peso de polímero de micropartícula está dentro del intervalo de 0,005 % a 20 % en p/p, por ejemplo, de 0,01 % a 10 % en p/p.

30 Tal como se describe en el presente documento, las micropartículas de la presente invención proporcionan ventajosamente liberación sostenida en uso clínico. En ciertos casos, el perfil de liberación *in vivo* (es decir, liberación de nanopartículas, particularmente nanopartículas que tienen una carga útil farmacéutica, desde la micropartícula) de la micropartícula después de la inyección de depósito de la micropartícula en un sujeto mamífero está en el intervalo de 1 semana a 6 meses, opcionalmente en el intervalo de 3 semanas a 3 meses. El perfil de liberación puede determinarse de acuerdo con técnicas experimentales *in vivo* (por ejemplo, modelos animales) conocidos por los expertos en la técnica y/o puede modelarse usando uno o más ensayos *in vitro* de liberación de fármacos. Preferentemente, el perfil de liberación es tal que la velocidad de liberación de las nanopartículas en el cuerpo (por ejemplo, espacio celular o extracelular) es sustancialmente más lenta que la velocidad de liberación de nanopartículas en ausencia de encapsulación (por ejemplo, una suspensión de nanopartículas inyectadas directamente). En casos preferidos, sustancialmente más lento en este contexto significa al menos 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces más lento.

45 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de micropartículas del primer aspecto de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunos casos, la composición farmacéutica comprende un agente antiaglomerante. El agente antiaglomerante puede tomar la forma de un recubrimiento aplicado a las micropartículas, por ejemplo, manitol.

50 En algunos casos, el vehículo es un líquido acuoso u orgánico, tal como un aceite biocompatible. En algunos casos, la composición farmacéutica toma la forma de un polvo liofilizado de micropartículas adecuadas para la reconstitución, por ejemplo, antes de usar.

55 En ciertos casos, la composición farmacéutica puede formularse para la administración por vía inyectable, tal como la inyección depot subcutánea o intramuscular, o formularse para la implantación durante la cirugía.

60 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una micropartícula del primer aspecto de la invención o una composición farmacéutica del segundo aspecto de la invención para su uso en medicina en la que la al menos una nanopartícula encapsulada por la micropartícula comprende además al menos un agente biológicamente activo que comprende un fármaco o profármaco que ejerce un efecto terapéutico.

65 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una micropartícula del primer aspecto o una composición farmacéutica del segundo aspecto para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto mamífero, en el que dicha micropartícula comprende un agente quimioterapéutico.

En algunos casos, la micropartícula comprende un agente quimioterapéutico y la micropartícula o composición es

para el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: un cáncer cerebral, tal como un glioblastoma, glioma o astrocitoma; un cáncer de ovario; un cáncer de hígado; y un cáncer de piel. En algunos casos, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en: temozolomida, irinotecán, clorotóxina, carmustina, platino (IV), platino (II), camptotecina, doxorubicina, docetaxel, maitansina, maitansinoides, inhibidores de la monometil auristatina E (MMAE) y la histona desacetilasa (HDAC), tales como panobinostat, vorinostat, romidepsina y chidamida.

De acuerdo con la micropartícula o composición farmacéutica para el uso del cuarto aspecto de la invención, el intervalo de tiempo entre la administración de dosis puede ser de al menos 1 semana, tal como al menos 2, 3 o 4 semanas, y, preferentemente, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un artículo de fabricación que comprende:

- una micropartícula del primer aspecto de la invención o una composición farmacéutica del segundo aspecto de la invención;
- un recipiente para alojar la micropartícula o composición farmacéutica; y
- un inserto y/o marcador.

En ciertos casos, el inserto y/o marcador proporciona instrucciones, información de dosificación y/o administración relacionada con el uso de la micropartícula o composición farmacéutica en un cáncer en un sujeto mamífero.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un proceso para producir una micropartícula del primer aspecto de la invención, comprendiendo el proceso:

proporcionar un primer líquido que comprende un soluto, un disolvente y una pluralidad de nanopartículas destinadas a ser encapsuladas dentro de las micropartículas, comprendiendo el soluto un polímero, la concentración de polímero en el primer líquido es al menos 10 % en p/v, siendo "p" el peso del polímero y siendo "v" el volumen del disolvente, comprendiendo las nanopartículas:

- (i) un núcleo que comprende un metal y/o un semiconductor; y (ii) una corona que comprende una pluralidad de ligandos unidos covalentemente al núcleo, en el que dichos ligandos comprenden al menos un carbohidrato y/o glutatión;

proporcionando un generador de gotículas de líquido que comprende un componente piezoeléctrico operable para generar gotículas de líquido, hacer que el generador de gotículas líquidas forme gotículas líquidas del primer líquido;

pasar las gotículas de líquido a través de un gas, poner en contacto las gotículas líquidas con un segundo líquido para hacer que el disolvente salga de las gotículas, formando así micropartículas sólidas;

siendo la solubilidad del disolvente en el segundo líquido al menos 5 g de disolvente por 100 ml de segundo líquido, siendo el disolvente sustancialmente miscible en el segundo líquido, en el que el segundo líquido se proporciona como un flujo y el método comprende poner en contacto las gotículas líquidas con el flujo del segundo líquido.

En ciertos casos, las nanopartículas se proporcionan en una fase mixta de disolvente orgánico:agua, opcionalmente una fase mixta de DMSO:agua y, además opcionalmente una fase mixta de DMSO: agua que tiene una relación DMSO:agua dentro del intervalo de 80:20 a 95:5. Las nanopartículas biocompatibles como se describen en el presente documento se proporcionan normalmente en forma de una suspensión acuosa. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que es posible preparar nanopartículas, tal como nanopartículas glucosiladas o de glutatión de núcleo de oro, en una fase mixta de DMSO-agua, por ejemplo, 90:10 de DMSO:agua. La fase mixta de DMSO:agua proporciona cierta compatibilidad ventajosa con el proceso de producción de micropartículas, por ejemplo, como se describe en el documento WO2012/042274. En particular, esto aborda el problema de que el polímero, tal como PLGA, es insoluble en agua. Por lo tanto, el uso de altas concentraciones de nanopartículas proporcionadas en una fase mixta tiene una idoneidad particular para su uso en el proceso de este aspecto de la presente invención.

En ciertos casos, el primer líquido comprende DMSO, copolímero de poli-lactida-co-glicólido ("PLGA") y nanopartículas, siendo las nanopartículas como se define en relación con el primer aspecto de la presente invención.

En ciertos casos, el segundo líquido puede ser como se define en el documento WO2012/042274. En ciertos casos, el segundo líquido comprende agua. El segundo líquido puede comprender una mezcla de agua y alcohol (por ejemplo, que tiene una relación agua: alcohol en el intervalo de 95:5 a 75:25). En casos particulares, el segundo líquido puede comprender una mezcla de agua y terc-butanol (por ejemplo, 85:15 de agua:terc-butanol).

De acuerdo con este aspecto de la presente invención, el segundo líquido puede tener una temperatura como se describe en el documento WO2012/042274. En determinados casos, la temperatura del segundo líquido puede estar dentro del intervalo de 1 °C a 10 °C, tal como de 4 °C a 8 °C.

En algunos casos, la concentración de polímero en el primer líquido puede ser de al menos un 20 %, al menos un 30 % o al menos un 40 % en p/v.

5 En algunos casos, el proceso de este aspecto de la presente invención emplea un aparato como se describe en el documento WO2012/042274. En algunos casos, el proceso de este aspecto de la presente invención emplea un aparato como se describe en el documento WO2012/042273.

10 En algunos casos, el proceso comprende además recoger las micropartículas sólidas separando las micropartículas sólidas del segundo líquido, opcionalmente al vacío. En determinados casos, la etapa de recoger las micropartículas usadas un dispositivo de recolección de perlas como se describe en el documento WO2013/014466. El método de separación de las micropartículas sólidas puede ser como se describe en el documento WO2013/014466.

15 En algunos casos, el proceso comprende además recoger las micropartículas sólidas y formular o empaquetar las micropartículas en una composición farmacéutica o forma de administración. Esto puede, en determinados casos, comprender liofilizar las micropartículas y/o someter las micropartículas a una etapa de esterilización. En algunos casos, las micropartículas pueden formularse en un líquido para administración por inyección depot.

20 En algunos casos, el proceso de este aspecto de la invención comprende además una etapa anterior en la que se producen las nanopartículas, comprendiendo la etapa precedente:
combinar una solución que comprende glutatión y/o un carbohidrato derivatizado con azufre (por ejemplo, un enlazador tioalquilo o tioglicol unido a un grupo de azúcar, tal como un monosacárido, disacárido o polisacárido) con una solución que comprende un material de formación de núcleo (por ejemplo, una sal de oro) y con un agente reductor (por ejemplo, borohidruro de sodio), haciendo que la nanopartícula se autoensamble.

25 En ciertos casos, la etapa precedente de producción de las nanopartículas comprende además conjugar o unir dicho agente biológicamente activo a la nanopartícula. Cuando la conjugación implica un enlazador covalentemente unido que conjuga el agente activo con la nanopartícula, esto se logra ventajosamente durante el proceso de autoensamblaje. En particular, la etapa anterior de producción de las nanopartículas puede comprender proporcionar un enlazador derivado de azufre (por ejemplo, tioalquilo, tioglicol o tioalquilpoliglicol) unido covalentemente al agente y combinar:

30 la solución que comprende el enlazador derivatizado con azufre unido covalentemente al agente;
35 la solución que comprende glutatión y/o un carbohidrato derivatizado con azufre;
la solución que comprende un material de formación de núcleo; y
el agente reductor. Los compuestos derivados de azufre se proporcionan normalmente en forma oxidada como disulfuros, lo que permite que el proceso de autoensamblaje continúe tras la adición del agente reductor.

40 En algunos casos, el enlazador derivatizado con azufre unido covalentemente al agente comprende enlazador tioalquilo y/o tioglicol unido covalentemente al agente.

En algunos casos, particularmente cuando el agente biológicamente activo comprende un péptido o polipéptido, la nanopartícula puede producirse primero y ponerse en contacto con una solución que comprende el péptido o polipéptido y el péptido o polipéptido puede unirse no covalentemente a la corona de la nanopartícula.

45 De acuerdo con todos los aspectos de la presente invención, las micropartículas y los métodos para su producción pueden ser estériles. Además o alternativamente, las nanopartículas y los métodos para su producción pueden ser estériles. Sin embargo, se contempla específicamente en el presente documento que la producción de las nanopartículas y/o la producción de las micropartículas incluye una o más etapas de esterilización.

50 De acuerdo con la presente invención, particularmente, el cuarto aspecto de la misma, el sujeto puede ser un ser humano, un animal de compañía (por ejemplo, un perro o un gato), un animal de laboratorio (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, cerdo o primate no humano), un animal doméstico o de granja (por ejemplo, un cerdo, vaca, caballo u oveja). Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

55 La presente invención incluye la combinación de los aspectos y rasgos preferidos descritos, exceptuando en donde tal combinación sea claramente inaceptable o se indique expresamente que tenga que evitarse. 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.

60 Breve descripción de las figuras

La **figura 1** muestra una representación esquemática de una nanopartícula que tiene una pluralidad de ligandos en la relación de 1:1 de alfa-galactosa:PEGamina y un núcleo de oro.

65 La **figura 2** muestra una imagen de microscopia electrónica de micropartículas esféricas. Se muestra una barra

de escala de 50 μm .

La **figura 3** muestra una representación esquemática "cortada" de una micropartícula de la presente invención. Se muestran las nanopartículas encapsuladas dentro de la micropartícula (no a escala).

La **figura 4** muestra una micrografía electrónica de micropartículas producidas como se describe en el experimento 1 del Ejemplo 3. La barra de escala muestra 50 μm .

La **figura 5** muestra una curva estándar de absorbancia a 382 nm contra la concentración de oro en $\mu\text{g/ml}$.

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

Tal y como se usa en el presente documento, "nanopartícula" se refiere a una partícula que tiene una escala nanométrica y no pretende transmitir ninguna limitación de forma específica. En particular, "nanopartícula" abarca nanoesferas, nanotubos, nanocajas, nanoclúster, 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 en, por ejemplo, el documento WO 2002/032404, el documento WO 2004/108165, el documento WO 2005/116226, el documento WO 2006/037979, el documento WO 2007/015105, el documento WO 2007/122388, el documento WO 2005/091704 y tales nanopartículas pueden encontrar uso de acuerdo con la presente invención.

Tal y 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 de carbohidrato, un resto tensioactivo y/o un resto glutatión. Por 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 tanto, en ciertos casos, la corona puede incluir una capa de revestimiento suficientemente completa sustancialmente para estabilizar el semiconductor o el núcleo que contiene metal. Sin embargo, se contempla específicamente en el presente documento que ciertas nanopartículas que tienen núcleos, por ejemplo, que incluyen un núcleo interno que contiene óxido de metal recubierto con un metal noble puede incluir una corona que recubre solo parcialmente la superficie del núcleo. En ciertos casos, la corona facilita la solubilidad, tal 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 semiconductores, que pueden usarse como sustrato para inmovilizar ligandos.

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

El material del núcleo puede ser un metal o un semiconductor (comprendiendo dicho semiconductor opcionalmente átomos metálicos o siendo un semiconductor orgánico) y puede estar formado por más de un tipo de átomo. Preferentemente, el material del núcleo es un metal seleccionado de 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 del núcleo preferentes son Au y Fe, siendo el material más preferido Au. Los núcleos de las nanopartículas comprenden preferentemente entre aproximadamente 100 y 500 átomos (por ejemplo, átomos de oro) para proporcionar diámetros del núcleo en el intervalo de nanómetros. Otros materiales del núcleo particularmente útiles se dopan con uno o más átomos que son activos en RMN, lo que permite detectar las nanopartículas usando RMN, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los ejemplos de átomos activos en RMN incluyen Mn^{+2} , Gd^{+3} , Eu^{+2} , Cu^{+2} , V^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} y lantánidos⁺³, o los puntos cuánticos descritos en otra parte de la presente solicitud.

Los núcleos de nanopartículas que comprenden compuestos semiconductores se pueden detectar, ya que los cristales semiconductores a escala nanométrica son capaces de actuar como puntos cuánticos, es decir, pueden absorber la luz, lo que excita los electrones en los materiales a niveles de energía más altos, liberando posteriormente fotones de luz a frecuencias características del material. Un ejemplo de un material del núcleo

semiconductor es seleniuro de cadmio, sulfuro de cadmio, telurio de cadmio. También se incluyen compuestos de cinc, tales como sulfuro de cinc.

5 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 está 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, rojo Texas, Cy3, Cy5, etc., y pueden detectarse mediante la excitación del marcador fluorescente y la detección de la luz emitida utilizando 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 determinados casos, el marcador detectable (por ejemplo, FITC) puede estar unido covalentemente al núcleo de la nanopartícula, por ejemplo, a través de un enlazador.

15 En algunas realizaciones, las nanopartículas pueden comprender un radionúclido para su uso en la detección de la nanopartícula usando la radiactividad emitida por el radionúclido, por ejemplo, mediante el uso de PET, SPECT, o para terapia, es decir, para matar células objetivo. Los ejemplos de radionucleidos utilizados habitualmente en la técnica que podrían adaptarse fácilmente para su uso en la presente invención incluyen ^{99m}Tc , que existe en diversos 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 habitualmente 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 se usa 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 radionucleidos 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 dopando los núcleos de las nanopartículas o incluyéndolos como marcadores presentes como parte de los ligandos inmovilizados en las nanopartículas.

Agentes activos

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "agente biológicamente activo" pretende abarcar fármacos y profármacos que ejercen un efecto sobre un sistema biológico, preferentemente un efecto terapéutico. La clase de agente activo contemplado en el presente documento incluye compuestos orgánicos de molécula pequeña, péptidos, polipéptidos y ácidos nucleicos. Ejemplos particulares incluyen: agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, temozolomida, irinotecán, clorotoxina, carmustina, platino (IV), platino (II), camptotecina, doxorubicina, docetaxel maitansina, maitansinoides, inhibidores de la monometil auristatina E (MMAE) y la/histona desacetilasa (HDAC), tales como panobinostat, vorinostat, romidepsina y chidamida); péptidos o polipéptidos (por ejemplo, insulina, GLP-1, amilina, exenatida, octreotida, teriparatida, glucagón, una citocina, y/o un anticuerpo); ADN o ARN (incluidos, por ejemplo, ARNsi).

40 Micropartículas

Las micropartículas de acuerdo con la presente invención pueden estar en forma de perlas sólidas. Como se usa en este documento en relación con micropartículas o perlas, se pretende que el sólido abarque un gel. Las micropartículas de acuerdo con la presente invención tienen un diámetro a lo largo de su dimensión más larga que está dentro del intervalo de 10 micrómetros a 75 micrómetros. Las micropartículas contempladas en el presente documento incluyen ventajosamente las perlas poliméricas monodispersas obtenibles por el proceso descrito en el documento WO 2012/042274.

Proceso para encapsular nanopartículas dentro de micropartículas

50 En ciertos casos, las micropartículas son producidas por el proceso Q Sphera® como se describe en el documento W02012/042274.

Administración y tratamiento

55 Las micropartículas y composiciones de la invención pueden administrarse a pacientes por cualquier número de rutas diferentes, incluyendo rutas enterales o parenterales. La administración parenteral incluye la administración por las siguientes vías: intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraocular, transepitelial, intraperitoneal y tópica (incluyendo dérmica, ocular, rectal, nasal, inhalación y aerosol), y vías sistémicas rectales.

60 La administración se realizará, por ejemplo, mediante inyección, especialmente inyección depot.

Las micropartículas de la invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas que pueden estar en forma de composiciones sólidas o líquidas. Dichas composiciones generalmente comprenderán un vehículo de algún tipo, por ejemplo un vehículo sólido o un vehículo líquido, tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica o glicoles tales como etilenglicol,

propilenglicol o polietilenglicol. Dichas composiciones y preparaciones generalmente contienen al menos 0,1 % en peso del compuesto.

5 Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o la inyección en el sitio de afección, el principio activo estará en forma de una solución acuosa o líquido parenteralmente aceptable apirógeno y tiene un pH adecuado, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia serán bien capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, soluciones de los compuestos o un derivado de los mismos, por ejemplo, en solución salina fisiológica, una dispersión preparada con glicerol, polietilenglicol líquido o aceites.

10 Además de uno o más de los compuestos, opcionalmente en combinación con otro ingrediente activo, las composiciones pueden comprender uno o más de un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo, tampón, estabilizante, agente isotonicizante, conservantes o antioxidantes u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del transportador u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo, 15 inyección intramuscular.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas se administran a un individuo en una cantidad profilácticamente efectiva o en una cantidad terapéuticamente efectiva (según sea el caso, aunque la profilaxis puede considerarse 20 terapia), que es suficiente para mostrar un beneficio al individuo. Normalmente, esto será para causar una actividad terapéuticamente útil que brinde beneficios al individuo. La cantidad real de los compuestos administrados y la velocidad y el tiempo de administración dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección a tratar. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., pertenecen a la responsabilidad de los médicos de familia y otros facultativos, y normalmente se tiene en cuenta el trastorno que ha de tratarse, el estado del paciente individual, el sitio de entrega, el método de administración y otros factores conocidos por los 25 facultativos. Se pueden encontrar ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente en el Handbook of Pharmaceutical Additives, 2ª edición (eds. M. Ash e I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, New York, EE.UU.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, 1994. A modo de ejemplo, y las composiciones se administran, preferentemente, a pacientes en dosis de entre aproximadamente 0,01 y 100 mg de compuesto activo por kg de peso corporal y, más preferentemente, entre aproximadamente 0,5 y 10 mg/kg de peso corporal. 30

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

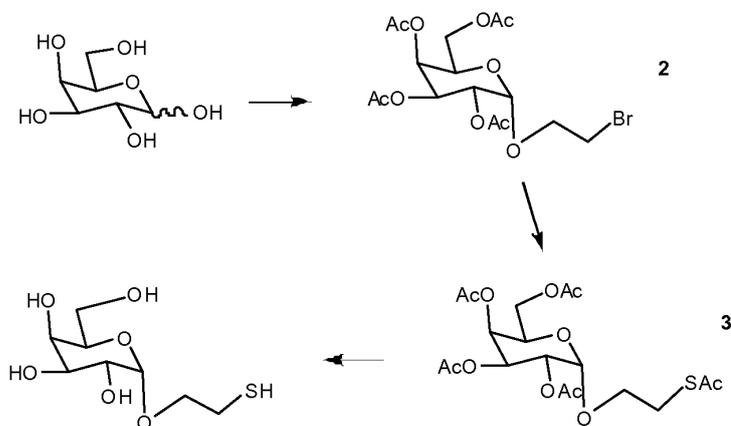
35 Ejemplos

Ejemplo 1 - Síntesis de nanopartículas

40 Las nanopartículas de oro que tienen una corona de ligandos de carbohidratos o ligandos de glutatión se sintetizaron esencialmente como se ha descrito anteriormente (documento WO 2011/154711; y Lund et al., 2011, Biomaterials Vol. 32 pp. 9776-9784).

NP de AL/ α -Gal

45 Preparación de 2-tio-etil- α -D-galactósido (α -galactosa C2SH)



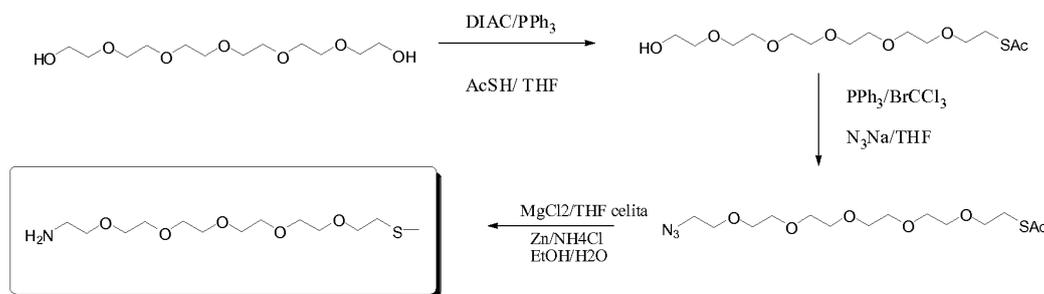
50 A una suspensión de galactosa (3 g, 16,65 mmol) en 2-bromoetanol (30 ml), se añade resina ácida Amberlite 120-H para alcanzar un pH de 2. La reacción se agita durante 16 horas a 50-60 °C. La mezcla de reacción se filtra y se lava con MeOH. Se añade trietilamina para alcanzar un pH de 8. El crudo de la reacción se concentra y se evapora

conjuntamente 3 veces con tolueno. La mezcla de reacción se disuelve piridina (75 ml) y Ac2O (35 ml) y se añade una cantidad catalítica de DMAP a 0 °C y se agita durante 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla se diluye con AcOEt y se lava con 1. H₂O; 2. HCl (10 %); 3. NaHCO₃ dis; 4. H₂O. La capa orgánica se recoge y se seca sobre Na₂SO₄ anhidro. La TLC (hexano_AcOEt 3:1, 2 eluciones) muestra un producto principal (deseado) y una minoría de R_f inferior. El producto se purifica por cromatografía instantánea utilizando la mezcla de hexano: acetato de etilo 6:1 como eluyente y se obtiene el 2-bromoetil-alfa-galactósido (**2**).

El producto de la reacción anterior, **2** se disuelve en 27 ml de 2-butanona. A esta solución, se añaden una cantidad catalítica de yoduro de tetrabutilamonio y 4 equivalentes de tioacetato de potasio. La suspensión resultante se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. A lo largo de este período, la reacción se prueba mediante TLC (hexano-AcOEt 2:1, 2 eluciones) para la desaparición del material de partida. La mezcla se diluye con 20 ml de AcOEt y se lava con una solución saturada de NaCl. 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**.

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 de sodio 1N (1 equivalente) y se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añade resina Amberlite IR-120H para alcanzar un pH de 5-6. A continuación, la mezcla resultante se filtra y se concentra a sequedad para obtener el producto final (α-galactosa C2SH).

20 Preparación del enlazador de amino-tiol.



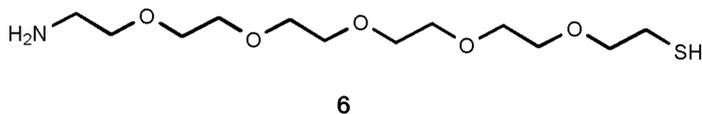
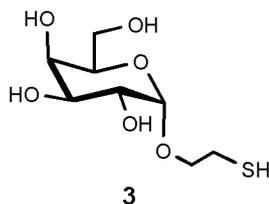
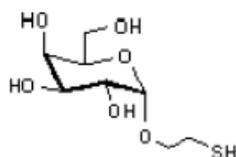
A una solución de PPh₃ (3 g, 11,4 mmol) en 20 ml de THF seco, se añade DIAC (2,3 g, 11,4 mmol). La mezcla se deja agitar a 0 °C durante 15 minutos hasta la aparición de un producto blanco. A esta mezcla se añade gotícula a gotícula una solución de hexaetilenglicol (1,45 ml, 5,7 mmol) y HSAC (610 μl, 8,55 mmol) en THF seco (20 ml) (embudo de adición). Después de 15 minutos, los productos comienzan a aparecer en la TLC a R_f 0,2. La solución se concentra en un evaporador. El crudo de la reacción se disuelve en 50 ml de diclorometano y se lava con una solución de K₂CO₃ al 10 %. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra al vacío. La cromatografía instantánea del crudo usando AcOEt: Hexano 1:1, AcOEt y, finalmente, DCM:MeOH 4:1 como eluyente dio el derivado acetil-tio-hexaetilenglicol.

El producto de reacción se disuelve en 5 ml de DMF y PPh₃ (2,25 g, 8,55 mmol), NaN₃ (0,741 g, 11,4 mmol) y BrCl₃C (0,845 ml, 8,55 mmol) se añaden y la solución se agita después durante 40 minutos a temperatura ambiente. El producto resultante tiene una R_f más alta que el producto inicial cuando se realiza la TLC (DCM: MeOH 25:1). La mezcla de reacción se diluye con 100 ml de éter dietílico y se lava tres veces con H₂O. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtra y se evapora al vacío. El producto se purifica por cromatografía instantánea utilizando la mezcla de eluyentes DMC/MeOH 200:1 y DCM/MeOH 40:1 para obtener el derivado de azido-acetilthio-hexaetilenglicol.

Para eliminar el óxido de trifenilfosfina, el producto de reacción se disuelve en 10 ml de THF y se añaden 0,5 g de MgCl₂ a esta solución. La reacción se agita durante 2 horas a 80 °C hasta que aparece un precipitado blanco y luego se filtra a través de celite.

El producto se disuelve en una mezcla de etanol:H₂O 3:1 y se añade polvo de Zn (0,45 g, 6,84 mmol) y NH₄Cl (0,6 g, 11,4 mmol). La reacción se agitó a reflujo durante 1 hora hasta que la presencia de material de partida ya no es detectable por TLC (DCM/MeOH 25:1). La reacción se filtra a través de Celite y el disolvente se evapora. La reacción cruda se diluye con AcOEt y se extrae con 5 ml de H₂O. La fase acuosa se evapora a sequedad para obtener el producto de amino-tiol-hexaetilenglicol.

El derivado **3** de alfa-galactosa C2 y el enlazador de hexaetilenglicol amina **6** se tomaron del almacén de Midatech Biogune. El clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDCHCl), HAuCl₄, NaBH₄ se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical Company. El monoclorhidrato de imidazol-4-acético se adquirió de Alfa Aesar. Se utilizó agua de alta calidad MeOH y Nanopure (18,1 mQ) para todos los experimentos y soluciones.

α-GalC2 (alfa)

2'-tioetil-α-D-galactopiranósido (alfa)

5

EG6NH2



10

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

Preparación de NP de AL/α-Gal: A una mezcla de enlazador de amino-mercapto hexaetilenglicol **6** y ligando de alfa-galactosa **3** en una relación de 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, 0,025M). La reacción se agitó durante 30 segundos y, después, se añadió una solución acuosa de NaBH₄ (IN) en varias porciones (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 14.000 rpm. El sobrenadante se elimina y el precipitado se disuelve en 2 ml de agua. Después, se introdujeron 2 ml de la suspensión en dos filtros (AMICON, 10 KDa, 4 ml) y se centrifugaron 5 minutos a 4.500 g. El residuo en el filtro se lavó dos veces más con agua. El residuo final se disolvió en 80 ml de agua.

Para la preparación de NP de oro, la fabricación se realizó en campana de flujo laminar. Todo el material de vidrio y plástico (como eppendorf, viales y botellas) y disolvente (agua, HAc) se esterilizaron primero en un autoclave. Todos los demás productos desechables (como puntas y filtros) estaban preesterilizados.

25

NP de GSH

El ligando oxidado, glutatión (Fluka 49741), se disolvió en metanol:agua y 9:1 y se añade cloruro de oro III (Sigma-Aldrich, Poole, UK). El ligando orgánico se usó con un exceso molar cuádruple en relación con el oro. La solución se mezcló luego durante 5 minutos suavemente en un agitador de lecho plano. Las nanopartículas se produjeron por reducción después de la rápida adición de un exceso molar de 20 veces con respecto al oro, de borohidruro de sodio 1 M recién preparado (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido) en agitación con vórtex enérgica. Las muestras se agitaron en vórtex durante un total de 30 s, seguido de una hora más de mezcla suave en el agitador de lecho plano. Como las nanopartículas no son solubles en disolvente metanol/agua, la purificación inicial fue por centrifugación en banco, eliminación del sobrenadante y dispersión del sedimento de nanopartículas en agua. Se logró purificación adicional mediante 4 lavados con agua en dispositivos de centrifugación 10 kDa (GE Healthcare). La concentración de oro de todas las preparaciones de nanopartículas se determinó mediante un ensayo colorimétrico simple. Brevemente, se digirieron 10 µl de muestra de nanopartículas o 12 mg/ml de patrón oro (Fluka (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido)) y los blancos con 30 µl de agua:agua regia a 50:50 en una placa ELISA durante 1 minuto, a lo que siguió la adición de 150 µl de NaBr 2 M, a continuación, la absorbancia a 405 nm se midió inmediatamente, teniendo el ensayo una excelente linealidad en el intervalo de 0-10 µg.

40

Nanopartículas de oro coloidal

Las nanopartículas de oro coloidales se prepararon internamente utilizando técnicas estándar.

5 Ejemplo 2: encapsulación de nanopartículas en micropartículas poliméricas

La encapsulación de nanopartículas de oro (GNP) en micropartículas de PLGA (perlas sólidas) se realizó utilizando las siguientes tres soluciones de GNP:

- 10 • NP-PEGamina/aGal (es decir, GNP que tienen una corona de aproximadamente 50:50 de ligandos de PEGamina (1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15, -penta-oxa-heptadecanol) a ligandos de C2-alfa-galactosa (2-tio-etil- α -D-galactósido) disueltos en una mezcla de 90:10 de DMSO/agua (1 mg/ml) ["NP1"].
- 15 • NP-Glutatión (es decir, GNP que tienen una corona de ligandos de glutatión) disueltos en una mezcla de 90:10 de DMSO/Agua (1 mg/ml) ["NP2"].
- Oro coloidal en una mezcla de 90:10 de DMSO/agua (0,18 mg/ml) ["NP3"].

20 Como PLGA es insoluble en agua, es difícil producir una solución estable de PLGA, DMSO y agua. Como máximo, se puede generar una mezcla que contiene hasta ~ 10 % de agua.

Por lo tanto, los presentes inventores buscaron obtener nanopartículas de oro (PNB) preparadas en una fase mixta de DMSO - agua. La solución altamente concentrada de GNP se contempla para su uso en el presente documento.

25 Para preparar una solución de PLGA y GNP, primero se preparó una solución altamente concentrada de PLGA en DMSO (60-80 % en p/v). Este fue un PLGA lineal (L/G 75:25) con un terminal de ácido carboxílico, peso molecular ~ 10 kDalton. A continuación, esta solución se diluyó en un 33 % -50 % con una de las soluciones de GNP anteriores, para producir una concentración final de polímero del 40 % en p/v.

30 Se produjo una solución de antidisolvente (85:15 agua/terc-butanol) y se enfrió a ~ 4 ° C. La solución se colocó luego en un dispositivo generador de gotículas piezoeléctrico (véase el documento W02012/042273) y se produjo una corriente de gotículas estable. Se dejó que las gotículas cayeran y reaccionaran con la solución antidisolvente anterior a una temperatura de entre 5 y 8 °C. Se produjo una reacción de extracción rápida, que produjo micropartículas sólidas de diámetro ~53 μ m.

35 Las microesferas sólidas se secaron al vacío utilizando un dispositivo Bead Harvester (véase el documento WO02013/014466) y se almacenaron a 4 °C.

Caracterización de micropartículas que encapsulan nanopartículas

40 Para cuantificar la eficiencia de encapsulación, se realizó un ensayo espectrofotométrico utilizando NP3 (que tiene una absorción visible a ~ 520 nm). Se preparó una dilución en serie en acetonitrilo. A continuación se disolvió en acetonitrilo una masa precisa de microesferas que contenían GNP y se cuantificó la absorción de la solución. Usando este método, los inventores determinaron que NP3 se había encapsulado con éxito con una eficiencia de atrapamiento de ~ 96 %.

45 Usando espectrofotometría UV-Vis, los inventores también determinaron que las muestras encapsuladas de NP1 y NP2 no se habían añadido durante el proceso, es decir, no se detectaron bandas de absorción de UV-VI después de la disolución de microesferas en acetonitrilo. Los presentes inventores contemplan estudios de carga y liberación que utilizan técnicas de espectrometría de masas de plasma acoplada inductivamente (ICPMS) para la cuantificación.

50 Una cantidad (3,5 mg) de micropartículas de PLGA que encapsulan NP2 (es decir, nanopartículas de glutatión) se trató con 200 μ l de agua regia al 50 % y las micropartículas se solubilizaron visualmente a > 50 % (todavía se podían ver algunas partículas). El material se centrifugó y se comprobó el contenido de oro en el sobrenadante usando un ensayo colorimétrico interno.

30 μ l de sobrenadante dieron 0,21 μ g de Au, lo que equivale a 1,4 μ g de Au/3,5 mg de micropartícula de PLGA-NP. Según un máximo teórico de 1,94 μ g de oro de NP2 si la eficiencia de encapsulación hubiera sido del 100 %, estos resultados representarían un 72 % de recuperación. Los presentes inventores concluyen que se había demostrado un nivel elevado de incorporación de nanopartículas en las microesferas de PLGA.

Ejemplo 3: encapsulación de nanopartículas de oro dentro de microesferas de PLGA

65 Otros ejemplos de nanopartículas se han encapsulado y caracterizado esencialmente como se describe en el Ejemplo 2.

Experimento 1

Con un dispositivo generador de gotículas piezoeléctrico se produjeron con éxito microesferas con 40 % en p/v de RG752H (Resomer® RG 752 H, terminado en ácido poli(D, L-lactida-co-glicólido), lactida:glicólido 75:25, Pm 4.000-15.000) en DMSO con 0,25 mg/ml de GNP de C2-glucosa (DMSO:agua 9:1). El antidisolvente fue butanol terciario al 15 % en v/v a temperatura ambiente. Una micrografía electrónica que muestra las micropartículas se puede ver en la Figura 4.

El diámetro promedio de las micropartículas fue de **53,49 µm**; Desviación estándar **4,34 µm**; CV **8,12 %**.

Experimento 2

Con un dispositivo generador de gotículas piezoeléctrico se produjeron con éxito microesferas con 40 % en p/v de RG752H en DMSO con 0,5 mg/ml de GNP de C2-glucosa (DMSO:agua 9:1). Antidisolvente: 15 % en v/v de butanol terciario a temperatura ambiente.

Diámetro promedio - **46,67 µm** Desviación estándar - **2,11 µm** CV - **4,53%**.

Experimento 3

Con un dispositivo generador de gotículas piezoeléctrico se produjeron con éxito microesferas con 40 % en p/v de RG752H en DMSO con 0,18 mg/ml de oro coloidal (DMSO:agua 9:1). Antidisolvente: 15 % en v/v de butanol terciario a temperatura ambiente.

Diámetro promedio - **44,82 µm** Desviación estándar - **3,35 µm** CV - **7,47 %**.

Como el oro coloide es detectable por espectrofotometría UV a 520 nm, se analizó la concentración dentro de las microesferas. Produjo una carga de 0,174 mg/ml que produjo una eficiencia de encapsulación del 96,4 %.

Experimento 4

Encapsulación de GNP conjugadas con FITC

Las GNP de FITC-PEG-SH-1kda c (Au) 0,587 g/l se centrifugaron y se resuspendieron en 250 µl de DMSO. Se transfirieron al 33 % en p/v de RG752H en formulación de DMSO. Se fabricaron con éxito con el generador de gotículas piezoeléctrico utilizando 15 % en v/v de butanol terciario como antidisolvente.

Diámetro promedio - **59,4 pm** Desviación estándar - **3 µm** CV - **5,1 %**

En 1 mg de las microesferas de GNP, se detectaron 2,18 µg/ml de la FITC-PEG-SH-1 kda.

La exitosa encapsulación de nanopartículas acopladas a un marcador detectable ilustra la provisión de nanopartículas encapsuladas acopladas a la carga útil de acuerdo con la presente invención.

Experimento 5

Encapsulación de GNP conjugadas con glutatión

Las GNP conjugadas con glutatión c(Au) 6,52 mg/ml se centrifugaron durante 30 minutos en amicon para eliminar la mayor parte del agua, a continuación, las GNP se resuspendieron en 200 µl de DMSO. Después, se añadieron 200 µl a una formulación de RG752H al 30 % en p/v en DMSO. Esto se usó para fabricar microesferas usando el generador de gotículas piezoeléctrico. Se usó 15 % en v/v de butanol terciario como antidisolvente.

Diámetro promedio - **49,36 µm** Desviación estándar - **4,48 pm** CV - **9,07 %**

Las nanopartículas se disolvieron en agua regia y se usó un ensayo colorimétrico para medir la concentración de oro. El ensayo se usó para producir una curva estándar usando la solución estándar AAS de oro leída a 382 nm. Se mostró una tendencia lineal entre un HLQ de 600 µg/ml y un LLQ de 10 µg/ml (véase la Figura 5).

Las microesferas produjeron una concentración de oro de 0,8279 mg/ml. La concentración teórica máxima de la formulación 1,304 mg/ml, lo que da una eficiencia de encapsulación del 63,49 %.

Las realizaciones específicas descritas en el presente documento se ofrecen a modo de ejemplo, no a modo de limitación. Todos los subtítulos en el presente documento se incluyen solo por comodidad y no deben interpretarse como que limitan la divulgación de ninguna manera.

REIVINDICACIONES

1. Una micropartícula que comprende al menos un polímero biocompatible, encapsulando la micropartícula al menos una nanopartícula, comprendiendo la nanopartícula:
- 5 (i) un núcleo que comprende un metal y/o un semiconductor;
(ii) una corona que comprende una pluralidad de ligandos unidos covalentemente al núcleo, en donde dichos ligandos comprenden al menos un carbohidrato y/o glutatión,
- 10 en donde la micropartícula tiene un diámetro a lo largo de su dimensión más larga que está dentro del intervalo de 10 μm a 75 μm .
2. La micropartícula de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la al menos una nanopartícula comprende además al menos un agente biológicamente activo o un marcador detectable unido covalentemente o no covalentemente unido a dicha corona y/o a dicho núcleo.
- 15 3. La micropartícula de acuerdo con la reivindicación 2, en donde:
- (i) el al menos un agente biológicamente activo comprende un agente quimioterapéutico y está unido covalentemente a dicho núcleo a través de un enlazador;
- 20 (ii) el al menos un agente biológicamente activo está unido covalentemente a dicho núcleo a través de un enlazador que comprende alquilo C2-C15 y/o glicol C2-C15; y/o
(iii) el al menos un agente biológicamente activo es un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en: temozolomida, irinotecán, clorotoxina, carmustina, platino (IV), platino (II), camptotecina, doxorubicina, docetaxel, maitansina, un maitansinoides, monometil auristatina E (MMAE) y un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC).
- 25 4. La micropartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la nanopartícula comprende además un resto dirigido a células, tejidos o tumores, en donde opcionalmente dicho resto dirigido se selecciona del grupo que consiste en: ácido fólico, lactosa, albúmina, glutamina, un ligando que se une a un receptor de superficie celular y un anticuerpo.
- 30 5. La micropartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:
- (i) el diámetro del núcleo de la nanopartícula está en el intervalo de 1 nm a 5 nm;
- 35 (ii) el diámetro de la nanopartícula que incluye sus ligandos está 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; y/o
(iii) el núcleo comprende un metal seleccionado del grupo que consiste en: Au, Ag, Cu, Pt, Pd, Fe, Co, Gd, Eu y Zn, o cualquier combinación de los mismos.
- 40 6. La micropartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la micropartícula comprende una pluralidad de dichas nanopartículas, en la que al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de las nanopartículas en dicha micropartícula tienen al menos un agente biológicamente activo conjugado o unido.
- 45 7. La micropartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde:
- (i) la micropartícula comprende al menos dos especies diferentes de agente biológicamente activo;
- 50 (ii) la micropartícula comprende al menos dos especies diferentes de agente biológicamente activo, en donde una primera de dichas al menos dos especies diferentes de agente biológicamente activo está conjugada o está unida a una primera nanopartícula y una segunda de dichas al menos dos especies diferentes de agente biológicamente activo está conjugada o está unida a una segunda nanopartícula;
- (iii) la micropartícula comprende al menos dos especies diferentes de agente biológicamente activo, en donde dicha al menos una nanopartícula tiene al menos dos especies diferentes de agente biológicamente activo conjugadas o unidas a la misma; y/o
- 55 (iv) la densidad promedio del agente biológicamente activo expresada en términos de % en peso de agente por peso de polímero de micropartículas está dentro del intervalo del 0,005 % al 20 % en p/p, opcionalmente en el intervalo del 0,01 % al 10 % en p/p.
- 60 8. La micropartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:
- (i) la micropartícula tiene un diámetro a lo largo de su dimensión más larga que está dentro del intervalo de 25 μm a 75 μm ;
- (ii) la morfología de la micropartícula es sustancialmente esférica o es lenticular;
- 65 (iii) la porosidad de la superficie de la micropartícula se **caracteriza por** un tamaño promedio de poro de superficie de < 20 nm, <100 nm, <1 μm o <10 μm ;

(iv) dicho al menos un polímero biocompatible se selecciona del grupo que consiste en: una polilactida, una policaprolactona, un polianhídrido y un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico ("PLGA"), opcionalmente en donde:

- 5 (a) dicho polímero o copolímero comprende al menos un grupo terminal o un grupo funcional terminal seleccionados del grupo que consiste en: carboxilo, hidroxilo y éster;
 (b) el polímero o el copolímero comprenden al menos un grupo terminal o un grupo funcional terminal que se unen a un grupo funcional presente en la corona de dicha nanopartícula;

10 (v) la concentración promedio de nanopartículas expresada en términos de % en peso de nanopartícula por peso de polímero de micropartículas está dentro del intervalo del 0,01 % al 25 % en p/p, opcionalmente en el intervalo del 0,05 % al 10 % en p/p; y/o

15 (vi) el perfil de liberación *in vivo* de la micropartícula después de la inyección depot de la micropartícula en un sujeto mamífero está en el intervalo de 1 semana a 6 meses, opcionalmente en el intervalo de 3 semanas a 3 meses.

9. Una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de micropartículas como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables, opcionalmente en donde:

- 20 (i) la composición comprende un agente antiaglomerante;
 (ii) el vehículo es un líquido acuoso u orgánico, tal como un aceite biocompatible; y/o
 (iii) la composición está formulada para la administración por vía inyectable, tal como la inyección depot subcutánea o intramuscular, o está formulada para la implantación durante una cirugía.

25 10. Una micropartícula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en medicina, en donde dicha al menos una nanopartícula comprende además al menos un agente biológicamente activo que comprende un fármaco o un profármaco que ejercen un efecto terapéutico.

30 11. Una micropartícula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto mamífero, en donde dicha micropartícula comprende un agente quimioterapéutico.

35 12. Una micropartícula o una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde:

- 40 (i) el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en: un cáncer cerebral, opcionalmente glioblastoma, glioma o astrocitoma; un cáncer de ovario; un cáncer de hígado; y un cáncer de piel, y en donde dicho agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en: temozolomida, irinotecán, clorotoxina, carmustina, platino (IV), platino (II), camptotecina, doxorubicina, docetaxel, maitansina, un maitansinoide, monometil auristatina E (MMAE) y un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC); o
 (ii) el intervalo de tiempo entre la administración de dosis es de al menos 1 semana, opcionalmente al menos 2, 3 o 4 semanas, y además opcionalmente al menos 1, 2 o 3 meses.

45 13. Un artículo de fabricación que comprende:

- una micropartícula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9;
 un recipiente para alojar la micropartícula o la composición farmacéutica; y
 50 un inserto y/o un marcador.

14. Un proceso para producir una micropartícula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo el proceso:

55 proporcionar un primer líquido que comprende un soluto, un disolvente y una pluralidad de nanopartículas destinadas a ser encapsuladas dentro de las micropartículas, comprendiendo el soluto un polímero, siendo la concentración de polímero en el primer líquido al menos del 10 % en p/v, siendo "p" el peso del polímero y siendo "v" el volumen del disolvente, comprendiendo las nanopartículas:

- 60 (i) un núcleo que comprende un metal y/o un semiconductor; y (ii) una corona que comprende una pluralidad de ligandos unidos covalentemente al núcleo, en donde dichos ligandos comprenden al menos un carbohidrato y/o glutatión;

65 proporcionar un generador de gotículas de líquido que comprende un componente piezoeléctrico que puede actuar para generar gotículas de líquido, hacer que el generador de gotículas líquidas forme gotículas líquidas del primer líquido;

pasar las gotículas de líquido a través de un gas,
poner en contacto las gotículas líquidas con un segundo líquido para hacer que el disolvente salga de las gotículas, formando así micropartículas sólidas;

- 5 siendo la solubilidad del disolvente en el segundo líquido al menos 5 g de disolvente por 100 ml de segundo líquido, siendo el disolvente sustancialmente miscible en el segundo líquido, en donde el segundo líquido se proporciona como un flujo y el método comprende poner en contacto las gotículas líquidas con el flujo del segundo líquido.
- 10 15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde:
- (i) las nanopartículas se proporcionan en una fase mixta de disolvente orgánico:agua; y/o
 - (ii) el proceso comprende además recoger las micropartículas sólidas y formular o empaquetar las micropartículas en una composición farmacéutica o en una forma de administración.

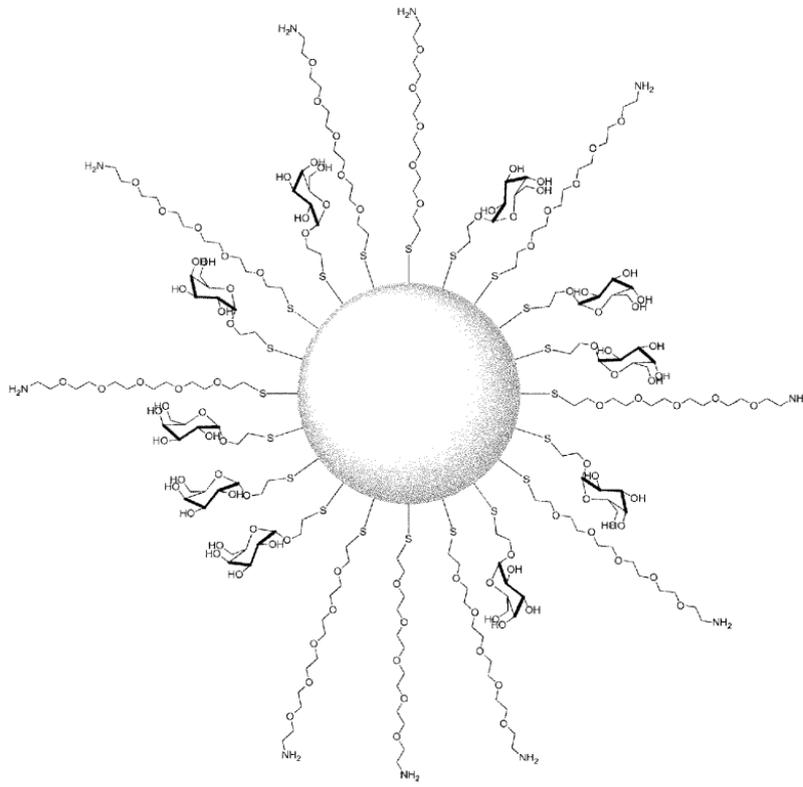


Figura 1

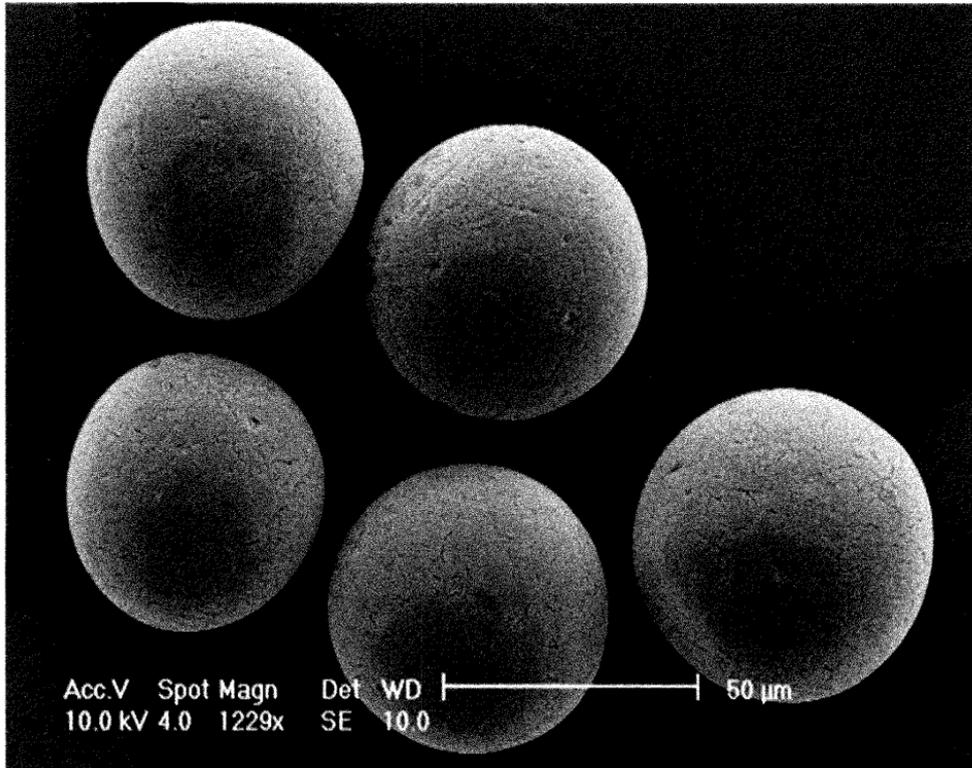


Figura 2

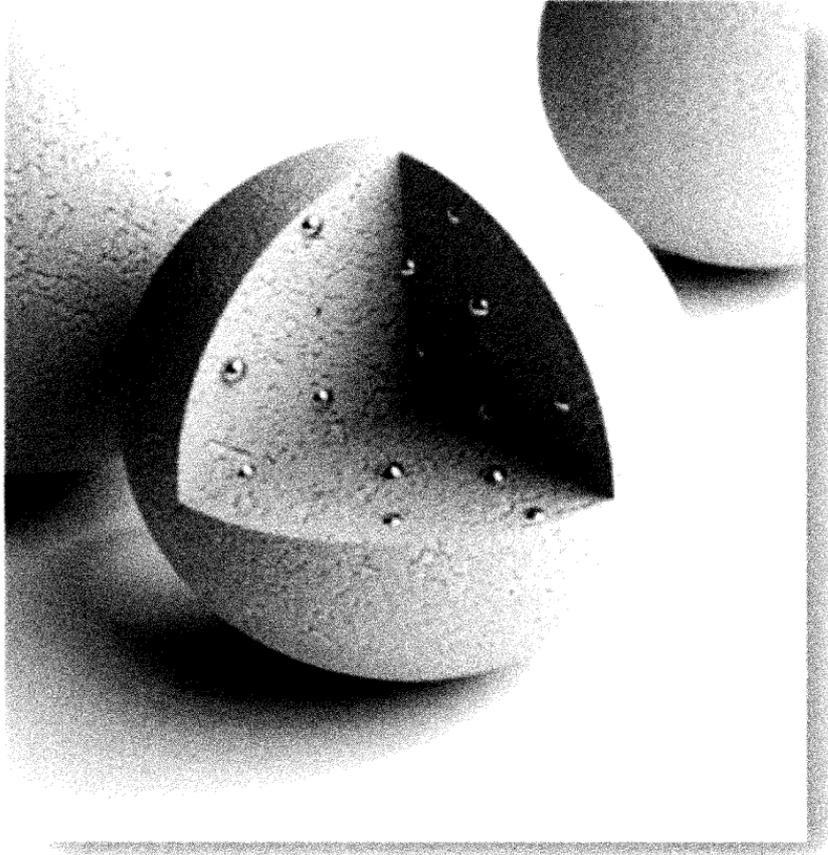


Figura 3

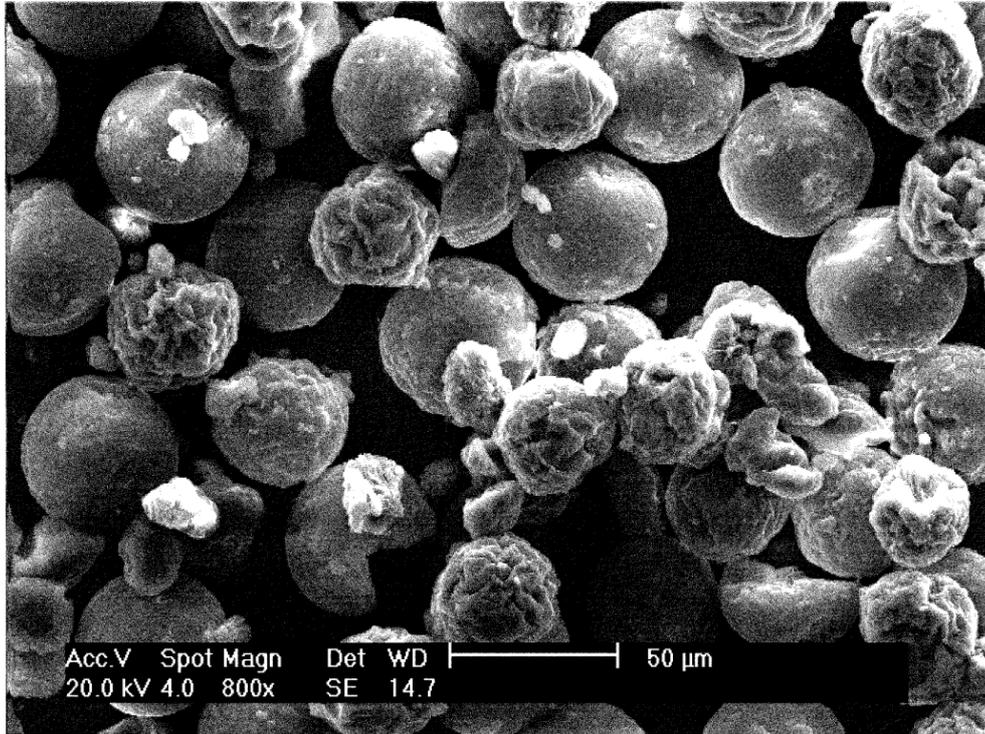


Figura 4

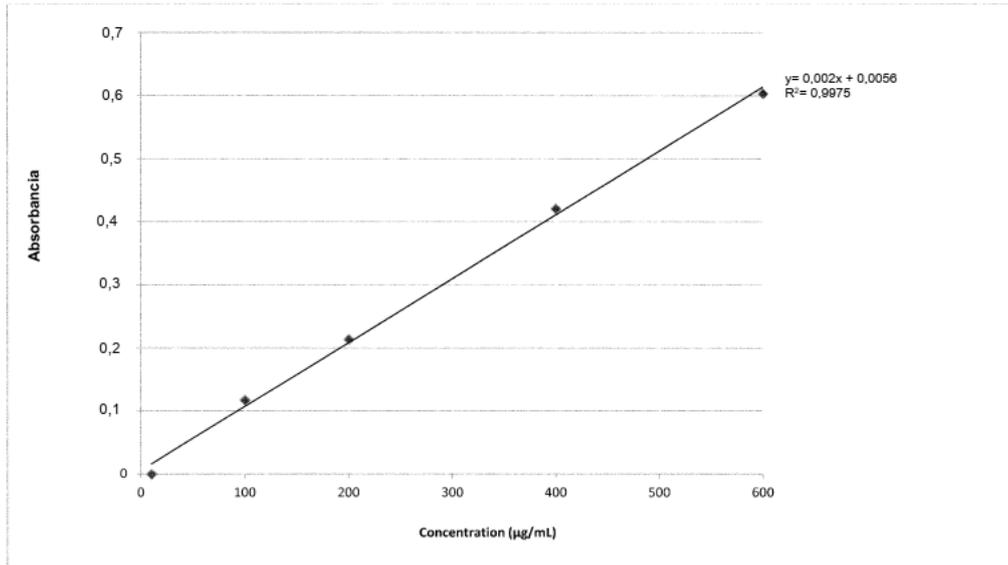


Figura 5