

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 962 580**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2018** **PCT/AU2018/051029**
87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2019** **WO19056062**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2018** **E 18858164 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2023** **EP 3684343**

54 Título: **Suprapartículas mejoradas**

30 Prioridad:

20.09.2017 AU 2017903828
20.09.2017 AU 2017903829
11.07.2018 AU 2018902513

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2024

73 Titular/es:

THE BIONICS INSTITUTE OF AUSTRALIA (50.0%)
384-388 Albert Street
East Melbourne, Victoria 3002, AU y
THE UNIVERSITY OF MELBOURNE (50.0%)

72 Inventor/es:

WISE, ANDREW;
CARUSO, FRANK;
BJORNMALM, MATTIAS y
MA, YUTIAN

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 962 580 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

Suprapartículas mejoradas

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a composiciones que comprenden suprapartículas mejoradas cargadas con altos niveles de carga útil y métodos para su producción. Tales composiciones de suprapartículas se pueden utilizar en una variedad de aplicaciones terapéuticas.

10

Antecedentes de la invención

Las sílices mesoporosas son materiales porosos con áreas superficiales extremadamente altas que se han utilizado ampliamente para encapsular diversos compuestos y para la síntesis de plantillas de diversos materiales nanoestructurados. Si bien los materiales porosos de este tipo revisten interés en una amplia gama de aplicaciones, tales como el suministro de fármacos, siguen sin resolverse diversas cuestiones, tales como la carga eficaz y el suministro sostenido de fármacos.

15

Sería deseable proporcionar nuevos materiales de este tipo, así como nuevos métodos para fabricar tales materiales, ya que se esperaría que los nuevos materiales pudieran tener varias propiedades interesantes.

20

Por consiguiente, se requieren suprapartículas mejoradas.

Maina et al. "Mold-Templated Inorganic-Organic Hybrid Supraparticles for Codelivery of Drugs", Biomacromolecules, vol. 15, núm. 11, 2014, páginas 4146-4151 informan sobre una técnica sencilla y robusta con moldes basados en plantillas para el ensamblaje de suprapartículas mesoporosas de sílice (MS) y demuestra su potencial como vehículos de suministro conjunto tanto para el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) como para la dexametasona (DEX).

25

Wise et al. "Improved Auditory Nerve Survival with Nanoengineered Supraparticles for Neurotrophin Delivery into the Deafened Cochlea", PLoS One, vol. 11, núm. 10, 2016, artículo 0164867 informan sobre la seguridad y eficacia de un sistema de suministro de fármacos para la cóclea que utiliza suprapartículas de sílice diseñadas con nanoingeniería.

30

Wang et al. "Mesoporous Silica Supraparticles for Sustained Inner-Ear Drug Delivery", Small, vol. 10, núm. 21, 2014, páginas 4244-4248 informan sobre la preparación de suprapartículas de sílice mesoporosa (MS-SP) mediante el autoensamblaje de nanopartículas de sílice mesoporosa bajo acción de fuerza capilar en gotitas confinadas.

35

40 Compendio de la invención

La presente invención se basa en la producción inesperada de suprapartículas que pueden cargarse con altos niveles de carga útil. Los autores de la presente invención también han identificado que las suprapartículas de uso en la presente invención parecen tener tamaños de poro únicos que pueden explicar los mayores niveles de carga. Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una suprapartícula, comprendiendo dicha suprapartícula nanopartículas de sílice mesoporosa y al menos una carga útil, en donde dicha carga útil es al menos 1,5 µg de un factor neurotrófico. En un ejemplo, la suprapartícula de uso en la invención comprende al menos 5 µg de carga útil. En otro ejemplo, la suprapartícula de uso en la invención comprende al menos 8 µg de carga útil. En otro ejemplo, la suprapartícula de uso en la invención comprende al menos 10 µg de carga útil. En otro ejemplo, la suprapartícula de uso en la invención comprende de 1,5 µg a 10 µg de carga útil.

45

50

En un ejemplo, la suprapartícula de uso en la invención comprende poros que tienen un diámetro de al menos 60 nm. En otro ejemplo, la suprapartícula de uso en la invención comprende poros que tienen un diámetro de al menos 100 nm. En otro ejemplo, la suprapartícula de uso en la invención comprende poros que tienen un diámetro de al menos 60 - 200 nm. En otro ejemplo, la suprapartícula de uso en la invención comprende poros que tienen un diámetro de al menos 50-100 nm.

55

En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención tienen una estructura de poros desordenada.

60

En un ejemplo, la suprapartícula de uso en la invención está compuesta por nanopartículas de sílice mesoporosa que tienen una estructura de poro bimodal. En un ejemplo, la estructura de poro bimodal de las nanopartículas tiene un diámetro de poro grande superior a 30 nm.

65

En otro ejemplo, la carga útil de la suprapartícula de uso en la invención es una neurotrofina. En un ejemplo, el factor neurotrófico tiene un punto isoeléctrico entre 9 y 10. En otro ejemplo, la carga útil es neurotrofina-3.

En otro ejemplo, la carga útil es BDNF o neurotrofina-3.

En otro ejemplo, la suprapartícula de uso en la invención comprende al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 cargas útiles diferentes, siendo una carga útil un factor neurotrófico. En otro ejemplo, la suprapartícula de uso en la invención comprende al menos dos cargas útiles, siendo una carga útil una neurotrofina.

En otros ejemplos, una composición divulgada en el presente documento comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos 10 suprapartículas. En estos ejemplos, las suprapartículas pueden comprender diferentes cargas útiles.

En un ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se pueden producir mediante electropulverización de una composición que comprende nanopartículas de sílice mesoporosa en una solución acuosa dicatiónica. En un ejemplo, la composición que comprende nanopartículas de sílice mesoporosa también comprende un Ácido alginico o un derivado polisacárido del mismo. Por consiguiente, en un ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se pueden producir mediante electropulverización de una composición que comprende nanopartículas de sílice mesoporosa y Ácido alginico o un derivado polisacárido del mismo en una solución acuosa dicatiónica. Según la invención, las suprapartículas producidas en estos ejemplos se pueden cargar con 1,5 µg a 15 µg de una carga útil tal como una neurotrofina. En estos ejemplos, las suprapartículas de uso en la invención también se pueden someter a calcinación para eliminar el ácido alginico antes de cargarlas con una carga útil. En un ejemplo, la calcinación se realiza a alrededor de 650°C. En un ejemplo, la calcinación se realiza durante aproximadamente 6 a aproximadamente 30 horas. En un ejemplo, el Ácido alginico es la Sal sódica de ácido alginico. Por consiguiente, en un ejemplo, la presente invención abarca composiciones que comprenden suprapartículas como se definen en el presente documento, en donde las suprapartículas se fabrican mediante electropulverización de una composición que comprende nanopartículas de sílice mesoporosa y ácido alginico o un derivado polisacárido del mismo en una solución acuosa dicatiónica. En este ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se pueden someter a calcinación para eliminar el ácido alginico. En un ejemplo, la calcinación se realiza a alrededor de 650°C. En un ejemplo, la calcinación se realiza durante aproximadamente 6 a aproximadamente 30 horas.

Los autores de la presente invención también han identificado que las suprapartículas divulgadas en el presente documento pueden liberar carga útil durante un período de tiempo relativamente largo. Además, las suprapartículas como se definen en el presente documento se pueden proporcionar en diversas formulaciones para manipular la liberación de la carga útil. Por ejemplo, los autores de la presente invención han identificado que las suprapartículas como se definen en el presente documento pueden liberar su carga útil respectiva durante un período prolongado. También han identificado que las suprapartículas como se definen en el presente documento se pueden proporcionar en diversas formulaciones para acelerar o retardar la liberación de la carga útil. Por consiguiente, en un ejemplo, se puede proporcionar una suprapartícula de uso en la invención o composición de la invención como una formulación de liberación lenta. En un ejemplo, la formulación de liberación lenta es una espuma o un gel. En un ejemplo, una composición de la invención comprende un hidrogel de glucógeno. En otro ejemplo, una composición de la invención comprende Ácido alginico [(C₆H₈O₆)_N] o un derivado polisacárido del mismo. En otro ejemplo, una composición de la invención comprende sal sódica del Ácido alginico [Na(C₆H₈O₆)_N] o un derivado polisacárido del mismo.

En un ejemplo, se proporciona una composición de la invención como una formulación de liberación acelerada. En un ejemplo, la formulación de liberación acelerada es una espuma o un gel. En un ejemplo, el gel o la espuma son termorreversibles. Por ejemplo, la formulación acelerada puede comprender una suprapartícula como se define en el presente documento y un hidrogel basado en PF127.

La presente invención proporciona adicionalmente una composición como se define en el presente documento para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno. En un ejemplo, la enfermedad o trastorno es la pérdida auditiva. En un ejemplo, la pérdida auditiva se caracteriza como pérdida auditiva neurosensorial (SNHL), presbiacusia o inducida por ruido.

La presente invención proporciona adicionalmente una composición como se define en el presente documento para uso en la promoción de la supervivencia de las neuronas del ganglio espiral en el oído de un sujeto. Dicho uso puede comprender administrar la composición definida en el presente documento a un sujeto. Por ejemplo, la composición se puede administrar al oído de un sujeto.

La presente invención proporciona adicionalmente un método para fabricar una composición como se define en el presente documento que comprende electropulverizar una composición que comprende nanopartículas de sílice mesoporosa y ácido alginico en una solución acuosa dicatiónica y cargar las suprapartículas así producidas con al menos 1,5 µg de un factor neurotrófico. En un ejemplo, tal método comprende adicionalmente someter las suprapartículas a calcinación para eliminar el ácido alginico. En un ejemplo, la calcinación se realiza a alrededor de 650°C. En un ejemplo, la calcinación se realiza durante aproximadamente 6 a aproximadamente 30 horas.

Cualquier ejemplo del presente documento se considerará aplicable *mutatis mutandis* a cualquier otro ejemplo a menos que se indique específicamente lo contrario.

- 5 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que se indique específicamente lo contrario o el contexto requiera lo contrario, se considerará que la referencia a una sola etapa, composición de materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de materia abarcará una y una pluralidad (es decir, una o más) de esas etapas, composiciones de materia, grupos de etapas o grupo de composiciones de materia.

- 10 La divulgación se describe a continuación mediante los siguientes Ejemplos no limitantes y con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos adjuntos

- 15 Figura 1. Procedimiento de elaboración de MS-SP.

Figura 2. Potencial zeta de MS-SP en función de diferentes valores de pH. Las mediciones del potencial zeta se llevaron a cabo en tampón de acetato de sodio 10 mM (pH 4), tampón de fosfato 10 mM (pH 6), tampón HEPES 10 mM (pH 8) y tampón de bicarbonato de sodio 10 mM (pH 10).

- 20 Figura 3. Imágenes de microscopía confocal de MS-SP cargadas con FITC-lisozima (verde). a, b) MS-SP con diferentes aumentos. c) Interior de una MS-SP fragmentada cargada con FITC-lisozima.

- Figura 4. Carga del fármaco después de 3 días (72 h) de incubación utilizando diferentes concentraciones de carga de FITC-lisozima. a) Cantidad adsorbida de FITC-lisozima en MS-SP^{alg} no porosas (círculos negros), MS-SP^{alg} de poro pequeño (cuadrados azules) y MS-SP^{alg} (triángulos rojos) frente a la concentración de carga de FITC-lisozima. b) Cantidad adsorbida de FITC-lisozima en MS-SP no porosas (círculos negros), MS-SP de poro pequeño (cuadrados azules) y MS-SP (triángulos rojos) frente a la concentración de carga de FITC-lisozima. c) Eficacia de carga de FITC-lisozima en MS-SP^{alg} y d) MS-SP. Los datos presentados son el promedio de tres réplicas, cada una con cinco SP, y las barras de error representan la desviación típica.

- Figura 5. Carga y comportamiento de liberación de FITC-lisozima de MS-SP con diferentes diámetros. a) Cantidad de carga de FITC-lisozima, b) Perfil de liberación de FITC-lisozima *in vitro*, c) Valor de FITC-lisozima liberada en cada momento individual, d) Curva patrón de liberación de FITC-lisozima *in vitro* de MS-SP con un diámetro de 200, 550, 650, 1000 μm .

- Figura 6. Viabilidad celular de células de glioblastoma de cerebro humano (línea celular U87MG) incubadas con diferentes cantidades de MS-SP durante 48 h. El etanol añadido a las células con insertos se preparó como control negativo (citotóxico) y las células no tratadas representan 100% de viabilidad. Los datos presentados son el promedio de cuatro muestras y las barras de error representan la desviación típica.

- Figura 7. Perfil acumulativo de liberación de fármaco *in vitro*, a) Liberación *in vitro* de FITC-lisozima (0,2 mg mL⁻¹, carga de fármaco durante 3 días) MS-SP (círculo rojo) y MS-SP^{alg} (triángulo negro). Los datos presentados son el promedio de tres réplicas, cada una con diez SP, y las barras de error representan la desviación típica. b) Liberación *in vitro* FITC-lisozima (1,0 mg mL⁻¹, carga de fármaco durante 3 días) de MS-SP. El recuadro en (b) es el perfil de liberación *in vitro* de FITC-lisozima a partir de los 6 días. c) Liberación *in vitro* de BDNF de MS-SP (1,0 mg mL⁻¹, carga de fármaco durante 3 días). Se utilizó ELISA de BDNF (Abcam) para medir la concentración de BDNF.

- Figura 8. El valor de FITC-lisozima liberada en cada momento individual para MS-SP^{alg} y MS-SP (condiciones de carga: 100 μL de FITC-lisozima de 0,2 mg mL⁻¹ cargada, tiempo de carga de 3 días). Los datos presentados son el promedio de tres réplicas, cada una de las cuales utiliza diez suprapartículas, y las barras de error representan la desviación típica.

- Figura 9. El valor de FITC-lisozima liberada en cada momento individual para MS-SP (condiciones de carga: 100 μL de FITC-lisozima de 1,0 mg mL⁻¹ cargada durante 3 días). La carga de fármaco fue de $6,49 \pm 0,48$ μg por suprapartícula. Los datos presentados son el promedio de tres réplicas, cada una de las cuales utiliza diez MS-SP, y las barras de error representan la desviación típica.

- Figura 10. Valor absoluto en cada punto de tiempo individual para estudios de fármacos BDNF *in vitro* (condiciones de carga: BDNF de 1,0 mg mL⁻¹ cargado durante 3 días). Los datos presentados son el promedio de tres réplicas, cada una de las cuales utiliza un MS-SP, y las barras de error representan la desviación típica.

- Figura 11. a) Ensayo MicroBCA para la medición de BDNF de MS-SP. b) El valor de BDNF liberado en cada momento individual de uso de MS-SP. La carga de fármaco es de 6,82 μg por suprapartícula. Los datos presentados son el promedio de tres réplicas y las barras de error representan la desviación típica.

Figura 12. a) Perfil de liberación *in vitro* de FITC-lisozima de MS-SP (círculo rojos) y MS-SP^{alg} (cuadrado negro) en el sistema de hidrogel PF127. b) Valor de FITC-lisozima liberada en cada momento individual para la figura (a) (100 μ L de FITC-lisozima de 0,2 mg mL⁻¹ cargada). La carga de fármaco es de $1,89 \pm 0,08$ μ g por suprapartícula y de $1,93 \pm 0,03$ μ g por suprapartícula en MS-SP y MS-SP^{alg} respectivamente. Los datos presentados son el promedio de tres réplicas, cada una de las cuales utiliza diez suprapartículas, y las barras de error representan la desviación típica.

Figura 13. Perfil de liberación *in vitro* cuando se carga al 50% (3,65 μ g/SP).

Figura 14. Degradación de MS-SP después de 150 días de estudios de liberación de fármacos *in vitro*. a) Imagen SEM de MS-SP después de 150 días de incubación en PBS (pH 7,4) a 37°C. b, c) Imágenes SEM de la estructura superficial de MS-SP después de 150 días de incubación en PBS (pH 7,4) a 37°C.

Figura 15. Se muestra la cantidad de neurotrofina-3 (% de la cargada) y el total en μ g. Después de 1 semana de implantación, cada SP contenía ~2 μ g de neurotrofina-3 (~40%) de la cantidad cargada inicial.

Descripción detallada de la invención

Técnicas generales y definiciones seleccionadas

A menos que se defina específicamente lo contrario, se considerará que todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica (p. ej., fisiología, estudios clínicos, biología molecular, moléculas de alta superficie, electropulverización y bioquímica).

A menos que se indique lo contrario, los mecanismos utilizados en la presente divulgación son procedimientos convencionales, bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales mecanismos se describen y explican a lo largo de la bibliografía en fuentes tales como, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volúmenes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editores), y F.M. Ausubel et al. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluidas todas las actualizaciones hasta el presente), Ed Harlow and David Lane (editores) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan et al. (editores) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluidas todas las actualizaciones hasta el presente).

Como se emplean en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, los términos en singular y las formas singulares "un", "uno", "una" y "el" y "la", por ejemplo, incluyen opcionalmente referentes en plural a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una suprapartícula" incluye opcionalmente una pluralidad de suprapartículas.

Como se emplea en el presente documento, el término "aproximadamente", a menos que se indique lo contrario, se refiere a +/- 10%, más preferiblemente +/- 5%, más preferiblemente +/- 1%, del valor designado.

Se entenderá que el término "y/o", p. ej., "X y/o Y" significa "X e Y" o "X o Y" y se considerará que brinda respaldo explícito para ambos significados o para cualquiera de los significados.

A lo largo de esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Como se emplea en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a una intervención clínica diseñada para alterar el curso natural del individuo o célula que se está tratando durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables ilustrativos del tratamiento incluyen la reducción de los síntomas asociados con un trastorno que se está tratando. En el contexto del tratamiento de la pérdida auditiva, los efectos deseables del tratamiento incluyen disminuir la tasa de pérdida auditiva y mejorar o paliar la pérdida auditiva. Un individuo es "tratado" con éxito, por ejemplo, si se mitigan o eliminan uno o más síntomas asociados con el trastorno.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a al menos la cantidad mínima necesaria para efectuar una mejora mensurable de un trastorno particular. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede incluir al menos la cantidad mínima requerida para efectuar una mejora mensurable en el trastorno de un sujeto. Se puede proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz en una o más administraciones. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar según la gravedad del trastorno que se está tratando y también según el peso, la edad, el origen racial, el sexo, la salud y/o la condición física de un sujeto que se está tratando. Típicamente, la cantidad eficaz estará dentro de un rango relativamente amplio (p. ej., un rango de

"dosificación") que un médico puede determinar mediante ensayos y experimentación de rutina. La cantidad terapéuticamente eficaz se puede administrar en una dosis única o en una dosis repetida una o varias veces durante un período de tratamiento.

5 Carga útil

Las suprapartículas de uso en la invención pueden comprender varias cargas útiles siempre que la carga útil de la suprapartícula comprenda al menos 1,5 µg de un factor neurotrófico. Una "carga útil" puede ser cualquier agente útil para tratar un trastorno. Los ejemplos de agentes incluyen productos biológicos tales como

10 polinucleótidos, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, productos conjugados de anticuerpos y fármacos, proteínas, proteínas biológicamente activas, proteínas de fusión, proteínas recombinantes, péptidos, polipéptidos, polipéptidos sintetizados, vacunas, sueros terapéuticos, virus, polinucleótidos, células tales como células madre o partes de las mismas, así como moléculas pequeñas.

15 Las cargas útiles virales ilustrativas pueden comprender retrovirus, Adenovirus (AdV), Virus adenoasociado (AAV) apropiadamente modificados o una forma recombinante tal como virus adenoasociado recombinante (rAAV) y derivados de los mismos tales como AAV autocomplementario (scAAV) y AV no-integrante. Otras cargas útiles terapéuticas virales ilustrativas pueden comprender virus del herpes simple (HSV), lentivirus, vacuna y virus de la estomatitis vesicular (VSV). Por ejemplo, la carga útil terapéutica viral puede comprender

20 AAV. Se conocen varios serotipos de AAV y pueden ser cargas virales adecuadas. En un ejemplo, el AAV es el serotipo 2. En otro ejemplo, el AAV es el serotipo 1. En otros ejemplos, el AAV es el serotipo 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13.

Por ejemplo, una carga útil de molécula pequeña es un neurotransmisor. El término "neurotransmisor" se utiliza

25 en el contexto de la presente divulgación para referirse a una sustancia que transmite señales a través de una sinapsis química de una célula a otra. Generalmente, un neurotransmisor transmite señales a través de una sinapsis química desde una neurona a una célula diana, tal como otra neurona, célula muscular o célula glandular. En otro ejemplo, la carga útil de molécula pequeña es un agonista de receptores. El término "agonista" se utiliza en el contexto de la presente divulgación para referirse a una sustancia que inicia una

30 respuesta fisiológica cuando se combina con un receptor. En otro ejemplo, la carga útil de molécula pequeña es un antagonista de receptores. El término "antagonista" se utiliza en el contexto de la presente divulgación para referirse a una sustancia que interfiere o inhibe la acción fisiológica de un receptor.

Las cargas útiles de polinucleótidos ilustrativos incluyen polinucleótidos antisentido, ADN de doble hebra

35 (ADNdh) o ARN de doble hebra (ARNdh). En un ejemplo, el ADNdh o ARNdh es un aptámero. En otro ejemplo, el ARNdh es un ARNip, miARN o ARNhs.

Las cargas útiles de anticuerpos ilustrativos y sus fragmentos incluyen anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, dianticuerpos, trianticuerpos,

40 tetraanticuerpos o anticuerpos de dominio único. En un ejemplo, el anticuerpo puede ser biespecífico, un producto conjugado anticuerpo-fármaco o un anticuerpo biosimilar. Otros polipéptidos ilustrativos incluyen citocinas, quimiocinas, hormonas y factores de coagulación sanguínea. En un ejemplo, la carga útil del polipéptido es una enzima. Las enzimas ilustrativas incluyen proteasas, lipasas, asparaginidasas, lipotamasas, activadores de plasminógeno tisular, colagenasas, glutaminasas, hialuronidasas, estreptoquinasas, uricasas,

45 uroquinasas o nucleasas, tales como una nucleasa programable. En un ejemplo, la enzima puede ser una ADN metiltransferasa. En un ejemplo, la enzima puede ser una nucleasa programable destinada a introducir una modificación genética en un gen o una región reguladora del mismo. Por ejemplo, la nucleasa programable puede ser una nucleasa modificada genéticamente guiada por ARN (RGEN). En un ejemplo, la RGEN proviene de un genoma de arqueas o puede ser una versión recombinante de la misma. En otro ejemplo, la RGEN

50 puede proceder de un genoma bacteriano o es una versión recombinante de la misma. En otro ejemplo, la RGEN procede de un sistema (CRISPR)-cas (asociado a CRISPR) Tipo I. En otro ejemplo, la RGEN es de un sistema (CRISPR)-cas (asociado a CRISPR) Tipo II. En otro ejemplo, la RGEN es de un sistema (CRISPR)-cas (asociado a CRISPR) Tipo III. En un ejemplo, la nucleasa es de una RGEN de clase I o una RGEN de clase II.

En otro ejemplo, la carga útil terapéutica es un inhibidor de la metilación del ADN, un inhibidor de histona acetil

55 transferasa o un inhibidor de histona desacetilasa.

En otro ejemplo, la carga útil terapéutica puede ser un antígeno que estimula una respuesta inmunitaria en un

60 sujeto. Los antígenos ilustrativos incluyen proteínas, péptidos, polisacáridos u oligosacáridos (libres o conjugados con un portador proteico) o mezclas de los mismos. Otros antígenos ilustrativos incluyen células o partes de las mismas o una partícula viral o una parte de la misma.

En un ejemplo, la carga útil terapéutica es un agente antineoplásico.

Otras cargas útiles terapéuticas ilustrativas incluyen agonistas o antagonistas de receptores de membrana en

el oído interno. Tales cargas útiles terapéuticas pueden modular la neurotransmisión. En otro ejemplo, la carga útil terapéutica es un agente neurológico útil para tratar uno o más trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la Epilepsia o la esclerosis múltiple.

5 El término factor neurotrófico se utiliza en el contexto de la presente invención para referirse a moléculas que mejoran el potencial de crecimiento o supervivencia de cualquier célula, incluidas las del sistema auditivo. Por ejemplo, los factores neurotróficos de uso en la invención pueden mejorar el crecimiento o la supervivencia de las células del sistema auditivo o sus conexiones sinápticas ubicadas en el oído interno, el oído medio o el sistema vestibular. Las células ilustrativas incluyen neuronas ganglionares espirales (SGN), células ciliadas, incluidas células ciliadas del oído interno y externo, células gliales cocleares y células de Schwann. Las conexiones sinápticas ilustrativas incluyen conexiones entre células ciliadas, células ciliadas y SGN u otras neuronas analizadas anteriormente. Otros ejemplos incluyen cuerpos celulares neuronales en el canal de Rosenthal o sus conexiones sinápticas, neuronas o conexiones sinápticas en las regiones cocleares medias superiores y/o fibras nerviosas en la lámina espiral ósea.

15 Los factores neurotróficos ilustrativos pueden incluir agentes discutidos anteriormente con eficacia terapéutica conocida para mejorar directa o indirectamente la supervivencia de las células del sistema auditivo y/o sus conexiones sinápticas.

20 En un ejemplo, el factor neurotrófico de uso en la invención es un péptido neurotrófico. Los péptidos neurotróficos ilustrativos incluyen factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso, neurotrofina-3, neurotrofina-4, miembros de la familia del factor neurotrófico ciliar (CNTF), tales como CNTF, Factor inhibidor de la leucemia (LIF), Interleucina-6 (IL-6), Factor de maduración de la glía (GMF), factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1), Neurregulina 1, Neurregulina 2, Neurregulina 3 y Neurregulina 4, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), miembros de la familia de Factor Neurotrófico Derivado de Células Gliales (GDNF) tales como GDNF, neurturina (NRTN), artemina (ARTN) y persefina (PSPN), efrinas tales como A1, A2, A3, A4, A5, B1, B2 y B3, factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1) e interleucinas tales como IL-11.

30 En un ejemplo, el factor neurotrófico de uso en la invención se selecciona del grupo que consiste en factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso, neurotrofina-3, neurotrofina-4, factor neurotrófico ciliar (CNTF), Factor Neurotrófico Derivado de Células Gliales (GDNF) e IL-11.

Una causa de la degeneración de las neuronas del ganglio espiral es la pérdida del suministro endógeno de neurotrofinas. Así, en un ejemplo, el factor neurotrófico de uso en la invención es una neurotrofina. El término "neurotrofina" se utiliza en el contexto de la presente divulgación para referirse a proteínas que inducen la supervivencia, el desarrollo y/o la función de las neuronas y/o sus conexiones sinápticas. Las neurotrofinas ilustrativas se analizan anteriormente e incluyen BDNF, factor de crecimiento nervioso, neurotrofina-3 y neurotrofina-4. Por consiguiente, en un ejemplo, la suprapartícula comprende BDNF. En otro ejemplo, la suprapartícula comprende factor de crecimiento nervioso. En otro ejemplo, la suprapartícula comprende neurotrofina-3. En otro ejemplo, la suprapartícula comprende neurotrofina-4. En un ejemplo, las suprapartículas pueden comprender al menos dos neurotrofinas diferentes. En otros ejemplos, las suprapartículas pueden comprender al menos tres o cuatro neurotrofinas diferentes.

45 La eficacia terapéutica se puede mejorar administrando suprapartículas que comprenden múltiples cargas útiles terapéuticas diferentes. Así, en un ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención pueden comprender al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos 10 diferentes, cargas útiles terapéuticas, siempre que la carga útil de la suprapartícula comprenda al menos 1,5 µg de un factor neurotrófico.

50 Por ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención pueden comprender al menos dos factores neurotróficos diferentes. En otros ejemplos, las suprapartículas de uso en la invención pueden comprender al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco factores neurotróficos diferentes. En estos ejemplos, se contemplan diversas combinaciones de factores neurotróficos tales como neurotrofinas. Las combinaciones ilustrativas de factores neurotróficos incluyen BDNF y factor de crecimiento nervioso, BDNF y neurotrofina-3, BDNF y neurotrofina-4, BDNF y CNTF, BDNF y GDNF, BDNF e IL-11, neurotrofina-3 y neurotrofina-4, neurotrofina-3 y CNTF, neurotrofina-3 y GDNF, neurotrofina-3 e IL-11, neurotrofina-4 y CNTF, neurotrofina-4 y GDNF, neurotrofina-4 e IL-11, CNTF y GDNF, CNTF e IL-11, GDNF e IL-11, BDNF, neurotrofina-3 y neurotrofina-4, BDNF, neurotrofina-3 y CNTF, BDNF, neurotrofina-3 y GDNF, BDNF, CNTF y GDNF, BDNF, CNTF e IL-11, neurotrofina-3, neurotrofina-4 y CNTF, neurotrofina-3, neurotrofina-4 y GDNF, neurotrofina-3, GDNF y GDNF, neurotrofina-3, neurotrofina-4 e IL-11, neurotrofina-4, CNTF y GDNF, neurotrofina-4, CNTF e IL-11, BDNF, neurotrofina-3, neurotrofina-4 y CNTF, BDNF, neurotrofina-3, neurotrofina-4 y GDNF, BDNF, neurotrofina-3, CNTF y GDNF, BDNF, neurotrofina-4, CNTF y GDNF, BDNF, neurotrofina-3, neurotrofina-4 e IL-11, neurotrofina-3, neurotrofina-4, CNTF y GDNF, neurotrofina-3, neurotrofina-4, CNTF e IL-11.

65 Otros factores neurotróficos ilustrativos incluyen anticuerpos u otras proteínas de unión tales como anti-quinasa

del receptor de Tropomiosina (TrK) B, anti-TrK C o proteínas de unión que interactúan con el receptor de neurotrofina p75. Por ejemplo, antagonistas del receptor de neurotrofina p75. En otro ejemplo, los factores neurotróficos incluyen ácidos nucleicos. Por ejemplo, el factor neurotrófico puede comprender una terapia génica, ARN silenciador tal como un ARNip o miARN, construcciones de expresión como plásmidos de ADN que comprenden un ácido nucleico de interés. En un ejemplo, el factor neurotrófico es una construcción de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una o varias opsinas.

En otro ejemplo, una suprapartícula de uso en la invención puede comprender un vector de expresión que comprende una opsina y uno cualquiera o más de BDNF, factor de crecimiento nervioso, neurotrofina-3, neurotrofina-4 y GDNF. En otro ejemplo, una suprapartícula de uso en la invención puede comprender un anticuerpo tal como anti- quinasa del receptor de tropomiosina (TrK) B o anti-TrK C y uno cualquiera o más de BDNF, factor de crecimiento nervioso, neurotrofina-3, neurotrofina-4, GDNF e IL-11.

Siempre que la carga útil de la suprapartícula comprenda al menos 1,5 µg de un factor neurotrófico, las suprapartículas de uso en la invención pueden comprender al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco cargas útiles terapéuticas diferentes en donde al menos una carga útil terapéutica es un factor neurotrófico. Por ejemplo, tales suprapartículas pueden comprender al menos tres cargas útiles terapéuticas diferentes en donde dos cargas útiles terapéuticas son factores neurotróficos. En otro ejemplo, tales suprapartículas pueden comprender al menos cuatro cargas útiles terapéuticas diferentes en donde tres cargas útiles terapéuticas son factores neurotróficos. En estos ejemplos, no es necesario que la carga útil terapéutica adicional mejore el potencial de crecimiento o supervivencia de las células del sistema auditivo, sino que puede proporcionar otro beneficio terapéutico. Por ejemplo, la carga útil terapéutica adicional puede suprimir el sistema inmunológico de un sujeto después de la administración de suprapartículas. En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención pueden comprender una carga útil que reduce la supervivencia de las células del sistema auditivo o sus conexiones sinápticas y uno o más factores neurotróficos. En este ejemplo, el factor neurotrófico puede aliviar la reducción en la supervivencia de las células del sistema auditivo o sus conexiones sinápticas causada por la carga terapéutica adicional. En un ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención pueden comprender agentes antineoplásicos que incluyen cisplatino o compuestos relacionados, antibióticos que incluyen aminoglicósidos tales como tobramicina o compuestos relacionados, diuréticos de asa tales como furosemida, antimetabolitos tales como metotrexato, salicilatos tales como aspirina o una fracción radiactiva y uno o más factores neurotróficos. Por ejemplo, una suprapartícula puede comprender un antibiótico y uno cualquiera o más de BDNF, factor de crecimiento nervioso, neurotrofina-3, neurotrofina-4, GDNF e IL-11.

Dependiendo del lugar de administración, es posible que sea necesario que la carga útil se difunda desde el oído medio hasta el oído interno o el sistema vestibular. Esto puede ocurrir mediante la difusión de la carga útil a través de las ventanas redonda u ovalada. Por lo tanto, en un ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención pueden comprender una o más molécula que ayuden a la difusión de la carga útil a través de las ventanas redonda y ovalada hasta el oído interno y/o el sistema vestibular.

En un ejemplo, la carga útil de las suprapartículas de uso en la invención tiene un punto isoeléctrico mayor que 7. En otro ejemplo, la carga útil tiene un punto isoeléctrico mayor que 8. En otro ejemplo, la carga útil tiene un punto isoeléctrico mayor que 9. En otro ejemplo, la carga útil tiene un punto isoeléctrico mayor que 10. En otro ejemplo, la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 7 y 10. En otro ejemplo, la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 7 y 9. En otro ejemplo, la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 8 y 10. En otro ejemplo, la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 9 y 10.

Las suprapartículas que comprenden una carga útil pueden denominarse suprapartículas cargadas en el contexto de la presente divulgación. Los métodos para producir suprapartículas cargadas no están particularmente limitados siempre que la suprapartícula resultante pueda cargarse con al menos 1,5 µg de una carga útil de factor neurotrófico. Preferiblemente, la suprapartícula resultante puede suministrar la carga útil al oído de un sujeto. Los métodos ilustrativos de carga son revisados por Wang et al. (2009) en J. Mater. Chem. 19, 6451 e incluyen encapsulación y atrapamiento de carga útil. En un ejemplo no limitante, las suprapartículas de uso en la invención se pueden cargar poniendo en contacto la suprapartícula con una solución acuosa de la carga útil seguido de un período de incubación. La solución de carga útil puede contener un exceso de la cantidad de carga útil que se va a cargar en la suprapartícula y la incubación puede ocurrir a temperatura ambiente. Se puede utilizar la agitación de la solución que contiene la suprapartícula y la carga útil para mejorar la carga de la carga útil.

Un experto en la técnica apreciará que el nivel requerido de carga útil probablemente estará influenciado por la propia carga útil y la indicación que se esté tratando según la presente divulgación.

Suprapartículas

El término "suprapartícula" ("SP") se utiliza en el contexto de la presente divulgación para referirse a partículas aglomeradas que comprenden una red de poros. La red de poros proporciona a las suprapartículas un gran

- suprapartículas comprenden al menos 11,5 µg de carga útil, en donde la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 9 y 10. En otro ejemplo, las suprapartículas comprenden al menos 12 µg de carga útil, en donde la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 9 y 10. En otro ejemplo, las suprapartículas comprenden al menos 15 µg de carga útil, en donde la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 9 y 10. En otro ejemplo, las suprapartículas comprenden al menos 20 µg de carga útil, en donde la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 9 y 10.

Por ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención pueden comprender al menos 6 µg de carga útil, en donde la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 9 y 10.

- En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención pueden comprender entre aproximadamente 2,5 y 10 µg de carga útil, en donde la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 8 y 10. En otro ejemplo, las suprapartículas pueden comprender entre aproximadamente 5 y 10 µg de carga útil, en donde la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 9 y 10. En otro ejemplo, las suprapartículas pueden comprender entre aproximadamente 6 y 10 µg de carga útil, en donde la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 9 y 10. Por ejemplo, las suprapartículas pueden comprender entre aproximadamente 6 y 8 µg de carga útil, en donde la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 9 y 10. En otro ejemplo, las suprapartículas pueden comprender entre aproximadamente 5 y 20 µg de carga útil, en donde la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 9 y 10. En otro ejemplo, las suprapartículas pueden comprender entre aproximadamente 5 y 15 µg de carga útil, en donde la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 9 y 10. En otro ejemplo, las suprapartículas pueden comprender entre aproximadamente 8 y 20 µg de carga útil, en donde la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 9 y 10. En otro ejemplo, las suprapartículas pueden comprender entre aproximadamente 8 y 15 µg de carga útil, en donde la carga útil tiene un punto isoeléctrico entre 9 y 10. Por ejemplo, la carga útil puede ser una neurotrofina que tiene un punto isoeléctrico entre 9 y 10.
- En un ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención que tienen la carga útil mencionada anteriormente se pueden proporcionar en un hidrogel de alginato.

- Las suprapartículas de uso en la invención cargadas con una carga útil ilustrada anteriormente pueden tener un tamaño de poro seleccionado entre los ejemplos discutidos a continuación. En un ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención son microporosas. El término "microporosa" se utiliza en el contexto de la presente divulgación para referirse a partículas que tienen un tamaño de poro inferior a aproximadamente 2 nm. Por ejemplo, las suprapartículas microporosas pueden tener un tamaño de poro de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 2 nm. En otros ejemplos, las suprapartículas microporosas tienen un tamaño de poro de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 2 nm, de aproximadamente 1,5 nm a aproximadamente 2 nm. En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención son mesoporosas. El término "mesoporosa" se utiliza en el contexto de la presente divulgación para referirse a partículas que tienen poros con diámetros de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 50 nm. Por ejemplo, las suprapartículas mesoporosas pueden tener un tamaño de poro de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 50 nm. En otros ejemplos, las suprapartículas mesoporosas tienen un tamaño de poro de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 40 nm, de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 30 nm. En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención son macroporosas. El término "macroporosa" se utiliza en el contexto de la presente divulgación para referirse a partículas que tienen un tamaño de poro superior a aproximadamente 50 nm. Por ejemplo, las suprapartículas macroporosas pueden tener un tamaño de poro de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 500 nm. En otros ejemplos, las suprapartículas macroporosas tienen un tamaño de poro de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 250 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 100 nm.

- Las suprapartículas de uso en la invención están compuestas de nanopartículas mesoporosas. En un ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención están compuestas por nanopartículas que tienen un tamaño de poro de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 50 nm. En otros ejemplos, las suprapartículas están compuestas por nanopartículas que tienen un tamaño de poro de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 40 nm, de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 30 nm.

- En otro ejemplo, las nanopartículas mesoporosas de las suprapartículas de uso en la invención tienen una estructura de poro bimodal. El término "bimodal" se utiliza en el contexto de la presente divulgación para referirse a partículas que comprenden múltiples tamaños de poro, generalmente un tamaño de poro más pequeño y un tamaño de poro más grande. En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención están compuestas de nanopartículas bimodales que tienen tamaños de poro más pequeños de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 4 nm y tamaños de poro más grandes de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 40 nm. En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención están compuestas de nanopartículas bimodales que tienen tamaños de poro más pequeños de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 3 nm y tamaños de poro más grandes de aproximadamente 4 nm a aproximadamente 40 nm.

- En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se cargan con al menos 3 µg de una carga útil mencionada anteriormente y están compuestas por nanopartículas bimodales que tienen tamaños de poro más pequeños de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 4 nm y tamaños de poro más grandes de

aproximadamente 15 nm a aproximadamente 40 nm. En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se cargan con al menos 5 µg de una carga útil mencionada anteriormente y están compuestas por nanopartículas bimodales que tienen tamaños de poro más pequeños de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 4 nm y tamaños de poro más grandes de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 40 nm.

En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se cargan con al menos 8 µg de una carga útil mencionada anteriormente y están compuestas por nanopartículas bimodales que tienen tamaños de poro más pequeños de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 4 nm y tamaños de poro más grandes de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 40 nm. En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se cargan con al menos 10 µg de una carga útil mencionada anteriormente y están compuestas por nanopartículas bimodales que tienen tamaños de poro más pequeños de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 4 nm y tamaños de poro más grandes de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 40 nm. En estos ejemplos, las suprapartículas se pueden proporcionar en un hidrogel de alginato.

En un ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención pueden tener un tamaño de poro sustancialmente uniforme. En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención comprenden tamaños de poro variables. En este ejemplo, el tamaño de los poros puede ser variable, pero estar dentro de un rango de tamaño particular. Por ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención pueden ser predominantemente mesoporosas. En otro ejemplo, las suprapartículas pueden ser predominantemente macroporosas. En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención están compuestas de nanopartículas que tienen un tamaño de poro sustancialmente uniforme. En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención están compuestas de nanopartículas bimodales que tienen tamaños de poros grandes y pequeños sustancialmente uniformes.

En un ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención pueden tener una estructura de poros ordenada. Estas suprapartículas tienen poros con una separación tridimensional regular. En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención pueden tener una estructura de poros desordenada. Estas suprapartículas tienen poros con una separación tridimensional irregular. En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención tienen una combinación de estructuras de poros tanto ordenadas como desordenadas.

El experto en la técnica apreciará que el tamaño de los poros de las suprapartículas se puede medir mediante, por ejemplo, microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM) y tomografía computarizada de rayos X. Un experto en la técnica puede identificar suprapartículas que tienen los tamaños de poro ilustrados anteriormente midiendo el ancho a través del punto más ancho de su estructura tridimensional. En un ejemplo, el punto más ancho o un poro pueden estar en la superficie de la suprapartícula.

Las suprapartículas de la presente divulgación pueden caracterizarse por la distancia entre sus partículas. En un ejemplo, la distancia promedio entre partículas puede oscilar entre aproximadamente 80 nm y aproximadamente 400 nm. En otro ejemplo, la distancia promedio entre partículas coloidales varía de aproximadamente 90 nm a aproximadamente 300 nm, aproximadamente 100 nm a

En un ejemplo, los poros de suprapartículas están conectados. Por ejemplo, las suprapartículas pueden comprender una serie de poros interconectados. En otro ejemplo, los poros de suprapartículas no están conectados. En otro ejemplo, las suprapartículas tienen una combinación de poros conectados y no conectados.

Las suprapartículas de la presente divulgación se pueden caracterizar por el volumen de sus poros. En un ejemplo, el volumen de poro de la suprapartícula oscila de aproximadamente 0,5 mLg⁻¹ a aproximadamente 10 mLg⁻¹. En otro ejemplo, las suprapartículas tienen un volumen de poro de aproximadamente 0,8 mLg⁻¹ a aproximadamente 5 mLg⁻¹, de aproximadamente 1 mL⁻¹ a aproximadamente 2,5 mLg⁻¹, de aproximadamente 1,5 mL⁻¹ a aproximadamente 2 mLg⁻¹.

Las suprapartículas de la presente divulgación pueden tener un núcleo hueco o un núcleo toroidal. En un ejemplo, el volumen interno del núcleo de la suprapartícula es al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% del volumen total de la suprapartícula. Los métodos ilustrativos de producción de suprapartículas de núcleo hueco incluyen procedimientos de núcleo ácido tales como los descritos en el documento US 4.468.498 y procedimiento de núcleo de éster tales como los descritos en los documentos US 5.157.084 y 5.521.253.

Las suprapartículas de la presente divulgación pueden caracterizarse por el área de superficie de su estructura. En un ejemplo, el área de superficie de las suprapartículas oscila entre aproximadamente 500 m² g⁻¹ a aproximadamente 1500 m² g⁻¹. En otro ejemplo, las suprapartículas tienen un área de superficie de entre aproximadamente 5500 m² g⁻¹ y aproximadamente 1250 m² g⁻¹, aproximadamente 600 metros² g⁻¹ y 1000m² g⁻¹, aproximadamente 600 metros² g⁻¹ y 700 metros² g⁻¹. En un ejemplo, el área de superficie de las

suprapartículas es de aproximadamente $600 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. En un ejemplo, el área de superficie de las suprapartículas es de aproximadamente $620 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

- 5 Las suprapartículas según la presente divulgación pueden caracterizarse por un perfil de liberación *in vitro* particular. En un ejemplo, las suprapartículas liberan carga útil durante al menos 50 días. En un ejemplo, las suprapartículas liberan carga útil durante al menos 100 días. En un ejemplo, las suprapartículas liberan carga útil durante al menos 150 días.

- 10 En otro ejemplo, se produce una liberación inicial inmediata de carga útil por parte de las suprapartículas seguida de una liberación sostenida de carga útil. Por ejemplo, las suprapartículas liberan un alto nivel de carga útil durante alrededor de 3 a 10 días, seguido de un perfil de liberación sostenida durante 30 días o más. En otro ejemplo, las suprapartículas liberan un alto nivel de carga útil durante alrededor de 8 a 10 días, seguido de un perfil de liberación sostenida durante 50 días o más.

- 15 En un ejemplo, la liberación inmediata inicial de carga útil es de $1,2 \text{ } \mu\text{g/día}$ durante al menos 2 días. En otro ejemplo, la liberación inmediata inicial de carga útil es de $1,3 \text{ } \mu\text{g/día}$ durante al menos 3 días. En otro ejemplo, la liberación inmediata inicial de carga útil es de $1,4 \text{ } \mu\text{g/día}$ durante 2 a 4 días. Un ejemplo de perfil de liberación sostenida es al menos $0,04 \text{ } \mu\text{g/día}$. Otro ejemplo de un perfil de liberación sostenida es al menos $0,06 \text{ } \mu\text{g/día}$. Otros ejemplos de perfiles de liberación sostenida son al menos $0,07 \text{ } \mu\text{g/día}$ y al menos $0,1 \text{ } \mu\text{g/día}$.

- 20 En otro ejemplo, las suprapartículas liberan al menos $2 \text{ } \mu\text{g}$ de carga útil durante al menos 20 días. En otro ejemplo, las suprapartículas liberan al menos $2 \text{ } \mu\text{g}$ de carga útil durante al menos 30 días. En otro ejemplo, las suprapartículas liberan al menos $2 \text{ } \mu\text{g}$ de carga útil durante al menos 40 días. En otro ejemplo, las suprapartículas liberan al menos $4 \text{ } \mu\text{g}$ de carga útil durante al menos 20 días. En otro ejemplo, las suprapartículas liberan al menos $4 \text{ } \mu\text{g}$ de carga útil durante al menos 30 días. En otro ejemplo, las suprapartículas liberan al menos $4 \text{ } \mu\text{g}$ de carga útil durante al menos 40 días.

- 30 En otro ejemplo, las suprapartículas liberan al menos $2 \text{ } \mu\text{g}$ de factor neurotrófico durante al menos 20 días. En otro ejemplo, las suprapartículas liberan al menos $2 \text{ } \mu\text{g}$ de factor neurotrófico durante al menos 30 días. En otro ejemplo, las suprapartículas liberan al menos $2 \text{ } \mu\text{g}$ de factor neurotrófico durante al menos 40 días. En otro ejemplo, las suprapartículas liberan al menos $4 \text{ } \mu\text{g}$ de factor neurotrófico durante al menos 20 días. En otro ejemplo, las suprapartículas liberan al menos $4 \text{ } \mu\text{g}$ de factor neurotrófico durante al menos 30 días. En otro ejemplo, las suprapartículas liberan al menos $4 \text{ } \mu\text{g}$ de factor neurotrófico durante al menos 40 días. Por ejemplo, las suprapartículas liberan al menos $2 \text{ } \mu\text{g}$ de BDNF durante al menos 20 días. En otros ejemplos, las suprapartículas pueden liberar al menos $2 \text{ } \mu\text{g}$ de BDNF durante al menos 40 días. En otro ejemplo, las suprapartículas pueden liberar al menos $4 \text{ } \mu\text{g}$ de BDNF durante al menos 20 días. En otro ejemplo, las suprapartículas pueden liberar al menos $4 \text{ } \mu\text{g}$ de BDNF durante al menos 40 días.

- 40 Un experto en la técnica puede medir el perfil de liberación *in vitro* de suprapartículas utilizando varios métodos. Los ejemplos de tales métodos se discuten a continuación en el Ejemplo 7. Por ejemplo, las suprapartículas divulgadas en el presente documento se pueden cargar con una carga útil marcada tal como FITC-lisozima antes de incubarlas en una solución tal como PBS. Se pueden utilizar mediciones intermitentes de fluorescencia para determinar el nivel de carga útil (p. ej., μg) liberada con el tiempo.

- 45 En un ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se producen a partir de nanopartículas que tienen un diámetro de entre aproximadamente 1 nm y 100 nm .

- 50 Las partículas ilustrativas que pueden formar suprapartículas incluyen partículas orgánicas, partículas inorgánicas, partículas metálicas o una combinación de las mismas. Las partículas orgánicas ilustrativas incluyen partículas poliméricas tales como ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), ácido polimetacrílico, ácido polietacrílico, ácido poliacrílico (PAA), poli (N-isopropilacrilamida), poli (N,N-dimetilacrilamida), poliamidas, poli-2-hidroxibutirato (PHB), gelatinas, policaprolactona (PCL) y ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). Las partículas inorgánicas ilustrativas incluyen cargas minerales tales como cargas pesadas o cargas de alta densidad, pigmentos, arcillas y otras partículas sintéticas. Otras partículas inorgánicas ilustrativas incluyen minerales densos tales como barita, hematita, óxido de magnesio, óxidos inorgánicos que incluyen dióxido de titanio, óxido de calcio, óxido de zinc, óxido de magnesio, óxido de cerio, dióxido de circonio y dióxido de silicio. En un ejemplo, el material es dióxido de silicio (es decir, sílice). Por tanto, en tal ejemplo, las suprapartículas pueden denominarse suprapartículas de sílice. Las partículas metálicas ilustrativas incluyen oro, plata y cobre. Las suprapartículas pueden comprender las mismas partículas. Por ejemplo, las suprapartículas pueden consistir sustancialmente en partículas de sílice. Las suprapartículas pueden comprender diferentes partículas; por ejemplo, partículas de sílice y arcilla. Las suprapartículas pueden comprender al menos tres, al menos cuatro, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 partículas diferentes.

- 65 Las suprapartículas pueden comprender polielectrolitos o material de polielectrolito. Los ejemplos de tales suprapartículas se describen en el documento WO 2006/037160. En este ejemplo, el polielectrolito puede ser

un polielectrolito cargado positivamente (o tener la capacidad de estar cargado positivamente) o un polielectrolito cargado negativamente (o tener la capacidad de estar cargado negativamente) o tener una carga neta cero.

- 5 Las suprapartículas de uso en la invención comprenden nanopartículas de sílice mesoporosa.

Las suprapartículas de la presente divulgación pueden tener varias formas. Por ejemplo, las suprapartículas pueden tener forma esférica. Las formas esféricas ilustrativas incluyen esferas y ovoides. En otro ejemplo, las suprapartículas tienen una forma no esférica. Las formas no esféricas ilustrativas incluyen mancuernas, semiesferas, discos, tetraedros, fibras, esferocilindros y formas irregulares. En un ejemplo, las suprapartículas pueden tener una estructura ordenada. Por ejemplo, las suprapartículas pueden comprender una matriz ordenada.

- 10 Las suprapartículas esféricas de la presente divulgación se pueden caracterizar por su diámetro. Por ejemplo, las suprapartículas de la presente divulgación tienen un diámetro superior a 100 μm . Por ejemplo, las suprapartículas de la presente divulgación pueden tener un diámetro de al menos aproximadamente 150 μm , aproximadamente 200 μm , aproximadamente 250 μm , aproximadamente 300 μm , aproximadamente 350 μm , aproximadamente 400 μm , aproximadamente 450 μm , aproximadamente 500 μm , aproximadamente 550 μm , aproximadamente 600 μm , aproximadamente 650 μm , aproximadamente 700 μm , aproximadamente 750 μm , aproximadamente 800 μm , aproximadamente 850 μm , aproximadamente 900 μm , aproximadamente 950 μm , aproximadamente 1000 μm . Por ejemplo, las suprapartículas pueden tener un diámetro de aproximadamente 550 μm . Este diámetro de suprapartícula es ventajoso ya que permite una alta carga de fármaco al tiempo que facilita el suministro al oído interno mediante una cánula. En otros ejemplos, las suprapartículas pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 150 μm y aproximadamente 1000 μm , aproximadamente 200 μm y aproximadamente 900 μm , aproximadamente 300 μm y aproximadamente 800 μm . En otro ejemplo, las suprapartículas pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 400 μm y aproximadamente 600 μm . En otro ejemplo, las suprapartículas pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 450 μm y aproximadamente 550 μm . En otro ejemplo, las suprapartículas pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 520 μm y aproximadamente 580 μm . En otro ejemplo, las suprapartículas pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 460 μm y aproximadamente 540 μm . En otro ejemplo, las suprapartículas pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 470 μm y aproximadamente 530 μm . En otro ejemplo, las suprapartículas pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 480 μm y aproximadamente 520 μm . En otro ejemplo, las suprapartículas pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 490 μm y aproximadamente 510 μm . En otros ejemplos, las suprapartículas se pueden caracterizar por el ancho del punto más ancho de su estructura tridimensional. Por ejemplo, las suprapartículas pueden tener una anchura compatible con los diámetros ilustrados anteriormente.

- En otro ejemplo, la superficie de la suprapartícula se modifica mediante la adición de radicales funcionales para mejorar la carga de una carga útil. Se puede añadir cualquier número de radicales funcionales a la superficie de una suprapartícula, seleccionándose la elección del radical funcional para complementar la carga útil que se carga. En un ejemplo, se injerta un radical tal como 3-aminopropiltrietoxisilano (APTS) sobre la superficie de una suprapartícula de sílice. Esto introduce una funcionalidad de amina que puede interactuar con cualquier grupo carboxilo presente en una carga útil. En otro ejemplo, la suprapartícula se modifica para soportar una carga neta general que mejora la carga de la carga útil (Tan et al. Adv. Mater. (2012) 24, 3362-3366). Por ejemplo, la superficie de la suprapartícula se puede modificar para soportar una carga neta positiva general, de modo que se mejore la carga de una carga útil que porta una carga neta negativa general. En otro ejemplo, la superficie de la suprapartícula se modifica para soportar una carga negativa neta general, de modo que se mejora la carga de una carga útil que soporta una carga positiva neta general.

- 50 Las suprapartículas de la presente divulgación también pueden comprender restos funcionales entrecruzados. Por ejemplo, los restos funcionales se pueden entrecruzar mediante una reacción química. En un ejemplo, las moléculas de ácido poliglicólico (PGA) se entrecruzan mediante una reacción química de las moléculas de PGA con cistamina (Tan et al. Adv. Mater. (2012) 24, 3362-3366).

55 Formulaciones

Las suprapartículas de uso en la invención se pueden formular como una composición farmacéutica adecuada para la administración a un sujeto. Las composiciones farmacéuticas ilustrativas pueden proporcionar suprapartículas solas o combinadas con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables. En estas composiciones, las suprapartículas se proporcionan en una cantidad suficiente para suministrar una cantidad de carga útil terapéuticamente eficaz a un sujeto. Dependiendo de la vía particular de administración, se pueden utilizar una variedad de portadores aceptables, conocidos en la técnica, como se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. EE.UU., 1991).

- 65 Las composiciones farmacéuticas ilustrativas también pueden comprender soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables, así como polvos

estériles para la reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de uso. Los ejemplos de portadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. Tales composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes o agentes antibacterianos y antifúngicos.

En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se pueden incorporar a sistemas de liberación lenta o de suministro dirigido. Por ejemplo, los autores de la presente invención han identificado que proporcionar a las suprapartículas divulgadas en el presente documento un hidrogel de alginato ralentiza la liberación de carga útil de las suprapartículas. Tales sistemas de liberación lenta pueden incluir espumas, geles, gotas y aerosoles para administración tópica o un depósito para inyección o cánula de inyección. Los sistemas de liberación lenta ilustrativos incluyen matrices poliméricas, liposomas y microesferas. Las matrices poliméricas incluyen sistemas basados en reservorios donde las suprapartículas están encerradas en recubrimientos poliméricos porosos (Yang y Pierstorff (2012) JALA. 17, 50-58) y sistemas de matrices monolíticas donde las suprapartículas están incluidas en matrices poliméricas (Langer R (1990) Science. 249, 1527-1533). Los liposomas pueden ser sistemas de suministro de fármacos biodegradables y anfífilos, que se pueden formular utilizando fosfolípidos y colesterol. Las microesferas se pueden formular utilizando polímeros biodegradables y biocompatibles. En otro ejemplo, el sistema de liberación lenta puede estar basado en polisacáridos. Por ejemplo, una formulación de suprapartículas de la invención puede comprender un polisacárido aniónico. En un ejemplo, el polisacárido puede ser ácido algínico o un derivado del mismo. Por ejemplo, la formulación de suprapartículas de la invención puede comprender un hidrogel de alginato. En la técnica se conocen diversos derivados del ácido algínico. Los ejemplos incluyen alginato de sodio, alginato de potasio y alginato de calcio. Otros ejemplos incluyen alginato de bario y alginato de estroncio. En un ejemplo, el ácido algínico es alginato de sodio. Por consiguiente, en un ejemplo, la presente invención proporciona una formulación que comprende una suprapartícula de uso en la invención como se define en el presente documento y alginato de sodio. El alginato se puede obtener de varias fuentes (p. ej., Sigma, FMC Health and Nutrition). En otro ejemplo, el polisacárido es un polisacárido no ramificado tal como un glicosaminoglicano. Por ejemplo, el polisacárido puede ser ácido hialurónico.

En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se proporcionan en una formulación que acelera la liberación de una carga útil. Por ejemplo, las suprapartículas pueden dotarse de hidrogel basado en Pluronic F127 (PF 127) o un análogo del mismo. En un ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención pueden dotarse de hidrogel basado en PF 127.

En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se proporcionan en una formulación que mejora la difusión a través de una membrana dentro del oído del sujeto, tal como la membrana timpánica, ventanas ovalada o redonda. Por ejemplo, tales formulaciones de suprapartículas pueden comprender perilinfa artificial.

En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se incorporan o incluyen dentro de armazones que son compatibles con el sujeto y que se degradan en productos que no son dañinos para un sujeto. Estos armazones albergan las suprapartículas que se van a trasplantar a un sujeto.

En la práctica de la invención se pueden utilizar con éxito una variedad de armazones diferentes. Los armazones ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, armazones biológicos degradables. Los armazones biodegradables naturales incluyen armazones de colágeno, fibronectina y laminina. Los armazones adecuados incluyen armazones de ácido poliglicólico o polímeros sintéticos tales como polianhídridos, poliortoésteres y ácido poliláctico.

Tratamiento y administración

La composición de la invención se puede proporcionar para uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno. Por consiguiente, en tal ejemplo, las composiciones que comprenden suprapartículas según la presente invención se administran a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en el sujeto.

La presente invención proporciona adicionalmente la composición de la invención para uso en el tratamiento de la pérdida auditiva. El término "pérdida auditiva" se utiliza en el contexto de la presente divulgación para referirse a cualquier reducción en la capacidad de un sujeto para detectar o procesar el sonido. Así, la referencia a pérdida auditiva engloba un déficit auditivo parcial o una incapacidad total para oír.

En un ejemplo, la pérdida auditiva se caracteriza como pérdida auditiva neurosensorial (SNHL). La SNHL se utiliza en el contexto de la presente divulgación para referirse a la pérdida auditiva resultante del daño a las delicadas células ciliadas sensoriales dentro de la cóclea, o la pérdida de sus conexiones sinápticas con las

neuronas del ganglio espiral (SGN) o la disfunción de las células de Schwann cocleares. En un ejemplo, la pérdida auditiva se caracteriza como presbiacusia. En otro ejemplo, la pérdida auditiva es inducida por el ruido. En otro ejemplo, la pérdida auditiva es inducida por una enfermedad o genética. En otro ejemplo, la pérdida auditiva es inducida por la exposición a ototoxinas, por ejemplo, aminoglicósidos.

5

En un ejemplo, el sujeto es un mamífero. En un ejemplo, el sujeto es un ser humano. Por ejemplo, el sujeto humano puede ser un adulto. En un ejemplo, el sujeto humano es un niño. Otros sujetos mamíferos ilustrativos incluyen animales de compañía tales como perros o gatos, o ganado tal como caballos o vacas. Los términos tales como "sujeto", "paciente" o "individuo" son términos que, en contexto, se pueden utilizar indistintamente en la presente divulgación.

10

En un ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se administran por vía intraperitoneal.

15

La composición de la invención también se puede proporcionar para uso en métodos de suministro de una carga útil a una célula, tejido u órgano en un sujeto a través del oído, comprendiendo el método administrar dicha composición al oído de un sujeto. En este ejemplo, el método puede suministrar una carga útil a una célula desde el oído interno, el oído medio y/o el sistema vestibular del sujeto. En otro ejemplo, el método suministra una carga útil terapéutica a una célula neural, tejido neural o el cerebro de un sujeto.

20

En un ejemplo, las composiciones de la invención se administran sobre la membrana timpánica. En este ejemplo, se pueden formular composiciones para administración tópica (p. ej., gotas, geles, espumas, aerosoles).

25

En otro ejemplo, las composiciones de la invención se administran en la cavidad del "oído medio". El término "oído medio" en el contexto de la presente divulgación se utiliza para referirse al espacio entre la membrana timpánica y el oído interno. Por tanto, el oído medio es externo a todo el tejido del oído interno. Por ejemplo, las composiciones de la invención se pueden administrar al oído medio mediante inyección a través de la membrana timpánica. En este ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se pueden administrar como una inyección de depósito. En otro ejemplo, un médico a cargo puede producir una abertura en la membrana timpánica para facilitar el acceso de las composiciones de la invención al oído medio. Cuando se administran composiciones de la invención al oído medio, dichas composiciones se pueden administrar en la ventana redonda y/u ovalada.

30

35

En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se administran en el oído interno. Por ejemplo, se pueden administrar suprapartículas a la cóclea. En un ejemplo, se pueden administrar suprapartículas en la espira basal de la cóclea. Se conocen en la técnica mecanismos quirúrgicos para acceder a la cóclea u otras estructuras del oído interno. Los mecanismos ilustrativos para acceder quirúrgicamente a la cóclea humana son descritos, por ejemplo, por Clark GM, et al., en "Surgery for an improved multiple-channel cochlear implant", Ann Otol Rhinol Laryngol 93:204-7, 1984, y por Clark GM, et al., en "Surgical and safety considerations of multichannel cochlear implants in children", Ear and Hearing Suppl. 12:15S-24S, 1991.

40

45

La combinación de suprapartículas de uso en la invención con intervención ótica se analiza anteriormente. En estos ejemplos, la intervención ótica se puede producir al mismo tiempo que la administración de suprapartículas. Por ejemplo, se puede implantar un dispositivo coclear al mismo tiempo que las suprapartículas. Sin embargo, una mayor supervivencia de las neuronas del ganglio espiral puede mejorar la utilidad de un implante coclear. Por tanto, puede ser deseable implantar un dispositivo coclear después de que se hayan administrado las suprapartículas. Por ejemplo, se puede implantar un dispositivo coclear aproximadamente un mes, aproximadamente dos meses, aproximadamente tres meses, aproximadamente seis meses después de que se hayan administrado las suprapartículas. En estos ejemplos, se pueden administrar suprapartículas adicionales con el dispositivo coclear.

50

En un ejemplo, se administra una primera dosis de suprapartículas de uso en la invención a la cóclea del sujeto y se administra al menos una segunda dosis de suprapartículas a la ventana redonda y/u ovalada del sujeto.

55

En un ejemplo, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de suprapartículas de uso en la invención a un oído del sujeto. En un ejemplo, se administran múltiples suprapartículas a un oído del sujeto. Por ejemplo, se pueden administrar al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos 5, al menos 10, al menos 20 suprapartículas a un oído del sujeto. En otro ejemplo, se administran aproximadamente de una a 10 suprapartículas. En otros ejemplos, se administran aproximadamente de dos a 9, aproximadamente de tres a 8, aproximadamente de cuatro a 7, aproximadamente de 5 a 6 suprapartículas a un oído del sujeto. En estos ejemplos, las suprapartículas pueden comprender la misma carga útil. Alternativamente, en otro ejemplo, las suprapartículas se cargan con diferentes cargas útiles. Por ejemplo, se pueden administrar una suprapartícula cargada con un factor neurotrófico y una suprapartícula cargada con un esteroide. En otro ejemplo, se pueden administrar una suprapartícula cargada con un factor neurotrófico y una suprapartícula cargada con un antibiótico. En otro ejemplo, se puede administrar una suprapartícula cargada con un factor neurotrófico con un antibiótico.

65

Composiciones/Kits

5 Las suprapartículas de uso en la invención se pueden proporcionar en un kit o envase. Por ejemplo, una composición de la invención puede envasarse en un recipiente adecuado con instrucciones escritas para tratar un trastorno del oído interno. En un ejemplo, una composición de la invención se puede proporcionar en un recipiente de dosis única, tal como un gotero o una jeringa precargada.

10 En un ejemplo, el kit comprende una suprapartícula de uso en la invención para uso en métodos de tratamiento de un trastorno del oído interno. En otro ejemplo, el kit comprende una suprapartícula de uso en la invención para uso en métodos de tratamiento de la pérdida auditiva. Por ejemplo, la pérdida auditiva es SNHL. En otro ejemplo, la pérdida auditiva es una pérdida auditiva inducida por ruido. En un ejemplo, un kit según la presente divulgación comprende adicionalmente un audífono o un implante. Por consiguiente, en un ejemplo, el kit puede comprender una suprapartícula de uso en la invención y un implante coclear.

15

Fabricación

20 La presente divulgación abarca un método para fabricar suprapartículas que pueden cargarse con altos niveles de carga útil. En un ejemplo, las suprapartículas se pueden fabricar a partir de una composición que comprende nanopartículas y ácido algínico o un derivado polisacárido del mismo. Más arriba se proporcionan varios ejemplos de nanopartículas. En un ejemplo, las nanopartículas tienen una estructura de poro bimodal. Las nanopartículas se pueden producir mediante varios métodos. Uno de estos métodos es descrito por Cui et al. 2015, en ACS Nano, 9, 1571-1580.

25 En otro ejemplo, las suprapartículas según la presente divulgación se producen mediante electropulverización. Los ejemplos de electropulverización son revisados por Jaworek A., 2007 en Powder Technology 1, 18 - 35. A continuación también se ilustra un ejemplo de electropulverización. En un ejemplo, la presente divulgación abarca un método de fabricación de suprapartículas, comprendiendo el método electropulverizar una composición que comprende nanopartículas y ácido algínico o un derivado polisacárido del mismo en una solución acuosa dicatiónica.

30

Más específicamente, la presente invención proporciona adicionalmente un método para fabricar una composición de la invención, comprendiendo el método electropulverizar una composición que comprende nanopartículas de sílice mesoporosa y ácido algínico en una solución acuosa dicatiónica y cargar las suprapartículas así producidas con al menos 1,5 μg de un factor neurotrófico.

35

La presente invención proporciona adicionalmente una composición de la invención, en donde la composición se puede obtener electropulverizando una composición que comprende nanopartículas de sílice mesoporosa y ácido algínico en una solución acuosa dicatiónica y cargando las suprapartículas así producidas con al menos 1,5 μg de un factor neurotrófico.

40

Un experto en la técnica apreciará que los parámetros de electropulverización se pueden optimizar en función del tipo de solución utilizada para la electropulverización. Por ejemplo, el voltaje y los caudales se pueden optimizar para proporcionar suprapartículas de un tamaño deseado. En un ejemplo, el caudal es de aproximadamente 6-10 mL h^{-1} . En otro ejemplo, el caudal es de aproximadamente 7-9 mL h^{-1} . En otro ejemplo, el caudal es de aproximadamente 8 mL h^{-1} . En un ejemplo, el voltaje está entre aproximadamente 10 y 25 KV. En otro ejemplo, el voltaje está entre aproximadamente 11 y 20 KV. En otro ejemplo, el voltaje está entre aproximadamente 12 y 14 KV. En otro ejemplo, el voltaje es de aproximadamente 13 KV.

45

50 En un ejemplo, las suprapartículas se producen mediante electropulverización de una solución de nanopartículas. En un ejemplo, la concentración de nanopartículas en solución es de aproximadamente 20 mg/mL . En un ejemplo, la concentración de nanopartículas en solución es de aproximadamente 30 mg/mL . En un ejemplo, la concentración de nanopartículas en solución es de aproximadamente 40 mg/mL . En un ejemplo, la concentración de nanopartículas en solución es de aproximadamente 50 mg/mL . En un ejemplo, la concentración de nanopartículas en solución es de aproximadamente 60 mg/mL .

55

En otro ejemplo, las suprapartículas se producen mediante electropulverización de una solución de nanopartículas que comprende ácido algínico o un derivado del mismo. En un ejemplo, la solución de nanopartículas se prepara a partir de una solución de 5 mg mL^{-1} de ácido algínico. En un ejemplo, la solución de nanopartículas se prepara a partir de una solución de 10 mg mL^{-1} de ácido algínico. En un ejemplo, la solución de nanopartículas se prepara a partir de una solución de 20 mg mL^{-1} de ácido algínico. En un ejemplo, la solución de nanopartículas se prepara a partir de una solución de 30 mg mL^{-1} de ácido algínico. En otro ejemplo, la solución de nanopartículas se prepara a partir de una solución de 5 mg mL^{-1} a 30 mg mL^{-1} de ácido algínico. En otro ejemplo, la solución de nanopartículas se prepara a partir de una solución de 10 mg mL^{-1} a 30 mg mL^{-1} de ácido algínico. En otro ejemplo, la solución de nanopartículas se prepara a partir de una solución de 20 mg mL^{-1} a 30 mg mL^{-1} de ácido algínico.

60

65

En un ejemplo, la solución de nanopartículas se prepara a partir de 5 mg mL⁻¹ de ácido algínico en agua. En un ejemplo, la solución de nanopartículas se prepara a partir de 10 mg mL⁻¹ de ácido algínico en agua. En un ejemplo, la solución de nanopartículas se prepara a partir de 20 mg mL⁻¹ de ácido algínico en agua. En un ejemplo, la solución de nanopartículas se prepara a partir de 30 mg mL⁻¹ de ácido algínico en agua. En otro ejemplo, la solución de nanopartículas se prepara a partir de 5 mg mL⁻¹ a 30 mg mL⁻¹ ácido algínico en agua. En otro ejemplo, la solución de nanopartículas se prepara a partir de 10 mg mL⁻¹ a 30 mg mL⁻¹ de ácido algínico en agua. En otro ejemplo, la solución de nanopartículas se prepara a partir de 20 mg mL⁻¹ a 30 mg mL⁻¹ de ácido algínico en agua.

En otro ejemplo, las suprapartículas se producen mediante electropulverización de una solución de nanopartículas que comprende ácido algínico.

Los derivados de ácido algínico no están particularmente limitados siempre que formen un gel a una temperatura definida. En un ejemplo, el derivado del ácido algínico es un derivado polisacárido. Los derivados de ácido algínico incluyen diversas formas de sales del ácido algínico. Los ejemplos incluyen alginato de sodio, alginato de potasio y alginato de calcio. Otros ejemplos incluyen alginato de bario y alginato de estroncio. En un ejemplo, el ácido algínico es alginato de sodio. En otro ejemplo, las suprapartículas se producen mediante electropulverización de una solución de nanopartículas que comprende ácido algínico.

Se pueden utilizar alginatos de diversas viscosidades para producir suprapartículas según la presente divulgación dependiendo del tamaño y la forma deseados de la suprapartícula. Por ejemplo, se puede utilizar alginato que tenga una viscosidad de aproximadamente 20 a 300 mPa*s. En otro ejemplo, el alginato tiene una viscosidad de aproximadamente 20 a 200 mPa*s. En un ejemplo, el alginato tiene una viscosidad de 20 mPa*s. En otro ejemplo, el alginato tiene una viscosidad de 100 mPa*s. En otro ejemplo, el alginato tiene una viscosidad de 200 mPa*s.

En un ejemplo, las suprapartículas se producen electropulverizando una composición que comprende nanopartículas en una solución acuosa. En un ejemplo, ésta es una solución acuosa dicatiónica. Los componentes dicatiónicos ilustrativos incluyen Ca²⁺ y Ba²⁺. Por ejemplo, la solución acuosa puede comprender cloruro de calcio. En otro ejemplo, la solución acuosa comprende cloruro de bario.

En un ejemplo, las suprapartículas se producen mediante electropulverización de una composición, en donde la concentración de alginato en la composición es de 5 mg mL⁻¹ a 30 mg mL⁻¹, la concentración de nanopartículas en la composición es de 20 mg mL⁻¹ a 50 mg mL⁻¹ y el voltaje es de 10 kV a 25 kV. En otro ejemplo, las suprapartículas se producen mediante electropulverización de una composición, en donde la concentración de alginato en la composición es de 10 mg mL⁻¹ a 30 mg mL⁻¹, la concentración de nanopartículas en la composición es de 30 mg mL⁻¹ a 50 mg mL⁻¹ y el voltaje es de 11 kV a 21 kV. En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se producen mediante electropulverización de una composición, en donde la concentración de alginato en la composición es de 20 mg mL⁻¹ a 30 mg mL⁻¹, la concentración de nanopartículas en la composición es de 35 mg mL⁻¹ a 45 mg mL⁻¹ y el voltaje es de 12 kV a 14 kV. En estos ejemplos, el caudal puede ser de 8 mL h⁻¹.

En otro ejemplo, las suprapartículas de uso en la invención se producen mediante electropulverización de una composición, en donde la concentración de alginato en la composición es de 30 mg mL⁻¹, la concentración de nanopartículas en la composición es de 40 mg mL⁻¹, el voltaje es de 13 kV y el caudal es de 8 mL h⁻¹.

En un ejemplo, las suprapartículas fabricadas utilizando métodos definidos en el presente documento se someten a calcinación para eliminar el ácido algínico o un derivado del mismo. En un ejemplo, la calcinación se realiza a aproximadamente 500°C. En otro ejemplo, la calcinación se realiza a aproximadamente 550°C. En otro ejemplo, la calcinación se realiza a aproximadamente 600°C. En otro ejemplo, la calcinación se realiza a aproximadamente 650°C. En otro ejemplo, la calcinación se realiza a aproximadamente 700°C. En un ejemplo, la calcinación se realiza durante aproximadamente 6 a aproximadamente 30 horas. En otro ejemplo, la calcinación se realiza durante aproximadamente 10 horas. En otro ejemplo, la calcinación se realiza durante aproximadamente 20 horas. En otro ejemplo, la calcinación se realiza durante aproximadamente 30 horas.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Producción de nanopartículas

Se produjeron nanopartículas de sílice mesoporosa (MS-NP) utilizando métodos basados en los descritos por Cui et al. 2015, en ACS Nano, 9, 1571-1580. Se disolvieron completamente 1,1 g de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) en 50 mL de Milli-Q con agitación. Posteriormente se añadieron 4,3 g de solución de ácido poliacrílico (PAA, M_w= 250 kDa, solución al 35% en agua) con agitación vigorosa durante 20 minutos a temperatura ambiente (25°C) hasta que se obtuvo una solución transparente. Después, se añadieron a la solución 3,5 mL de solución de hidróxido de amonio (28-30%) con agitación vigorosa, dando como resultado

una suspensión lechosa. Después, se añadieron 4,46 mL de ortosilicato de tetraetilo (TEOS) después de agitar durante 20 min. La solución se agitó durante 15 minutos más antes de transferir la mezcla a un autoclave sellado con teflón, que se dejó a 90°C durante 48 h.

- 5 Las MS-NP sintetizadas se lavaron con etanol una vez, agua dos veces y etanol dos veces y finalmente se secaron a 90°C. Las plantillas orgánicas se eliminaron mediante calcinación a 550°C durante 30 h.

Ejemplo 2 - Inicio del procedimiento de fabricación de suprapartículas - Procedimiento A

- 10 Las nanopartículas mesoporosas de sílice (MS), se prepararon según Wang et al. (2010) Chem Mater. 22, 3829-3831. Las nanopartículas MS se dispersaron en agua Milli-Q con una concentración de partículas de 5% en peso y se sometieron a sonicación brevemente para formar una suspensión coloidal estable. Después, se aplicó una alícuota de 0,5 a 2,0 µl de la dispersión de nanopartículas MS a una superficie plana, que se cubrió previamente con una película de parafina. Las gotitas se secaron bajo un flujo de aire para impulsar el ensamblaje de las nanopartículas de MS a suprapartículas de sílice mesoporosa (MS-SP de fuerza capilar) mediante la acción de la fuerza capilar. El tamaño de las MS-SP de fuerza capilar se controló mediante el volumen de la dispersión de nanopartículas aplicada en la gotita.

- 20 Bajo fuerza capilar, los coloides de MS se autoensamblaron en una estructura compacta para formar MS-SP. Después, las MS-SP de fuerza capilar se retiraron de la película de parafina y se transfirieron a un recipiente de cerámica y se recocieron a 923 K para mejorar la estabilidad mecánica de las MS-SP de fuerza capilar. Después, se cargaron las MS-SP de fuerza capilar con carga útil. Se cargaron aproximadamente 1,33 µg de proteína por partícula. Se demostró que las MS-SP de fuerza capilar tenían una estructura de poro bimodal (2-3 nm y 15-30 nm) y los macroporos dentro de las MS-SP de fuerza capilar, el espacio entre las nanopartículas densamente empaquetadas, eran de 100-200 nm.

Ejemplo 3 - Procedimiento de fabricación modificado - Procedimiento B

- 30 Se añadieron 80 mg de polvo de MS-NP a 2 mL de solución de sal sódica de ácido algínico (30 mg mL⁻¹ en agua). La solución resultante se sometió a sonicación durante 1 hora hasta que las MS-NP se distribuyeron uniformemente en la solución de sal sódica de ácido algínico.

- 35 Para formar MS-SP de poros grandes (^lMS-SP), la solución sometida a sonicación se añadió a una jeringa de plástico de 3 mL y se colocó en una bomba de jeringa, con el líquido electropulverizado en un baño de solución de cloruro de calcio (1% en peso preparado en agua) utilizando caudales de alrededor de 8 mL h⁻¹ (configuración de electropulverización mostrada en la Figura 1). El tamaño de las gotitas se controló aplicando un campo eléctrico entre el extremo del tubo y la solución de cloruro de calcio. Las cuentas de alginato MS-SP (^lMS-SP^{alg}) se recogieron del baño de cloruro de calcio y se cargaron con carga útil. Se observó un rendimiento de carga de fármaco significativamente mejorado para estas partículas (^lMS-SP) en comparación con las producidas mediante el procedimiento A: aproximadamente 7,8 µg de proteína por partícula, con estabilidad mecánica mejorada.

Ejemplo 4 - Procedimiento de fabricación modificado - Procedimiento C

- 45 Se produjeron MS-SP (^lMS-SP^{alg}) utilizando el método descrito en el Ejemplo 3. La sal sódica del ácido algínico se eliminó mediante calcinación a 650°C durante 30 h. Esta etapa eliminó todos los componentes orgánicos y dejó solo las nanopartículas de sílice mesoporosa (MS-SP) y trazas de calcio y cloruro de sodio. Después, las MS-SP se cargaron con carga útil. Se observó un rendimiento de carga de fármaco significativamente mejorado para estas partículas en comparación con las producidas mediante el procedimiento A: aproximadamente 7,8 µg de proteína por partícula.

- 50 Las suprapartículas también se fabricaron a partir de nanopartículas sin poros ^NMS-SP^{alg} (no porosas; ^NMS-SP^{alg}) y nanopartículas que tienen tamaños de poro <2 nm (MS-^sSP^{alg} de poro pequeño; ^sMS-SP^{alg}). Cuando se eliminó el alginato de estas suprapartículas, el rendimiento de carga del fármaco se redujo significativamente (Tabla 1).

La carga máxima de fármaco de MS-SP producidas por el procedimiento B y el procedimiento C se resume en la Tabla 1.

- 60 Tabla 1: Carga de MS-SP producidas por el procedimiento B y el procedimiento C

Tipo de partícula	q _{max} (ug/partícula)
^N MS-SP ^{alg} no porosas	q _{max} =8,215
^N MS-SP no porosas	q _{max} =2,009

S MS-SP ^{alg} de poro pequeño	$q_{\max}=10,06$
S MS-SP de poro pequeño	$q_{\max}=2,802$
I MS-SP ^{alg} de poros grandes	$q_{\max}=9,245$
I MS-SP de poros grandes	$q_{\max}=7,843$

Ejemplo 5 - Propiedades de liberación de suprapartículas.

Lisozima

5

Se prepararon SP cargadas con FITC-lisozima para estudios de liberación *in vitro* incubando SP esterilizadas con 100 μ L de solución de FITC-lisozima (0,2 mg mL⁻¹ en agua Milli-Q). La lisozima es un buen modelo de proteína para imitar la neurotrofina BDNF (ya que la lisozima es económica y fácilmente disponible mientras que el BDNF es costoso) porque comparte propiedades fisicoquímicas similares (lisozima, $M_w = 14,3 \pm 0,5$ KDa, $R_h = 18,9 \pm 0,25$ Å y $pI = 11$; BDNF, $M_w = 13$ kDa, $R_h = 24,0 \pm 3,2$ Å y $pI = 10$).

10

El perfil de liberación *in vitro* de las MS-SP cargadas con lisozima se muestra en la Figura 4 partes a) y b) y la Figura 7 parte a). Los perfiles de liberación de las MS-SP producidas por los procedimientos A y C son similares. Aunque las MS-SP producidas mediante el procedimiento C están cargadas con niveles significativamente más altos de lisozima marcada. La liberación de carga útil se reduce significativamente para las MS-SP producidas por el procedimiento B en comparación con las MS-SP producidas por los procedimientos A y C.

15

Potencial zeta

20

Después, las MS-SP se cargaron con lisozima marcada con fluoresceína (FITC-lisozima). Como se muestra en la Figura 2, las MS-SP exhibieron potenciales zeta negativos que oscilaban entre $\sim -7,6$ mV y $\sim -33,9$ mV a medida que el valor del pH aumentaba de 4 a 10. Por lo tanto, la lisozima y el BDNF cargados positivamente se pueden cargar en las MS-SP con la ayuda de fuerzas impulsoras electrostáticas. Las imágenes de microscopía confocal (Figura 3a, b) mostraron FITC-lisozima cargada en la superficie de las MS-SP. Sin embargo, puesto que el tamaño de las MS-SP es bastante grande (cientos de micrómetros de diámetro), la microscopía confocal de barrido láser convencional no es adecuada para obtener imágenes de la estructura interna de las SP. No obstante, al fracturar las MS-SP con un bisturí, se pudieron obtener imágenes del interior y se descubrió que también se observaba FITC-lisozima en las estructuras internas porosas de las MS-SP (Figura 3c).

25

30

Evaluación adicional de la capacidad de carga

Después, se investigó la capacidad de carga para diferentes tipos de SP utilizando FITC-lisozima a diferentes concentraciones de carga con un tiempo de incubación de 3 días (Figura 4). En general, a medida que aumentaba la concentración de FITC-lisozima, aumentaba la cantidad de carga de fármaco. Los resultados muestran que las N MS-SP^{alg}, S MS-SP^{alg} y I MS-SP^{alg} que contienen alginato tenían mayores capacidades de carga que las N MS-SP, S MS-SP y I MS-SP sin alginato (a concentraciones comparables). Esto puede deberse al aumento de las interacciones electrostáticas entre la FITC-lisozima cargada positivamente y el alginato cargado negativamente alrededor del valor de pH neutro. Además, a una concentración de carga baja de FITC-lisozima ($< 0,4$ mg mL⁻¹), las I MS-SP^{alg} tenían una capacidad de carga de fármaco similar a la de las S MS-SP^{alg} y S MS-SP^{alg} no porosas, pero cuando la concentración fue mayor ($> 0,4$ mg mL⁻¹), se podía cargar más FITC-lisozima en las I MS-SP^{alg} en comparación con N MS-SP^{alg} y S MS-SP^{alg}. Para las MS-SP sin alginato se observó una tendencia similar: las I MS-SP podían cargar más FITC-lisozima que las N MS-SP y las S MS-SP. Estos resultados muestran que las grandes estructuras porosas (en I MS-SP y I MS-SP^{alg}) son factores clave para mejorar la carga de fármaco, probablemente al proporcionar superficies adicionales y, por lo tanto, carga y capacidad cuando las superficies externas de las partículas y las áreas intrapartículas (en las estructuras SP) han sido completamente saturadas por el fármaco. Además, la capacidad de carga también depende del diámetro de las MS-SP, donde las MS-SP más grandes (1000 μ m) tenían mayor capacidad de carga que las MS-SP más pequeñas (200 μ m) (Figura 5).

35

40

45

50

La cantidad de carga máxima determinada experimentalmente de FITC-lisozima en N MS-SP y S MS-SP^{alg} fue aproximadamente 3 μ g por SP y 2 μ g por SP respectivamente, que eran significativamente más bajas que I MS-SP con aproximadamente 15 μ g por SP (la concentración de FITC-lisozima fue de 1,5 mg mL⁻¹, y el tiempo de carga fue de 3 días). Además, la cantidad máxima de carga de FITC-lisozima determinada experimentalmente en las N MS-SP y las S MS-SP fue aproximadamente 2 μ g por SP y 1 μ g por SP respectivamente, que también fueron drásticamente menos que I MS-SP con aproximadamente 10 μ g por SP (la concentración de FITC-lisozima fue de 5,0 mg mL⁻¹, y el tiempo de carga fue de 3 días).

55

La eficiencia de carga de fármacos de seis SP diferentes se muestra en las Figuras 4c y 4d. A medida que aumentaba la concentración de carga de FITC-lisozima, se podía cargar más FITC-lisozima en las SP.

BDNF

- 5 Las MS-SP se esterilizaron sumergiéndolas en 100 μ l de etanol (80% vol/vol) durante 4 horas antes de enjuagarlas con 100 μ l de agua Milli-Q seis veces. Después, las MS-SP se lavaron una vez en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,1 M. Las MS-SP se cargaron colocándolas en un tubo Eppendorf que contenía 15 μ l de solución de BDNF (Geneway, BDNF Human Protein, Núm. Cat. 10-663-45078) (1 mg/mL de BDNF) e incubándolas a temperatura ambiente durante tres días con sacudimiento a mano ocasional. Sorprendentemente, se logró una carga de aproximadamente 10 μ g de BDNF.

Ejemplo 6 – Citotoxicidad de las suprapartículas

- 15 Para investigar si las MS-SP podrían aplicarse como portadores de fármacos biocompatibles, se realizaron estudios de citotoxicidad *in vitro* de MS-SP. Se incubaron células de glioblastoma de cerebro humano (línea celular U87MG) con MS-SP y se evaluó la viabilidad celular mediante un ensayo con Alamar Blue. Como se muestra en la Figura 6, las MS-SP no fueron tóxicas ni siquiera cuando el número de MS-SP se incrementó a diez por pocillo (1×10^4 células por pocillo). Los escenarios de tratamiento *in vivo* típicos de sistemas de partículas similares sugieren la administración de 1 a 8 SP por oído interno.

Ejemplo 7 - Liberación de fármaco

- 25 Basándose en los resultados de la capacidad de carga, se realizaron estudios de liberación de FITC-lisozima (tiempo de carga 3 días, concentración de carga 0,2 mg mL⁻¹) incubando diez MS-SP y diez MS-SP^{alg} en PBS (pH 7,4) a 37°C.

- 30 La SP cargadas con FITC-lisozima para los estudios de liberación *in vitro* se prepararon esterilizando las SP, seguido de incubación de diez MS-SP o diez MS-SP^{alg} con 100 μ L de solución de FITC-lisozima de 'baja concentración' (0,2 mg mL⁻¹ en agua Milli-Q). Después de tres días, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) a cada tubo y se incubaron a 37°C. A intervalos de tiempo definidos (más de 150 días), se recogieron 90 μ l de solución y se reemplazaron por PBS de nueva aportación. La fluorescencia de las muestras recolectadas se midió con un lector de microplacas Infinite M200 y utilizando una curva patrón, se pudo determinar a continuación la concentración de FITC-lisozima en el sobrenadante.

- 40 La carga de FITC-lisozima después de la carga en la solución de baja concentración fue de $1,89 \pm 0,02$ μ g y $1,93 \pm 0,01$ μ g por SP para MS-SP y MS-SP^{alg}, respectivamente. Como se muestra en la Figura 7a, se liberó >1 μ g de FITC-lisozima por las MS-SP durante más de 150 días, mientras que se liberó una cantidad menor de FITC-lisozima (~0,4 μ g por SP) de las MS-SP^{alg} durante este tiempo. Una posible razón para la menor cantidad de FITC-lisozima liberada por estas últimas es la presencia de alginato, que potencialmente puede bloquear los poros grandes de las partículas primarias de sílice o interactuar fuertemente con la lisozima, previniendo o inhibiendo la liberación de lisozima. Los valores individuales de liberación de FITC-lisozima medida en cada momento (que se utilizó para preparar los resultados acumulativos presentados en la Figura 7) se muestran en la Figura 8.

- 50 A medida que aumentaba la concentración de carga de fármaco utilizado para cargar la SP, se pudo cargar más fármaco en las MS-SP. Por lo tanto, se investigaron los perfiles de liberación de fármacos tanto para FITC-lisozima como para BDNF a una concentración de incubación más alta (1,0 mg mL⁻¹). La cantidad de carga de FITC-lisozima a esta concentración (1,0 mg mL⁻¹) fue de $6,49 \pm 0,48$ μ g por SP. El perfil de liberación de FITC-lisozima se observó en dos fases de liberación: liberación inmediata en los primeros tres días y liberación sostenida durante más de 110 días (Figura 7b). Se liberaron alrededor de 4,2 μ g de FITC-lisozima por SP en la etapa de liberación inmediata. Después de 3 días, ~2,3 μ g de FITC-lisozima (cantidad cargada - cantidad liberada durante la liberación inmediata) permanecieron cargados en las SP y posteriormente se observó un comportamiento de liberación más sostenido. Los valores individuales de FITC-lisozima liberada en cada momento fueron de decenas a cientos de nanogramos por SP (Figura 9). Como se muestra en la Figura 7c, el perfil de liberación *in vitro* de BDNF fue similar al de FITC-lisozima, observándose una liberación inmediata en los primeros tres días seguida de una liberación más sostenida durante más de 40 días. El valor acumulado liberado de las SP después de 40 días fue de ~4,68 μ g de fármaco y el peso de cada SP fue de ~0,05 mg. Por lo tanto, la liberación acumulada observada fue de aproximadamente 93,6 μ g mg⁻¹. Esta es una mejora de 4.000 veces en comparación con lo que se ha observado recientemente para las nanopartículas de sílice nanoporosa. Los valores individuales de BDNF liberados en cada momento oscilaron entre decenas y cientos de nanogramos por SP (Figura 10). La cantidad de BDNF liberado también se midió mediante un ensayo MicroBCA (Figura 11), con resultados similares.

- 65 Con el fin de investigar métodos potenciales para ajustar aún más el comportamiento de liberación de fármacos

y ayudar al suministro quirúrgico en el oído interno, se realizaron estudios de liberación de fármacos *in vitro* de MS-SP y MS-SP^{alg} incorporadas dentro de hidrogeles PF127. Los hidrogeles PF127 se forman como líquidos viscosos a temperaturas frías (p. ej., 4°C) y como gel a temperatura corporal (37°C). En estos estudios, se observó que la mayor parte de la FITC-lisozima se liberaba tanto de MS-SP como de MS-SP^{alg} (ambas en hidrogeles PF127) aproximadamente el día 14 (Figura 12), lo que indica una cinética de liberación acelerada. Por lo tanto, el sistema de suprapartícula-PF127 es adecuado cuando se desea una liberación del fármaco a corto plazo (~1 semana), mientras que las SP sin el hidrogel PF127 son más adecuadas para una liberación del fármaco a más largo plazo (varios meses).

- 10 También se llevaron a cabo experimentos *in vitro* para establecer la cinética de liberación de BDNF a lo largo del tiempo cuando las SP se cargaron aproximadamente al 50%. Según los datos de las lisozimas, la liberación de BDNF fue más lineal durante las primeras 4 semanas (p. ej., no hubo liberación inmediata; Figura 13).

Ejemplo 8 - Degradación de suprapartículas

- 15 Las partículas de sílice porosa que pueden degradarse en entornos biológicos (p. ej., en ácido silícico, que puede excretarse a través de la orina) y revisten interés para diversas aplicaciones biomédicas. Para investigar las tasas de degradación, se incubaron MS-SP durante 150 días (PBS, pH 7,4, 37°C) (Figura 14). Se observó una disminución de ~55% en el diámetro de las MS-SP y la forma/morfología de las MS-SP también cambió sustancialmente. Las partículas primarias de sílice en la superficie de las MS-SP cambiaron tanto de morfología como de tamaño.

Ejemplo 9 - Farmacocinética

- 25 Se llevaron a cabo estudios *in vivo* para determinar la carga útil del fármaco y la eliminación de neurotrofina suministrada en una suprapartícula implantada en el oído después de 4 horas, 3 días y 7 días de implantación. El objetivo era determinar la cantidad de neurotrofina que queda en la cóclea a lo largo del tiempo.

- 30 Se implantó 1 SP que contenía neurotrofina-3 radiomarcada en cada cóclea. Las cócleas se recolectaron después de 4 horas (n=5), 3 días (n=7) o 7 días (n=4). Se midieron los recuentos gamma cocleares completos para determinar la eliminación de neurotrofina-3 a lo largo del tiempo. La cantidad restante de neurotrofina-3 (% de la cargada) y el total en µg se muestran en la Figura 15. Después de 1 semana de implantación, cada SP contenía ~2µg de neurotrofina-3 (~40%) de la cantidad cargada inicial.

- 35 Se llevaron a cabo experimentos adicionales (n=2) para examinar la eliminación de neurotrofina-3 después del suministro a ventana redonda. Tres días después de la implantación, se utilizaron nuevamente mediciones cocleares completas para determinar el aclaramiento de neurotrofina-3 de la membrana de la ventana redonda. Se observó un nivel similar de eliminación utilizando la ventana redonda en comparación con el sitio de suministro intracoclear (47,4% de la neurotrofina-3 restante después del suministro a ventana redonda en comparación con 56% para el suministro intracoclear).

Estos datos muestran que se puede lograr una liberación prolongada de neurotrofina-3 con altos niveles de neurotrofina-3 todavía disponibles incluso después de 1 semana de tratamiento.

Referencias

- Clark GM, et al. (1984) Ann Otol Rhinol Laryngol 93:204-207
- Clark GM, et al. (1991) Ear and Hearing Suppl. 12:15S-24S
- 50 Cui et al. (2015) ACS Nano 9:1571-1580
- Jaworek (2007) Powder Technology 176(1), 18-35
- 55 Langer R (1990) Science. 249, 1527-1533
- Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. USA, 1991)
- Tan et al. (2012) Adv. Mater. 24: 3362-3366
- 60 Wang et al. (2009) J. Mater. Chem. 19: 6451-6464
- Wang et al. (2010) Chem Mater. 22: 3829-3831
- 65 Yang and Pierstorff (2012) JALA. 17, 50-58

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una suprapartícula, comprendiendo dicha suprapartícula nanopartículas de sílice mesoporosa y al menos una carga útil, en donde dicha carga útil es al menos 1,5 µg de un factor neurotrófico.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la suprapartícula comprende al menos 5 µg de carga útil.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde la suprapartícula comprende de 1,5 µg a 10 µg de carga útil.
4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la suprapartícula comprende poros que tienen un diámetro de al menos 50 nm, preferiblemente al menos 60 nm.
5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las suprapartículas tienen una estructura de poros desordenada.
6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la suprapartícula está compuesta de nanopartículas que tienen una estructura de poro bimodal, preferiblemente en donde la estructura de poro bimodal de las nanopartículas tiene un diámetro de poro grande superior a 30 nm.
7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el factor neurotrófico
 - (i) tiene un punto isoeléctrico entre 8 y 10;
 - (ii) es BDNF; o
 - (ii) es neurotrofina-3.
8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la suprapartícula comprende al menos 2, al menos 3, al menos 4 o al menos 5 cargas útiles diferentes.
9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la composición se proporciona como una formulación de liberación lenta, que comprende preferiblemente un hidrogel de glucógeno.
10. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde las suprapartículas se fabrican por electropulverización de una composición que comprende dichas nanopartículas y ácido algínico en una solución acuosa dicatiónica.
11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende ácido algínico $[(C_6H_8O_6)_n]$, preferiblemente sal sódica de ácido algínico $[Na(C_6H_8O_6)_n]$.
12. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para uso en el tratamiento de un trastorno en donde el trastorno es pérdida auditiva, y preferiblemente en donde dicha pérdida auditiva se caracteriza como pérdida auditiva neurosensorial (SNHL), presbiacusia o inducida por ruido.
13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para uso en la promoción de la supervivencia de las neuronas del ganglio espiral en el oído de un sujeto.
14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la suprapartícula tiene un diámetro de 150 µm a 1000 µm.
15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la composición se puede obtener electropulverizando una composición que comprende dichas nanopartículas y ácido algínico en una solución acuosa dicatiónica y cargar las suprapartículas así producidas con al menos 1,5 µg de un factor neurotrófico.
16. Un método para fabricar la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende electropulverizar una composición que comprende dichas nanopartículas y ácido algínico en una solución acuosa dicatiónica y cargar las suprapartículas así producidas con al menos 1,5 µg de un factor neurotrófico.
17. El método de la reivindicación 16, que comprende además someter las suprapartículas a calcinación para eliminar ácido algínico, preferiblemente en donde la calcinación se realiza a alrededor de 650°C o durante aproximadamente 6 a aproximadamente 30 horas.

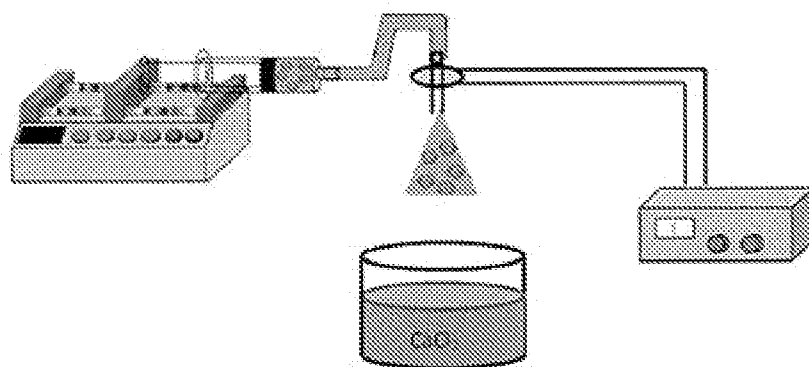


FIGURA 1

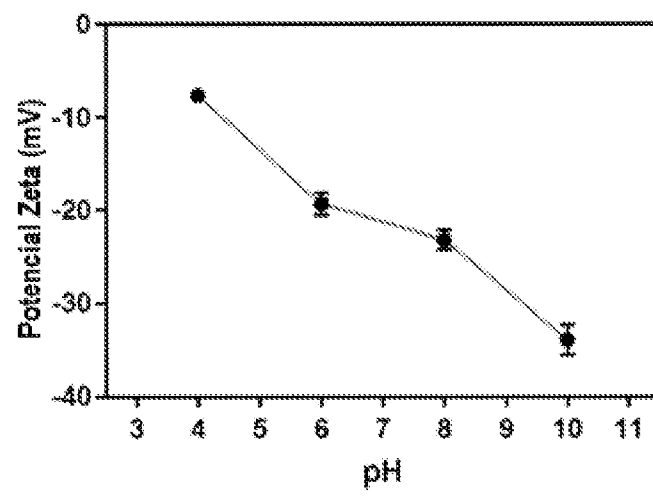


FIGURA 2

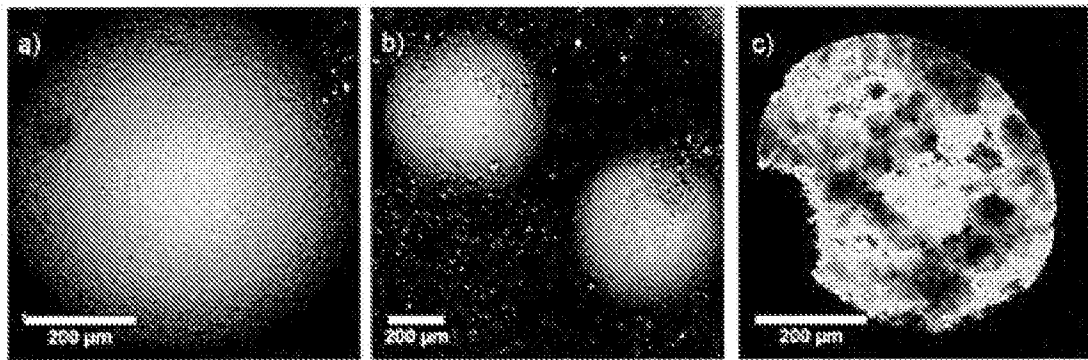


FIGURA 3

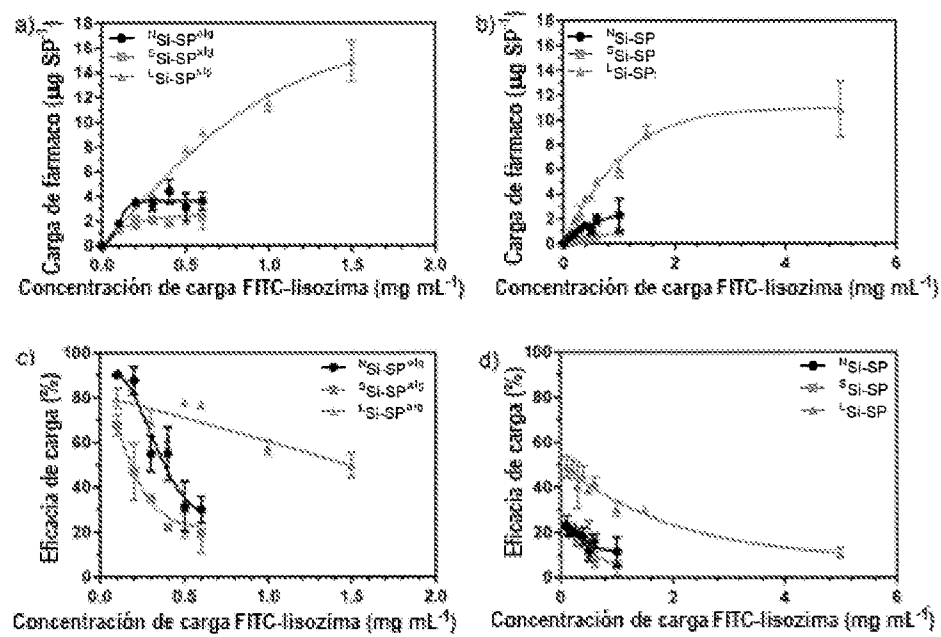


FIGURA 4

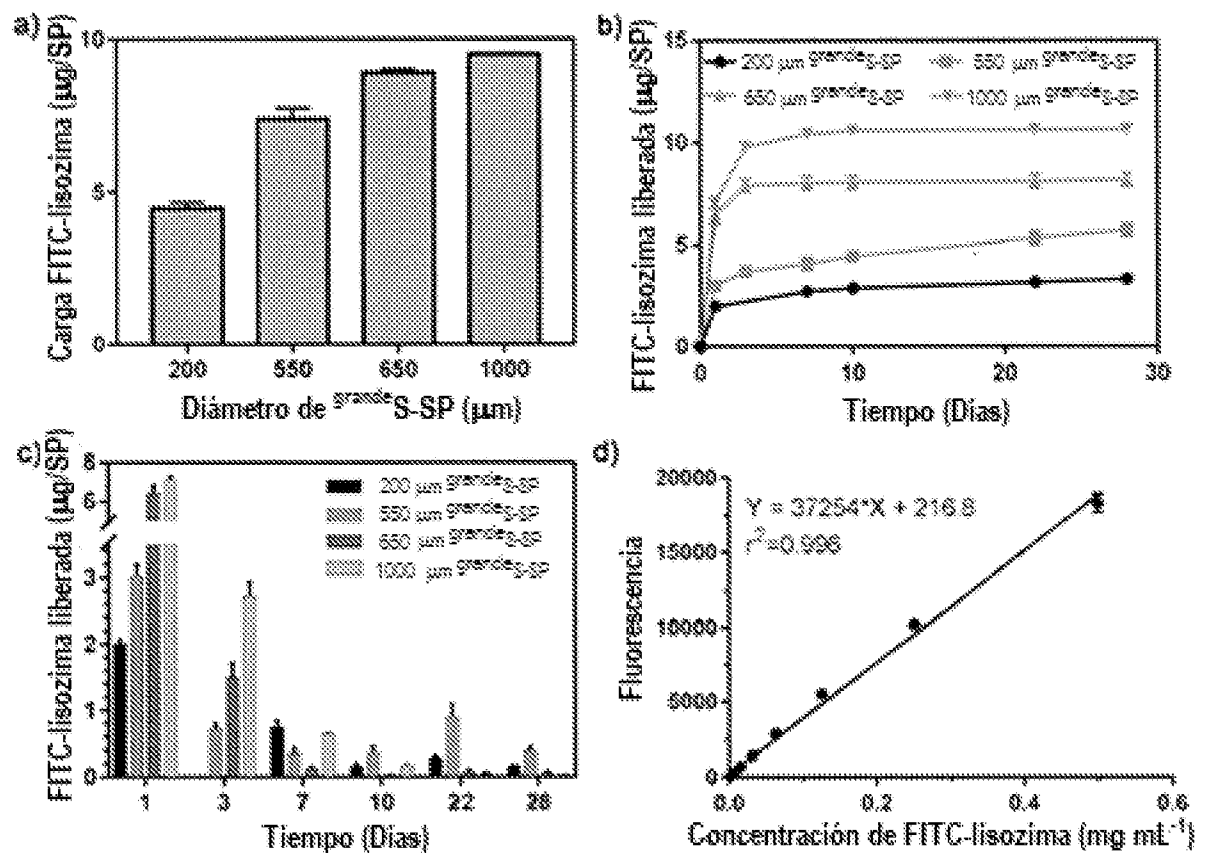


FIGURA 5

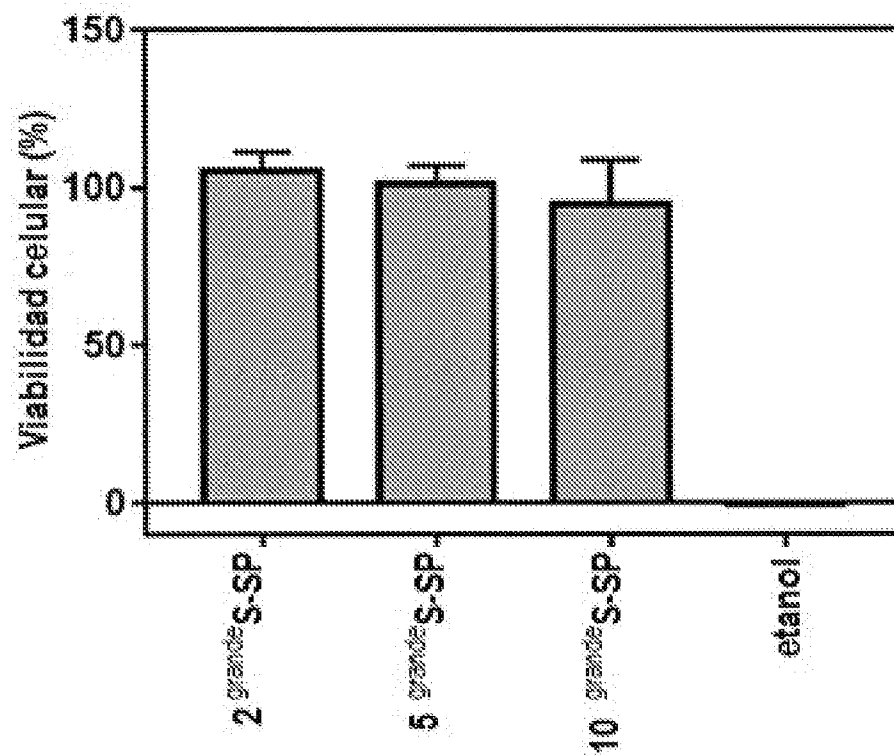


FIGURA 6

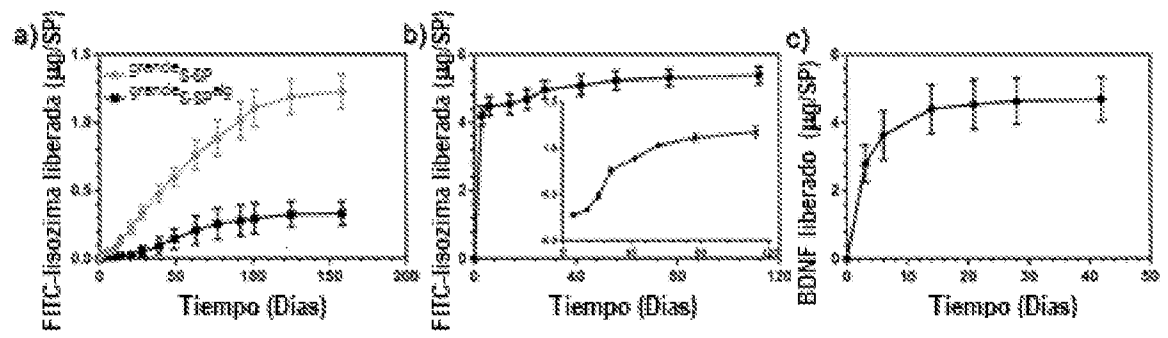


FIGURA 7

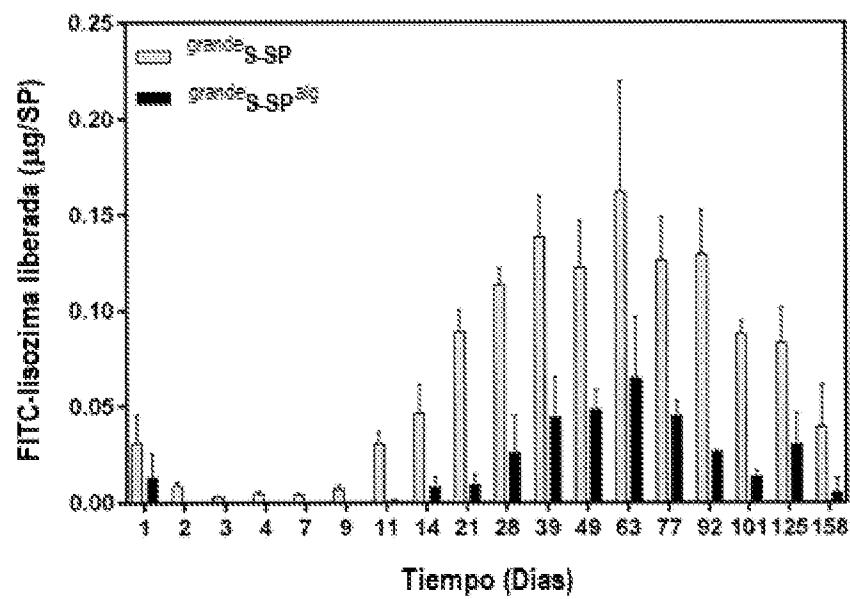


FIGURA 8

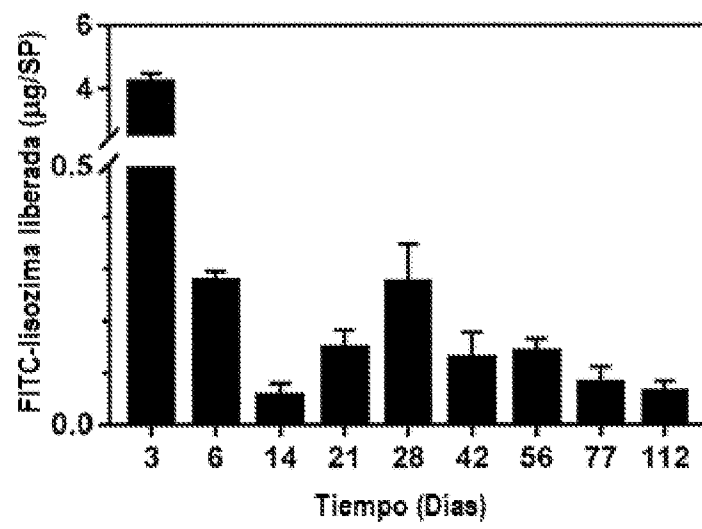


FIGURA 9

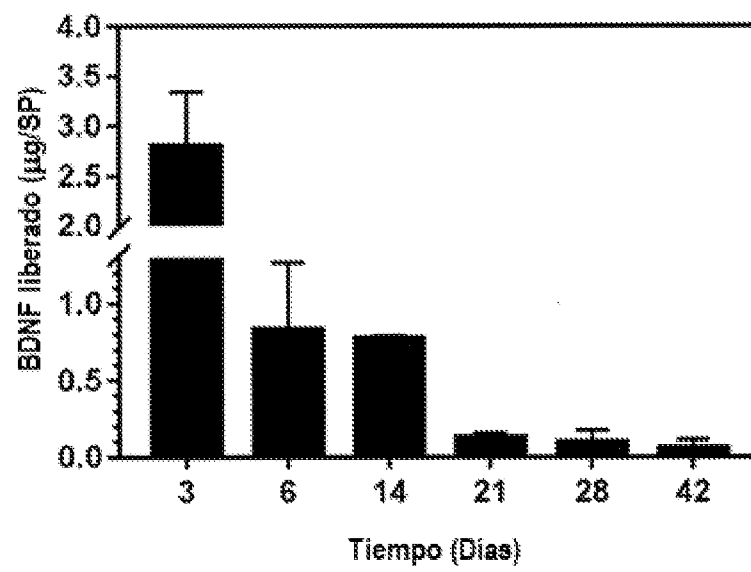


FIGURA 10

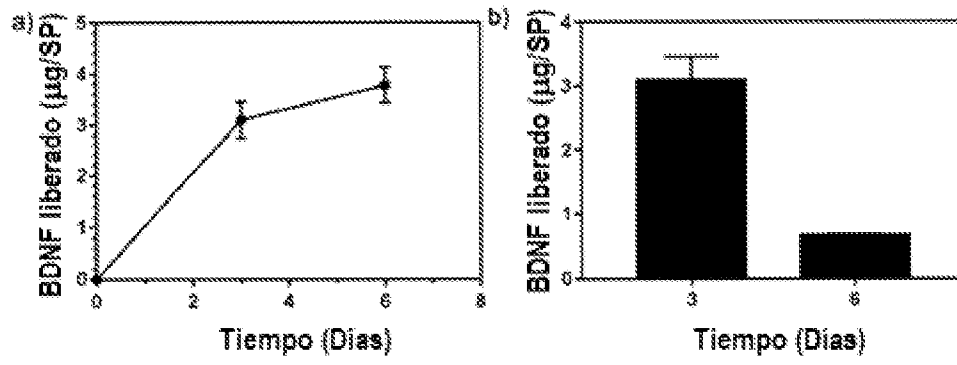


FIGURA 11

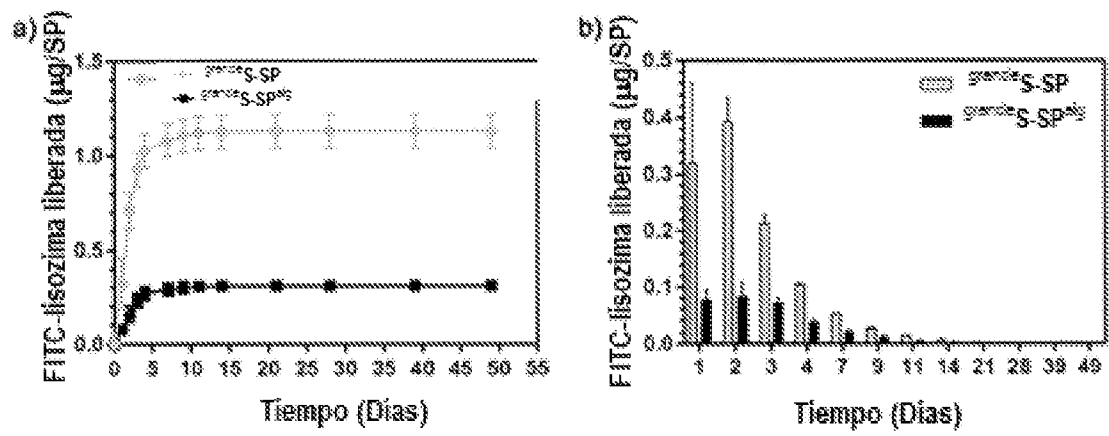


FIGURA 12

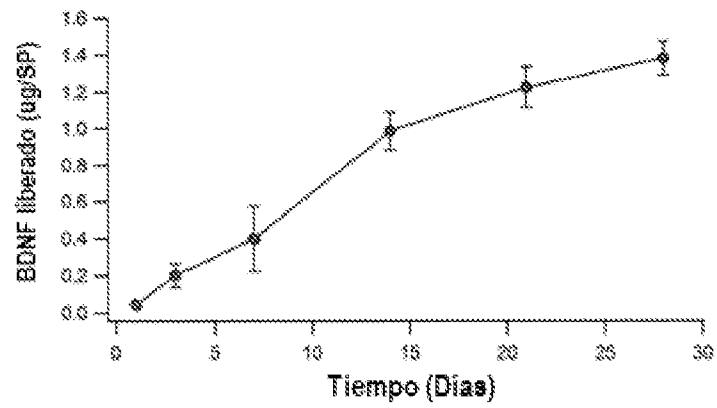


FIGURA 13

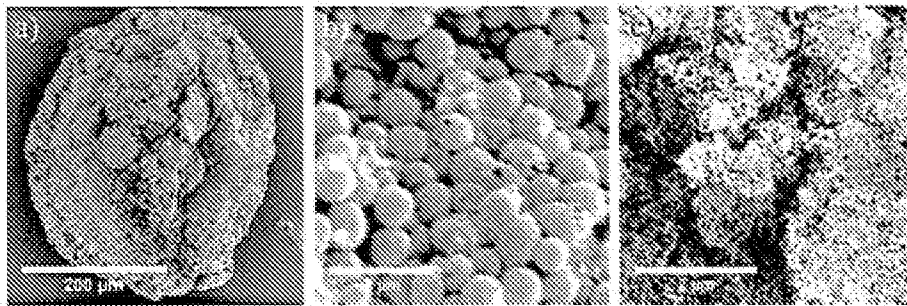


FIGURA 14

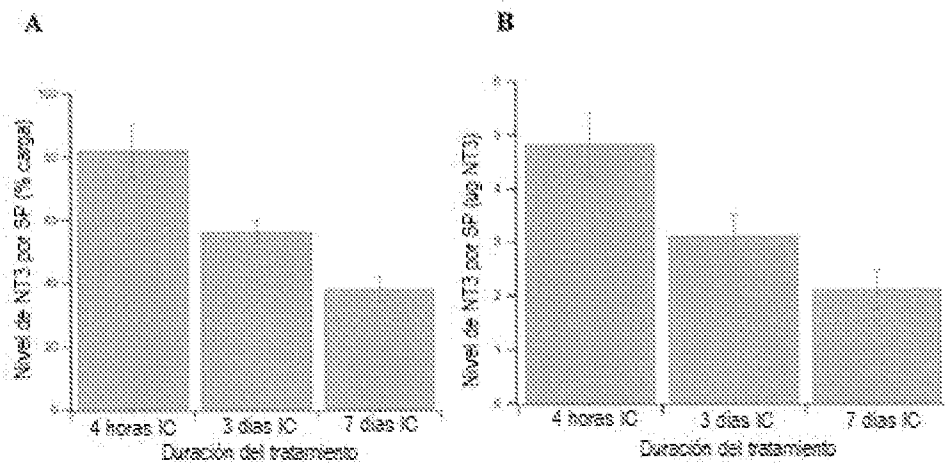


FIGURA 15