

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 779**

51 Int. Cl.:

A61K 38/43 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2017 E 17186824 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3284483**

54 Título: **Nanopartículas de sílice huecas con ingredientes bioactivos encapsulados, procedimiento de preparación y aplicaciones de las mismas**

30 Prioridad:

19.08.2016 US 201662376920 P

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

03.12.2020

73 Titular/es:

**NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY (100.0%)
No. 1, Sec.4, Roosevelt Road
Taipei 10617, TW**

72 Inventor/es:

**MOU, CHUNG-YUAN;
KOU, NAI-YUAN;
WU, SI-HAN y
CHEN, YI-PING**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 797 779 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 de sílice huecas con ingredientes bioactivos encapsulados, procedimiento de preparación y aplicaciones de las mismas

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud está relacionada con, y reivindica el beneficio de, la solicitud provisional US 62/376.920 presentada el 19 de agosto de 2016.

CAMPO DE LA INVENCÓN

[0002] La presente invención se refiere a nanopartículas de sílice huecas como un sistema de administración de fármacos que carga ingredientes bioactivos. En particular, la presente invención se refiere a nanopartículas de sílice que comprenden cubiertas de sílice con múltiples capas con uno o más ingredientes bioactivos encapsulados entre las cubiertas y sus aplicaciones en la administración de fármacos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCÓN

[0003] El desarrollo de nuevas formas de productos terapéuticos que usan macromoléculas, tales como proteínas o ácidos nucleicos, como agentes terapéuticos ha creado la necesidad de desarrollar nuevos y eficaces enfoques de suministrar dichas macromoléculas a sus dianas celulares apropiadas. La tecnología de nanopartículas se ha aplicado en farmacología y administración de fármacos.

[0004] Se han desarrollado nanotransportadores para el suministro de macromoléculas, incluyendo polímeros, liposomas y nanopartículas inorgánicas, tales como nanopartículas de sílice. Entre los diversos nanomateriales de sílice, se ha considerado que las nanopartículas de sílice huecas (HSN) tienen un gran potencial como sistemas de administración o suministro de fármacos debido a sus propiedades físicas/químicas únicas, tales como un gran volumen de poros, estabilidad química/térmica, alta capacidad de carga, propiedades de superficie ajustables y excelente biocompatibilidad. A diferencia de las nanopartículas de sílice mesoporosas sólidas (MSN) habituales, las HSN pueden encapsular especies de gran tamaño (tales como ingredientes bioactivos) y exhibir una mayor capacidad de carga de dichas especies grandes debido a la morfología única, es decir, una cubierta delgada porosa y un espacio interior hueco, que a su vez mejoran la eficacia de las aplicaciones en catálisis, biomedicina, etc. La morfología y las características de las HSN dependen en gran medida de las estrategias sintéticas, que difieren de una aplicación a otra.

[0005] Los procedimientos con plantillas duras, conocidos como procedimientos convencionales para la síntesis de nanopartículas de sílice huecas, utilizan partículas sólidas y rígidas (tales como partículas de poliestireno) como una plantilla del núcleo, y el material de la plantilla es heterogéneo a la sílice. Dado esto, la plantilla del núcleo se puede grabar por calcinación, disolución en disolvente u otros medios para dejar un espacio hueco dentro de la cubierta de sílice cerrada (Li, Y.; Shi, J. Hollow-structured mesoporous materials: chemical synthesis, functionalization and applications. Adv Mater 2014, 26, 3176-3205). Aunque la homogeneidad del tamaño de las nanopartículas, la forma y la dimensión de las nanopartículas de la cavidad pueden controlarse con precisión, tales procedimientos requieren un proceso sintético de múltiples etapas, así como un tedioso procedimiento de grabado de plantillas, que lleva mucho tiempo y/o es complicado.

[0006] Los procedimientos con plantillas blandas también utilizan el concepto de grabar la plantilla del núcleo a partir de una estructura de núcleo-cubierta para formar nanopartículas de sílice huecas, pero la plantilla del núcleo es más "blanda" que las aplicadas en los procedimientos con plantillas duras. Por ejemplo, las plantillas de núcleo blandas pueden ser "partículas" líquidas flexibles, tales como micelas, emulsión, vesículas que consisten en materiales de sílice heterogénea, o incluso burbujas de gas. Sin embargo, generalmente, se considera que las HSN preparadas mediante estos procedimientos tienen una apariencia irregular y una distribución de tamaño de partícula más amplia debido a la flexibilidad de la plantilla blanda. Por ejemplo, se formarán HSN especiales similares a Kippah si el aceite en la emulsión de aceite en agua (O/W) escapa a través de los mesoporos antes de que la estructura de la cubierta de sílice se vuelva rígida (Tsou, C.-J.; Hung, Y.; Mou, C.-Y. Hollow mesoporous silica nanoparticles with tunable Shell thickness and pore size distribution for application as broad-ranging pH nanosensor. Microporous and Mesoporous Materials. 2014, 190, 181-188).

[0007] Sin embargo, los ingredientes bioactivos no pueden cargarse antes del procedimiento de grabado con plantilla porque dicho procedimiento probablemente destruiría la actividad de los mismos.

[0008] Además de los procedimientos mencionados anteriormente, los procedimientos de grabado selectivo de diferencia estructural proporcionan un concepto diferente para la síntesis de nanopartículas de sílice huecas. En tales procedimientos, se usan diferentes fuentes de sílice para formar nanopartículas de sílice que tienen una diferencia estructural dentro de las nanopartículas, es decir, la estructura exhibiría diferentes resistencias en diferentes sitios, en particular las capas internas serían más frágiles que las capas externas. Dicho fenómeno se encontró en algunos

procesos sol-gel, incluido el procedimiento Stöber más general. Por lo tanto, al eliminar selectiva y suavemente las partes frágiles de las nanopartículas, se crearía un espacio hueco. La eliminación selectiva de las partes frágiles podría ser relativamente controlable, en particular cuando el nivel de diferencia estructural se eleva mediante diseños específicos durante la fabricación de las nanopartículas de sílice.

5 **[0009]** Al aprovechar las ventajas de la síntesis en un sistema de microemulsión, Chang et al., han descrito un procedimiento de encapsulación enzimática *de novo* en HSN. (Enzyme encapsulated hollow silica nanospheres for intracellular biocatalysis ACS Appl Mater Interfaces 2014, 6, 6883-6890; Intracellular implantation of enzymes in hollow silica nanospheres for protein therapy: cascade system of superoxide dismutase and catalase. Small 2014, 10, 4785-4795). Sin embargo, aunque los procedimientos de grabado selectivo de diferencia estructural pueden prevenir de alguna manera los problemas a los que se enfrentan al usar procedimientos de plantilla dura o blanda, el rendimiento de las nanopartículas de sílice huecas es bastante bajo (hasta aproximadamente 10 mg/20 ml de aceite). Además, las nanopartículas preparadas mediante estos procedimientos todavía tienden a agregarse, lo cual es un problema importante a resolver.

15 El documento WO 2006/084339 describe un procedimiento para administrar un fármaco a un paciente que comprende administrar al paciente una nanopartícula en capas que comprende una partícula central porosa y una o más capas que rodean al menos parcialmente dicha partícula central, teniendo dicha nanopartícula en capas el fármaco distribuido de manera sustancialmente homogénea en al menos una de las capas o la partícula central. También se describe el uso de la nanopartícula en capas para administrar un medicamento a un paciente.

20 El documento WO 2016/164987 sugiere nanopartículas huecas aproximadamente mesoporosas que tienen un núcleo hueco y una cubierta mesoporosa con poros de 2 nm a 20 nm. También se proporciona una composición para proporcionar la liberación sostenida de un compuesto (hidrofóbico) que tiene efectos beneficiosos o terapéuticos cuando se usa en sistemas biológicos, comprendiendo la composición las nanopartículas huecas aproximadamente mesoporosas que tienen compuestos (hidrofóbicos) incorporados en las mismas o sobre las mismas. Sin embargo, los compuestos hidrófobos son de un tamaño que es más pequeño que los poros.

[0010] Por lo tanto, todavía hay una necesidad de mejorar las nanopartículas de sílice huecas como sistemas de administración de fármacos y de una manera simple rentable para sintetizar dichas nanopartículas de sílice huecas.

30 **DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION**

[0011] Con el fin de superar los problemas a los que se enfrentan en la técnica, la presente solicitud proporciona las siguientes soluciones.

35 **[0012]** Se proporciona una nanopartícula de sílice, que pertenece a una nanopartícula de sílice hueca (HSN) y, en particular, puede actuar como un sistema de administración de fármacos, se proporciona.

40 **[0013]** En primer lugar, la presente solicitud proporciona una nanopartícula de sílice, que comprende cubiertas de sílice de múltiples capas, en las que cada cubierta tiene mesoporos y encierra un espacio hueco cerrado, en la que opcionalmente el espacio hueco cerrado más interno tiene un núcleo de sílice sólido; y uno o más ingredientes bioactivos encapsulados dentro del espacio, en la que el ingrediente bioactivo tiene un tamaño mayor que el tamaño de poro de la cubierta que lo encapsula, y en la que el ingrediente bioactivo en cada espacio puede ser el mismo o diferente.

45 **[0014]** En segundo lugar, la presente solicitud también proporciona un procedimiento para preparar una nanopartícula de sílice, que comprende las etapas de:

(a) cualquiera de las etapas (a-1) y (a-2):

(a-1) proporcionar una fase oleosa, un tensioactivo, una fuente de alcoxisilano y/o silicato, una fase acuosa que contiene opcionalmente uno o más ingredientes bioactivos y opcionalmente un cotensioactivo para formar una microemulsión de agua en aceite (W/O); y

50 (a-2) proporcionar una fase oleosa, un tensioactivo, una fuente de alcoxisilano y/o silicato y opcionalmente un cotensioactivo para formar una mezcla;

(b) agregar un reactivo iniciador a la microemulsión W/O de (a-1), o agregar un reactivo iniciador acuoso a la mezcla de (a-2) para formar una microemulsión W/O, y a continuación formar un nanonúcleo de sílice que une el ingrediente bioactivo en la superficie del mismo y/o encapsula el ingrediente bioactivo en el mismo;

55 (c) proporcionar una fase acuosa que contiene un ingrediente bioactivo;

(d) introducir una fuente de alcoxisilano y/o silicato para formar una capa de sílice adicional que encierra el nanonúcleo de sílice de (b);

(e) opcionalmente repetir las etapas (c) y (d) una o más veces;

60 (f) realizar una condición de desestabilización para desestabilizar la microemulsión W/O y recoger la partícula resultante así formada de la microemulsión; y

(g) dispersar la partícula recogida en la etapa (f) en una fase de lavado acuosa para obtener la nanopartícula de sílice; en el que la fuente de alcoxisilano y/o silicato en las etapas (d) y (e) y opcionalmente en la etapa (e) comprenden al menos un organoalcoxisilano, y

65 en el que el tamaño de los ingredientes bioactivos es mayor que el tamaño de poro de la cubierta de sílice que los encapsula.

[0015] La presente solicitud también proporciona los productos preparados mediante el procedimiento, tal como se describe anteriormente.

5 BREVES DESCRIPCIONES DE LOS DIBUJOS

[0016] Las figuras 1 A) a 1(F) son imágenes de TEM de las nanopartículas de sílice de control y las nanopartículas de sílice de la invención.

Las figuras 2(A) y 2(B) son isotermas de sorción de nitrógeno de las nanopartículas de sílice de la invención.

10 Las figuras 3(A) y 3(B) muestran los resultados de las pruebas de actividad enzimática de ASNasa, PEGs-ASNasa y las nanopartículas de sílice de la invención.

La figura 4 muestra los resultados del ensayo de citotoxicidad de la línea celular leucémica MOLT-4 con PEGs-ASNasa, nanopartículas de sílice de control y nanopartículas de sílice de la invención.

15 Las figuras 5(A) y (B) muestran los resultados del ensayo de eficacia de absorción celular (en células MOLT-4) basado en las nanopartículas de sílice de la invención.

La Figura 6 muestra los resultados de las pruebas de la capacidad de inducir apoptosis de la línea celular leucémica MOLT-4 con ASNasa libre, nanopartículas de sílice de control y las nanopartículas de sílice de la invención.

La figura 7 muestra los resultados de la depuración de la circulación de las nanopartículas de sílice de la invención en ratones.

20 La figura 8 muestra los resultados del análisis de biodistribución de las partículas de la invención mediante el sistema de formación de imágenes de fluorescencia IVIS.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 [0017] Con el fin de facilitar la comprensión de la presente descripción, los términos tal como se utilizan en el presente documento se definen a continuación.

30 [0018] En el contexto de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen los referentes plurales, a menos que se indique específicamente lo contrario. A menos que se indique lo contrario, todos y cada uno de los ejemplos o lenguaje de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionados en este documento se usan simplemente para una mejor ilustración de la presente invención, en lugar de limitar el alcance de la presente invención.

35 [0019] Debe entenderse que cualquier intervalo numérico indicado en esta memoria descriptiva pretende incluir todos los subintervalos abarcados en el mismo. Por ejemplo, un intervalo de "50 a 70 °C" incluye todos los subintervalos y valores específicos entre el valor mínimo establecido de 50 °C y el valor máximo establecido de 70 °C, inclusive, por ejemplo, de 58 °C a 67 °C, y de 53 °C a 62 °C, 60 °C o 68 °C. Como los intervalos numéricos descritos son continuos, contienen cada valor numérico entre el valor mínimo y máximo. A menos que se especifique lo contrario, los diversos intervalos numéricos indicados en esta memoria descriptiva son aproximados.

40 [0020] En la presente invención, el término "aproximadamente" se refiere a una desviación aceptable de un valor dado medido por una persona de experiencia ordinaria en la técnica, dependiendo, en parte, de la forma de medir o determinar el valor.

45 [0021] En la presente invención, a menos que se especifique particularmente, el prefijo "nano", tal como se utiliza en el presente documento, significa un tamaño de aproximadamente 300 nm o menos. A menos que se especifique particularmente, el prefijo "meso-", tal como se utiliza en el presente documento, a diferencia de la definición sugerida por la IUPAC, significa un tamaño de aproximadamente 5 nm o menos.

50 [0022] En la presente invención, el término "silano", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a derivados de SiH₄. Normalmente, al menos uno de los cuatro hidrógenos se reemplaza con sustituyentes, tales como alquilo, alcoxilo, amino, etc., tal como se describe a continuación. El término "alcoxisilano", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un silano que tiene al menos un sustituyente alcoxilo unido directamente al átomo de silicio. El término "organoalcoxisilano", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un silano que tiene al menos un sustituyente alcoxilo y al menos un sustituyente hidrocarbilo directamente unidos al átomo de silicio. El término "fuente de silicato", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a sustancias que pueden considerarse como una forma de sal o una forma de éster de ácido ortosilícico, por ejemplo, ortosilicato de sodio, metasilicato de sodio, ortosilicato de tetraetilo (tetraetoxisilano, TEOS), ortosilicato de tetrametilo, ortosilicato de tetrapropilo. Opcionalmente, el sustituyente hidrocarbilo puede sustituirse adicionalmente o interrumpirse con un heteroátomo.

65 [0023] En la presente invención, el término "hidrocarbilo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un radical monovalente derivado de hidrocarburos. El término "hidrocarburo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula que consiste únicamente en átomos de carbono e hidrógeno. Los ejemplos de los hidrocarburos incluyen, pero no se limitan a, (ciclo)alcanos, (ciclo)alquenos, alcadienos, aromáticos, etc. Cuando el hidrocarbilo se sustituye adicionalmente, tal como se mencionó anteriormente, el sustituyente puede ser halógenos,

grupos amino, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, etc. Cuando el hidrocarbilo se interrumpe con un heteroátomo, tal como se mencionó anteriormente, el heteroátomo puede ser S, O o N. En la presente invención, un hidrocarbilo comprende preferiblemente de 1 a 30 átomos de carbono.

5 **[0024]** En la presente invención, el término "alquilo" se refiere a un alquilo saturado, lineal o ramificado, que comprende preferiblemente 1-30 átomos de carbono, y más preferiblemente 1-20 átomos de carbono. Los ejemplos de alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, 2-etilbutilo, n-pentilo, isopentilo, 1-metilpentilo, 1,3-dimetilbutilo, n-hexilo, 1-metilhexilo, n-heptilo, isoheptilo, 1,1,3,3-tetrametilbutilo, 1-metilheptilo, 3-metilheptilo, n-octilo, 2-etilhexilo, 1,1,3-trimetilhexilo, 1,1,3,3-tetrametilpentilo, nonilo, decilo, undecilo, 10 1-metilundecilo, dodecilo, 1,1,3,3,5,5-hexametilhexilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo o similares.

[0025] En la presente invención, el término "alcoxilo" o "alcoxi", tal como se utiliza en el presente documento, significa un grupo que tiene una fórmula "-O-alquilo", en el que la definición de "alquilo" en dicha fórmula tiene el significado de "alquilo" como se indicó anteriormente.

[0026] En la presente invención, el término "cicloalquilo", tal como se utiliza en el presente documento, significa un radical de carbono cíclico, saturado o parcialmente insaturado, que contiene de 3 a 10 átomos de carbono en el anillo y, más preferiblemente, de 3 a 8 átomos de carbono en el anillo, y opcionalmente un sustituyente o sustituyentes de 20 alquilo en el anillo. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclopropenilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, 2-ciclohexen-1-ilo y similares.

[0027] En la presente invención, el término "halógeno" o "halo" significa flúor, cloro, bromo o yodo.

25 **[0028]** En la presente invención, el término "amino", tal como se utiliza en el presente documento, significa un grupo funcional de la fórmula $-NR_1R_2$, en el que R_1 y R_2 representan cada uno independientemente hidrógeno o un grupo hidrocarbilo, tal como se definió anteriormente.

30 **[0029]** En la presente invención, el término "fase acuosa", tal como se utiliza en este documento, significa una fase sustancialmente miscible con agua. Los ejemplos de la fase acuosa incluyen, pero no se limitan a, agua per se, tampones acuosos, soluciones acuosas de dimetilsulfóxido (DMSO), soluciones alcalinas acuosas, etc. La fase acuosa se puede ajustar para que sea ácida, neutra o alcalina, según demanda de la síntesis y/o la estabilidad de la sustancia presente en la fase acuosa.

35 **[0030]** En la presente invención, el término "fase oleosa", tal como se utiliza en este documento, significa una fase sustancialmente inmiscible con la fase acuosa como se ha mencionado anteriormente. Los ejemplos de la fase oleosa incluyen, pero no se limitan a, (ciclo)alcanos líquidos, sustituidos o no sustituidos, tales como hexano, decano, octano, dodecano, ciclohexano, etc.; disolventes aromáticos sustituidos o no sustituidos, tales como benceno, tolueno, xileno, etc.

40 **[0031]** En la presente invención, el término "ingrediente bioactivo", tal como se utiliza en este documento, se refiere a la sustancia que tiene una actividad en un organismo. Los ejemplos del ingrediente bioactivo incluyen, pero sin limitación, una enzima, un fármaco proteico, un anticuerpo, una vacuna, un antibiótico o un fármaco de nucleótido.

45 **Nanopartículas de sílice hueca que encapsulan ingredientes bioactivos**

[0032] En un aspecto, la invención proporciona una nanopartícula de sílice que comprende: cubiertas de sílice de múltiples capas, en la que cada cubierta tiene mesoporos y encierra un espacio hueco cerrado, opcionalmente el espacio hueco cerrado más interno tiene un núcleo de sílice sólido con mesoporos; y uno o más ingredientes bioactivos encapsulados dentro del espacio, en la que el ingrediente bioactivo tiene un tamaño mayor que el tamaño de poro de la cubierta que lo encapsula, y en la que el ingrediente bioactivo en cada espacio puede ser igual o diferente.

55 **[0033]** En una realización de la nanopartícula de sílice de la presente invención, tiene una estructura de núcleo-cubierta con un nano-núcleo y al menos una cubierta cerrada, y hay un espacio entre el nanonúcleo y la cubierta o cubiertas. En una realización, el nanonúcleo es sólido. En otra realización, el nanonúcleo es hueco y, por lo tanto, también puede considerarse como una cubierta hueca cerrada. En una realización, la nanopartícula de sílice tiene un nanonúcleo hueco y una cubierta externa, es decir, dos cubiertas cerradas en total. En otra realización, la nanopartícula de sílice tiene un nanonúcleo sólido y una cubierta externa cerrada. En una realización, la nanopartícula de sílice tiene un núcleo hueco y dos o más cubiertas cerradas, es decir, tres o más cubiertas cerradas en total. En otra realización, la nanopartícula de sílice tiene un nanonúcleo sólido y dos o más cubiertas externas cerradas.

60 **[0034]** El tamaño de partícula de una nanopartícula de sílice hueca de la presente invención se define por el diámetro exterior de la cubierta cerrada más externa. En una realización, la nanopartícula de sílice de la presente invención tiene un tamaño de partícula que varía de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 500 nm, preferiblemente que varía de aproximadamente 20 nm a 150 nm, más preferiblemente inferior a 100 nm o inferior a 30 nm.

[0035] En una realización, las cubiertas de la nanopartícula de sílice de la presente invención tienen cada una independientemente un grosor de al menos aproximadamente 2 nm, al menos aproximadamente 3 nm o al menos aproximadamente 5 nm; y como máximo, aproximadamente 15 nm, como máximo, aproximadamente 12 nm o, como máximo, 10 nm; o el grosor se encuentra en un intervalo formado por cualquier combinación de los límites superior e inferior mencionados anteriormente.

[0036] El nanonúcleo y las cubiertas de la nanopartícula de sílice hueca de la presente invención son mesoporosos, y los mesoporos tienen un tamaño de aproximadamente 5 nm o menos, preferiblemente 3 nm o menos, más preferiblemente de 2 nm o menos.

[0037] En una realización, cada cubierta encierra un espacio hueco cerrado, y la distancia entre el nanonúcleo y la cubierta o entre las cubiertas es menor que 75 nm, preferiblemente varía de aproximadamente 2 nm a 75 nm, más preferiblemente varía de aproximadamente 2 nm a 50 nm.

[0038] En una realización, las superficies exterior e interno de la cubierta o cubiertas pueden ser independientemente sin modificar o modificadas. Las modificaciones de la superficie de las cubiertas pueden hacerse de novo o pueden ser posteriores a las modificaciones. Los ejemplos de modificación pueden ser, pero sin limitación, modificaciones hidrofílicas, tales como modificación con poli(etilenglicol) (PEG), modificación con polietilenimina (PEI), modificación con 3-(trihidroxisilil)propil metilfosfonato (THPMP), modificación con ácido N-(trimetoxisilil)etilendiamino triacético (EDTAS) N-[3-(trimetoxisilil)propil]etilendiamina, modificación con N-[3-(trimetoxisilil)propil]-N,N,N-trimetilamonio (TA-trimetoxisilano), modificación con (3-mercatopropil)trimetoxisilano (MPTMS), modificación con silano zwitteriónico; modificaciones de especificidad, tales como modificaciones con biomarcadores, por ejemplo modificaciones con anticuerpos, modificaciones con enlazadores, modificación con ligandos dirigidos a tumores, etc.; o modificaciones de actividad no específica, tales como modificaciones de las propiedades de la superficie de la cubierta, por ejemplo, modificación de los tipos o distribución de carga, etc.

[0039] La nanopartícula de sílice hueca comprende uno o más ingredientes bioactivos encapsulados dentro del espacio. En una realización, los ingredientes bioactivos se encapsulan entre cada cubierta. En una realización, la nanopartícula de sílice hueca tiene un nanonúcleo sólido y una cubierta externa cerrada, y el ingrediente bioactivo se encapsula entre el nanonúcleo y la cubierta. En otra realización, para el nanonúcleo y la cubierta más externa, el ingrediente bioactivo puede estar unido a la superficie de los mismos. En una realización, los ingredientes bioactivos tienen un tamaño mayor que el de los mesoporos. En realizaciones adicionales, el agente o agentes terapéuticos adicionales que tienen un tamaño menor o igual a los mesoporos pueden cargarse de novo o cargarse pasivamente en la nanopartícula de sílice hueca.

[0040] En una realización, el ingrediente bioactivo puede seleccionarse de entre los que son solubles en agua o que tienen modificación de la superficie por lo que es capaz de dispersarse o disolverse en una fase acuosa. En una realización, el ingrediente bioactivo es una enzima, un fármaco proteico, un anticuerpo, una vacuna, un antibiótico o un fármaco de nucleótido. Los ejemplos de la enzima incluyen, pero no se limitan a, agalsidasa, imiglucerasa, taliglucerasa, velaglucerasa, alglucerasa, sebelipasa, laronidasa, idursulfasa, elosulfasa, galsulfasa, alglucosidasa, asparaginasa, glutaminasa, arginina deiminasa, arginasa, metioninasa, cisteinasa, homocisteinasa, fenilalanina hidroxilasa, fenilalanina amoniaco liasa, urato oxidasa, catalasa, peroxidasa de rábano picante, superóxido dismutasa o glutatión peroxidasa.

[0041] Los ejemplos del agente terapéutico adicional incluyen, pero no se limitan a, doxorrubicina, curcumina, paclitaxel, ixabepilona, gemcitabina, irinotecán, SN-38, 5-FU, daunorrubicina, docetaxel, etc.

[0042] Sin limitarse a la teoría, la nanopartícula de sílice de la presente invención exhibe un área de superficie BET de aproximadamente 400 m²/g o menos, por ejemplo de 50 a 200 m²/g, dependiendo de los tipos y cantidades de los agentes bioactivos encapsulados, el número de múltiples capas y la modificación en la superficie de las cubiertas de la nanopartícula de sílice.

[0043] La nanopartícula de sílice de la presente invención se puede preparar mediante, por ejemplo, pero sin limitación a, un procedimiento de grabado selectivo de diferencia estructural. Preferiblemente, la nanopartícula de sílice de la presente invención no se calcina durante la preparación. Dado esto, la nanopartícula de sílice de la presente invención preferiblemente tiene uno o varios residuos de organosílice, por ejemplo, residuos de organoalcoxisilano, dentro o sobre la superficie del nanonúcleo y la cubierta o cubiertas cerradas.

Procedimiento para preparar nanopartículas de sílice que encapsulan el ingrediente bioactivo

[0044] La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar una nanopartícula de sílice que encapsula un ingrediente bioactivo en la misma. El procedimiento comprende las siguientes etapas:

(a) cualquiera de las etapas (a-1) y (a-2):

(a-1) proporcionar una fase oleosa, un tensioactivo, una fuente de alcoxisilano y/o silicato, una fase acuosa que contiene opcionalmente uno o más ingredientes bioactivos y opcionalmente un cotensioactivo para formar una microemulsión de agua en aceite (W/O); y

(a-2) proporcionar una fase oleosa, un tensioactivo, una fuente de alcoxisilano y/o silicato y opcionalmente un cotensioactivo para formar una mezcla;

(b) agregar un reactivo iniciador a la microemulsión W/O de (a-1), o agregar un reactivo iniciador acuoso a la mezcla de (a-2) para formar una microemulsión W/O, y a continuación formar un nanonúcleo de sílice que une el ingrediente bioactivo en la superficie del mismo y/o encapsula el ingrediente bioactivo en el mismo;

(c) proporcionar una fase acuosa que contiene un ingrediente bioactivo;

(d) introducir una fuente de alcoxisilano y/o silicato para formar una capa de sílice adicional que encierra el nanonúcleo de sílice de (b);

(e) opcionalmente repetir las etapas (c) y (d) una o más veces;

(f) realizar una condición de desestabilización para desestabilizar la microemulsión W/O y recoger la partícula resultante así formada de la microemulsión; y

(g) dispersar la partícula recogida en la etapa (f) en una fase de lavado acuosa para obtener la nanopartícula de sílice; en el que la fuente de alcoxisilano y/o silicato en las etapas (d) y (e) y opcionalmente en la etapa (e) comprenden al menos un organoalcoxisilano, y

en el que el tamaño de los ingredientes bioactivos es mayor que el tamaño de poro de la cubierta de sílice que los encapsula.

[0045] En la etapa (a-1), se seleccionan las cantidades de la fase oleosa, tensioactivo y fase acuosa, de manera que se formará una microemulsión de agua-en-aceite (W/O) después de mezclar estas sustancias. En general, la cantidad de fase oleosa es mucho mayor que la del tensioactivo y la fase acuosa para formar una microemulsión W/O. Los medios para formar una microemulsión W/O son generalmente conocidos en la técnica, y pueden utilizarse en la presente invención medios que no son perjudiciales para la actividad del ingrediente bioactivo. Las definiciones y ejemplos de la fase oleosa, fase acuosa, ingrediente bioactivo, fuente de alcoxisilano y silicato se han descrito en detalle anteriormente.

[0046] Los tensioactivos usados para la formación de una microemulsión W/O se utilizan comúnmente y son fácilmente conocidos en la técnica. Preferiblemente, se usan tensioactivos no iónicos en la presente invención. Los ejemplos de tensioactivo no iónico incluyen, pero no se limitan a, poli(oxietileno)nonilfenil éter (por ejemplo, CO-520), éster alquílico de polioxietilenglicol sorbitano, polietilenglicol alquil éter, glucósido alquil éter, polietilenglicol octilfenil éter, polietilenglicol alquilfenil éter, éster alquílico de glicerol, polipropilenglicol alquil éteres, poloxámeros, cocamida monoetanolamina (cocamida MEA), cocamida dietanolamina (cocamida DEA), óxido de laurildimetilamina, seboamina polietoxilada, etc.

[0047] Opcionalmente, puede usarse un cotensioactivo para facilitar la formación o para estabilizar la microemulsión. Los ejemplos del cotensioactivo incluyen, pero no se limitan a, alcanoles, tales como alcohol hexílico; polietilenglicol 400 (PEG 400), PEG 600, etc.

[0048] Se pueden introducir codisolventes en pequeñas cantidades en la fase acuosa para conseguir una buena dispersión o disolución de los ingredientes bioactivos, si es necesario. Los ejemplos del codisolvente incluyen, pero no se limitan a, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, PEI, PEG, polilisina, poliarginina, solución de arginina, solución de glutamato, solución de mezcla de arginina-glutamato, monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, tampón Tris, tampón fosfato.

[0049] En una realización, la fase acuosa que contiene opcionalmente uno o más ingredientes bioactivos se proporciona antes de la fuente de alcoxisilano y/o silicato en la etapa (a-1). En otra realización, la fuente de alcoxisilano y/o silicato se proporciona antes de la fase acuosa que contiene opcionalmente uno o más ingredientes bioactivos en la etapa (a-1). En otra realización, la fase acuosa que contiene opcionalmente uno o más ingredientes bioactivos y la fuente de alcoxisilano y/o silicato se proporciona simultáneamente en la etapa (a-1). Es decir, el orden de introducción de la fase acuosa que contiene opcionalmente uno o más ingredientes bioactivos y la fuente de alcoxisilano y/o silicato en la etapa (a-1) puede invertirse o realizarse simultáneamente.

[0050] En otra realización, se adopta la etapa (a-2); es decir, se proporcionan una fase oleosa, un tensioactivo, una fuente de alcoxisilano y/o silicato y opcionalmente un codisolvente para formar una mezcla.

[0051] A continuación, se añade un reactivo de iniciación para iniciar la formación de sílice, como en la etapa (b). En la etapa (b), el reactivo iniciador es una sustancia que puede desencadenar la reacción para formar sílice. Los ejemplos del reactivo iniciador incluyen, pero no se limitan a, sustancias ácidas, tales como ácidos o soluciones acuosas ácidas, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, etc.; sustancias alcalinas, tales como bases o soluciones acuosas alcalinas, tales como amoniaco acuoso, una solución acuosa de hidróxido de sodio; y fuentes iónicas, tales como sales, soluciones de sales y tampones, por ejemplo fluoruro de sodio, tampones de fosfato, etc. En una realización, cuando se adopta la etapa (a-2), el reactivo iniciador introducido en la etapa (b) es un reactivo iniciador acuoso, que desencadena no solo la formación de una microemulsión W/O, sino también la reacción para formar sílice. Tras iniciarse la reacción, se forma un nanonúcleo de sílice, en el que el ingrediente bioactivo está unido a la superficie del nanonúcleo de sílice y/o está encapsulado dentro del nanonúcleo de sílice.

[0052] En una realización, cuando se usa fase acuosa que no contiene ningún ingrediente bioactivo en la etapa (a-1), el nanonúcleo de sílice formado en la etapa (b) no se unirá y/o encapsulará ningún ingrediente bioactivo de novo. En una realización, cuando se usa una fase acuosa que contiene un ingrediente bioactivo en la etapa (a-1), el nanonúcleo de sílice formado en la etapa (b) se unirá y/o encapsulará el ingrediente bioactivo.

5 **[0053]** En las etapas posteriores (c) y (d), se introducen una nueva fase acuosa que contiene un ingrediente bioactivo y una fuente de alcoxisilano y/o silicato adicional, respectivamente. A continuación, se forma una capa de sílice adicional que encierra el nanonúcleo de sílice, haciendo que la partícula de sílice tenga dos capas.

10 **[0054]** Tras la formación de una partícula de sílice de dos capas, las operaciones de las etapas (c) y (d) pueden opcionalmente repetirse una o más veces, como la etapa (e), para formar un número de capas adicionales (tales como una tercera, cuarta, ... capa) que encierran la partícula de sílice existente.

15 **[0055]** A continuación, se realiza una condición de desestabilización de la microemulsión W/O como etapa (f) y se recogen las partículas resultantes así formadas de la microemulsión. Los ejemplos de la condición de desestabilización incluyen, pero no se limitan a, agregar un agente desestabilizador, tal como un alcohol, exceso de tensioactivo o tensioactivos, etc. Las partículas recogidas se pueden aclarar rápidamente con agua, alcanoles (tales como alcohol C₁₋₃), por ejemplo, etanol, alcohol isopropílico, etc.) o soluciones alcalinas acuosas.

20 **[0056]** Por último, la partícula recogida en la etapa (f) se dispersa en una fase acuosa de lavado como etapa (g) para obtener la nanopartícula de sílice, tal como se reivindica. La fase de lavado puede ser agua, alcanoles (tales como alcohol C₁₋₃, por ejemplo, etanol, alcohol isopropílico, etc.) o soluciones alcalinas acuosas.

25 **[0057]** El nano-núcleo y la cubierta o cubiertas producidas por el presente procedimiento tienen mesoporos en la superficie. Sin estar ligado a la teoría, el tamaño de los mesoporos puede ajustarse utilizando diferentes tipos de tensioactivos, cotensioactivos y/o fuente o fuentes de alcoxisilano y/o silicato, o las cantidades de la fuente o fuentes de alcoxisilano y/o silicato.

30 **[0058]** Preferiblemente, la relación del volumen total del tensioactivo y cotensioactivo con respecto al volumen total de la fuente o fuentes de alcoxisilano y/o silicato utilizado en el procedimiento está controlada. En una realización, dicha relación varía de aproximadamente 3,5:1 a aproximadamente 9,0:1, preferiblemente de 4,5:1 a aproximadamente 8,0:1, más preferiblemente de aproximadamente 5,5:1 a aproximadamente 7,5:1.

35 **[0059]** En una realización, cuando se emplea la etapa (e), es decir, se proporcionan o introducen la fase o fases acuosas adicionales que contienen un ingrediente bioactivo y la fuente o fuentes de alcoxisilano y/o silicato, el número de cubiertas se puede ajustar en la etapa (g) dependiendo del deseo del fabricante. Los factores que determinan el número de las cubiertas incluyen los tiempos de las etapas de repetición (c) y (d), los tipos de la fuente o fuentes de alcoxisilano y/o silicato que se usan en estas etapas, el tiempo de lavado en la etapa (g), la temperatura para llevar a cabo el lavado en la etapa (g), etc. Por ejemplo, cuando las nanopartículas de sílice que tienen una estructura de dos capas, la etapa (e) debe realizarse al menos una vez. En una realización, la etapa (e) se realiza una vez y se producen nanopartículas de sílice que tienen solo una capa después del lavado. Además, la temperatura y/o el tiempo de lavado pueden determinarse en función de la susceptibilidad de la fuente o fuentes de alcoxisilano y/o silicato al lavado. Por ejemplo, cuando la temperatura es más alta, el efecto del lavado puede ser más evidente, y viceversa. La temperatura de lavado puede ser, por ejemplo, de hasta 80 °C, hasta 70 °C, etc., o puede ser ambiente (20 °C, 25 °C o 37 °C). En una realización, el nanonúcleo de sílice permanece sólido después del lavado, mientras que se forman una o más cubiertas que encierran el nanonúcleo de sílice y el espacio hueco cerrado. En una realización, cada capa, incluyendo el nanonúcleo de sílice, es una cubierta que encierra un espacio hueco cerrado.

50 **[0060]** En una realización, las fuentes de alcoxisilano y/o silicatos utilizados en las etapas (a), (d) y (e) son cada una independientemente la misma o diferente. En una realización, la fuente de alcoxisilano y/o silicato comprende tetraetoxisilano (TEOS), tetrametoxisilano (TMOS), silicato de sodio o una mezcla de los mismos. En una realización, el organoalcoxisilano es 2-[metoxi(polietileno)propil]-trimetoxisilano (PEG-trimetoxisilano), 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS), propil trietoxisilano, butil trimetoxisilano, octil trimetoxisilano, difenil dietoxisilano, n-octil trietoxisilano, mercapto propil trimetoxisilano, clorometil trimetoxisilano, isobutil trietoxisilano, 3-aminopropil trietoxisilano, etil trimetoxi estireno silano, metil trietoxisilano, fenil trietoxisilano (PTEOS), fenil trimetoxisilano (PTO-MOS), metil trimetoxisilano (MTMOS), etiltriacetoxisilano (ETAS), ácido N-(trimetoxisililpropil) etilendiamino triacético (EDTAS), (3-trihidroxisilil)propil metilfosfonato (THPMP), metiltriacetoxisilano (MTAS), N-[3-(trimetoxisilil)propil] etilendiamina, trimetoxisililpropil (polietilenoimina), cloruro de N-trimetoxisililpropil trimetilamonio, (3-mercatopropil) trimetoxisilano (MPTMS), silano zwitteriónico o una mezcla de los mismos. En una realización, la fuente de alcoxisilano y/o silicato es una mezcla de TEOS y APTMS, una mezcla de THPMP, APTMS y TEOS o una mezcla de EDTAS, APTMS y TEOS. En una realización, la fuente de alcoxisilano y/o silicato usada en la etapa (a) es una mezcla de THPMP, APTMS y TEOS; o una mezcla de EDTAS, APTMS y TEOS. En una realización, la fuente de alcoxisilano y/o silicato usada en la etapa (d) y/o (e) es una mezcla de APTMS y TEOS.

65 **[0061]** La presente invención también proporciona una nanopartícula de sílice preparada mediante cualquiera de los procedimientos, tal como se han descrito anteriormente.

[0062] Los siguientes ejemplos se proporcionan para hacer la presente invención más comprensible para los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención, pero no pretende limitar el alcance de la invención.

5 EJEMPLOS

Materiales, metodologías y modelos de prueba

ASNasa modificada con PEG (PEG-ASNasa)

10 **[0063]** Tal como se conoce en la técnica, las asparaginidas ("ASNasas") son útiles en el tratamiento de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (ALL). Por lo tanto, la ASNasa se usa como un ejemplo del ingrediente bioactivo de la presente invención. Para aumentar la solubilidad de ASNasa en fase acuosa, modificamos la superficie de ASNasa con el resto SCM-PEG-MPTMS; el producto se denominó en lo sucesivo PEG-ASNasa. Sin limitarse a la teoría, se cree que la PEG-ASNasa puede conjugarse con la fuente de alcoxilano y/o sílice y dicha conjugación puede ser útil para la encapsulación posterior de PEG-ASNasa. La preparación de PEG-ASNasa se ilustra de la siguiente manera: maleimida-poli(etilenglicol)-succinimidil éster (MAL-PEG-SCM) (6,4 mg) y (3-mercaptopropil) trimetoxisilano (MPTMS) (5 µL) se mezclan con ASNasa (1 mg), la mezcla se disuelve en una solución tampón de NaH₂PO₄ (50 mM, pH 7,8) y la solución se agita a 4 °C durante 6 horas. A continuación, el producto (PEGs-ASNasa) se purifica dializando el exceso de MAL-PEG-SCM, MPTMS o RITC en una solución tampón de NaH₂PO₄ (50 mM, pH 7,8) a 4 °C durante 2 días para eliminar estos agentes en exceso. Finalmente, la PEGs-ASNasa se concentra con filtros Amicon® Ultra.

ASNasa marcada con fluoróforo

25 **[0064]** Para los ensayos basados en fluorescencia, la ASNasa puede conjugarse con un fluoróforo; aquí, por ejemplo, isotiocianato de rodamina (RITC) o isotiocianato de fluoresceína (FITC). La síntesis de PEG-ASNasa marcada con RITC se puede lograr mediante un procedimiento similar al de sintetizar PEGs-ASNasa, mientras que RITC se introdujo junto con MAL-PEG-SCM y MPTMS, y también se puede conjugar covalentemente sobre ASNasa.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

30 **[0065]** La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se usa para evaluar y examinar directamente la apariencia de las nanopartículas de sílice, tal como el tamaño de cada capa, el número y el grosor de las cubiertas, la dimensión del espacio hueco cerrado, etc. Las imágenes TEM se tomaron en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7100 que funcionaba a un voltaje acelerado de 75 kV, y las muestras se dispersaron en etanol y se sonicaron durante 30 segundos antes de depositarlas en rejillas de cobre recubiertas de carbono y se secaron al aire.

Dispersión dinámica de luz (DLS)

40 **[0066]** Las medidas de tamaño de las nanopartículas de sílice en diferentes entornos de solución se realizaron con dispersión dinámica de luz (DLS) en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido). La concentración de las nanopartículas de sílice es 0,2-0,3 mg/mL. Se analizaron los tamaños de partículas (solvatadas) en diferentes soluciones: H₂O (pH 6-7), de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con FBS al 10%, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con FBS al 20%, Medio RPMI 1640 con FBS al 10% y solución de tampón PBS (pH 7,4).

Pruebas de actividad de ASNasa para caracterización

50 **[0067]** La estimación cuantitativa de la actividad de ASNasa se llevó a cabo mediante el procedimiento de Nesslerización a través de la detección de amoníaco (Mashburn, LT y Wriston, JC, Biochemical and biophysical Research Communications, 1963, 12 (1), 50-55). En particular, las ASNasas o las nanopartículas de sílice que contienen ASNasas se centrifugaron y dispersaron respectivamente en 200 µL de tampón Tris 0,05 M, pH 8,6, y a continuación, se incubaron con su sustrato (es decir, 1,7 ml de L-asparagina 0,01 M en tampón Tris 0,05 M, pH 8,6; la L-asparagina se adquirió de Pro-Spec) a 37 °C durante 10 minutos a 72 horas; se incubó un grupo de control paralelo sin la adición de ASNasa en la misma condición. La reacción se interrumpió mediante la adición de 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M. La muestra se sometió a continuación a centrifugación y se diluyeron 500 µL del sobrenadante con 7 ml de agua D.I. (resistividad de 18,2 MΩ) y se mezcló con 1 ml de reactivo de Nessler (adquirido en Merck; que contenía hidróxido de potasio y tetrayodomercurato de potasio) para formar una solución amarillenta (que contenía amoníaco). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se midió la absorbancia a 480 nm mediante un espectrofotómetro. Se utilizó sulfato de amonio como patrón para establecer la curva de calibración. 1 Unidad (U) de ASNasa se define como la cantidad de µmol de amoníaco por minuto por miligramo producido por la ASNasa a 37 °C, pH 8,6.

Ejemplo sintético 1

Síntesis de PEGs-HSN

Ejemplo 1A: PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15

[0068] Se mezclaron veinte (20) ml de decano (como fase oleosa), 3,5 ml de CO-520 (como tensioactivo) y 1,1 ml de alcohol hexílico (como un cotensioactivo opcional). A continuación, se añadieron a la mezcla 200 µl de TEOS y 25 µl de solución etanólica de APTMS (de una solución madre de 200 µl de APTMS en 1,4 ml de etanol) (como fuente de alcoxisilano y/o sílice) y la mezcla se agitó a 20 °C. Quince minutos después, se añadieron gota a gota 500 µl de NH₄OH (28-30% en peso) (como reactivo iniciador) a la mezcla para iniciar la hidrólisis de alcoxisilano de sílice y/o fuente de sílice y formar un nanonúcleo de sílice. Después de 2 horas, se añadieron lentamente a la microemulsión 700 µl de H₂O (con 2385,2 µg de PEG-ASNasa en la misma, como una fase acuosa). 10 minutos más tarde, se añadieron 300 µl de TEOS y 100 µl de solución etanólica de APTMS (como fuente de alcoxisilano y/o sílice) a la microemulsión y la microemulsión se agitó durante 12 horas a 20 °C para formar una segunda capa de sílice que encerraba el nanonúcleo de sílice. A continuación, se añadieron 500 µl de PEG-trimetoxisilano y 50 µl de TEOS a ambas para modificar la superficie de las nanopartículas de sílice. Después de 24 horas, se usó etanol al 95% para desestabilizar el sistema de microemulsión. Las partículas resultantes se recogieron por centrifugación a 15.500 rpm durante 25 minutos y se enjuagaron rápidamente con etanol dos veces. A continuación, las partículas se transfirieron a 200 ml de agua D.I. para lavar a 50°C durante 2 horas. Finalmente, se formaron las nanopartículas de sílice huecas (HSN), se recogieron por centrifugación y se lavaron con etanol dos veces. El producto (PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15) finalmente se dispersó y se almacenó en etanol al 99,5%. La PEG-ASNasa se encapsuló dentro del espacio entre las capas interna y externa.

[0069] Ejemplo 1B: Se preparó un grupo de control de las nanopartículas de sílice huecas que no contenían ASNasa (PEG-HSN 18) con un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1A anterior, excepto que la ASNasa no estaba incluida en la fase acuosa.

Ejemplo 1C: PEGs-ASNasa@PEG-HSN 10

[0070] Se mezclaron veinte (20) ml de decano (como fase oleosa), 3,5 ml de CO-520 (como tensioactivo) y 1,1 ml de alcohol hexílico (como cotensioactivo opcional). A continuación, se añadieron 350 µl de H₂O con 669,5 µg de PEGs-ASNasa a la solución (como fase acuosa que contiene el ingrediente bioactivo). Después de 2 minutos, se añadieron a la microemulsión 200 µl de TEOS y 25 µl de solución etanólica de APTMS (de una solución madre de 200 µl de APTMS en 1,4 ml de etanol) (como fuente de alcoxisilano y/o sílice) y la microemulsión se agitó a 20 °C. Quince minutos después, se añadieron gota a gota 500 µl de NH₄OH (28-30% en peso) (como reactivo iniciador) a la microemulsión para iniciar la hidrólisis del alcoxisilano de sílice y/o fuente de sílice y formar un nanonúcleo de sílice. Después de 2 horas, se añadieron lentamente a la microemulsión 350 µl de H₂O con 669,5 µg de PEGs-ASNasa (como fase acuosa que contiene el ingrediente bioactivo). 10 minutos más tarde, se añadieron a la microemulsión 300 µl de TEOS y 100 µl de solución etanólica de APTMS (como fuente de alcoxisilano y/o sílice) y la microemulsión se agitó durante 12 horas a 20 °C para formar una segunda capa de sílice que encerraba el nanonúcleo de sílice. A continuación, se añadieron 500 µl de PEG-trimetoxisilano y 50 µl de TEOS a ambas para modificar la superficie de las nanopartículas de sílice. Después de 24 horas, se usó etanol al 95% para desestabilizar el sistema de microemulsión. Las partículas resultantes se recogieron por centrifugación a 15.500 rpm durante 25 minutos y se enjuagaron rápidamente con etanol dos veces. A continuación, las partículas se transfirieron a 200 ml de agua D.I. para lavar a 50°C durante 2 horas. Finalmente, se formaron las nanopartículas de sílice huecas (HSN), se recogieron por centrifugación y se lavaron con etanol dos veces. El producto (PEGs-ASNasa@PEG-HSN 10) finalmente se dispersó y se almacenó en etanol al 99,5%. La PEG-ASNasa se encapsuló dentro del espacio dentro de la capa interna, así como el espacio entre las capas interna y externa.

Síntesis de PEGs-HSN con modificación de la superficie de TA-trimetoxisilano

Ejemplo 1D: PEGs-ASNasa@PEG-HSN 17

[0071] La preparación de nanopartículas de sílice con modificación de la superficie de TA-trimetoxisilano con cloruro de N-[3-(trimetoxisilil)propil]-trimetilamonio se ilustra a continuación. Se mezclaron veinte (20) ml de decano (como fase oleosa), 3,5 ml de CO-520 (como tensioactivo) y 1,1 ml de alcohol hexílico (como un cotensioactivo opcional). A continuación, se añadieron a la mezcla 200 µl de TEOS y 25 µl de solución etanólica de APTMS (de una solución madre de 200 µl de APTMS en 1,4 ml de etanol) (como fuente de alcoxisilano y/o sílice) y la mezcla se agitó a 20 °C. Quince minutos después, se añadieron gota a gota 500 µl de NH₄OH (28-30% en peso) (como reactivo iniciador) a la mezcla para iniciar la hidrólisis de alcoxisilano de sílice y/o fuente de sílice y formar un nanonúcleo de sílice durante 2 horas. A continuación, se introdujeron 100 µl de cloruro de N-[3-(trimetoxisilil)propil]-trimetilamonio (TA-trimetoxisilano, 95%) después de la hidrólisis de alcoxisilano de sílice y/o fuente de sílice y se agitó durante 2 horas. A continuación, se añadieron lentamente a la microemulsión 700 µl de H₂O (con 2385,2 µg de PEG-ASNasa en la misma, como una fase acuosa). 10 minutos más tarde, se añadieron 300 µl de TEOS y 100 µl de solución etanólica de APTMS (como fuente de alcoxisilano y/o sílice) a la microemulsión y la microemulsión se agitó durante 12 horas a 20 °C para formar una segunda capa de sílice que encerraba el nanonúcleo de sílice. A continuación, se añadieron 500 µl de PEG-trimetoxisilano y 50 µl de TEOS a ambas para modificar la superficie externa de las nanopartículas de sílice. Después de 24 horas, se usó etanol al 95% para desestabilizar el sistema de microemulsión. Las partículas se recogieron por centrifugación a 15.500 rpm durante 25 minutos y se enjuagaron rápidamente con etanol dos veces. A

continuación, las partículas se transfirieron a 200 ml de agua D.I. para lavar a 50°C durante 2 horas. Finalmente, se formaron las HSN, se recogieron por centrifugación y se lavaron con etanol dos veces. El producto (PEGs-ASNasa@PEG-HSN 17) finalmente se almacenó en etanol al 99,5%.

- 5 **[0072]** Ejemplo IE: se proporciona un grupo de control de las nanopartículas de sílice huecas donde no ASNasa está contenido (PEG-HSN 19) mediante un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1D anterior, excepto que la ASNasa no está incluida en la fase acuosa.

Ejemplo IF: PEGs-ASNasa@PEG-HSN 11

- 10 **[0073]** La preparación de nanopartículas de sílice con modificación de la superficie de TA-trimetoxisilano con cloruro de N-[3-(trimetoxisilil)propil]-trimetilamonio se ilustra a continuación. Se mezclaron veinte (20) ml de decano (como fase oleosa), 3,5 ml de CO-520 (como tensioactivo) y 1,1 ml de alcohol hexílico (como cotensioactivo opcional). A continuación, se añadieron 350 µl de H₂O con 669,5 µg de PEGs-ASNasa a la mezcla (como fase acuosa que contiene el ingrediente bioactivo). Después de 2 minutos, se introdujeron 25 µl de cloruro de N-[3-(trimetoxisilil)propil]-trimetilamonio (TA-trimetoxisilano, 95%) en la microemulsión. A continuación, se añadieron a la microemulsión 200 µl de TEOS y 25 µl de solución etanólica de APTMS (200 µl de APTMS en 1,4 ml de etanol) (como fuente de alcoxisilano y/o sílice) y la microemulsión se agitó a 20 °C. Quince minutos después, se añadieron gota a gota 500 µl de NH₄OH (28-30% en peso) (como reactivo iniciador) a la microemulsión para iniciar la hidrólisis del alcoxisilano de sílice y/o fuente de sílice y formar un nanonúcleo de sílice durante 2 horas. A continuación, se introdujeron 25 µl de cloruro de N-[3-(trimetoxisilil)propil]-trimetilamonio (TA-trimetoxisilano, 95%) después de la hidrólisis del alcoxisilano de sílice y/o fuente de sílice y se agitó durante 2 horas. A continuación, se añadieron lentamente a la microemulsión 350 µl de H₂O (con 669,5 µg de PEGs-ASNasa en la misma como fase acuosa). 10 minutos más tarde, se añadieron a la microemulsión 300 µl de TEOS y 100 µl de solución etanólica de APTMS (como fuente de alcoxisilano y/o sílice) y la microemulsión se agitó durante 12 horas a 20 °C para formar una segunda capa de sílice que encerraba el nanonúcleo. A continuación, se añadieron 500 µl de PEG-trimetoxisilano y 50 µl de TEOS a ambas para modificar la superficie externa de las partículas. Después de 24 horas, se usó etanol al 95% para desestabilizar el sistema de microemulsión. Las partículas se recogieron por centrifugación a 15.500 rpm durante 25 minutos y se enjuagaron rápidamente con etanol dos veces. A continuación, las partículas se transfirieron a 200 ml de agua D.I. y se lavaron a 50°C durante 2 horas. Finalmente, se formaron las HSN, se recogieron por centrifugación y se lavaron con etanol dos veces. El producto (PEGs-ASNasa@PEG-HSN 11) finalmente se dispersó y se almacenó en etanol al 99,5%. La PEG-ASNasa se encapsuló dentro del espacio dentro de la capa interna, así como en el espacio entre las capas interna y externa.

- 35 **[0074]** Las PEG-HSN que encapsulan agentes bioactivos y que tienen una sola capa también se prepararon usando diferentes condiciones de lavado.

[0075] Los rendimientos de los productos de las partículas obtenidas por estos procedimientos de síntesis son cada uno de aproximadamente 100 mg/20 ml de aceite.

40

Ejemplo 2

Mediciones TEM y DLS

- 45 **[0076]** Las nanopartículas de sílice huecas, tal como se han sintetizado en el Ejemplo 1, se sometieron a mediciones con TEM y los resultados se muestran en la Figura 1. Se puede observar que las nanopartículas de sílice huecas de dos capas, donde cada capa define un espacio hueco cerrado, se prepararon con éxito. Los tamaños de partícula y las desviaciones estándar de los mismos se muestran en la Tabla 1.

50

Tabla 1

Muestra	Tamaño ± DE (nm)
10	Segundo: 64,0 ± 6,0
	Primero: 28,1 ± 4,3
11	Segundo: 90,0 ± 11,1
	Primero: 48,4 ± 10,5
18 (control)	Segundo: 86,24 ± 9,3
	Primero: 38,82 ± 6,0
15	Segundo: 83,74 ± 8,4
	Primero: 38,85 ± 8,1
19 (control)	Segundo: 97,20 ± 11,4
	Primero: 36,00 ± 6,4
17	Segundo: 94,32 ± 6,3
	Primero: 42,48 ± 4,2

[0077] Los resultados de TEM sugieren que PEGs-ASNasa@PEG-HSN 10, 11, 15 y 17 tienen un tamaño de partícula promedio de alrededor de 60 a 95 nm y pequeñas desviaciones estándar del tamaño de partícula, que reflejan la uniformidad de las partículas y la superioridad de los procedimientos de preparación descritos en la presente invención.

5 [0078] El tamaño de partícula de las nanopartículas de sílice huecas medido mediante dispersión de luz dinámica (DLS) en diferentes entornos de solución se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

10

Muestra	Solución				
	H ₂ O	DMEM+10%FBS	DMEM+20%FBS	RPMI+10%FBS	PBS
10	83.0	72.9			81.8
11	96.8	87.0			94.4
18 (control)	95.21	79.4	63.2	66.8	95.9
15	105	100.7	80.3	86.2	106.1
19 (control)	119.7	102.6	92.7	109.9	114.4

40

Muestra	Solución				
	H ₂ O	DMEM+10%FBS	DMEM+20%FBS	RPMI+10%FBS	PBS
17	258.9	223.6	167.9	239.1	250.4

50

Unidad: nm

[0079] Los resultados de DLS muestran que PEG-HSN 18 y 19 y PEGs-ASNasa@PEG-HSN 10, 11 y 15 se dispersaron bien dentro del intervalo de aproximadamente 60 a aproximadamente 110 nm en un medio que contiene suero, lo que se considera muy adecuado para la absorción celular. Aunque se produce un aumento del tamaño de partícula de PEGs-ASNasa@PEG-HSN 17, que puede deberse al alto potencial zeta de la partícula resultante de la modificación de la superficie, el tamaño sigue siendo aceptable para la absorción celular.

60 Isotermas de sorción de nitrógeno y áreas de superficie BET

[0080] La Figura 2 muestra isotermas de sorción de nitrógeno de PEGs-ASNasa@ PEG-HSN 15 y PEGs-ASNasa@ PEG-HSN 17. En base a las isotermas, se revela que el área de superficie BET de PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 y PEGs-ASNasa@PEG-HSN 17 fueron 117,40 m²/g y 120,00 m²/g, respectivamente.

65 **Ejemplo 3**

[0081] Se obtiene la actividad enzimática de ASNasas libres y ASNasas encapsuladas en las nanopartículas de sílice para evaluar el potencial tratamiento del efecto de las nanopartículas de sílice, con la metodología descrita anteriormente.

5 **[0082]** La figura 3(A) muestra los resultados de la actividad enzimática de la ASNasa libre y PEGs-ASNasa. Se observa que las ASNasas libres y modificadas muestran una actividad enzimática similar, lo que implica que la modificación de la superficie de la ASNasa para aumentar la solubilidad en agua y la probabilidad de conjugación entre las PEG-ASNasa y las fuentes de sílice no influirían en la actividad de la ASNasa.

10 **[0083]** La figura 3 (B) muestra los resultados de la actividad enzimática de PEGs-ASNasa, PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 y PEGs-ASNasa@PEG-HSN 17. Se observa que la actividad enzimática de PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 y PEGs-ASNasa@PEG-HSN 17 fue similar a la de la ASNasa libre, ya sea medida en 10 minutos o 1 hora. Estos resultados revelan que la actividad de ASNasa encapsulada en HSN no se modificó significativamente, lo que garantiza la validez de las nanopartículas de sílice en la expresión de la actividad enzimática en los tratamientos.

15

Ejemplo 4

Ensayo de tolerancia a la tripsina

20 **[0084]** Tal como se conoce en la técnica, uno de los efectos secundarios del tratamiento con ASNasa es la pancreatitis aguda, que provoca la liberación de tripsina del páncreas y da lugar a una concentración elevada de tripsina en la sangre. En consecuencia, las ASNasas se someten más fácilmente a la degradación por la tripsina. Para determinar el efecto protector de las nanopartículas de sílice descritas en este documento sobre la ASNasa encapsulada en las mismas de la degradación por tripsina, las ASNasas libres o ASNasas encapsuladas en nanopartículas de sílice se sometieron a digestión con tripsina, y se determinó la actividad de ASNasa restante se determinó mediante un ensayo de actividad de ASNasa. Por lo tanto, se realizan pruebas de tolerancia a la tripsina para evaluar el efecto protector de las nanopartículas de sílice sobre las ASNasas encapsuladas en las mismas.

25

30 **[0085]** Las ASNasas libres y las ASNasas encapsuladas en PEG-HSN, todas conteniendo 0,8 U de ASNasas, se centrifugaron y se dispersaron en 200 µl de tampón Tris (0,05 M, pH 8,6), se mezclaron con tripsina (1,5 U por 40 µl en solución tampón de NaH₂PO₄), y se sometieron a digestión con tripsina a 37 °C durante 2 horas. Después de la digestión, se determinó la actividad de ASNasa en las muestras mediante un ensayo de actividad de ASNasa.

30

35 **[0086]** Los siguientes grupos se sometieron al ensayo de tolerancia a tripsina: ASNasa libre, ASNasa modificada con PEG-trimetoxisilano ("PEG-ASNasa") encapsulada en la PEG-HSN de doble capa sin modificación con TA ("PEG-ASNasa@PEG-HSN 15"), ASNasa modificada con PEG-trimetoxisilano encapsulada en la PEG-HSN de doble capa con modificación TA ("PEGs-ASNasa@PEG-HSN 17"), en donde todos los grupos contienen 0,8 U de ASNasa. Se determinó la actividad relativa de ASNasa de cada grupo en comparación con el grupo control (ASNasas libres sin ser digeridas por tripsina). Los resultados mostraron que tanto PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 como 17 eran capaces de alcanzar aproximadamente el 100% de actividad relativa en 6 horas. Por el contrario, después de la digestión, las ASNasas libres solo pueden alcanzar un 10% de actividad relativa de ASNasa en 8 horas. Dado lo anterior, las ASNasas encapsuladas en las nanopartículas de sílice de doble capa fueron más resistentes a la digestión con tripsina en comparación con las ASNasas libres. Los resultados revelaron que las nanopartículas de sílice descritas en el presente documento pueden proporcionar un excelente efecto protector sobre las proteínas/enzimas encapsuladas en las mismas de la degradación por la proteasa.

35

40

45

Ejemplo 5

50 **[0087]** Tal como se conoce en la técnica, el agotamiento de L-asparagina provoca la inhibición de síntesis de proteínas en las células tumorales (tales como células leucémicas agudas), lo que da lugar a la muerte celular. Se analizó la citotoxicidad de la ASNasa encapsulada en las nanopartículas de sílice mediante los siguientes experimentos:

50

Cultivo de células

55 **[0088]** Se incubaron células MOLT-4 y Jurkat (ambas son una línea celular en suspensión de leucemia linfoblástica aguda humana, obtenida del Bioresource Collection and Research Center (Taiwán)), 4T1 (línea celular de cáncer de glándula mamaria de ratón, este tumor es un cáncer de mama humano en estadio IV animal; obtenido como donación de otro laboratorio) y A549 (línea celular de cáncer de pulmón humano, obtenida como donación de otro laboratorio) en medio RPMI-1640 con suero fetal bovino (FBS) al 10%, se incubó BxPc-3 (línea celular de cáncer de páncreas) obtenida del Bioresource Collection and Research Center (Taiwán) en medio RPMI-1640 con HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM y suero bovino fetal (FBS) al 10% a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% humidificada, y todos los medios mencionados anteriormente contenían 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Cuando las células en suspensión alcanzaron aproximadamente 60-70% de confluencia, fueron recogidas para subcultivo.

60

65 Ensayo de citotoxicidad (mediante ensayo WST-1)

[0089] En este experimento, se trataron las líneas celulares leucémicas (MOLT-4 y Jurkat), la línea celular de cáncer de mama (4T1) y la línea celular de páncreas (BxPC-3) con ASNasa libre, PEG-ASNasa@PEG-HSN 15 y 17 que contenían 0,4, 0,4, 0,2 o 1 U/ml de ASNasa, respectivamente. Las PEG-HSN 18 y 19 se trataron como grupos de control (grupos de control de PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 y 17 sin ASNasa). En particular, 4×10^5 células por pocillo de células leucémicas agudas (MOLT-4 y Jurkat) y 2×10^4 células por pocillo de la línea celular 4T1 se sembraron en una placa de 24 pocillos y se trataron con los grupos mencionados anteriormente durante 24 o 72 horas. Se sembraron 4×10^3 células por pocillo de la línea celular pancreática (BxPc-3) en una placa de 96 pocillos y se trataron con los grupos mencionados anteriormente durante 48 horas. A continuación, las células se incubaron con el reactivo WST-1 (Clontech) a 37 °C durante 30 minutos, y se midió la absorbancia a 450 nm para detectar el colorante amarillo de formazán producido por las células vivas mediante un lector de microplacas (Bio-Red, modelo 680). Las células sin ningún tratamiento se usaron como control de viabilidad celular del 100%. Tal como se muestra en la Figura 4, PEG-ASNasa@PEG-HSN 15 y 17 exhibieron una citotoxicidad excelente contra la línea celular leucémica MOLT-4 comparable a la ASNasa libre. Los resultados mostraron que encapsular la ASNasa por las nanopartículas de sílice no influyó significativamente en la bioactividad de la misma. Además, dado que tanto PEG-HSN 18 como 19 no exhibieron citotoxicidad obvia, se cree que la citotoxicidad de PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 y 17 se atribuyó únicamente a ASNasa. Además de la línea celular leucémica MOLT-4, también realizamos un ensayo de citotoxicidad de la línea celular leucémica Jurkat, la línea celular de cáncer de mama 4T1 y la línea celular de cáncer de páncreas BxPc-3. Los resultados mostraron que tanto PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 como 17 exhibieron citotoxicidad contra estas líneas celulares de cáncer.

Ejemplo 6

Ensayos de absorción celular

[0090] La eficacia de la absorción celular de las nanopartículas de sílice por células MOLT-4 y A549 se determinó mediante una citometría de flujo FACS Calibur (BD Biosciences). El colorante de fluoresceína emisor de rojo (rodamina-B-isotiocianato; RITC) conjugado con la ASNasa en las nanopartículas de sílice sirvió como marcador para determinar cuantitativamente la eficacia de absorción celular de la partícula. La condición de cultivo celular de las células MOLT-4 y A549 fue la misma que la descrita en el Ejemplo 5. En particular, se sembraron 1×10^6 células MOLT-4 o 2×10^5 células A549 por pocillo en placas de 6 pocillos y se incubaron con PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 y 17 (0,9 mg de partículas/ml) en medio que contenía suero durante 24 horas. Las células se lavaron a continuación dos veces con PBS, se recogieron, se centrifugaron y se sometieron a un análisis de citometría de flujo para detectar la señal de fluorescencia de las mismas. La relación de absorción celular se calculó mediante la relación de las células con señal de fluorescencia y las células totales; la intensidad de fluorescencia media (MFI) fue el valor medio de la intensidad de fluorescencia de las células que tenían señal de fluorescencia. Tal como se muestra en la Figura 5 (A), tanto PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 como 17 exhibieron una buena eficacia de absorción celular en la línea celular leucémica MOLT-4, y la eficacia de absorción celular de las de nanopartículas de sílice modificadas con TA-trimetoxisilano PEGs-ASNasa@PEG-HSN 17 fue mayor. Sin limitarse a la teoría, las PEGs-ASNasa@PEG-HSN 17 más cargadas positivamente provocado por la modificación de TA hicieron que las nanopartículas de sílice fueran más fácilmente absorbidas por las células. Los resultados también mostraron que se pueden usar diferentes modificaciones realizadas sobre las nanopartículas de sílice para ajustar sus propiedades, tales como la eficacia de absorción celular. Tal como se muestra en la Figura 5 (B), la intensidad de fluorescencia media (MFI) de los dos grupos fue similar. Además de la línea celular leucémica MOLT-4, también se demostró que PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 y 17 podían ser absorbidos por la línea celular de cáncer de pulmón A549 (una línea celular de tumor sólido).

Ejemplo 7

Ensayos de apoptosis

[0091] Para investigar el efecto del tratamiento de las ASNasas a nivel de apoptosis, se sembraron 1×10^6 células MOLT-4 (la condición de cultivo celular de células MOLT-4 era la misma que la descrita en el Ejemplo 2) en una placa de 6 pocillos y se trataron con ASNasa libre, PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 y 17 que contenían 0,4 U/mL de ASNasa, y PEG-HSN 18 y 19 (grupos de control de PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 y 17, sin encapsular ASNasas) a 37 °C en medio que contenía suero durante 24 horas. Las células se recogieron por centrifugación (400 g, 10 minutos, a 4 °C), se lavaron con PBS, se tiñeron con diclorhidrato de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 1 µg/ml) durante 10 minutos, se lavaron con PBS nuevamente, y se resuspendieron en 1 ml de PBS en una placa de 6 pocillos. Los cambios en la morfología nuclear y los cuerpos apoptóticos (causados por la fragmentación del ADN) de las células se observaron bajo un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus, aumento de 40X, lámpara de mercurio para la excitación UV). Tal como se muestra en la Figura 6, las células MOLT-4 tratadas con ASNasa libre (d) y PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 y 17 (e) y (f) exhibieron signos apoptóticos. Los resultados sugieren que las ASNasas encapsuladas en las nanopartículas de sílice descritas en el presente documento exhibieron eficacia para inducir una apoptosis similar a las ASNasas libres.

Ejemplo 8

Depuración de nanopartículas de sílice de la circulación

5 [0092] Se usó PEGs-ASNasa@PEG-HSN (que tiene RITC conjugado con ASNasa) para investigar su velocidad de
depuración de la circulación en ratones. En particular, ratones desnudos BALB/c con tumor 4T1 (8 semanas de edad)
fueron inyectados por vía intravenosa con PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 y 17 (en PBS, dosis de 30 mg/ml). Los vasos
10 sanguíneos en los oídos de los ratones se observaron bajo microscopía de dos fotones, y se obtuvieron imágenes en
tiempo real a los 10, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección. Tal como se muestra en la Figura 7, la señal de
PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 decayó muy lentamente (incluso después de 120 minutos desde la inyección la señal
aún podía detectarse) (fila superior de la Figura 7); en cambio, la señal de fluorescencia de PEGs-ASNasa@PEG-
15 HSN 17 fue mucho más débil incluso en los mismos puntos de tiempo (fila inferior de la figura 7). Un mayor tiempo de
circulación indica una vida media más larga en la sangre. Los resultados sugieren que más PEGs-ASNasa@PEG-
HSN 17 cargados más positivamente (con modificación de TA-trimetoxisilano) se depura más fácilmente de la
sangre. Se puede inferir que las modificaciones, tal como la modificación de TA, podrían usarse para ajustar la vida
media de las nanopartículas de sílice en la sangre. Además, a pesar del diferente tiempo de circulación en la sangre,
ambos PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 y 17 se dispersaron bien y no formaron agregados obvios en la sangre, lo que
sugiere que las nanopartículas de sílice tienen buena estabilidad *in vivo*.

Ejemplo 9

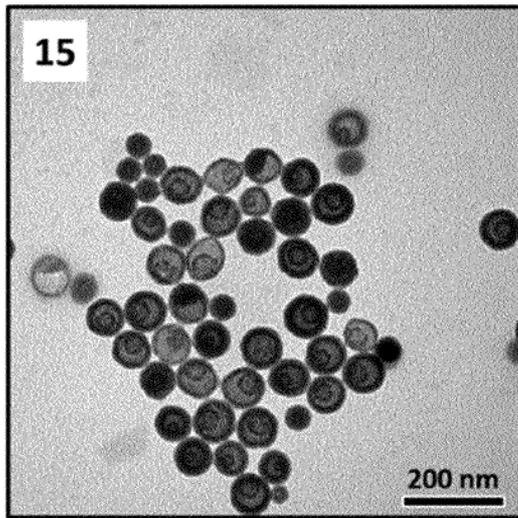
Ensayos de biodistribución

20 [0093] Se inyectó por vía intravenosa a ratones desnudos BALB/c con tumor (9 semanas de edad) PEGs-
ASNasa@PEG-HSN 15 y 17 (en PBS, dosis de 30 mg/ml). La biodistribución de las nanopartículas de sílice en los
órganos principales (incluidos el corazón, los pulmones, el bazo, el hígado y los riñones), el tumor, la orina y la sangre
se observó bajo el sistema de imágenes por fluorescencia IVIS (Lumina), después de 24 horas de la inyección. Tal
25 como se muestra en la Figura 8, PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 (la fila superior) y 17 (la fila inferior) quedaron
atrapados principalmente en el tumor y el hígado, así como en el hígado, respectivamente; ambas nanopartículas
podían encontrarse en el riñón; no se observó señal significativa en orina y sangre. Los resultados mostraron que
PEGs-ASNasa@PEG-HSN 15 podía quedar más fácilmente atrapado en el tejido tumoral y proporcionar una forma
efectiva de suministrar ingredientes bioactivos al tumor; los resultados también sugieren que PEGs-ASNasa@PEG-
30 HSN 15 produjo excelentes efectos mejorados de permeabilidad y retención (EPR) en las nanopartículas para
mantenerlas acumuladas en el tumor. Se cree que la baja acumulación en el tumor de PEGs-ASNasa@PEG-HSN 17
era resultado de su rápida depuración de la circulación. Los resultados sugieren que podrían usarse modificaciones
(como una modificación de TA) para ajustar el perfil de biodistribución de las nanopartículas de sílice.

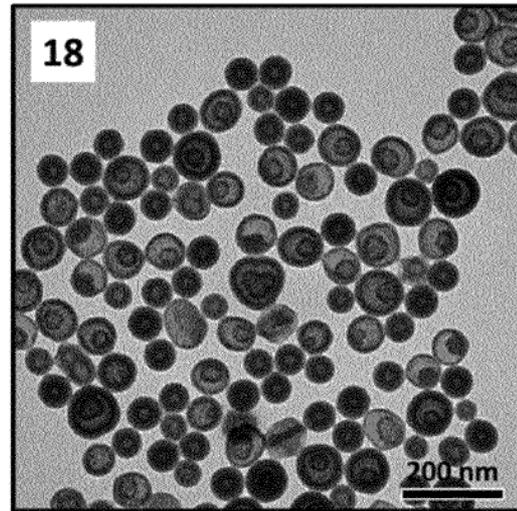
REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula de sílice, que comprende
 5 cubiertas de sílice con múltiples capas, en las que cada capa tiene mesoporos y encierra un espacio hueco cerrado, opcionalmente el espacio hueco cerrado más interno tiene un núcleo de sílice sólido; y uno o más ingredientes bioactivos encapsulados dentro del espacio, en la que el ingrediente bioactivo tiene un tamaño mayor que el tamaño de poro de la cubierta que lo encapsula, y en la que el ingrediente bioactivo en cada espacio puede ser el mismo o diferente.
- 10 2. Nanopartícula de sílice, según la reivindicación 1, que tiene un tamaño de partícula que varía de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 500 nm.
3. Nanopartícula de sílice, según la reivindicación 1, que tiene un tamaño de partícula que varía de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 150 nm.
- 15 4. Nanopartícula de sílice según la reivindicación 1, que tiene dos o más cubiertas.
5. Nanopartícula de sílice, según la reivindicación 1, en la que cada cubierta tiene residuos de organosilicato.
- 20 6. Nanopartícula de sílice, según la reivindicación 1, en la que el tamaño de poro de la cubierta es inferior a 5 nm.
7. Nanopartícula de sílice, según la reivindicación 1, en la que cada capa tiene independientemente un grosor de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 15 nm.
- 25 8. Nanopartícula de sílice, según la reivindicación 1, en la que el tamaño del espacio es ajustable.
9. Nanopartícula de sílice, según la reivindicación 1, en la que el tamaño del espacio entre las cubiertas varía de 2 nm a 75 nm.
- 30 10. Nanopartícula de sílice, según la reivindicación 1, en la que el ingrediente bioactivo con o sin modificación de la superficie puede dispersarse o disolverse en una fase acuosa.
11. Nanopartícula de sílice, según la reivindicación 1, en la que el ingrediente bioactivo es una enzima, un fármaco proteico, un anticuerpo, una vacuna, un antibiótico o un fármaco de nucleótido.
- 35 12. Nanopartícula de sílice, según la reivindicación 11, en la que la enzima es agalsidasa, imiglucerasa, taliglucerasa, velaglucerasa, alglucerasa, sebelipasa, laronidasa, idursulfasa, elosulfase, galsulfasa, alglucosidasa, asparaginasa, glutaminasa, arginina deiminasa, arginasa, metioninasa, cisteinasa, homocisteinasa, fenilalanina hidroxilasa, fenilalanina amoniaco liasa, urato oxidasa, catalasa, peroxidasa de rábano picante, superóxido dismutasa o glutatión peroxidasa.
- 40 13. Nanopartícula de sílice, según la reivindicación 1, en la que un poli(etilenglicol) (PEG) o un ligando dirigido al tumor están opcionalmente unidos a la superficie externa de cada cubierta.
- 45 14. Procedimiento para preparar una nanopartícula de sílice, que comprende las etapas de:
 (a) cualquiera de las etapas (a-1) y (a-2):
 (a-1) proporcionar una fase oleosa, un tensioactivo, una fuente de alcoxisilano y/o silicato, una fase acuosa que contiene opcionalmente uno o más ingredientes bioactivos y opcionalmente un cotensioactivo para formar una microemulsión de agua en aceite (W/O); y
 50 (a-2) proporcionar una fase oleosa, un tensioactivo, una fuente de alcoxisilano y/o silicato y opcionalmente un cotensioactivo para formar una mezcla;
 (b) agregar un reactivo iniciador a la microemulsión W/O de (a-1), o agregar un reactivo iniciador acuoso a la mezcla de (a-2) para formar una microemulsión W/O, y formar un nanonúcleo de sílice que une el ingrediente bioactivo en la superficie del mismo y/o encapsula el ingrediente bioactivo en el mismo;
 55 (c) proporcionar una fase acuosa que contiene un ingrediente bioactivo;
 (d) introducir una fuente de alcoxisilano y/o silicato para formar una capa de sílice adicional que encierra el nanonúcleo de sílice de (b);
 (e) opcionalmente repetir las etapas (c) y (d) una o más veces;
 (f) realizar una condición de desestabilización para desestabilizar la microemulsión W/O y recoger la partícula resultante así formada de la microemulsión; y
 60 (g) dispersar la partícula recogida en la etapa (f) en una fase de lavado acuosa para obtener la nanopartícula de sílice; en el que la fuente de alcoxisilano y/o silicato en las etapas (d) y (e) y opcionalmente en la etapa (e) comprenden al menos un organoalcoxisilano, y
 en el que el tamaño de los ingredientes bioactivos es mayor que el tamaño de poro de la cubierta de sílice que los
 65 encapsula.

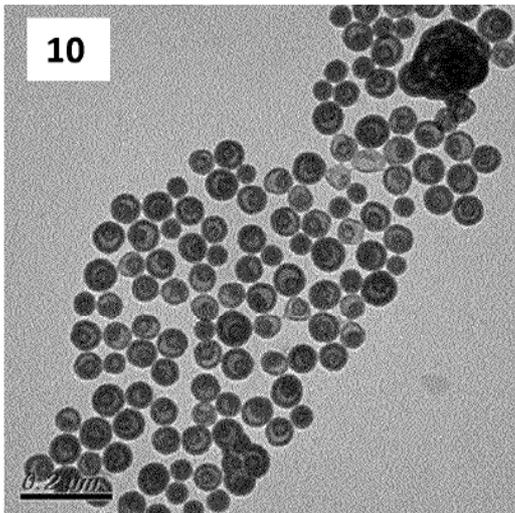
15. Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que el orden de introducción de la fase acuosa que contiene opcionalmente uno o más ingredientes bioactivos y la fuente de alcoxisilano y/o silicato en la etapa (a-1) puede invertirse o realizarse simultáneamente.
- 5 16. Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que la fase oleosa es dodecano, decano, octano, hexano, ciclohexano, benceno, tolueno, xileno, aceite de triglicéridos o un aceite vegetal.
17. Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que el tensioactivo es un tensioactivo no iónico.
- 10 18. Procedimiento, según la reivindicación 17, en el que el tensioactivo no iónico es poli(oxietileno)nonilfenil éter, éster alquílico de polioxietilenglicol sorbitano, polietilenglicol alquil éter, glucósido alquil éter, polietilenglicol octilfenil éter, polietilenglicol alquilfenil éter, éster alquílico de glicerol, polipropilenglicol alquil éteres, copolímeros de bloque, poloxámeros, cocamida MEA, cocamida DEA, óxido de laurildimetilamina o seboamina polietoxilada.
- 15 19. Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que las fuentes de alcoxisilano y/o silicato son cada una independientemente iguales o diferentes.
20. Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que la fuente de alcoxisilano y/o silicato comprende tetraetoxisilano (TEOS), tetrametoxisilano (TMOS), silicato de sodio o una mezcla de los mismos.
- 20 21. Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que el organoalcoxisilano es 2-[metoxi(polietileno)propil]-trimetoxisilano (PEG-trimetoxisilano), 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS), propil trietoxi silano, butil trimetoxi silano, octil trimetoxi silano, difenil dietoxi silano, n-octil trietoxi silano, mercapto propil trimetoxi silano, clorometil trimetoxi silano, isobutil trietoxi silano, 3-aminopropil trietoxisilano, etil trimetoxi estireno silano, metil trietoxisilano, feniltriethoxi silano (PTEOS), feniltrimetoxi silano (PTMOS), metiltrimetoxi silano (MTMOS), etiltriacetoxisilano (ETAS), ácido N-(trimetoxisililpropil)etilendiamina triacético (EDTA), (3-trihidroxisilil) propil metilfosfonato (THPMP), metiltriacetoxisilano (MTAS), N-[3-(trimetoxisilil) propil] etilendiamina, trimetoxisililpropil modificado (polietilenimina), (3-mercatopropil) trimetoxisilano (MPTMS), cloruro de N-[3-(trimetoxisilil)propil]-N, N, N-trimetilamonio, silano zwitteriónico o una mezcla de los mismos.
- 25 30 22. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que la fuente de alcoxisilano y/o silicato es una mezcla de TEOS y APTMS, una mezcla de THPMP, APTMS y TEOS o una mezcla de EDTAS, APTMS y TEOS.
- 35 23. Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que cuando se emplea la etapa (e), en la que el número de cubiertas de las nanopartículas de sílice se determina mediante la fuente de alcoxisilano y/o silicato, el tiempo de lavado y la temperatura para llevar a cabo el lavado.
- 40 24. Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que la fase acuosa es agua, tampón acuoso, solución acuosa de DMSO o solución alcalina acuosa o solución que contiene codisolvente.
- 45 25. Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que los ingredientes bioactivos en las etapas (a), (c) y (e) son cada uno independientemente el mismo o diferentes.
26. Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que el ingrediente bioactivo con o sin modificación de superficie puede dispersarse o disolverse en una fase acuosa.
27. Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que el ingrediente bioactivo es una enzima, un fármaco proteico, un anticuerpo, una vacuna, un antibiótico o un fármaco de nucleótido.
- 50 28. Procedimiento, según la reivindicación 27, en el que la enzima es agalsidasa, imiglucerasa, taliglucerasa, velaglucerasa, alglucerasa, sebelipasa, laronidasa, idursulfasa, elosulfasa, galsulfasa, alglucosidasa, asparaginasa, glutaminasa, arginina deiminasa, arginasa, metioninasa, cisteinasa, homocisteinasa, fenilalanina hidroxilasa, fenilalanina amoniaco liasa, urato oxidasa, catalasa, peroxidasa de rábano picante, superóxido dismutasa o glutatión peroxidasa.
- 55 29. Nanopartícula de sílice, que se prepara mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 28.



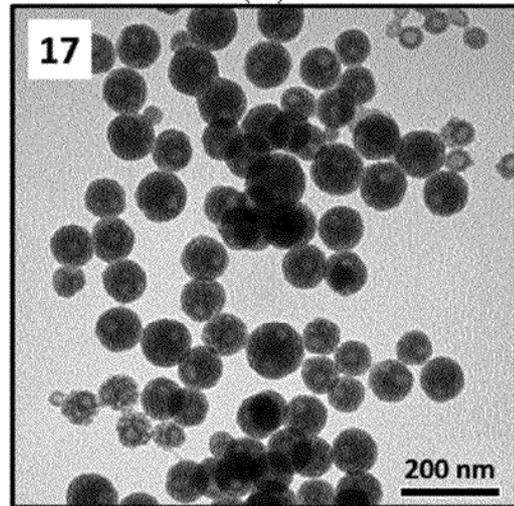
(A)



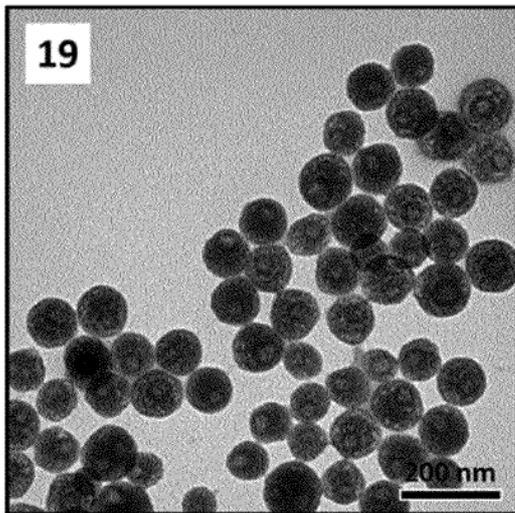
(B)



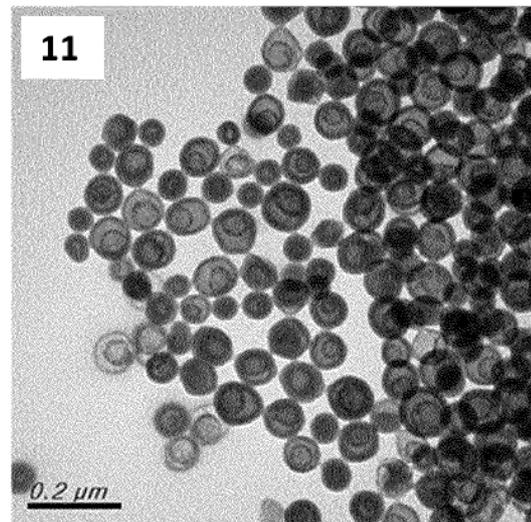
(C)



(D)



(E)



(F)

Fig. 1

15

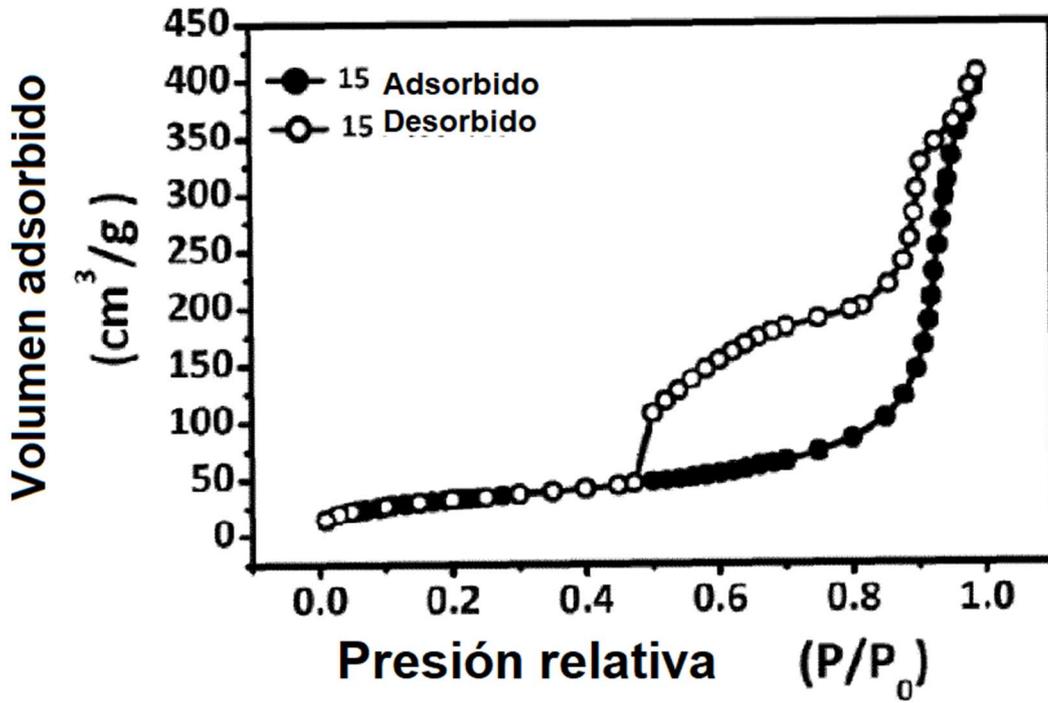


Fig. 2 (A)

17

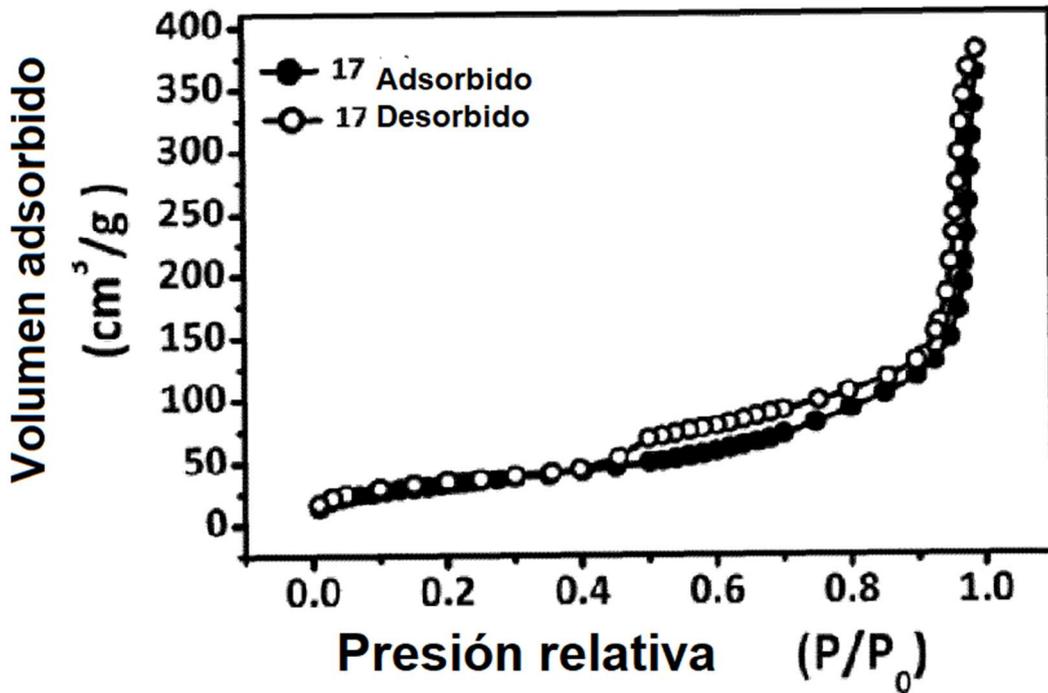


Fig. 2 (B)

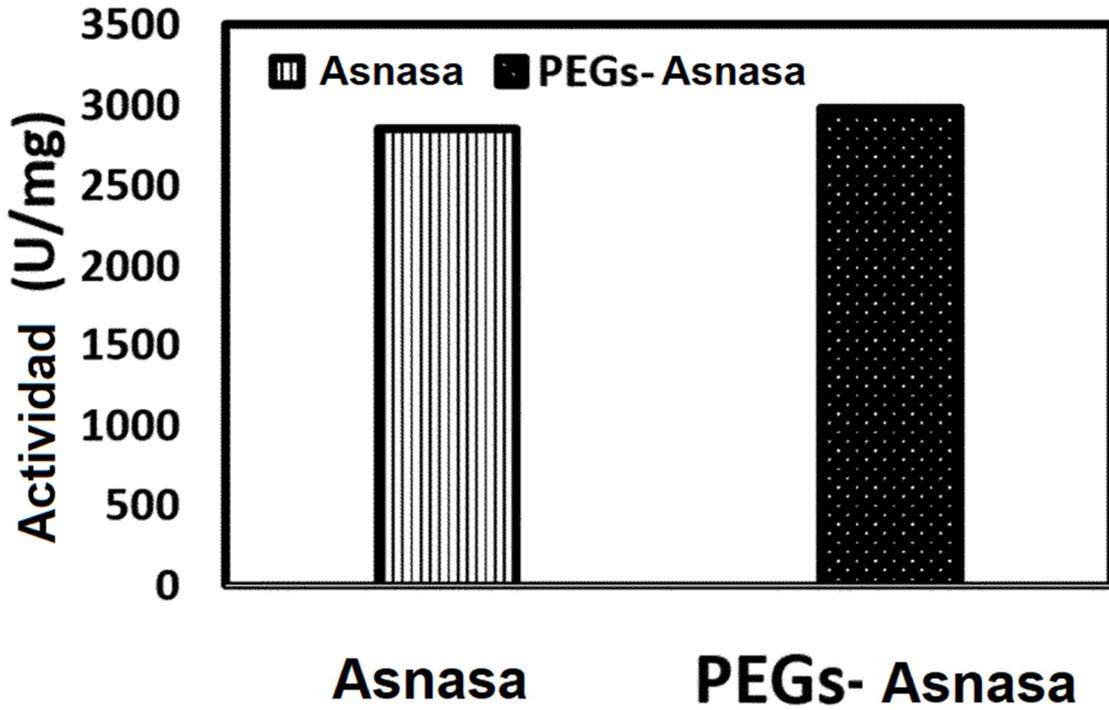


Fig. 3 (A)

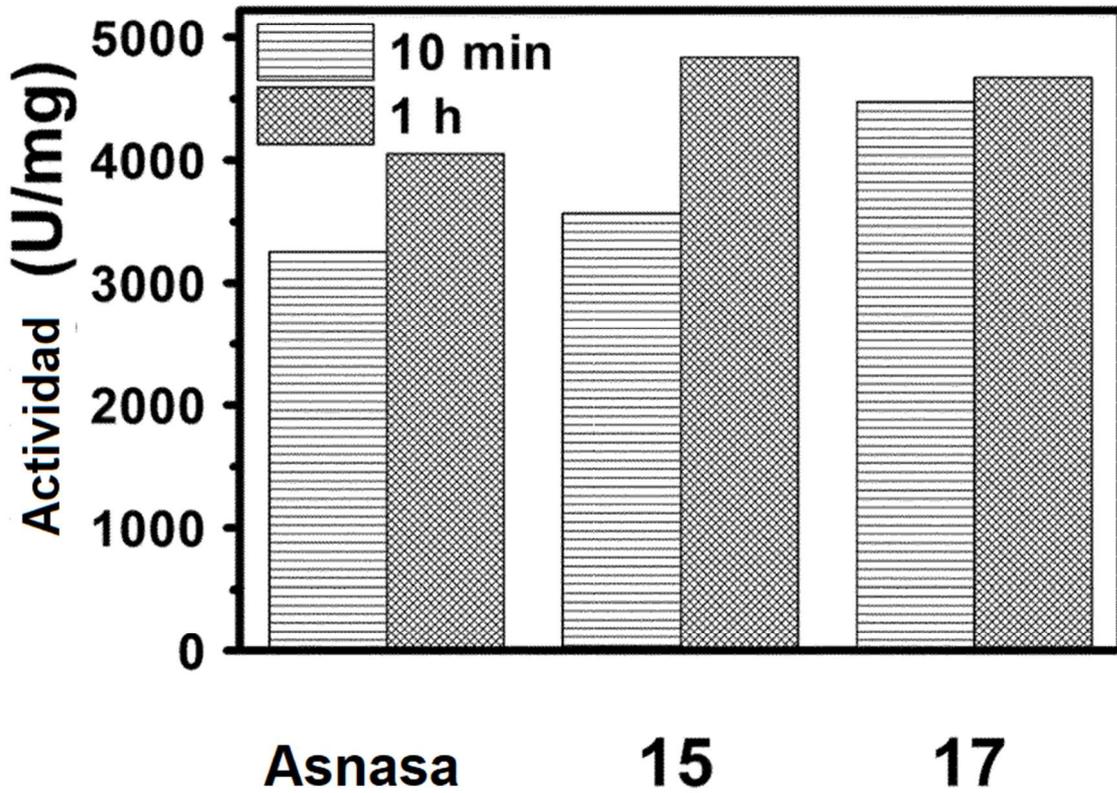


Fig. 3 (B)

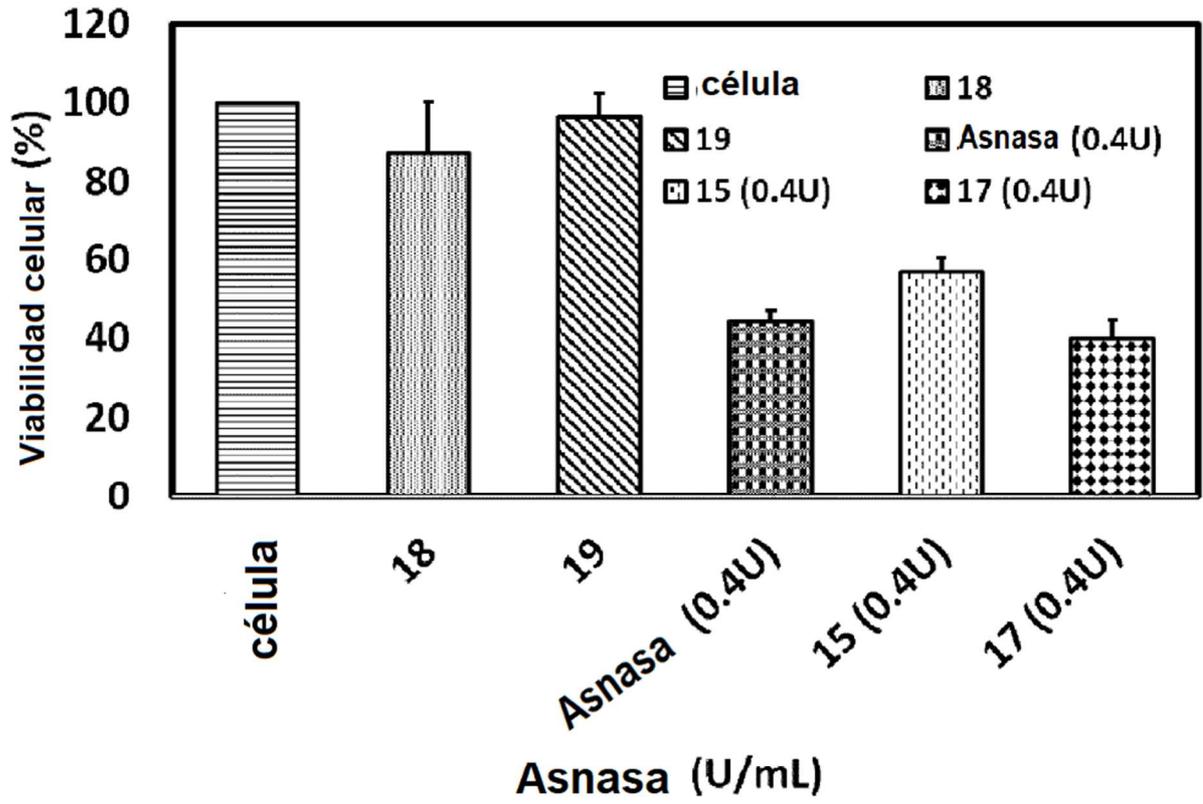


Fig. 4

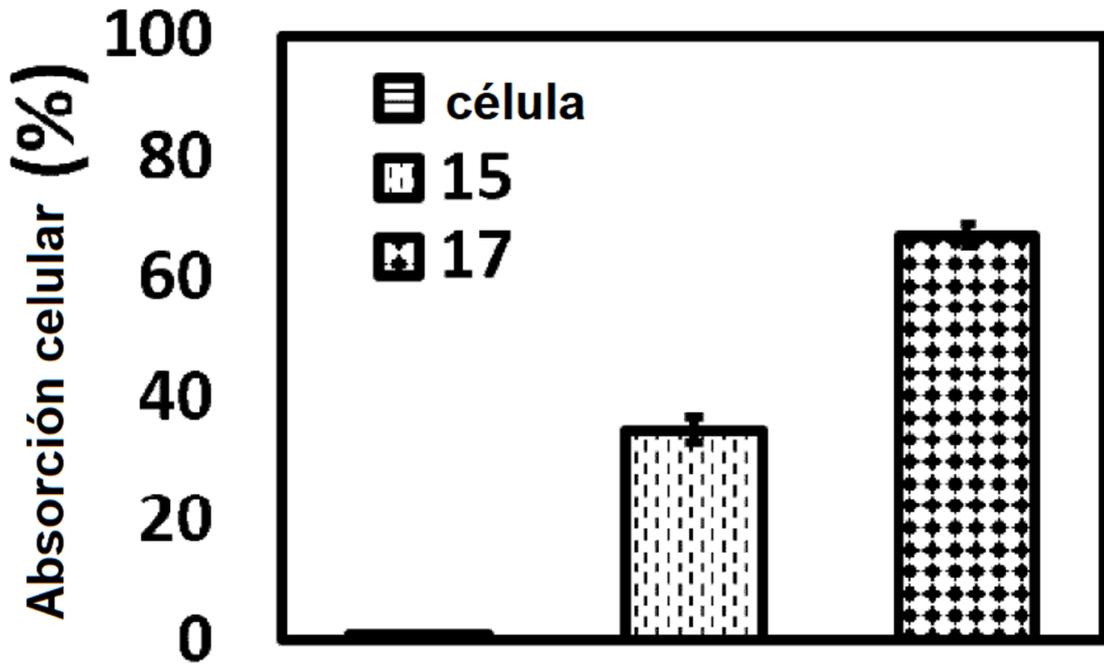


Fig. 5 (A)

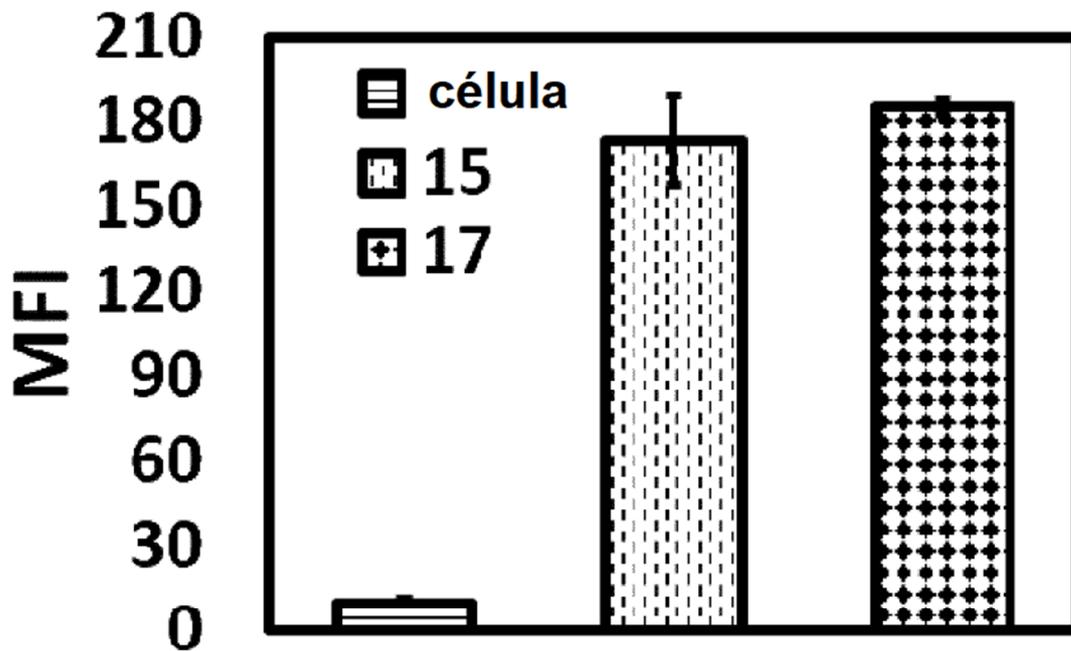


Fig. 5 (B)

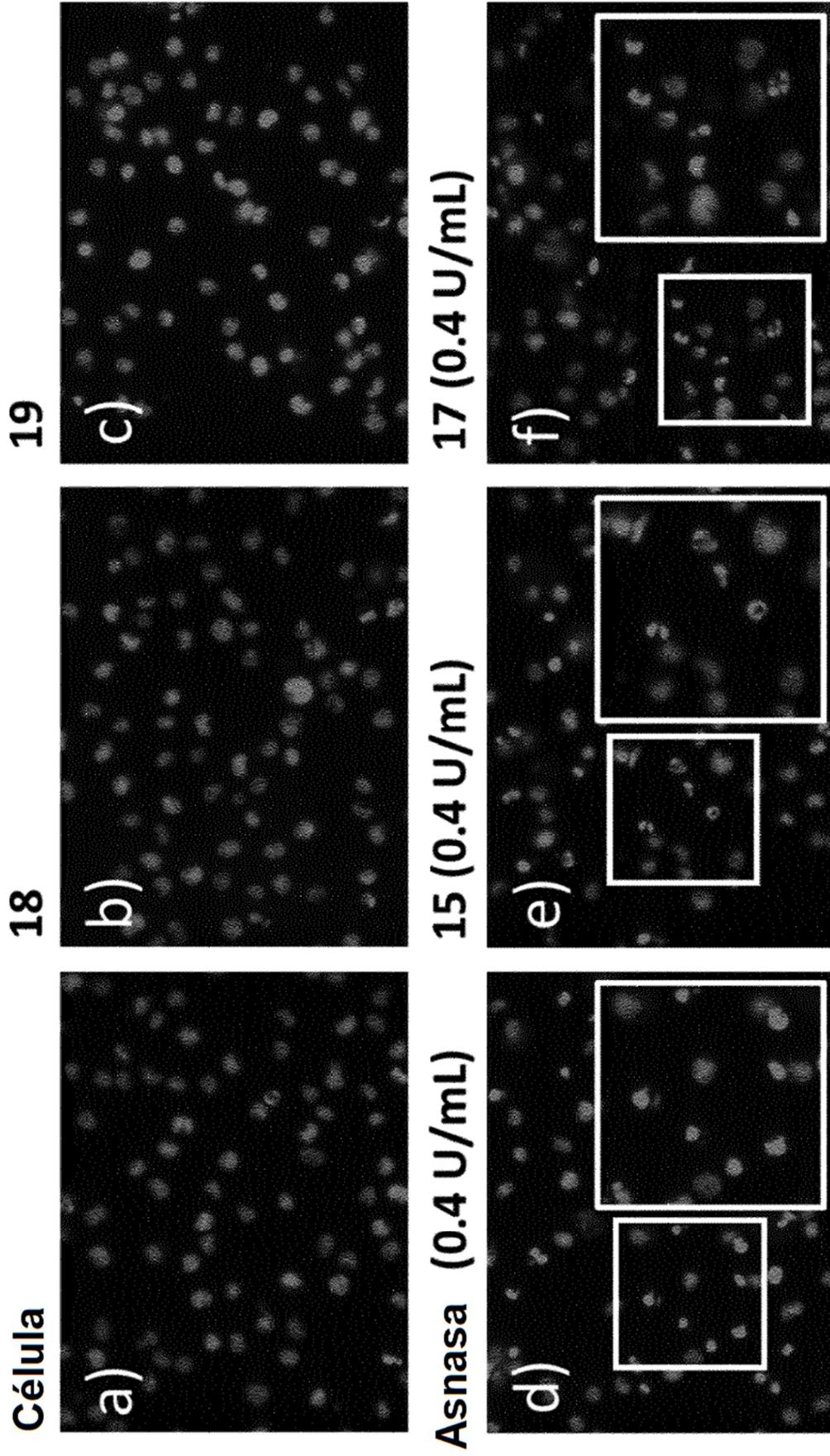


Fig. 6

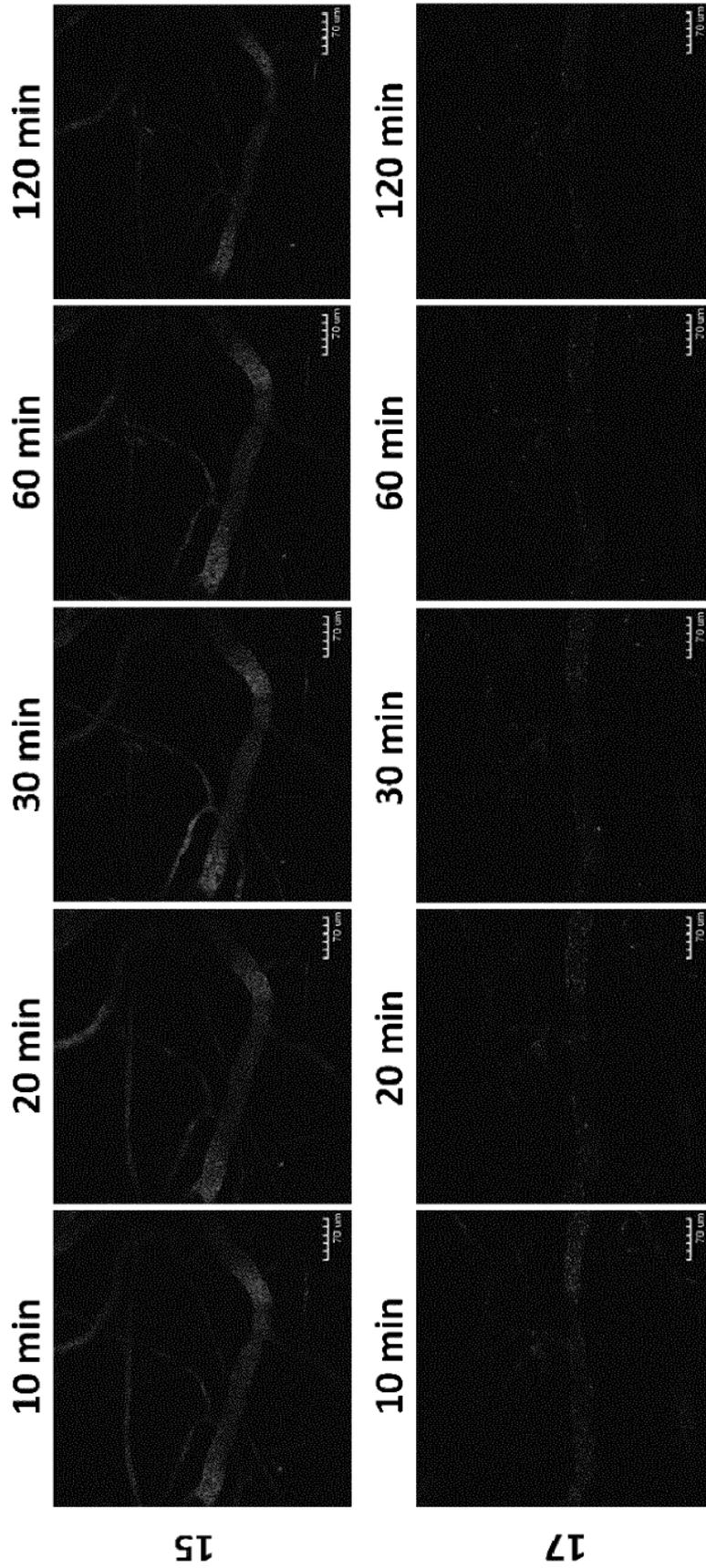


Fig. 7

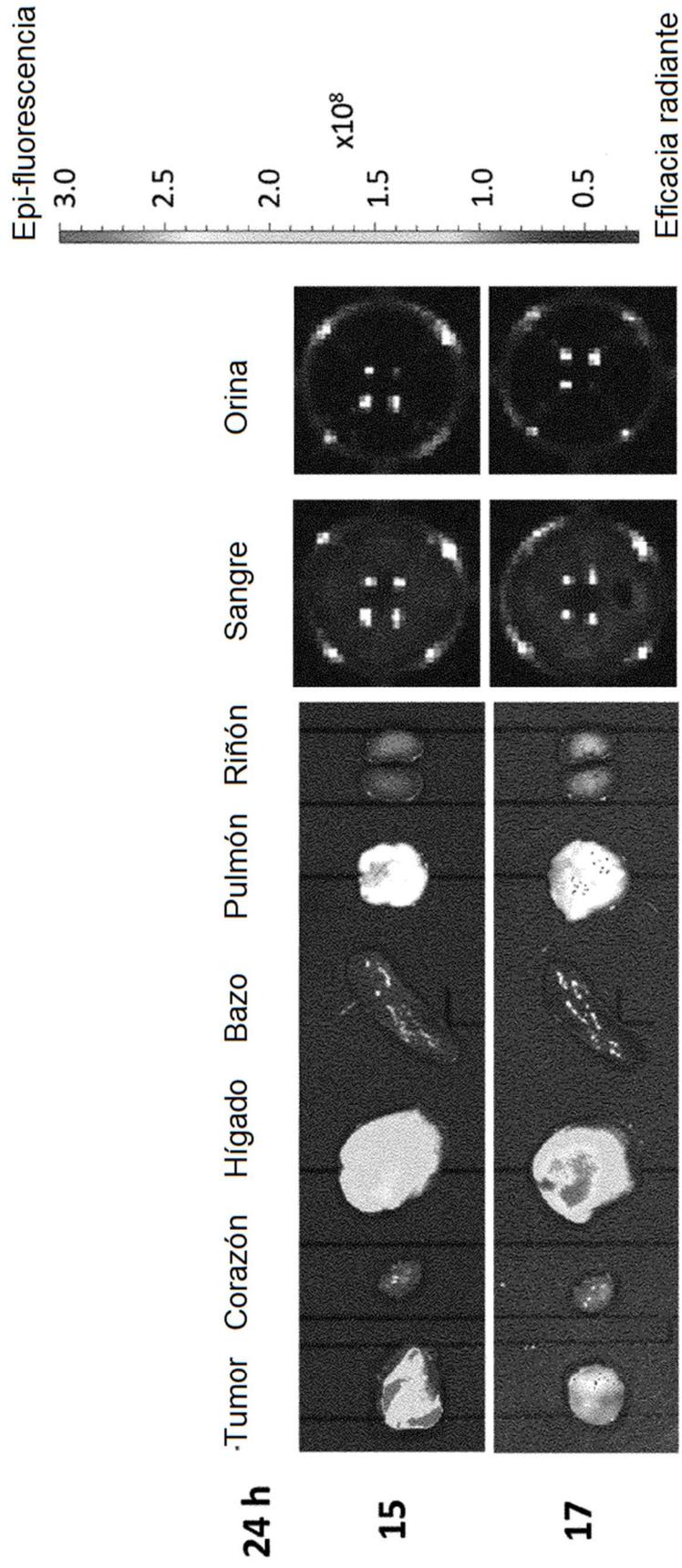


Fig. 8