

DESCRIPCIÓN

SISTEMA DE SUMINISTRO DE INSULINA SENSIBLE A LA GLUCOSA
USANDO NANOCOMPUESTOS SENSIBLES A LA HIPOXIA

5

SOLICITUDES RELACIONADAS

10

La presente solicitud reivindica prioridad a y el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los EE.UU. N.º 62/150,622, presentada el 21 de abril de 2015, la descripción de la cual se incorpora en el presente documento por referencia en su integridad.

CAMPO TÉCNICO

15

20

La materia objeto que ahora se desvela se refiere a sistemas y composiciones, tales como vesículas, nanopartículas, microagujas y matrices de microagujas, para el suministro sensible a la glucosa de agentes de tratamiento de la diabetes, tal como insulina y/o derivados bioactivos de la misma. La materia objeto que se desvela ahora se refiere a procedimientos de preparación de las composiciones y procedimientos de suministro de agentes de tratamiento de la diabetes a un sujeto que lo necesite.

25

ABREVIATURAS

°C	=	grados Celsius
%	=	porcentaje
µl	=	microlitro
µm	=	micrómetro o micra
µs	=	microsegundos

	2	
a.u.	=	unidades de absorbancia
BOC	=	<i>terc</i> - butiloxicarbonilo
CD	=	dicroísmo circular
DI	=	desionizado
dI	=	decilitro
DLS	=	dispersión dinámica de luz
DMF	=	dimetilformamida
EDC	=	hidrocloruro de N- (3- dimetilaminopropil)- N'-etilcarbodiimida
ELISA	=	inmunoabsorción ligado a enzimas
FESEM	=	microscopio electrónico de barrido de emisión de campo
FITC	=	isotiocianato de fluoresceína
GOx	=	glucosa oxidasa
VGF	=	vesícula sensible a la glucosa
h	=	hora
AH	=	ácido hialurónico
SH	=	sensible a la hipoxia
UI	=	unidades internacionales

KCI	=	cloruro de potasio
K ₂ CO ₃	=	carbonato de potasio
kDa	=	kilodalton
kg	=	kilogramo
KH ₂ PO ₄	=	fosfato de monopotasio
CC	=	capacidad de carga
MBA	=	bisacrilamida de N,N'-metileno
mg	=	miligramo
AH-m	=	ácido hialurónico modificado con acrilato
min	=	minutos
ml	=	mililitro
mm	=	milímetro
mM	=	milimolar
MA	=	microaguja
mV	=	milivoltio
N	=	Newton
NaCl	=	cloruro de sodio
NADPH	=	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Na ₂ HPO ₄	=	fosfato de disodio
NHS	=	N-hidroxisuccinimida
NI	=	2-nitroimidazol
nm	=	nanómetro
RMN	=	resonancia magnética nuclear
O ₂	=	oxígeno

		tampón fosfato
PBS	=	salino
pI	=	punto isoeléctrico
TA	=	temperatura ambiente
		microscopio
MEB	=	electrónico de barrido
STZ	=	estreptozotocina
		microscopio
MET	=	electrónico de transmisión
UV	=	ultravioleta
Zn	=	zinc

ANTECEDENTES

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas
5 caracterizada por la acumulación de glucosa en sangre. Véase
Pickup y col., Diabetes-Metabolism Research and Reviews, 24,
604-610 (2008); y Stumvoll y col., Lancet, 365, 1333-1346
(2005). En el 2014, 387 millones de personas padecen diabetes
en todo el mundo y se estima que el número aumentará a 592
10 millones en 2035. Véase Mo y col., Chemical Society Reviews,
43, 3595-3629 (2014); y Tabák y col., Lancet, 379, 2279-2290
(2012). El cuidado tradicional para los diabéticos implica el
control continuo de los niveles de glucosa en sangre y las
consiguientes inyecciones de insulina para mantener la
15 normoglucemia. Véase Owens y col., Lancet, 358, 739-746 (2001).
Sin embargo, tal autoadministración puede asociarse con dolor
y un control de glucosa limitado. Véase Bratlie y col.,
Advanced Healthcare Materials, 1, 267-284 (2012); y Ravaine y

col., Journal of Controlled Release, 132, 2-11 (2008).

En la última década, se ha intentado realizar el desarrollo de dispositivos de inyección transdérmica con agujas a micro-
5 escala para el suministro de insulina. Véase Martanto y col., Pharmaceutical Research 21, 947-952 (2004); Narayan, J. Biomedical Nanotechnology, 10, 2244-2260 (2014); Ling y col., Acta Biomaterialia, 9, 8952-8961 (2013); Prausnitz y col., Nature Biotechnology, 26, 1261-1268 (2008); y Yang y col.,
10 Nature Communications, 4, (2013), doi 10.1038/ncomms2715. Sin embargo, aún existe la necesidad de sistemas de suministro de insulina adicionales y composiciones relacionadas, en particular para sistemas de suministro de "bucle cerrado" que pueden suministrar insulina a un sujeto rápidamente en
15 respuesta a cambios en glucosa en sangre y con apenas dolor.

SUMARIO

En algunas realizaciones, la materia objeto que ahora se
20 desvela proporciona una composición que comprende: (a) un material polimérico anfifílico, en el que el material polimérico anfifílico comprende un polímero hidrófilo conjugado con un grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia, en el que el grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia comprende un
25 resto sensible a la hipoxia que puede reducirse en la presente de un entorno hipóxico para formar un resto hidrófilo; (b) un agente de tratamiento de la diabetes, en el que opcionalmente el agente de tratamiento de la diabetes es una insulina o un derivado bioactivo de la misma; y (c) un agente oxidante de
30 glucosa.

En algunas realizaciones, el polímero hidrófilo es biodegradable. En algunas realizaciones, el polímero hidrófilo es un poliaminoácido, tal como ácido poliglutámico, un copolímero en bloque sintético o un polisacárido, en el que
5 opcionalmente el polímero hidrófilo es un polisacárido, en el que opcionalmente de forma adicional el polisacárido es un glucosaminoglicano. En algunas realizaciones, el polímero hidrófilo es un ácido hialurónico.

10 En algunas realizaciones, el resto sensible a la hipoxia comprende un nitroimidazol. En algunas realizaciones, el grupo hidrofóbico está unido de forma covalente con el polímero hidrófilo. En algunas realizaciones, el material polimérico anfifílico comprende un polímero hidrófilo conjugado con un
15 grupo amino de un precursor de grupo hidrofóbico sustituido con amino, formando de este modo una amida entre dicho grupo amino y un grupo de ácido carboxílico presente sobre el polímero hidrófilo. En algunas realizaciones, el material polimérico anfifílico comprende ácido hialurónico conjugado
20 con 6-(2-nitroimidazol)hexilamina.

En algunas realizaciones, el agente oxidante de glucosa es glucosa oxidasa (GOx). En algunas realizaciones, el agente de tratamiento de la diabetes es una insulina o un derivado
25 bioactivo de la misma, en el que la insulina o el derivado bioactivo de la misma se selecciona a partir de insulina humana, una insulina humana recombinante, insulina a partir de un animal no humano, una insulina de acción rápida, un análogo de insulina de acción breve, una insulina de acción intermedia
30 y/o una insulina de acción prolongada. En algunas realizaciones, el agente de tratamiento de la diabetes es

insulina humana recombinante. En algunas realizaciones, el material polimérico anfifílico forma una vesícula que encapsula dicho agente de tratamiento de la diabetes y dicho agente oxidante de glucosa.

5

En algunas realizaciones, la materia objeto que ahora se desvela proporciona una nanopartícula que comprende: (a) un material polimérico anfifílico, en el que el material polimérico anfifílico comprende un polímero hidrófilo
10 conjugado con un grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia, en el que el grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia comprende un resto sensible a la hipoxia que puede reducirse en la presente de un entorno hipóxico para formar un resto hidrófilo; (b) un agente de tratamiento de la diabetes, opcionalmente una
15 insulina o un derivado bioactivo de la misma; y (c) un agente oxidante de glucosa.

En algunas realizaciones, la materia objeto que ahora se desvela proporciona una vesícula que comprende un material
20 polimérico anfifílico que comprende un polímero hidrófilo conjugado con un grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia, en el que dicho grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia comprende un resto sensible a la hipoxia que es capaz de reducirse en un entorno hipóxico para formar un resto hidrófilo y
25 adicionalmente en el que (i) un agente de tratamiento de la diabetes, opcionalmente una insulina o un derivado bioactivo de la misma y (ii) un agente oxidante de glucosa están contenido dentro de dicha vesícula. En algunas realizaciones, el polímero hidrófilo es un poliaminoácido, tal como ácido poliglutámico,
30 un copolímero en bloque sintético o un polisacárido, tal como un glucosaminoglicano, opcionalmente en el que el polímero

hidrófilo es ácido hialurónico. En algunas realizaciones, el resto sensible a la hipoxia comprende un nitroimidazol. En algunas realizaciones, el agente de tratamiento de la diabetes es insulina humana recombinante. En algunas realizaciones, el agente oxidante de glucosa es glucosa oxidasa (GOx).

En algunas realizaciones, la materia objeto que ahora se desvela proporciona una matriz de microagujas que comprende una vesícula que comprende un material polimérico anfifílico que comprende un polímero hidrófilo conjugado con un grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia, en el que dicho grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia comprende un resto sensible a la hipoxia que es capaz de reducirse en un entorno hipóxico para formar un resto hidrófilo y adicionalmente en el que (i) un agente de tratamiento de la diabetes, opcionalmente una insulina o un derivado bioactivo de la misma y (ii) un agente oxidante de glucosa están contenido dentro de dicha vesícula. En algunas realizaciones, la matriz de microagujas comprende una pluralidad de microagujas en las que dicha pluralidad de microagujas tiene una longitud de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 1000 micrómetros. En algunas realizaciones, cada una de la pluralidad de microagujas tiene una longitud de aproximadamente 600 micrómetros.

En algunas realizaciones, la matriz de microagujas se proporciona como parte de un parche cutáneo, en el que opcionalmente dicho parche comprende una o más capas exteriores y/o adhesivos compatibles con la piel.

En algunas realizaciones, la materia objeto que ahora se desvela proporciona un sistema de suministro de insulina de

bucle cerrado que comprende una matriz de microagujas que comprende una vesícula que comprende un material polimérico anfifílico que comprende un polímero hidrófilo conjugado con un grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia, en el que dicho grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia comprende un resto sensible a la hipoxia que es capaz de reducirse en un entorno hipóxico para formar un resto hidrófilo y adicionalmente en el que (i) una insulina o derivado bioactivo de la misma y (ii) un agente oxidante de glucosa están contenidos en dicha vesícula.

En algunas realizaciones, la materia objeto que ahora se desvela proporciona un procedimiento de suministro de un agente de tratamiento de la diabetes a un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento (a) proporcionar una matriz de microagujas que comprende una vesícula que comprende un material polimérico anfifílico que comprende un polímero hidrófilo conjugado con un grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia, en el que dicho grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia comprende un resto sensible a la hipoxia que es capaz de reducirse en un entorno hipóxico para formar un resto hidrófilo y adicionalmente en el que (i) un agente de tratamiento de la diabetes, opcionalmente una insulina o un derivado bioactivo de la misma y (ii) un agente oxidante de glucosa están contenidos en dicha vesícula y (b) aplicar dicha matriz a una superficie cutánea de dicho sujeto, en la que la glucosa entra en contacto con la matriz de microagujas, se oxida, creando de este modo un entorno hipóxico que resulta en la reducción del resto sensible a la hipoxia para formar un resto hidrófilo, conduciendo a la interrupción de las vesículas y liberación del agente de tratamiento de la diabetes contenido

en las vesículas.

En algunas realizaciones, el suministro del agente de tratamiento de la diabetes se encuentra a un intervalo que se
5 corresponde con la concentración de glucosa que entra en contacto con la matriz de microagujas. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es diabético.

10 En algunas realizaciones, la materia objeto que ahora se desvela proporciona un procedimiento de preparación de una matriz de microagujas para el suministro sensible a la glucosa de un agente de tratamiento de la diabetes, opcionalmente una insulina o un derivado bioactivo de la misma, comprendiendo el
15 procedimiento: (a) preparar una solución acuosa de una vesícula que comprende un material polimérico anfifílico que comprende un polímero hidrófilo conjugado con un grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia, en el que dicho grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia comprende un resto sensible a la hipoxia
20 que es capaz de reducirse en un entorno hipóxico para formar un resto hidrófilo y adicionalmente en el que (i) un agente de tratamiento de la diabetes, opcionalmente una insulina o un derivado bioactivo de la misma y (ii) un agente oxidante de glucosa están contenidos dentro de dicha vesícula; (b)
25 dispersar dicha solución acuosa dentro de un molde que comprende una pluralidad de cavidades de microagujas, proporcionando de este modo un molde cargado; (c) secar el molde cargado para retirar agua; y (d) retirar el molde para proporcionar una matriz de microagujas. En algunas
30 realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente reticular materiales poliméricos en la matriz de microagujas.

En algunas realizaciones, la reticulación se realiza mediante exposición a radiación ultravioleta (UV).

En algunas realizaciones, la etapa (b) se realiza al vacío.

5 En algunas realizaciones, después de la etapa (b), el molde se centrifuga para compactar las micelas dentro de las cavidades de las microagujas.

En algunas realizaciones, antes de la etapa (c), se añaden
10 al molde un polímero hidrófilo adicional y/o un reticulante químico, en el que opcionalmente el molde se centrifuga después de la adición del polímero hidrófilo adicional y/o reticulante químico, en el que opcionalmente de forma adicional el polímero hidrófilo adicional es un ácido hialurónico modificado, tal
15 como un ácido hialurónico modificado por alquileno y/o modificado por acrilato. En algunas realizaciones, la etapa (c) se realiza en un desecador al vacío. En algunas realizaciones, el molde comprende silicona.

20 Por consiguiente, es un objeto de la materia objeto que ahora se desvela proporcionar composiciones, vesículas, nanopartículas, microagujas, matrices de microagujas, sistemas y procedimientos para el suministro sensible de glucosa de un agente de tratamiento de la diabetes, tal como una insulina
25 y/o un derivado de la misma, así como procedimiento de preparación de las matrices de microagujas. Ese y otros objetos se logran en su totalidad o en parte mediante la materia objeto que ahora se desvela.

30 Un objeto de la materia objeto que ahora se desvela que se ha descrito anteriormente, otros objetos y ventajas de la

materia objeto que ahora se desvela será evidente para los expertos en la materia después de un estudio de la siguiente descripción de la materia objeto que ahora se desvela y de las figuras y ejemplos no limitantes.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1A es un dibujo esquemático que muestra la formación de un sistema de suministro de insulina sensible a la glucosa que comprende una vesícula sensible a la hipoxia, también denominada en el presente documento como vesícula sensible a la glucosa (VGF), preparada usando ácido hialurónico (AH) sensible a la hipoxia (SH) y cargada con insulina y una enzima oxidante de glucosa, es decir, glucosa oxidasa (GOx); la reducción de un resto sensible a la hipoxia hidrofóbico, es decir, 2-nitroimidazol (NI), en las VGF para formar restos hidrófilos (2-aminoimidazol) desencadenados por la hipoxia causada por la oxidación de GOx de glucosa; y el siguiente desmontaje de las VGF y liberación de insulina a partir de las VGF.

La figura 1B muestra dibujos esquemáticos de un parche de matriz de microagujas que contiene una vesícula sensible a la glucosa (VGF) para el suministro de insulina *in vivo* desencadenado por un estado de hiperglucemia. Las microagujas pueden comprender las VGF descritas para la figura 1A y el parche puede aplicarse a la piel. En un estado de normoglucemia, se libera poca insulina; pero en un estado hiperglucémico, se desencadena una liberación de insulina a partir de las microagujas.

La figura 2A es una serie de imágenes de microscopio electrónico de transmisión (MET) de vesículas sensibles a la glucosa (VGF) cargadas con insulina y glucosa oxidasa (i) antes de su incubación en una solución de glucosa de 400 miligramos por decilitro (mg/dl), (ii) después de veinte minutos de incubación en una solución de glucosa de 400 mg/dl, (iii) después de una hora de incubación en una solución de glucosa de 400 mg/dl, o (iv) después de 24 horas de incubación en una solución de glucosa de 400 mg/dl.

10

La figura 2B es un gráfico de barras que muestra la distribución de tamaño de las vesículas sensibles a glucosa (VGF) antes de su incubación en una solución de glucosa de 400 miligramos por decilitro (mg/dl).

15

La figura 2C es un gráfico de barras que muestra la distribución de tamaño de vesículas sensibles a glucosa (VGF) después de su incubación en una solución de glucosa de 400 miligramos por decilitro (mg/dl) durante 24 horas.

20

La figura 2D es una imagen de 2,5 de fluorescencia dimensional (2,5D) de una solución de vesículas sensibles a glucosa (VGF) cargadas con insulina de isotiocianato de fluoresceína (FITC) antes de su incubación en una solución de glucosa de 400 miligramos por decilitro (mg/dl).

25

La figura 2E es una imagen de 2,5 de fluorescencia dimensional (2,5 D) de vesículas sensibles a glucosa (VGF) cargadas con insulina de isotiocianato de fluoresceína (FITC) después de su incubación en una solución de glucosa de 400 miligramos por decilitro (mg/dl) durante 1 hora a 37 grados Celsius (°C).

30

La Figura 2F es un gráfico que muestra la durabilidad del perfil de fosforescencia de vesículas sensibles a glucosa (VGF) incubadas en soluciones de glucosa que contienen distintas concentraciones de glucosa y que contienen una sonda molecular de concentración de oxígeno. Se proporcionan los datos para las VGF incubadas en una solución de glucosa de 100 miligramos por decilitro (mg/dl) (círculos rellenos) y en una solución de glucosa de 400 mg/dl (triángulos rellenos). Por comparación, se proporcionan datos para las VGF incubadas en tampón de fosfato salino (PBS) sin glucosa (cuadrados rellenos).

La figura 2G es un gráfico que muestra el tiempo de dependencia de absorción ultravioleta (UV) (a 330 nanómetros (nm)) de vesículas sensibles a glucosa (VGF) en diversas soluciones de glucosa a 37 grados Celsius (°C). Se proporcionan los datos para las VGF incubadas en una solución de glucosa de 100 miligramos por decilitro (mg/dl) (círculos rellenos) y en una solución de glucosa de 400 mg/dl (triángulos rellenos). Por comparación, se proporcionan datos para las VGF incubadas en tampón de fosfato salino (PBS) sin glucosa (cuadrados rellenos). Las barras de error indican la desviación estándar (d.e) para tres replicados.

La figura 3A es un gráfico que muestra la liberación de insulina acumulada *in vitro* a partir de vesículas sensibles a glucosa (VGF) incubadas en distintas soluciones de glucosa de diversa concentración de glucosa (0 miligramos por decilitro mg/dl) de glucosa (es decir, PBS, cuadrados rellenos); 100 mg/dl de glucosa (círculos rellenos); y 400 mg/dl de glucosa (triángulos rellenos) a 37 grados Celsius (°C).

La figura 3B es un gráfico que muestra los perfiles autorregulados de vesículas sensibles a glucosa (VGF) que contienen glucosa oxidasa (GOx) e insulina (VGF (E+I), círculos abiertos) y VGF similares que contienen la mitad de cantidad de GOx (VGF(1/2E+I), círculos rellenos). La cantidad de liberación de insulina se muestra como una función de concentración de glucosa (es decir, 100 miligramos por decilitro (mg/dl), 200 mg/dl o 400 mg/dl).

10

La figura 3C es un perfil de liberación pulsátil de vesículas sensibles a glucosa (VGF) expuestas secuencialmente a una solución de glucosa de 100 miligramos por decilitro (mg/dl) durante diez minutos y a continuación una solución de glucosa de 400 mg/dl durante diez minutos durante varias repeticiones.

15

La figura 3D es un espectro de dicroísmo circular (DC) de una solución de insulina nativa (círculos abiertos) y de una solución de insulina liberada a partir de vesículas sensibles a la glucosa (VGF) incubadas en una solución de glucosa de 400 miligramos por decilitro (mg/dl) (círculos rellenos). Las barras de error muestran la desviación estándar para tres replicados.

20

La figura 4A es un dibujo esquemático de un procedimiento de fabricación para parche de matriz de microagujas (MA) cargado con vesículas sensibles a la glucosa (VGF) de la materia objeto que ahora se desvela a partir de un molde de silicona.

25

30

La figura 4B es una fotografía de una matriz de microagujas

(MA) ilustrativa de la materia objeto que ahora se desvela. La barra de escala en la parte inferior derecha de la fotografía represente 1 centímetro (cm).

5 La figura 4C es una imagen microscópica de fluorescencia de microagujas (MA) cargadas con vesículas sensibles a glucosa (VGF) que contienen insulina marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). La inserción es una imagen más cerca de una de las microagujas. La barra de escala representa 200
10 micrómetros (μm).

La figura 4D es una imagen de microscopio electrónico de barrido (MEB) de una matriz de microagujas ilustrativa (MA) de la materia objeto que ahora se desvela. La barra de escala
15 representa 200 micrómetros (μm).

La figura 4E es un gráfico que representa el comportamiento mecánico de microagujas (MA) cargadas con vesículas sensible a glucosa (VGF) reticuladas y no reticuladas.
20

La figura 5A es un grupo de imágenes de: (superior izquierda) el dorso de un ratón y piel relevante (el área dentro del círculo) tratada transcutáneamente con un parche de matriz de microagujas (MA) de la materia objeto que ahora se
25 desvela; (superior derecha) mancha azul tripán que muestra la permeación de las MA de la piel del ratón; y (inferior) sección manchada de hematoxilina y eosina (H&E) de piel de ratón penetrada por una de las MA. En la imagen superior derecha, la barra de escala representa 500 micrómetros (μm). En la imagen
30 inferior, la barra de escala representa 100 micrómetros (μm); los tejidos musculares y grasos se indican mediante "M" y "G",

respectivamente; y la región en la que se produce la inserción de MA se indica mediante la línea discontinua.

La figura 5B es un gráfico de los niveles de glucosa en sangre durante estudios *in vivo* de tratamiento con parche de matriz de microagujas (MA) cargado con vesículas sensibles a glucosa (VGF) para la diabetes tipo I en ratones diabéticos con estreptozotocina inducida (STZ). Se proporcionan datos para los ratones tratados con MA vacías (MA que no contienen insulina o una enzima, triángulos abiertos); MA cargada solo con VGF que contienen insulina recombinante humana (VGF(I), círculos rellenos); MA cargada con VGF que contiene insulina y enzima de glucosa oxidasa (VGF(E+I), cuadrados rellenos); y MA cargada con insulina y media cantidad de enzima (VGF(1/2E+I), cuadrados abiertos). Como un control, se proporcionan datos para ratones tratados mediante inyección de insulina (círculos abiertos).

La figura 5C es un gráfico de concentraciones de insulina de plasma durante estudios *in vivo* de tratamiento con parche de matriz de microagujas (MA) cargado con vesículas sensibles a glucosa para la diabetes tipo I en ratones diabéticos con estreptozotocina inducida (STZ). Se proporcionan datos para ratones tratados con una matriz de MA cargada solo con insulina recombinante humana (VGF(I), triángulos rellenos); una matriz de MA cargada con insulina y enzima de glucosa oxidasa (VGF(E+I), cuadrados rellenos); y una matriz de MA cargada con insulina y media cantidad de la enzima (VGF(1/2E+I), círculos rellenos).

30

La figura 5D es una imagen de microscopio electrónico de

barrido (MEB) de un parche de matriz de microagujas (MA) cargado con vesículas sensibles a glucosa (VGF) después de su inserción en el dorso de un ratón durante 4 horas. Las MA se cargaron con VGF que contenía insulina y enzima de glucosa oxidasa (es decir, VGF(E+I)). La barra de escala representa 200 micrómetros (μm).

La figura 5E es un gráfico de los datos obtenidos en una prueba in vivo de tolerancia a la glucosa en sangre en ratones diabéticos una hora después de la administración de un parche de matriz de microagujas (MA) cargado con vesículas sensibles a glucosa (VGF) en las que las VGF contenían insulina y enzima de glucosa oxidasa (es decir, VGF(E+I), círculos rellenos). Por comparación, también se muestran datos de ratones sanos (cuadrados rellenos) y de ratones diabéticos una hora después de la administración de un parche de matriz de MA en el que las MA se cargan solo con insulina (triángulos rellenos).

La figura 5F es un gráfico que muestra la receptividad a glucosa inyectada intraperitonealmente en ratones de la prueba descrita en la figura 5E, calculada basándose en el área bajo la curva (AUC) en 120 minutos, con el valor basal establecido en la lectura de glucosa de cero minutos.

La figura 5G es un gráfico que muestra los cambios de glucosa en sangre en ratones tratados con administración adicional de un parche de matriz de microagujas (MA) una hora después de la administración de un parche de matriz de MA cargado con vesículas sensibles a glucosa (VGF), en el que el primer parche de matriz de MA cargado con VGF contenía VGF cargadas con insulina y enzima de glucosa oxidasa (es decir, VGF(E+I)). El

parche de matriz de MA adicional contenía VGF cargadas tanto
 con insulina como enzima de glucosa oxidasa (VGF(E+I) +
 VGF(E+I), cuadrados abiertos); las VGF cargadas con insulina y
 media enzima (VGF(E+I) + (VGF(1/2E+I), círculos cargados); o
 5 solo insulina (VGF(E+I) + insulina, círculos abiertos). Por
 comparación, también se proporcionan datos para ratones que no
 han recibido un segundo parche de matriz de MA (VGF(E+I),
 cuadrados rellenos). Las flechas negras indican los puntos de
 tiempo de administración del primer y segundo parche de matriz
 10 de MA.

La figura 5H es un gráfico de cambios de glucosa en sangre
 en ratones sanos tratados con parches de matriz de microagujas
 (MA) cargados con vesículas sensibles a glucosa (VGF) durante
 15 el tiempo. Se proporcionan los datos para ratones tratados con
 un parche de matriz de MA cargado con VGF en el que las VGF
 contenían tanto insulina como enzima de glucosa oxidasa
 (VGF(E+I), círculos rellenos) y en las que las VGF contenían
 solo insulina (VGF(I), triángulos rellenos). Por comparación,
 20 se proporcionan datos para ratones inyectados con insulina
 (Insulina, cuadrados rellenos). La flecha negra indica el punto
 de tiempo de administración.

La figura 5I es un gráfico de la ecuación del índice
 25 hipoglucémico de los ratones descritos en la figura 5H. El
 índice hipoglucémico se calculó a partir de la diferencia entre
 las lecturas de glucosa en sangre inicial y el punto más bajo
 dividido por el tiempo en el que se alcanzó el punto más bajo.
 *P<0,05 para administración con un parche de matriz de
 30 microagujas (MA) de vesículas sensibles a glucosa (VGF) que
 contiene VGF cargadas con enzima e insulina (VGF(E+I)) en

comparación con un parche de matriz de MA cargado con insulina (VGF(I)). Las barras de error indican la d.e. (n=5).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5

La materia objeto que ahora se desvela se describirá con más detalle en el presente documento a continuación en referencia a las figuras y ejemplos adjuntos, en los cuales se muestran las realizaciones representativas. La materia objeto
10 que ahora se desvela puede, sin embargo, materializarse en distintas formas y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones que se indican en el presente documento. En su lugar, estas realizaciones se proporcionan de modo que esta divulgación será exhaustiva y completa y reflejará por completo
15 el ámbito de las realizaciones para aquellos expertos en la materia. Ciertos componentes en las figures no se tienen que escalar necesariamente, en cambio el énfasis se pone en la ilustración de los principios de la materia objeto que ahora se desvela (en algunos casos esquemáticamente).

20

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido normalmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la materia objeto que ahora se describe. Todas las publicaciones, solicitudes de
25 patente, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su integridad.

30

A lo largo de toda la especificación y reivindicaciones, una fórmula química dada o nombre abarcará todos los activos ópticos y estereoisómeros, así como mezclas racémicas en los

que existen tales isómeros y mezclas.

I. DEFINICIONES

5 Mientras que los siguientes términos se cree que son bien entendidos por un experto habitual en la materia, se enumeran las siguientes definiciones para facilitar la explicación de la materia objeto que ahora se desvela.

10 Siguiendo la dilatada convención legislativa sobre patentes, los términos "un", "una", "el" y "la" se refieren a "uno o más" cuando se usan en la presente solicitud, reivindicaciones incluidas. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una composición" o "un polímero" incluye una
15 pluralidad de tales composiciones o polímeros, y así sucesivamente.

 A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de tamaño, condiciones de reacción y otros
20 usados en la especificación y reivindicaciones se deben entender como que están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos que se exponen en la presente especificación y reivindicaciones adjuntas son
25 aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se esperan obtener por la materia objeto que ahora se desvela.

 Tal como se usa en el presente documento, el término
30 "aproximadamente", cuando se refiere a un valor o a una cantidad de tamaño (es decir, diámetro), peso, concentración o

porcentaje, significa que abarca variaciones de un ejemplo en $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, en otro ejemplo $\pm 5\%$, en otro ejemplo $\pm 1\%$, ay aún en otro ejemplo $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los
5 procedimientos desvelados.

Tal como se usa en el presente documento, el término "y/o" cuando se usa en el contexto de una enumeración de entidades, se refiere a las entidades que están presentes de forma única
10 o en combinación. Por lo tanto, por ejemplo, la frase "A, B, C y/o D" incluye A, B, C y D individualmente, pero también incluye cualquier y todas las combinaciones y subcombinaciones de A, B, C y D.

15 El término "que comprende", que es sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por" es inclusivo y abierto y no excluye elementos o etapas de procedimiento adicionales o que no se citan. "Que comprende" es un término de la técnica usado en el lenguaje de las reivindicaciones que
20 significa que los elementos nombrados son esenciales, pero pueden añadirse otros elementos y aún formar un constructo dentro del ámbito de la reivindicación.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "que
25 consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación. Cuando la frase "que consiste en" aparece en una oración del cuerpo de la reivindicación, en lugar de seguirle inmediatamente el preámbulo, solo limita el elemento que se indica a continuación
30 en esa oración; no se excluyen otros elementos de la reivindicación como un todo.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "que consiste esencialmente en" limita el ámbito de una reivindicación a los materiales o etapas especificadas, además
 5 de aquellos que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y nueva(s) de la materia objeto reivindicada.

Con respecto a los términos "que comprende", "que consiste
 10 en" y "que consiste esencialmente en", en el que uno de estos términos se usa en el presente documento, la materia objeto que ahora se desvela y reivindica puede incluir el uso de cualquiera de los otros dos términos.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a C₁₋₂₀ incluido, lineal (es decir, "cadena lineal"), ramificado o cíclico, saturado o al menos parcialmente en algunos casos completamente insaturado (es decir, alqueno y alquino) cadenas de hidrocarburo, que
 20 incluye por ejemplo, grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *terc*-butilo, pentilo, hexilo, octilo, etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, octenilo, butadienilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, heptinilo y anelilo. "Ramificado" se refiere a un grupo alquilo
 25 en el que un grupo alquilo inferior, tal como metilo, etilo o propilo, está unido a una cadena de alquilo lineal. "Alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono (es decir, un alquilo C₁₋₈), por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 átomos de carbono.
 30 "Alquilo superior" se refiere a un grupo alquilo que tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 átomos de carbono, por

ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de carbono. En ciertas realizaciones, "alquilo" se refiere, en particular, a alquilos C₁₋₈ de cadena lineal. En otras realizaciones, "alquilo" se refiere, en particular, a alquilos C₁₋₈ de cadena ramificada.

Los grupos alquilo pueden sustituirse opcionalmente (un "alquilo sustituido") con uno o más sustituyentes de grupo alquilo, que puede ser el mismo o distinto. El término "sustituyente de grupo alquilo" incluye pero no está limitado a alquilo, alquilo sustituido a alquilo, halo, nitro, amino, arilamino, acilo, hidroxilo, arioxilo, alcoxilo, alquitío, aritío, aralquiloxilo, aralquitío, carboxilo, alcoxicarbonilo, oxo y cicloalquilo. Puede insertarse opcionalmente a lo largo de la cadena de alquilo uno o más de oxígeno, sulfuro o átomos de nitrógeno sustituido o no sustituido, en el que el sustituyente de nitrógeno es hidrógeno, alquilo inferior (también referido en el presente documento como "alquiloaminoalquilo") o arilo.

Por lo tanto, tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo sustituido" incluye grupos alquilo, tal como se define en el presente documento, en el que uno o más átomos o grupos funcionales del grupo alquilo se colocan con el otro átomo o grupo funcional, que incluye por ejemplo, alquilo, alquilo sustituido a alquilo, halógeno, arilo, arilo sustituido, alcoxilo, hidroxilo, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato y mercapto.

El término "arilo" se usa en el presente documento para referirse a un sustituyente aromático que puede ser un anillo aromático único o múltiples anillos aromáticos que se fusionan

juntos, unidos de forma covalente o unidos a un grupo común, tal como, pero sin estar limitado a, un resto de metileno o etileno. El grupo de unión común también puede ser un carbonilo, como en benzofenona u oxígeno, como en difeniléter o nitrógeno, como en difenilamina. El término "arilo" abarca específicamente compuestos aromático heterocíclicos. El/los anillo(s) aromático(s) pueden comprender fenilo, naftilo, bifenilo, difeniléter, difenilamina y benzofenona, entre otros. En realizaciones particulares, el término "arilo" significa un aromático cíclico que comprende aproximadamente de 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de carbono y que incluye anillos aromáticos herocíclicos y de hidrocarburo de 5 y 6 miembros.

El grupo arilo puede sustituirse opcionalmente (un "arilo sustituido") con uno o más sustituyentes de grupo arilo, que pueden ser los mismos o distintos, en el que el "sustituyente de grupo arilo" incluye alquilo, alquilo sustituido a alquilo, arilo, arilo sustituido, aralquilo, hidroxilo, alcóxilo, arioxilo, aralquilo, carboxilo, acilo, halo, nitro, alcóxicarbonilo, ariloxicarbonilo, aralcoxicarbonilo, aciloxilo, acilamino, aroilamino, carabamoilo, alquilcarbamoilo, dialquilcarbamoilo, aritío, alquitío, alquilenos y $-NR'R''$, en el que R' y R'' puede ser cada uno independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido a alquilo, arilo, arilo sustituido y aralquilo.

Por lo tanto, tal como se usa en el presente documento, el término "arilo sustituido" incluye grupos arilo, tal como se define en el presente documento, en el que uno o más átomos o grupos funcionales del grupo arilo se colocan con otro átomo o

grupo funcional, que incluye por ejemplo, alquilo, alquilo sustituido a alquilo, halógeno, arilo, arilo sustituido, alcoxilo, hidroxilo, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato y mercapto.

5

Entre los ejemplos específicos de grupos arilo se incluyen, aunque no de forma limitativa, ciclopentadienilo, fenilo, furano, tiofeno, pirrol, pirano, piridina, imidazol, benzimidazol, isotiazol, isoxazol, pirazol, pirazina,
 10 triazina, pirimidina, quinolina, isoquinolina, indole, carbazol y similares.

El término "aralquilo" se refiere a un grupo -alquilo-arilo, en el que opcionalmente el grupo alquilo y/o arilo comprende
 15 uno o más de sustituyentes de grupo alquilo o arilo.

En algunas realizaciones, el término "bivalente" se refiere a un grupo que puede unir (por ejemplo, unido de forma covalente) o está unido a otros dos grupos, tales como otros
 20 grupos alquilo, aralquilo, cicloalquilo o arilo. Normalmente, dos sitios distintos sobre el grupo bivalente (por ejemplo, dos átomos distintos) pueden unirse a grupos sobre otras moléculas. Por ejemplo, el grupo bivalente puede ser un grupo alquileno.

25

"Alquileno" puede referirse a un grupo de hidrocarburo alifático bivalente lineal o ramificado que tiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20
 30 átomos de carbono. El grupo alquileno puede ser lineal, ramificado o cíclico. El grupo alquileno también puede ser

opcionalmente insaturado y/o sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo alquilo." Puede insertarse opcionalmente a lo largo del grupo alquilenos uno o más de oxígeno, sulfuro o átomos de nitrógeno sustituidos o no sustituidos (también referidos en el presente documento como "alquilaminoalquilo"), en el que el sustituyente de nitrógeno es alquilo como se ha descrito anteriormente. Grupos alquilenos ilustrativos incluyen metileno ($-\text{CH}_2-$); etileno ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); propileno ($-(\text{CH}_2)_3-$); ciclohexileno ($-\text{C}_6\text{H}_{10}-$); $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$; $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$; $-(\text{CH}_2)_q-\text{N}(\text{R})-(\text{CH}_2)_r-$, en el que cada uno de q y r es independientemente un número entero de 0 a aproximadamente 20, por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20, y R es hidrógeno o un alquilo inferior; metilenodioxilo ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$); y etilenodioxilo ($-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-$).

Un grupo alquilenos puede tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 átomos de carbono y puede tener adicionalmente 6-20 carbonos.

"Arlenos" se refiere a un grupo arilo bivalente.

El término "amino" se refiere al grupo $-\text{NR}'\text{R}''$, en el que R' y R'' se seleccionan independientemente a partir del grupo que incluye H y alquilo, cicloalquilo, heterociclo, aralquilo, arilo y heteroarilo sustituidos o no sustituidos. En algunas realizaciones, el grupo amino es $-\text{NH}_2$. "Aminoalquilo" y "aminoarilo" se refiere al grupo $-\text{NR}'\text{R}''$, en el que R' es como se define anteriormente en el presente documento y R'' es un alquilo o arilo sustituido o no sustituido, respectivamente.

Los términos "carboxilato" y "ácido carboxílico" pueden referirse a los grupos $-\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$ and $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, respectivamente. En algunas realizaciones, "carboxilato" puede referirse tanto

al grupo -C(=O)O^- como al grupo -C(=O)OH .

El término "amida" se refiere a un grupo que tiene la fórmula -C(=O)-NRR'' , en el que R y R" son cada una independientemente H, alquilo, alquilo sustituido a alquilo, aralquilo, aralquilo sustituido, arilo o arilo sustituido.

Los términos "nanoescala," "nanomaterial," "polímero de escala nonométrica", "nanocluster" y "nanopartícula" se refieren a una estructura (por ejemplo, una vesícula) que tiene al menos una región con una dimensión (por ejemplo, longitud, anchura, diámetro, etc.) de menos de aproximadamente 1.000 nm. En algunas realizaciones, la dimensión es más pequeña (por ejemplo, inferior a aproximadamente 500 nm, inferior a aproximadamente 250 nm, inferior a aproximadamente 200 nm, inferior a aproximadamente 150 nm, inferior a aproximadamente 125 nm, inferior a aproximadamente 100 nm, inferior a aproximadamente 80 nm, inferior a aproximadamente 70 nm, inferior a aproximadamente 60 nm, inferior a aproximadamente 50 nm, inferior a aproximadamente 40 nm, inferior a aproximadamente 30 nm o incluso inferior a aproximadamente 20 nm). En algunas realizaciones, la dimensión es inferior a aproximadamente 10 nm.

En algunas realizaciones, la nanopartícula es aproximadamente esférica. Cuando la nanopartícula es aproximadamente esférica, la dimensión característica puede corresponderse al diámetro de la esfera. Además de las formas esféricas, la nanopartícula y otro material de nanoescala puede tener forma de disco, oblonga, poliédrica, de varilla, cúbica o irregular. Un material de nanoescala también puede tener forma irregular o comprender clústeres o esferas, varillas,

discos o cubos.

El término "micro" (por ejemplo, en "microaguja") tal como se usa en el presente documento se refiere a una estructura que tiene al menos una región con una dimensión inferior a aproximadamente 1.000 micrómetros (μm). En algunas realizaciones, el término "micro" se refiere a una estructura que tiene una dimensión de entre aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 1.000 micrómetros.

10

El término "diámetro" está reconocido por la técnica y se usa en el presente documento para referirse tanto al diámetro físico como al diámetro hidrodinámico. El diámetro de una partícula esencialmente esférica puede referirse al diámetro físico o hidrodinámico. Tal como se usa en el presente documento, el diámetro de una partícula no esférica puede referirse a la distancia lineal más grande entre dos puntos sobre la superficie de la partícula. Cuando se hace referencia a múltiples partículas, el diámetro de las partículas se refiere normalmente al diámetro promedio de las partículas. El diámetro de partícula puede medirse usando varias técnicas en la técnica entre las que se incluye, pero sin estar limitado a, dispersión dinámica de luz.

15

20

25

"Monodisperso" se usa en el presente documento para describir una población de partículas en las que todas las partículas son del mismo o casi del mismo tamaño. Por ejemplo, "monodisperso" puede referirse a dispersiones de partículas en las que el 90 % de la distribución se encuentra dentro del 15 %, 10 % o 5 % del tamaño de partícula medio.

30

Los términos "polímero" y "polimérico" se refieren a estructuras químicas que tienen unidades repetitivas (es decir, múltiples copias de una subestructura química dada). Tal como se usa en el presente documento, los polímeros se pueden referir a grupos que tienen más de 10 unidades repetitivas y/o a grupos en los que la unidad repetitiva es distinta de metileno. Los polímeros pueden formarse a partir de monómeros polimerizables. Un monómero polimerizable es una molécula que comprende uno o más restos reactivos {por ejemplo, éteres de siloxano, hidróxilos, aminas, grupos vinílicos (es decir, enlaces dobles carbono-carbono), halogenuros (es decir, Cl, Br, F y I), ésteres, ésteres activados y similares} que pueden reaccionar para formar enlaces con otras moléculas. En general, cada molécula de monómero polimerizable puede unirse a dos o más otras moléculas. En algunos casos, un monómero polimerizable se unirá solo a una otra molécula, formando un extremo del material polimérico. Algunos polímeros contienen enlaces biodegradables, tales como ésteres o amidas, de modo que pueden degradarse durante el tiempo en condiciones biológicas.

Un "copolímero" se refiere a un polímero derivado de más de una especie de un monómero.

Tal como se usa en el presente documento, "un copolímero en bloque" se refiere a un copolímero que comprende bloques (es decir, subsecciones poliméricas del copolímero completo) en una secuencia lineal. Un "bloque" se refiere a una porción de un copolímero que tiene el menos una característica que no está presente en las porciones adyacentes de la macromolécula. Por lo tanto, un "copolímero" en bloque" puede referirse a un

copolímero en el que los bloques adyacentes son constitucionalmente distintos, es decir, cada uno de estos bloques comprende unidades constitucionales derivadas de distintas especies características de monómero o con distinta
5 composición o distribución de secuencia de unidades constitucionales.

"Biocompatible" tal como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a un material y cualquier metabolito o
10 productos de degradación del mismo que generalmente no es tóxico al destinatario y no causa ningún efecto adverso al destinatario.

"Biodegradable", tal como se usa en el presente documento, se
15 refiere generalmente a un material que se degradará o erosionará en condiciones fisiológicas en unidades más pequeñas o especies químicas que son capaces de ser metabolizadas, eliminadas o excretadas por el sujeto. En algunas realizaciones, el tiempo de degradación es una función de la
20 composición del polímero y morfología. Los tiempos de degradación adecuados van desde días a semanas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polímero puede degradarse durante un periodo de tiempo de siete días a 24 semanas, opcionalmente de siete días a doce semanas, opcionalmente de siete días a
25 seis semanas u opcionalmente de forma adicional de siete días a tres semanas.

El término "hidrófilo" puede referirse a un grupo que se disuelve o preferentemente se disuelve en agua y/o soluciones
30 acuosas.

El término "hidrofóbico" se refiere a grupos que no se disuelven significativamente en agua y/o soluciones acuosas y/o que se disuelven preferentemente en grasas y/o soluciones no acuosas.

5

El término "anfifílico" se refiere a una molécula o polímero que contiene tanto grupos hidrófilos como hidrofóbicos.

El término "conjugado" puede referirse a composiciones que comprenden al menos dos restos químicos distintos o moléculas (por ejemplo, pequeñas moléculas, polímeros, proteínas, etc.) unidas entre sí, tal como a través de enlaces iónicos, coordinativos o covalentes. En algunas realizaciones, El término "conjugado" se refiere a restos o moléculas que están unidas de forma covalente entre sí. En algunas realizaciones, el conjugado puede comprender dos restos químicos distintos asociados entre sí a través de fuerzas intramoleculares tales como enlace de hidrógeno, fuerzas de dispersión de London, interacciones van der Waals', etc.

20

El término "insulina" tal como se usa en el presente documento, se refiere a insulina de un humano u otro mamífero. En algunas realizaciones, el término "insulina" se refiere a insulina humana. En algunas realizaciones, el término "insulina" se refiere a insulina humana recombinante.

25

"Derivado bioactivo" tal como se usa en el presente documento, se refiere a insulina humana o insulina de otro mamífero en la que uno o más restos de aminoácidos se han reemplazado por otro resto de aminoácido o eliminado, en el que la cadena A y/o la cadena B se ha extendido mediante la

30

adición de uno o más restos de aminoácido en el extremo N o el extremo C, y/o en el que la insulina se ha modificado mediante la adición de uno o más sustituyentes químicos. El derivado puede funcionar para reemplazar insulina endógena y retener al menos alguna de la actividad biológica de la insulina endógena. Los derivados de insulina pueden tener una distinta farmacocinética que la insulina endógena. Las dosis pueden optimizarse basándose en la farmacocinética del derivado de la insulina en relación con la insulina humana basándose en la farmacocinética conocida por un experto en la materia.

El término "agente de tratamiento de la diabetes" tal como se usa en el presente documento puede referirse a un agente terapéutico que trata la diabetes o una complicación de la misma (tal como, pero sin estar limitado a, neuropatía diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, glaucoma o cetoacidosis diabética) u otro trastorno del metabolismo de la glucosa que resulte en hiperglucemia. En algunas realizaciones, el agente de tratamiento de la diabetes es una insulina o un derivado bioactivo de la misma o un agente de tratamiento no basado en insulina conocido en la técnica para su uso en el tratamiento de la diabetes. Agentes de tratamiento no basados en insulina para su uso en el tratamiento de la diabetes incluyen, aunque no de forma limitativa, sensibilizadores de la insulina, inhibidores DPP IV, péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y análogos del mismo, secretagogos de la insulina, tal como, pero sin estar limitado a sulfonilureas, meglitinidas, polipéptidos inhibidores gástricos (GIP), activadores receptores de la insulina, biguanidas, tiazolidinedionas, inhibidores de la alfa-glucosidasa y similares. En algunas realizaciones, el agente

de tratamiento de la diabetes es una insulina o un derivado bioactivo.

Los términos "reactivo reticulante" o "agente reticulante" se refiere al compuesto que incluye al menos dos grupos funcionales reactivos (o grupos que pueden desbloquearse o desprotegerse para proporcionar grupos funcionales reactivos), que puede ser el mismo o distinto. En algunas realizaciones, los dos grupos funcionales reactivos pueden tener una reactividad química distinta (por ejemplo, los dos grupos funcionales reactivos son reactivos (por ejemplo, forman enlaces, tales como enlaces covalentes) con distintos tipos de grupos funcionales en otras moléculas, o uno o dos grupos funcionales reactivos tiene a reaccionar más rápidamente con un grupo funcional en particular sobre otra molécula distinta del otro grupo funcional reactivo). Por lo tanto, el reactivo reticulante puede usarse para unir (por ejemplo, unir de forma covalente) dos otras entidades (por ejemplo, moléculas, polímeros, proteínas, ácidos nucleicos, vesículas, liposomas, nanopartículas, micropartículas, etc.) para formar una composición reticulada.

El término "vesícula" puede referirse a una partícula creada artificialmente, (en algunas realizaciones, una nanopartícula) que comprende fluido encerrado por una capa o capas concéntricas de una molécula o polímero (por ejemplo, un polímero anfifílico). Puede haber uno o más agentes terapéuticos disuelto o suspendido en el fluido (por ejemplo, pequeñas moléculas, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). De acuerdo con algunas realizaciones de la materia objeto que ahora se desvela, el fluido puede comprender un agente de

tratamiento de la diabetes, tal como una insulina o un derivado bioactivo de la misma y un agente oxidante de glucosa, tal como una glucosa oxidasa, disuelto en una solución acuosa. El fluido puede comprender más de un agente terapéutico, por ejemplo, tanto insulina o derivado bioactivo de la misma como otro agente terapéutico, tal como un agente no basado en insulina para el tratamiento de la diabetes o una complicación de la misma. En algunas realizaciones, cada agente terapéutico puede ser un agente terapéutico soluble en agua.

10

El término "hiperglucemia", tal como se usa en el presente documento, puede referirse a una afección en la que una cantidad elevada de glucosa circula en plasma sanguíneo de un sujeto relativo a un individuo sano. La hiperglucemia puede diagnosticarse usando procedimientos conocidos en la técnica, que incluye la medición de los niveles de glucosa en sangre en ayunas.

15

El término "hiperinsulinemia", tal como se usa en el presente documento, puede referirse a una afección en la que hay niveles elevados de insulina en circulación cuando, simultáneamente, los niveles de glucosa en sangre son elevados o normales. La hiperinsulinemia puede estar causada por la resistencia a la insulina asociada con la dislipidemia, tal como altos triglicéridos, colesterol alto, lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL); niveles altos de ácido úrico; síndrome de ovario poliquístico; diabetes del tipo II y obesidad.

25

El término "resistencia a la insulina" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una afección en la que una

30

cantidad normal de insulina es incapaz de producir una respuesta molecular o fisiológica normal. En algunos casos, una cantidad hiper-fisiológica de insulina, bien producida endógenamente o administrada endógenamente, es capaz de vencer
5 la resistencia a la insulina, de forma completa o en parte, y producir una respuesta biológica.

El término "síndrome metabólico" tal como se usa en el presente documento, puede referirse a un clúster asociado de
10 rasgos que incluye, pero no está limitado a, hiperinsulinemia, tolerancia a la glucosa anormal, obesidad, redistribución de grasa al compartimento abdominal o del tronco superior, hipertensión, disfibrinólisis y dislipidemia caracterizada por altos triglicéridos, bajo colesterol de lipoproteína de alta
15 densidad (HDL) y altas partículas poco densas de lipoproteína de baja densidad (LDL). Los sujetos que tienen el síndrome metabólico están en riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 y/u otros trastornos (por ejemplo, aterosclerosis).

20 El término "tolerancia a la glucosa", tal como se usa en el presente documento, puede referirse a la capacidad de un sujeto de controlar el nivel de glucosa en plasma y/o insulina en plasma cuando fluctúa la ingesta de glucosa. Por ejemplo, la tolerancia a la glucosa abarca la capacidad de reducir el nivel
25 de glucosa en plasma a un nivel anterior a la ingesta de glucosa dentro de aproximadamente 120 minutos más o menos.

II. CONSIDERACIONES GENERALES

30 Un sistema de suministro de insulina sensible a la glucosa de bucle cerrado similar al páncreas que es capaz de "segregar"

insulina en respuesta a una glucosa en sangre elevada podría proporcionar un modo deseable de regular la glucemia con un esfuerzo del paciente mínimo y mejoras potenciales en la glucemia y calidad de vida. Véase Bratlie y col., *Advanced Healthcare Materials*, 1(3):267-284 (2012); Ravaine y col., *J. Controlled Release*, 132(1):2-11 (2008); and Wu y col., *Chem. Rev.*, 111(12):7855-7875 (2011). Los sistemas actuales de bucle cerrado combinan un módulo de control de la glucosa y un módulo de liberación de insulina desencadenado por un sensor. Véase Bratlie y col., *Advanced Healthcare Materials*, 1(3):267-284 (2012); y Ravaine y col., *J. Controlled Release*, 132(1):2-11 (2008). Por ejemplo, existen dispositivos electrónicos/mecánicos de bucle cerrado que emplean un sensor que controla la glucosa de forma continua calibrado por el paciente y una bomba de infusión de insulina externa. Véase Veiseh y col. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(1):45-57 (2015). Sin embargo, diversas dificultades, tales como garantizar una respuesta de señal con precisión y evitar la bioincrustación, pueden asociarse con tales dispositivos.

Otro modo de evitar estas dificultades requiere un enfoque químico que usa una matriz cargada con insulina que tiene elementos sensores de glucosa. La matriz podría diseñarse para someterse a transformaciones estructurales, por ejemplo, encogimiento, hinchamiento o disociación, en respuesta a cambios en la concentración de glucosa, conduciendo a una liberación de insulina estimulada por la glucosa. Véase Gordijo y col., *Adv. Funct. Mater.*, 21(1):73-82 (2011); Gu y col., *ACS Nano*, 7(8):6758-6766 (2013); Katoaka y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 120(48):12694-12695 (1998); y Gu y col., *ACS Nano*, 7(5):4194-4201 (2013). Entre los restos con sensores de glucosa posibles

para dispositivos de bucle cerrado se incluye ácido fenilborónico (PBA), proteína de unión a glucosa (GBP) y glucosa oxidasa (GOx). Desafortunadamente, la mayoría de los sistemas de bucle cerrado sintéticos existentes se han limitado

5 a estudios *in vitro*, mostrando una relativamente poca aplicabilidad *in vivo* debido a problemas particulares relacionados con cada estrategia de sensor de glucosa. Por ejemplo, El PBA y sus derivados son conocidos por su interacción reversible con moléculas de poliol, tal como

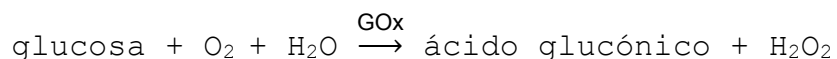
10 glucosa (véase Aronoff y col., Carbohydr. Res., 40(2):299-309 (1975)); pero una interacción eficaz entre la glucosa y el PBA y un cambio estructural subsiguiente de la matriz normalmente requiere un pH básico, superior que el entorno fisiológico. La seguridad y toxicidad de los conjugados de PBA también quedan

15 por determinar. La concavavalina A (Con A) es el GBP más comúnmente usado para el suministro de insulina, basándose generalmente en sus múltiples puntos de unión e interacción competitiva con glucosa y dextrano (usado como el material de matriz). Véase Kim y col., J. Controlled Release, 11(1):193-

20 201 (1990). Sin embargo, la toxicidad e inestabilidad *in vivo* de Con A limita sus aplicaciones clínicas. Véase Tiegs y col., J. Clin. Invest., 90(1):196 (1992).

La GOx es una enzima que puede convertir glucosa en ácido

25 glucónico en la presencia de oxígeno:



Véase Wu y col., Chem. Rev., 111(12):7855-7875 (2011). Los sistemas sensibles a glucosa que emplean GOx se han integrado previamente con materiales sensibles a pH, que pueden o bien

30 protonarse o bien degradarse con una disminución local de pH, promovido por el aumento de concentración de glucosa. Sin

embargo, tales procedimientos dependientes de la disminución de pH pueden verse comprometidos por una capacidad de respuesta lenta, especialmente en un entorno fisiológico tamponado. véase Lin y col., Nature Reviews Drug Discovery, 14(1):45-57 (2015).

5

La materia objeto que ahora se desvela proporciona un procedimiento de suministro de insulina que combina: (1) rápida capacidad de respuesta, para imitar mejor la farmacocinética a una actividad pancreática normal; (2) facilidad de

10 administración; y (3) biocompatibilidad sin efectos secundarios de larga duración. De forma más particular, la materia objeto que ahora se desvela proporciona dispositivos de suministro de insulina (y/u otros agentes de tratamiento de la diabetes) basados en vesículas sensibles a la hipoxia que

15 contienen (por ejemplo, disueltos en un fluido encerrado en la vesícula) insulina (y/u otro agente de tratamiento de la diabetes) y agente oxidante de glucosa (por ejemplo, GOx). En lugar de usar cambios de pH inducidos enzimáticamente, los dispositivos que ahora se desvelan se aprovechan de la

20 generación local de hipoxia debido al consumo de oxígeno durante la oxidación de glucosa como desencadenante para promover rápidamente la liberación de insulina (y/u otro agente de tratamiento de la diabetes) en respuesta a la hiperglucemia. El coeficiente de transporte de oxígeno se ha demostrado que

25 es más lento que el coeficiente de difusión de ion de hidrógeno *in vivo* (véase Fletcher, Biophys. J., 29(3):437-458 (1980); Michaels y col. AICHE J., 21(5):985-996 (1975); y Dowd y col., Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume, 65(1):79-83 (1983)), que implica que podría lograrse una respuesta más

30 rápida si los materiales sensibles a la hipoxia se incorporan en formulaciones sensibles a glucosa basadas en agente oxidante

de glucosa.

En una realización la materia objeto que ahora se desvela, para lograr la transducción sensible a la hipoxia, se usaron materiales modificados con 2-nitroimidazol (NI) como material sensible a la hipoxia. NI es un componente hidrofóbico que se usa a menudo en imágenes para la detección de cáncer debido a su alta sensibilidad al trastorno hipóxico en los sitios de tumores. Véase Nunn y col., Eur. J. Nucl. Med., 22(3):265-280 (1995); y Krohn y col., J. Nucl. Med., 49(Suppl. 2):129S-148S (2008). NI puede convertirse en un 2-aminoimidazol hidrófilo en un entorno hipóxico a través de la reducción de único electrón catalizado por una serie de nitroreductasas, acoplado a un agente bio-reductor, tal como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), una coenzima que es abundante en tejidos biológicos. Véase Nunn y col., Eur. J. Nucl. Med., 22(3):265-280 (1995); Krohn y col., J. Nucl. Med., 49(Suppl. 2):129S-148S (2008); Edwards J. Antimicrob. Chemother., 31(1):9-20 (1993); y Takasawa y col., Stroke, 39(5):1629-1637 (2008). (25-28).

Como se muestra en la Figura 1A, NI funcionalizado con amina se conjugó con un polímero biocompatible, y biodegradable, ácido hialurónico (AH; peso molecular: 300 kDa). A través del autoensamblaje, el AH sensible a la hipoxia anfifílico (AH-SH) puede formar rápidamente vesículas sensibles a glucosa de nanoescala (VGF), que pueden encapsular insulina humana recombinante (y/u otro agente de tratamiento de la diabetes) y un agente oxidante de glucosa, tal como GOx, en una solución acuosa. En la presencia de alta glucosa en sangre, el oxígeno disuelto puede consumirse rápidamente debido a la oxidación de

glucosa catalizado por el agente oxidante de glucosa, que conduce a un entorno hipóxico local. Los grupos NI del AH-SH se reducen a continuación en 2-aminoimidazoles hidrófilos en la presente de NADPH y reductasa, que resulta en la disociación de las VGF y la posterior liberación de insulina (y/u otro agente de tratamiento de la diabetes).

Para aumentar la facilidad de administración, las VGF que ahora se desvelan pueden cargarse dentro de un parche a base de una matriz de microagujas (MA) para el suministro sin dolor de un agente de tratamiento de la diabetes (por ejemplo insulina). Véanse Figuras 1B y 4A. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 4A, se puede fabricar una matriz de microagujas a partir de AH reticulado, en la que la reticulación puede mejorar la rigidez de las microagujas y restringir la pérdida de VGF de las agujas. Como se muestra en la Figura 1B, cuando se administra subcutáneamente, las VGF cargadas en las microagujas se desensamblan cuando se exponen a un alto nivel de glucosa de fluido intersticial en las redes linfáticas y capilares, promoviendo de este modo la liberación del agente de tratamiento de la diabetes (por ejemplo, insulina) que puede absorberse a través de los vasos linfáticos y capilares rápidamente. Como se describe en el presente documento a continuación, un "parche de insulina inteligente" ilustrativo con mecanismos sensible a la hipoxia y sensible a la glucosa puede mostrar una capacidad de respuesta a la regulación de glucosa rápida y una prevención segura de hipoglucemia en un modelo de ratón de diabetes tipo 1.

III. VESÍCULAS SENSIBLES A GLUCOSA, COMPOSICIONES Y SISTEMAS RELACIONADOS

Un sistema de suministro de insulina de bucle cerrado que "secreta" insulina en respuesta a la glucosa en sangre mantiene la gran promesa para tratar la diabetes de tipo 1 y diabetes
5 avanzada de tipo 2, así como mejorar la calidad de vida de los pacientes diabéticos. La materia objeto que ahora se desvela proporciona, en algunas realizaciones, un dispositivo de suministro sensible a glucosa para el suministro de insulina y/u otro agente de tratamiento de la diabetes usando un parche
10 de matriz de microagujas sin dolor que contiene vesículas sensibles a la hipoxia, que pueden disociarse rápidamente y liberar un agente o agentes encapsulados terapéuticos (por ejemplo, insulina) cuando se exponen a un entorno hipóxico local generado por la oxidación enzimática de la glucosa en el
15 estado hiperglucémico. Este "parche de insulina inteligente" puede regular la glucosa en sangre con una capacidad de respuesta rápida y la prevención de la hipoglucemia.

En algunas realizaciones, la materia objeto que ahora se
20 desvela se refiere a composiciones para el suministro de un agente de tratamiento de la diabetes, por ejemplo, insulina o derivados bioactivos de la misma) a un sujeto que lo necesite, por ejemplo, para el control de la diabetes u otro trastorno metabólico de la glucosa que conduce a la hiperglucemia. En
25 algunas realizaciones, las composiciones que ahora se desvelan pueden proporcionar el suministro de un tratamiento de la diabetes de bucle cerrado sensible a la glucosa a un sujeto que lo necesite, promoviendo de este modo un control de la diabetes más económico y sencillo, así como la prevención de
30 complicaciones hipoglucémicas del tratamiento de la diabetes.

En algunas realizaciones, la materia objeto que ahora se desvela proporciona una composición que comprende:

- 5 (a) un material polimérico anfifílico, en el que el material polimérico anfifílico comprende un polímero hidrófilo conjugado con un grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia, en el que el grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia comprende un resto sensible a la hipoxia que puede reducirse en la presente de un entorno hipóxico para formar un resto hidrófilo;
- 10 (b) un agente de tratamiento de la diabetes, opcionalmente una insulina o un derivado bioactivo de la misma; y
- (c) un agente oxidante de glucosa.

El polímero hidrófilo puede ser un polímero biocompatible sintético o producido naturalmente. Entre los polímeros hidrófilos adecuados se pueden incluir restos de cadena lateral polares o cargadas. En algunas realizaciones, el polímero hidrófilo puede ser biodegradable. Los polímeros hidrófilos adecuados incluyen, pero sin limitarse a ácidos de poliaminoácidos (tal como ácido poliglutámico, ácido poliaspártico, etc.) copolímeros en bloque sintéticos (por ejemplo, en el que al menos un bloque comprende una cadena polimérica hidrófila) y polisacáridos, tal como glucosaminoglicanos (GAG). En algunas realizaciones, el polímero hidrófilo es un GAG, tal como ácido de hialuronano o hialurónico; heparina, sulfato de heparano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano y sulfato de queratina. En algunas realizaciones, el polímero hidrófilo es un ácido hialurónico.

30 Tal como se indica anteriormente, el grupo hidrofóbico comprende un resto sensible a la hipoxia, por ejemplo un resto

que puede someterse a una reacción química u otro cambio estructural en respuesta a una disminución en oxígeno (por ejemplo, en un disolvente o entorno fisiológico en contacto con el material polimérico anfifílico). Por ejemplo, el grupo

5 sensible a la hipoxia puede someterse a una reacción o reacciones de reducción en respuesta a una disminución en oxígeno. La reacción o reacciones de reducción pueden catalizarse mediante una enzima. En algunas realizaciones, la disminución en oxígeno puede ser el resultado del agotamiento

10 localizado de oxígeno causado por la actividad de un agente oxidante de glucosa que oxida glucosa en contacto con el material polimérico anfifílico. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la hipoxia es un efecto secundario de un aumento en la concentración de glucosa cerca del material polimérico

15 anfifílico y su agente oxidante de glucosa asociado.

Entre los restos sensibles a la hipoxia representativos se incluyen grupos arilo sustituidos con nitro. En algunas realizaciones, el resto sensible a la hipoxia es un

20 nitroimidazol (por ejemplo, un 2-nitroimidazol). El nitroimidazol puede comprender uno o más sustituyentes de grupo arilo (por ejemplo, alquilo, halo, etc.) sustituido sobre carbono y/o átomos de nitrógeno del anillo de imidazol, es decir, además del grupo nitro sustituido sobre el anillo de

25 imidazol. En algunas realizaciones, el resto sensible a la hipoxia puede incluir más de uno de grupo nitro.

En algunas realizaciones, el grupo hidrofóbico está unido de forma covalente con el polímero hidrófilo. Por ejemplo, el

30 grupo hidrofóbico puede basarse en una molécula precursora que incluye un grupo amino. El grupo amino de la molécula

precursora puede formar un enlace de amida con un grupo de ácido carboxílico presente sobre el polímero hidrófilo. En algunas realizaciones, el material anfifílico polimérico puede comprender ácido hialurónico (u otro polímero hidrófilo que comprende grupos de cadena lateral carboxílica) conjugado con una alquilamina sustituido con 2-nitroimidazol, tal como, pero sin limitarse a 6-(2-nitroimidazol)hexilamina, 5-(2-nitroimidazol)pentilamina, 4-(2-nitroimidazol)butilamina, 7-(2-nitroimidazol)heptilamina, 8-(2-nitroimidazol)octilamina y similares.

Puede usarse cualquier agente oxidante de glucosa adecuado. En algunas realizaciones, el agente oxidante de glucosa es una enzima, tal como glucosa oxidasa (GOx) (EC1.1.3.4), que oxida glucosa para producir peróxido de hidrógeno y D-glucono- δ -actona, la forma cíclica de ácido glucónico. En algunas realizaciones, el agente oxidante de glucosa puede ser una variante biológicamente activa de GOx.

En algunas realizaciones, el agente de tratamiento de la diabetes es una insulina o un derivado bioactivo de la misma, tal como insulina humana, insulina humana recombinante, insulina de origen animal no humano (por ejemplo, bovino, porcino) o cualquier otra insulina, que incluye derivados de insulina. En algunas realizaciones, la insulina es de la misma especie que la del destinatario deseado, es decir, insulina humana para el tratamiento de humanos. La insulina o el derivado bioactivo de la misma puede incluir mezclas de distintas insulinas y/o derivados. La insulina o derivado bioactivo de la misma puede incluir insulinas de acción rápida, análogos de insulina de acción breve, insulinas de acción

intermedia y/o insulinas de acción prolongada. En algunas realizaciones, la insulina o derivado bioactivo de la misma es una insulina de acción breve.

5 Las insulinas de acción breve empiezan a trabajar a entre los uno a 20 minutos, con su máximo efecto una hora después y durando de tres a cinco horas. La insulina de acción rápida tarda aproximadamente dos horas en absorberse por completo dentro de la circulación sistémica. Las insulinas de acción
10 rápida incluyen insulina humana recombinante regular (tal como HUMULIN™ comercializada por Lilly y NOVOLIN™, comercializada por NovoNordisk). Las insulinas bovinas y porcinas, que difieren en varios aminoácidos en cuanto a la insulina humana, pero son bioactivas en los humanos, también son insulinas de
15 acción rápida.

Las insulinas de acción breve incluyen insulinas que han sido modificadas o tienen ubicaciones alteradas de aminoácidos para aumentar su velocidad de absorción. Existen tres tipos de
20 análogos de insulina de acción breve en el mercado disponible: insulina lispro (insulina Lisine-Prolina, vendida por Eli Lilly as HUMALOG™), insulina glulisina (vendida por Sanofi-Aventis como APIDRA™) e insulina aspart (vendida por Novo Nordisk como NOVOLOG™) .

25

Insulina de acción intermedia tiene un tiempo de vida más largo que la insulina de acción corta, pero es más lenta en empezar a trabajar y le lleva más tiempo en alcanzar su resistencia máxima. La insulina de acción intermedia
30 normalmente empieza a trabajar a las 2-4 horas después de su inyección, con su máximo aproximadamente entre 4-14 horas

después de la inyección y permanece efectiva hasta 24 horas después de la inyección. Entre los tipos de insulina de acción intermedia se incluye insulina NPH (protamina neutra Hagedorn) y LENTE™. La insulina NPH contiene protamina que ralentiza la velocidad de absorción de modo que la absorción de insulina tarda más en alcanzar el torrente sanguíneo pero tiene un máximo y tiempo de vida superiores.

Las insulinas de acción prolongada incluyen Eli Lilly's Humulin™ U (insulina humana Ultralente™ (origen ADN recombinante) suspensión de zinc extendido); e insulina glargina (LANTUS™ Aventis). La insulina glargina es un análogo de insulina humana recombinante que puede tener hasta 24 horas de duración. Difiere de la insulina humana por tener una glicina en lugar de asparagina en la posición 21 y dos argininas añadidas a la terminal carboxi de la cadena beta. LANTUS™ consiste en insulina glargina en un fluido acuoso claro (100 IU, 3.6378 mg de insulina glargina, 30 microgramos de zinc, 2,7 mg de m-cresol, 20 mg de glicerol 85 % y agua a 1 ml).

Adicionalmente, o como una alternativa a la insulina o derivado bioactivo de la misma, la composición que ahora se desvela puede comprender un agente activo no basado en insulina conocido en la técnica para el tratamiento de la diabetes o para una complicación de la misma o para otro trastorno metabólico de glucosa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la composición que ahora se desvela puede incluir un fármaco de diabetes no basado en insulina, tal como, pero sin estar limitado a, los agentes de tratamiento de diabetes no basados en insulina que se enumeran a continuación en el presente documento, por ejemplo, Péptido 1 similar al glucogón (GLP1) o

un análogo del mismo, un inhibidor de alfa-glucosidasa, una sulfonilurea, una tiazolidinediona o una biguanida.

En algunas realizaciones, el material polimérico anfifílico
5 forma una nanopartícula que contiene el agente de tratamiento de la diabetes (por ejemplo, la insulina o el derivado bioactivo de la misma y/u otro agente de tratamiento de la diabetes) y el agente oxidante de glucosa encerrado o atrapado dentro del interior de la nanopartícula (por ejemplo, en poros
10 u otros espacios interiores dentro de la nanopartícula) o de otro modo asociado de forma no covalente con el material polimérico. En algunas realizaciones, la reducción del resto sensible a la hipoxia puede interrumpir la estructura de la nanopartícula (por ejemplo, según el polímero anfifílico se
15 vuelve más hidrófilo), permitiendo que el agente de tratamiento de la diabetes (por ejemplo, la insulina o el derivado bioactivo de la misma) se disperse desde la nanopartícula (por ejemplo, mediante difusión). En algunas realizaciones, el material polimérico anfifílico forma una vesícula que encapsula
20 el agente de tratamiento de la diabetes (por ejemplo, la insulina o el derivado bioactivo de la misma) y el agente oxidante de glucosa. La reducción del resto sensible a la hipoxia (por ejemplo, en respuesta a la hipoxia resultante de un aumento en la actividad del agente oxidante de glucosa
25 debido a un aumento en glucosa) puede conducir al desensamblaje de la vesícula y a la liberación del agente de tratamiento de la diabetes (por ejemplo, la insulina o derivado de la misma).

En algunas realizaciones, la nanopartícula y/o vesículas
30 pueden tener un diámetro promedio de entre aproximadamente 50 a aproximadamente 500 nm. En algunas realizaciones, el diámetro

promedio se encuentra entre aproximadamente 50 y aproximadamente 250 nm. En algunas realizaciones, el diámetro promedio se encuentra entre aproximadamente 80 y aproximadamente 160 nm (por ejemplo, aproximadamente 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, o 160 nm). En algunas realizaciones, las nanopartículas y/o vesículas tienen un diámetro promedio (por ejemplo, según medido a través de dispersión dinámica de luz) de aproximadamente 118 nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas y/ vesículas puede ser mono-dispersas o casi mono-dispersas (por ejemplo, en las que al menos aproximadamente el 80 % de la distribución recae entre el 15 %, 10 % o 5 % del tamaño de partícula medio).

En algunas realizaciones, las composiciones de la materia objeto que ahora se desvela, por ejemplo, las nanopartículas y/o vesículas, pueden usarse para preparar una microaguja o una matriz de microagujas para el suministro de un agente de tratamiento de la diabetes (por ejemplo, insulina o un derivado bioactivo de la misma).

En algunas realizaciones, la materia objeto que ahora se desvela proporciona una matriz de microagujas que comprende una pluralidad de microagujas que comprenden vesículas y/o nanopartículas, en las que las vesículas y/o nanopartículas comprende un material polimérico anfifílico que comprende un polímero hidrófilo conjugado (por ejemplo, conjugado de forma covalente) a un grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia, en el que dicho grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia comprende un resto sensible a la hipoxia que es capaz de reducirse en un entorno hipóxico para formar un resto hidrófilo y

adicionalmente en el que (i) un agente de tratamiento de la diabetes, opcionalmente una insulina o un derivado bioactivo de la misma y (ii) un agente oxidante de glucosa están contenido dentro de dicha vesícula. En algunas realizaciones, la matriz de microagujas puede comprender una pluralidad de microagujas en las que cada una de dicha pluralidad de microagujas tiene una longitud de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 1000 micrómetros (por ejemplo, aproximadamente 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o aproximadamente 1000 micrómetros). En algunas realizaciones, cada una de la pluralidad de microagujas tiene una longitud de entre aproximadamente 500 micrómetros y aproximadamente 700 micrómetros. En algunas realizaciones, cada microaguja tiene una forma aproximadamente cónica o piramidal. En algunas realizaciones, la punta de las microagujas puede ser inferior a aproximadamente 100 micrómetros, de menos de aproximadamente 75 micrómetros, de menos de aproximadamente 50 micrómetros, de menos de aproximadamente 40 micrómetros, inferior a aproximadamente 30 micrómetros o inferior a aproximadamente 20 micrómetros. En algunas realizaciones, la punta de cada una de las microagujas puede ser de aproximadamente 10 micrómetros.

La matriz de microagujas puede comprender una pluralidad de microagujas, en las que las bases de las microagujas se disponen en cualquier patrón bidimensional adecuado. Las microagujas pueden disponerse en una matriz regular (por ejemplo, un patrón de forma cuadrada, rectangular, circular, oval y de otra forma) en el que la distancia entre las microagujas individuales permanece siendo el mismo o varía de un modo repetitivo o en una matriz irregular (por ejemplo, en

la que la distancia entre las microagujas individuales varía de un modo repetitivo no reconocible).

En algunas realizaciones, la matriz de microagujas puede proporcionarse como parte de un parche cutáneo. En algunas realizaciones, la matriz de microagujas puede comprender uno o más capas exteriores (por ejemplo, para proteger la matriz de microagujas de la humedad o de agresiones físicas (por ejemplo, rasguños). En algunas realizaciones, la matriz de microagujas puede comprender una capa que se extiende hacia afuera de la matriz (por ejemplo, coplanar a la base de la matriz) que comprende un adhesivo compatible con la piel para ayudar en la unión de la matriz a la piel.

Las matrices de microagujas que ahora se desvelan pueden liberar un agente o agentes de tratamiento de la diabetes (por ejemplo, insulina o un derivado bioactivo de la misma y/u otro agente de tratamiento de la diabetes) de un modo sensible o dependiente a la glucosa. En algunas realizaciones, la velocidad de liberación del agente o agentes de tratamiento de la diabetes (por ejemplo, de la insulina o derivado bioactivo) es dependiente de la concentración de glucosa que entra en contacto con la matriz (por ejemplo, la velocidad de liberación es más rápida cuando la matriz está en contacto con concentraciones de glucosa más altas). En algunas realizaciones, la matriz de microagujas es un sistema de suministro de insulina de bucle cerrado.

IV. PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO

En algunas realizaciones, la materia objeto que ahora se desvela proporciona un procedimiento de suministro de un agente

de tratamiento de la diabetes, tal como insulina o un derivado de insulina bioactivo, a un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento la administración de una composición (por ejemplo, una nanopartícula y/o vesícula) de la materia objeto que ahora se desvela al sujeto. La administración puede realizarse a través de cualquier vía (por ejemplo, oral, intravenosa (i.v.), intraperitoneal (i.p.), subcutánea, intramuscular, transdérmica o vía inhalación). Las composiciones que ahora se desvelan pueden proporcionarse en una cantidad efectiva terapéutica en cualquier portador, vehículo o diluyente farmacológicamente aceptable adecuado (por ejemplo, agua).

Por "cantidad terapéuticamente efectiva" quiere decirse que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una dosis única o bien como parte de una serie de dosis, es eficaz para producir un efecto medible sobre el sujeto. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser la cantidad requerida para disminuir o rebajar la concentración de glucosa en sangre del sujeto o para causar una mejora en la prueba de tolerancia a la glucosa. Por lo tanto, una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser una cantidad suficiente para reducir o disminuir cualquier nivel (por ejemplo, un nivel de base) de glucosa en plasma en ayunas (GPA), en el que, por ejemplo, la cantidad es suficiente para reducir un nivel de FGP mayor que 200 mg/dl a inferior que 200 mg/dl o en el que la cantidad es suficiente para reducir un nivel de GPA entre aproximadamente 175 mg/dl y aproximadamente 200 mg/dl a inferior que el nivel de inicio. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para reducir el nivel de GPA a inferior que aproximadamente

150 mg/dl, inferior a aproximadamente 125 mg/dl, inferior a aproximadamente 120 mg/dl, inferior a aproximadamente 115 mg/dl o inferior a aproximadamente 110 mg/dl. La cantidad terapéuticamente eficaz puede ajustarse en conexión con el

5 régimen de dosis y el análisis diagnóstico de la afección del sujeto (por ejemplo, control de los niveles de glucosa y/o insulina en el plasma). La cantidad terapéuticamente efectiva puede variar dependiendo de la salud y condiciones físicas del sujeto, el peso del sujeto, el grado de la solución de la

10 enfermedad deseado, la actividad de la insulina o el derivado de insulina (u otro agente de tratamiento de la diabetes), la actividad del agente oxidante de glucosa, la formulación, etc.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende

15 proporcionar una matriz de microagujas de la materia objeto que ahora se desvela y aplicar dicha matriz a la superficie cutánea del sujeto. Cuando la glucosa entra en contacto con la matriz de microagujas, se oxida, creando de este modo un entorno hipóxico que resulta en la reducción del resto sensible

20 a la hipoxia del grupo hidrofóbico del material polimérico anfifílico, formando de este modo un resto hidrófilo. La formación del resto hidrófilo puede conducir a la interrupción de las vesículas y/o nanopartículas que comprenden el material polimérico anfifílico y la liberación del agente de tratamiento

25 de la diabetes (por ejemplo, la insulina o el derivado de insulina bioactivo) contenido en las vesículas y/o nanopartículas. En algunas realizaciones, el suministro del agente de tratamiento de la diabetes (por ejemplo, la insulina o el derivado de insulina bioactivo) está a una velocidad que

30 se corresponde con la concentración de glucosa que entra en contacto con la matriz de microagujas.

En algunas realizaciones, más de una matriz de microagujas puede aplicarse sobre la superficie cutánea del sujeto, por ejemplo, simultánea o secuencialmente. Por ejemplo, las
5 matrices de microagujas pueden aplicarse secuencialmente cada pocas horas. En algunas realizaciones, una o más matrices pueden aplicarse antes de, durante o dentro de unos pocos minutos (por ejemplo, dentro de aproximadamente 5 a 120 minutos) tras el consumo de comida por el sujeto. En algunas
10 realizaciones, la matriz de aplica antes del consumo de comida por el sujeto y una segunda matriz se aplica a los pocos minutos después del consumo de comida por el sujeto.

La matriz de microagujas puede incluir una unidad de
15 dosificación adecuada del agente de tratamiento de la diabetes (por ejemplo, insulina o derivado bioactivo de la misma) apropiado para el sujeto a tratar (por ejemplo, basándose en el peso del sujeto) y/o a base de una concentración de sangre real o estimada en el sujeto a tratar (por ejemplo, basándose
20 en la ingesta de alimentos real o estimada (en particular ingesta de carbohidratos) por el sujeto). El término "unidad de dosificación" puede referirse a una unidad separada que contiene una cantidad predeterminada de insulina, agente oxidante de glucosa y/u otro agente terapéutico, suficiente
25 para producir una efecto deseable o medible.

En algunas realizaciones, uno o más agente terapéutico adicional está contenido dentro de las vesículas y puede liberarse junto con el agente de tratamiento de la diabetes
30 (por ejemplo, la insulina o derivado bioactivo de la misma). En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es

soluble en agua. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es una proteína o un derivado de proteína.

5 En algunas realizaciones, la vesícula puede incluir tanto insulina (o un derivado bioactivo de la misma) como un agente terapéutico adicional, en el que el agente terapéutico adicional es otro agente para el tratamiento de la diabetes o una complicación de la misma (por ejemplo, neuropatía

10 diabética, retinopatía diabética, nefropatía diabética, glaucoma, cetoacidosis diabética, infecciones bacterianas o fúngicas). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional puede incluir uno o más agentes activos no basados en insulina conocidos en la técnica y usados en el

15 tratamiento de la diabetes (por ejemplo, diabetes de tipo 2). Los agentes no basados en insulina pueden clasificarse dentro de varias amplias clases de fármacos que incluyen, pero sin estar limitados a, sensibilizadores de la insulina, inhibidores DPP IV y análogos de GLP1, secretagogos de la insulina que

20 incluyen, pero sin estar limitados a, sulfonilureas tales como acetohexamida (DYMEJOR), clorpropamida (DIABINESE), tolazamida (TOLINASE), tolbutamida (ORINASE), glimepirida (AMARYL), glipizida (GLUCOTROL), glipizida de liberación extendida (GLUCOTROL XL), gliburida (DIABETA, MICRONASE), gliburida

25 micronizada (GLYNASE, PRESTAB), meglitinidas tales como nateglinida (STARLIX) y repaglinida (PRANDIN), polipéptidos inhibidores gástricos (GIP), péptido similar al glucagón (GLP)-1, morfilinoguanida BTS 67582, inhibidores de fosfodiesterasa y derivados de éster de succinato, activadores de recepción de

30 insulina; biguanidas sensibilizantes de insulina tales como metformina (GLUCOPHAGE), tiazolidinedionas (TZD) tales como

troglitazona (REZULIN), pioglitazona (ACTOS), rosiglitazona (AVANDIA), MCC-555, rivoglitazona, ciglitazona; antagonista GL262570 de peroxisoma proliferador activado del receptor (PPAR γ) de no TZD, inhibidores de alfa-glucosidasa tales como

5 acarbosa (PRECOSE) y miglitol (GLYSET), agentes de combinación tales como glucovance (GLUCOPHAGE con GLYBURIDE), inhibidores de tirosina fosfatasa tales como vanadio, inhibidores PTP-1B y activadores AMPK, incluyendo 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleosida (AICAR), y otros agentes tales como exendina

10 (EXENATIDE (exendina-4 sintética)) y amilina (SYMLIN™ (acetato de plamlintida)), D-quiro-inositol, ligandos de péptido alterados (NBI-6024), complejo DB anérgico, melanocortina inhibidora de GABA, agente reductor de glucosa (ALT-4037), aerodosis (AEROGEN), imitador de insulina, factor-1 de

15 crecimiento similar a la insulina solo o en un complejo con BP3 (SOMATOKLINE), metoclopramida HCL (Emitasol/SPD 425), análogos de motilide/ertromicina e imitadores de GAG. En ciertas realizaciones, el agente de tratamiento de la diabetes no basado en insulina puede ser un sensibilizador de insulina,

20 tal como, pero sin estar limitados a, una tiazolidinediona, por ejemplo, rosiglitazona, pioglitazona, troglitazona, MCC-555, rivoglitazona, ciglitazona y similares, y combinaciones de los mismos.

25 En algunas realizaciones, el sujeto tratado según la materia objeto que ahora se desvela es un sujeto humano, aunque se entiende que los procedimientos descritos en el presente documento son eficaces con respecto a todas las especies vertebradas, que están concebidos para que se incluyen en el

30 término "sujeto".

De forma más particular, en el presente documento se proporciona el tratamiento de mamíferos, tales como humanos, así como aquellos mamíferos de importancia debido al hecho de que están el peligro de extinción (tales como tigres siberianos), de importancia económica (animales criados en granjas para el consumo humano) y/o de importancia social (animales mantenidos como mascotas o en zoos) para los humanos, por ejemplo, carnívoros distintos de humanos (tales como gatos y perros), porcinos (cerdos, puercos y jabalíes), rumiantes (tales como ganado, bueyes, ovejas, jirafas, ciervos, cabras, bisontes y camellos) así como caballos. Por lo tanto, las realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento incluyen el tratamiento de ganado, incluyendo, pero sin estar limitados a, porcinos domesticados (cerdos y puercos), rumiantes, caballos, aves de corral y similares.

En general, los procedimientos que ahora se desvelan pueden usarse para tratar sujetos con diabetes u otro trastorno metabólico de glucosa que resulta en una concentración de glucosa en sangre aumentada (es decir, hiperglucemia). La frase " trastorno metabólico de glucosa" puede abarcar cualquier trastorno caracterizado por un síntoma clínico o una combinación de síntomas clínicos que están asociados con un nivel elevado de glucosa y/o un nivel elevado de insulina en un sujeto en relación con un individuo sano. Los niveles elevados de glucosa y/o insulina pueden manifestarse en las siguientes enfermedades, trastornos y condiciones: hiperglucemia, diabetes tipo II, diabetes gestacional, diabetes tipo I, resistencia a la insulina, alteración de tolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, metabolismo de glucosa alterado, prediabetes, otros trastornos metabólicos

(tales como síndrome metabólico, que también se denomina como síndrome X), y obesidad, entre otros.

En términos generales, los términos "diabetes" y "diabético" se refieren a una enfermedad progresiva del metabolismo de carbohidratos que implican una producción adecuada o el uso de insulina, frecuentemente caracterizada por hiperglucemia y glicosuria. Los términos "prediabetes" y "prediabético" tal como se usa en el presente documento, pueden referirse a un estado en el que el sujeto no tiene las características, síntomas y similares que se observa normalmente en la diabetes, pero tiene las características, síntomas y similares que, si no se tratan, pueden progresar a una diabetes. La presencia de estas condiciones pueden determinarse usando, por ejemplo, bien la prueba de glucosa en plasma en ayunas (GPA) o la prueba de tolerancia oral de la glucosa (OGTT). Ambas requieren normalmente que un sujeto esté en ayunas al menos 8 horas antes de iniciar la prueba.

En la prueba de FPG, la glucosa en sangre de un sujeto se mide después de la conclusión de las ayunas; en general, el sujeto ayuna durante la noche y la glucosa en sangre se mide por la mañana antes de que el sujeto coma. Un sujeto sano tendría generalmente una concentración de FPG de entre aproximadamente 90 y aproximadamente 100 mg/dl, un sujeto con "prediabetes" tendría generalmente una concentración de FPG de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 125 mg/dl y un sujeto con "diabetes" tendría generalmente un nivel de FPG por encima de aproximadamente 126 mg/dl.

30

En la OGTT, se mide la glucosa en sangre de un sujeto después

de ayunas y de nuevo dos horas después de beber una bebida rica en glucosa. Dos horas después del consumo de la bebida rica en glucosa, el sujeto sano generalmente tiene una concentración de glucosa en sangre por debajo de aproximadamente 140 mg/dl, un sujeto prediabético tiene generalmente una concentración de glucosa en sangre aproximadamente de 140 a aproximadamente 199 mg/dl y un sujeto diabético tiene generalmente una concentración de glucosa en sangre de aproximadamente 200 mg/dl o superior.

10

Mientras que los valores glucémicos anteriormente mencionados pertenecen a sujetos humanos, la normoglucemia, la hiperglucemia moderada y la hiperglucemia abierta se escalan de forma distinta en sujetos murinos. Un sujeto murino sano después de una ayunas de cuatro horas generalmente tiene una concentración de GPA de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 150 mg/dl, un sujeto murino con "prediabetes" generalmente tendría una concentración de GPA de entre aproximadamente 175 y aproximadamente 250 mg/dl y un sujeto murino con "diabetes" tendría generalmente una concentración de GPA por encima de aproximadamente 250 mg/dl.

En algunas realizaciones, el sujeto es diabético. El sujeto puede tener una diabetes tipo 1 o tipo 2. En algunas realizaciones, el sujeto puede tener diabetes gestacional o prediabetes. En algunas realizaciones, el sujeto puede tener un trastorno metabólico de glucosa distinto a diabetes (por ejemplo, síndrome metabólico, metabolismo de glucosa alterado, hiperinsulinemia, etc.). Los candidatos adecuados para el tratamiento usando los procedimientos que ahora se desvelan pueden determinarse usando procedimientos de diagnóstico

conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante análisis de glucosa en plasma y/o niveles de insulina. Por ejemplo, los sujetos adecuados pueden incluir humanos que tienen una concentración de glucosa en sangre en ayunas (por ejemplo, después de una ayunas de 8 a 10 horas) superior a aproximadamente 100 mg/dl, superior a aproximadamente 110 mg/dl, superior a aproximadamente 120 mg/dl, superior a aproximadamente 150 mg/dl o superior a aproximadamente 200 mg/dl. Los sujetos adecuados también pueden incluir humanos que tienen una concentración de glucosa en sangre postprandial de dos horas de más de aproximadamente 140 md/dl, más de aproximadamente 150 mg/dl o más de aproximadamente 200 mg/dl. La concentración de glucosa también puede presentarse en las unidades de milimol por litro (mmol/L), que se pueden adquirir mediante la división de los mg/dl por un factor de 18.

V. PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE MATRICES DE MICROAGUJAS

En algunas realizaciones, la materia objeto que ahora se desvela proporciona un procedimiento de preparación de una matriz de microagujas para el suministro sensible de glucosa de un agente de tratamiento de la diabetes (por ejemplo, insulina o un derivado bioactivo de la misma). En algunas realizaciones, el procedimiento puede comprender:

- (a) preparar una solución acuosa de una vesícula y/o nanopartículas de la materia objeto que ahora se desvela;
- (b) dispersar dicha solución acuosa dentro de un molde que comprende una pluralidad de cavidades de microagujas, proporcionando de este modo un molde cargado;
- (c) secar el molde cargado para retirar agua; y
- (d) retirar el molde para proporcionar una matriz de

microagujas.

En algunas realizaciones, el procedimiento puede comprender adicionalmente la reticulación de materiales poliméricos en la matriz de microagujas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un reticulante químico (por ejemplo, N,N-metilenobisacrilamida) y/o un fotoiniciador pueden añadirse al molde antes del secado. En algunas realizaciones, la reticulación puede realizarse mediante exposición a irradiación UV después de que se haya retirado el molde.

En algunas realizaciones, puede añadirse un polímero adicional al molde antes del secado. El polímero adicional puede ser el mismo o distinto del polímero hidrófilo del material polimérico anfifílico. En algunas realizaciones, el polímero adicional es un ácido hialurónico modificado, tal como un ácido hialurónico modificado con alquileno y/o acrilato.

En algunas realizaciones, la carga del molde en la etapa (b) puede realizarse al vacío y/o puede involucrar el centrifugado del molde (por ejemplo, para ayudar en el embalaje eficaz y/o aumentado de las vesículas en las cavidades de las microagujas).

En algunas realizaciones, el molde puede desecarse en un desecador o un desecador al vacío.

En algunas realizaciones, el molde puede comprender un polímero, tal como silicona (por ejemplo, polidimetilsiloxano (PDMS)). El molde puede comprender aproximadamente 10, 50, 100, 250, 500, 1000 o más microcavidades. El espacio de punta a

punta entre las puntas de las microcavidades puede ser de entre aproximadamente 100 micrómetros y aproximadamente 1000 micrómetros (por ejemplo, aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 5 900, 950, o aproximadamente 1000 micrómetros).

En algunas realizaciones, la micromatriz preparada puede embalsarse, por ejemplo, para su almacenamiento o envío. Por ejemplo, el embalaje puede incluir una película de polímero, 10 tal como una película de polímero impermeable a la humedad y/o gas. Las matrices pueden embalsarse individualmente o en envases de multimatrices.

EJEMPLOS

15

Los siguientes ejemplos se han incluido para proporcionar las directrices a un experto en la técnica para practicar las realizaciones representativas de la materia objeto que ahora se desvela. A la luz de la presente divulgación y el nivel 20 general del experto en la técnica, aquellos expertos pueden apreciar que los siguientes ejemplos están concebidos con fines ilustrativos únicamente y que numerosos cambios, modificaciones y alteraciones pueden emplearse sin alejarse del ámbito de la materia objeto que ahora se desvela.

25

En general, los resultados *in vitro* e *in vivo* presentados son Promedio $\pm$ el error estándar del promedio. Se realizó un análisis estadístico usando la prueba t de Student o la prueba ANOVA. Con un valor $p < 0,05$, se consideraron las diferencias 30 entre los grupos experimentales y los grupos de control estadísticamente significantes.

EJEMPLO 1

SÍNTESIS REPRESENTATIVA DE

ÁCIDO HIALURÓNICO SENSIBLE A LA HIPOXIA

5

El ácido hialurónico sensible a la hipoxia (AH-SH) se sintetizó conjugando químicamente el AH con 6-(2-nitroimidazol)hexilamina a través de formación de amida. Todos los químicos se compraron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Estados Unidos de América) a menos que se especifique lo contrario y se usaron tal como se recibieron. El ácido hialurónico de sodio (peso molecular 300 kiloDaltons (kDa) se compró de Freda Biochem Co., Ltd. (Shandong, China).

15

Primeramente, se sintetizó 6-(2-nitroimidazol)hexilamina para su reacción con los ácidos carboxílicos del AH. En resumen, se disolvió nitroimidazol (NI, 0,15 g, 1,3 mmol) en DMF, al cual se añadió K_2CO_3 (0,28 g, 2,0 mmol). Después, se añadieron gota a gota 6-(*terc*-butiloxycarbonilamino)hexil bromida (es decir, 6-(BOC-amino)hexilbromida, 0,39 g, 1,4 mmol) dentro de la solución y se agitó a 80°C durante 4h. Las impurezas sólidas se retiraron de la mezcla de reacción mediante filtro y se lavaron con metanol. El disolvente residual se evaporó a continuación para obtener el producto sólido, que se suspendió en agua desionizada (DI) y se extrayó con acetato de etilo. La capa orgánica se recogió y secó sobre sulfato de sodio y a continuación se concentró. El producto se volvió a disolver en metanol sobre hielo. Se añadieron cinco (5) ml 1,25 M de HCl en metanol a la solución y se agitó durante 24h a temperatura ambiente (TA), después de lo cual se retiró el disolvente usando un evaporador rotatorio para obtener el

30

NI funcionalizado con amina. A continuación, se conjugó 6-(2-nitroimidazol)hexilamina con el AH en la presencia de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). En resumen, se disolvieron 0,24 g de AH (peso molecular: ~300 kDa) en agua, a los cuales se añadieron EDC (0,56 g, 3,4 mmol) y NHS (0,39 g, 3,4 mmol) y agitaron durante 15 min a TA. A continuación se añadió 6-(2-nitroimidazol)hexilamina (0,18 g, 0,85 mmol) a la mezcla a TA durante 24 h. La solución de reacción se dializó exhaustivamente frente a una mezcla 1:1 de agua DI y metanol durante 1 día y frente a agua DI durante 2 días. Después, Se obtuvo AH-SH mediante liofilización y se caracterizó por RMN ^1H (Varian GEMINI 2300; Varian Inc., Palo Alto, California, Estados Unidos de América).

6-(2-nitroimidazol)hexylamina: RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz, δ ppm): 1,30-1,78 (m, 8H, $\text{NH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4$), 2,73 (s, 2H, NH_2CH_2), 4,38 (s, 2H, NCH_2), 7,19 (s, 1H), 7,87 (s, 1H).

AH-SH: RMN ^1H (D_2O , 300 MHz, δ ppm): 1,88-2,40 (m, 8H, $\text{NH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4$), 2,87-3,19 (m, 4H, NH_2CH_2 , NCH_2), 7,19 (s, 1H), 7,48 (s, 1H).

EJEMPLO 2

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS SENSIBLES A GLUCOSA (VGF)

Las VGF se prepararon mediante autoensamblaje en una solución acuosa. En resumen, 20 mg de AH-SH anfifílico se disolvió en agua/metanol (2/1, v/v), seguido por la adición de 10 mg de insulina humana y 1,0 mg de GOx. Se compró insulina

recombinante humana (sal de zinc (Zn), 27,5 unidades internacionales por miligramo (UI/mg)) de Life Technology (Carlsbad, California, Estados Unidos de América). La emulsión se agitó a 4°C durante 2 horas. A continuación se retiró el metanol mediante diálisis frente a agua DI durante 1 día. El valor pH de la solución de VGF resultante se ajustó a 5,3 (el punto isoeléctrico (pI) de insulina) para retirar la insulina no cargada mediante centrifugación a 8.000 rpm durante 10 min y se filtró adicionalmente mediante un filtro centrífugo (100.000 Da umbral de masa molecular, Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos de América) a un pH de 7,4. La solución de VGF se almacenó a 4°C para un estudio posterior. La capacidad de carga de insulina (CC) de las VGF se determinó midiendo el contenido de insulina cargada usando un análisis de proteínas Coomassie Plus (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos de América). El potencial zeta y la distribución de tamaño de las VGF se midieron sobre el Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). Se obtuvieron imágenes de microscopio electrónico de transmisión (MET) sobre el instrumento JEOL 2000FX TEM (JEOL EE.UU., Inc., Peabody, Massachusetts, Estados Unidos de América).

Por lo tanto, se formaron VGF mediante autoensamblaje de un ácido hialurónico sensible a la hipoxia, encapsulando insulina humana recombinante y GOx en el núcleo. Véase la figura 1A. El AH-SH se obtuvo a través de la formación de un enlace amida con NI funcionalizado con amina en tres etapas como se describe en el ejemplo 1. La incorporación de grupos NI hidrofóbicos presente el AH anfifílico derivado, permitiendo la formación de VGF en la solución acuosa. Además, NI proporciona un

elemento sensible a la hipoxia, que se espera que se bio-reduzca en condiciones hipóxicas. Véase Nunn y col., Eur. J. Nucl. Med, 22(3):265-280 (1995); y Takasawa y col., Stroke, 39(5):1629-1637 (2008). El producto reducido con los grupos amina es soluble en agua, conduciendo al desensamblaje de las VGF. Véase la figura 1A.

Las VGF tenían una forma esférica con un tamaño monodispersado. Véase la figura 2A, imagen MET a la izquierda. El diámetro promedio de las VGF se determinó como 118 nm mediante la dispersión dinámica de luz (DLS) (véase figura 2B), que es consistente con la observación con MET. El potencial zeta de las VGF se midió como $-34.7 \pm 0,4$ mV debido al carboxilo residual de AH. La imagen de fluorescencia de las VGF con insulina marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) verificó adicionalmente la encapsulación exitosa de insulina. Véase la figura 2D. La capacidad de carga de insulina de las VGF se determinó como 8,7 %. Si no estaban expuestas a condiciones hipóxicas, las VGF eran altamente estables y no se observó una precipitación significativa a 4°C durante un mes.

EJEMPLO 3

LIBERACIÓN DE INSULINA SENSIBLE A LA GLUCOSA DE VGF *IN VITRO*

Para evaluar la capacidad de respuesta de glucosa de las VGF, las VGF se incubaron en un tampón de PBS de 600 μ l (NaCl, 137 mM; KCl, 2,7 mM; Na_2HPO_4 , 10 mM; KH_2PO_4 , 2 mM; pH 7,4) con 100 μ M de NADPH y 5 μ g/ml de citocromo c reductasa. Se añadieron diversas cantidades de glucosa para proporcionar soluciones con una concentración final de glucosa de 0 mg/dl, 100 mg/dl o 400 mg/dl. La solución de concentración de glucosa de 400 mg/dl

representa un nivel de glucosa hiperglucémico típico, la solución de concentración de glucosa de 100 mg/dl representa un nivel de glucosa normoglucémica y la solución de concentración de glucosa de 0 mg/dl se usó como control. Las

5 mezclas se incubaron a 37°C en un recipiente con una concentración de oxígeno del 21 % mediante regulación con medidor de flujo de masa. En tiempos predeterminados, se registró el valor pH de cada mezcla usando un medidor de pH (AB15, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts,

10 Estados Unidos de América), y a continuación el valor pH se ajustó al pI de insulina para aislar la insulina liberada mediante centrifugación a 8.000 rpm durante 10 min. La concentración de insulina residual encapsulada en las VGF se examinó usando una prueba de proteínas Coomassie Plus (Thermo

15 Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos de América). La absorbancia se detectó a 595 nm sobre una placa de lectura multimodo INFINITE® 200 PRO (Tecan Group Ltd., Zúrich, Suiza), y el contenido de insulina se calibró con una curva estándar de insulina. Para representar la absorción UV-

20 Vis de las soluciones de VGF, la intensidad de absorbancia se midió a 330 nm en tiempos establecidos. Para evaluar el perfil de liberación de la insulina a partir de las VGF en distintas condiciones de pH, las VGF se incubaron en un tampón de PBS a un pH de 4,0 a un pH de 7,4, ambos en la presencia de 100 µM

25 de NADPH y 5 µg/ml de citocromo c reductasa. La insulina liberada se midió usando el mismo procedimiento mencionado anteriormente. El espectro de dicroísmo circular (DC) de UV lejano de una solución de insulina nativa y de una solución de insulina liberada a partir de las VGF (0,1 mg/ml) se analizaron

30 usando un espectrómetro DC (Aviv Biomedical Inc., Lakewood, New Jersey, Estados Unidos de América).

El consumo de oxígeno, causado por la oxidación de glucosa catalizada por GOx, se midió usando una sonda molecular fosforescente sensible al oxígeno. Véase Will y col., Nat. Protoc., 1(6):2563-2572 (2006); y Fercher y col., Acs Nano, 5(7):5499-5508 (2011). La muestra expuesta a la solución hiperglucémica tenía una concentración de oxígeno inferior en comparación con las otras dos muestras. Véase la figura 2F. Esta alcanzó rápidamente equilibrio en 10 minutos, sugiriendo que la velocidad de consumo de oxígeno alcanzó el equilibrio con la velocidad de disolución. El valor pH registrado de la solución de VGF en una solución de glucosa de 400 mg/dl disminuyó de manera constante con el tiempo, justificando adicionalmente la conversión de glucosa en ácido glucónico catalizado por GOx.

En este entorno hipóxico, los grupos nitro del AH-SH se redujeron eficazmente mediante electrones de NADPH catalizado por la reductasa. De acuerdo con el espectro de absorción de UV-Vis de las VGF, la disminución del máximo característico de NI a 330 nm y la generación de un nuevo máximo a 280 nm, que se corresponde con el máximo característico de 2-aminoimidazol, también confirmó que el grupo nitro de NI se convirtió al grupo amina a través de la reacción de reducción en una condición hipóxica después de una incubación de 2 horas con una solución de glucosa de 400 mg/dl. La concentración residual de NI se controló en tiempo real mediante la medición de la absorbencia de UV-Vis a 330 nm. La intensidad correspondiente de VGF incubadas con la solución de glucosa de 400 mg/dl se redujo gradualmente con el tiempo (véase figura 2G), sugiriendo el reemplazo de los grupos NI hidrofóbicos con grupos amina en el

núcleo.

Por el contrario, se observó un descenso mucho más lento de intensidad de absorción en las muestras asociadas con la solución de glucosa de 100 mg/dl y no se observó ninguna disminución en la muestra de control sin glucosa. Además, se observaron evoluciones correspondientes de la conformación y tamaño de VGF a través de imágenes MET y DLS. Véase figura 2A y figura 2C.

10

Para validar adicionalmente la liberación de insulina a partir de las VGF desensambladas, la insulina conjugada con FITC se encapsuló dentro de VGF. La señal de fluorescencia se distribuyó más homogéneamente en la solución completa tras 1 h, mientras que la solución de VGF mostró una gran cantidad de señal de clúster, sugiriendo la liberación de insulina FITC con el tiempo. Véase la figura 2E.

15

Se logró un perfil de liberación de insulina rápido a partir de las VGF incubadas en la solución de glucosa de 400 mg/dl debido a la disociación de VGF, mientras que solo una pequeña cantidad de insulina se liberó de las VGF incubadas en las soluciones de PBS con 0 o 100 mg/dl de glucosa. Véase la figura 3A. Para validar si la velocidad de liberación de insulina se corresponde directamente con la reducción de grupos NI como resultado del nivel de oxígeno en lugar del nivel de pH disminuido, se investigó la cinética de liberación en una solución de pH=4,0. El resultado demostró que había una liberación de insulina insignificante de la muestra incubada en una solución de pH=4,0, confirmando que las VGF son estables en una condición ácida. Además, un perfil de liberación

20

25

30

cinética alterable de insulina se observó al variar la concentración de glucosa. Véase la figura 3B. Un máximo de diferencia de 6,6 veces en la velocidad de liberación de insulina se logró cuando la concentración de glucosa se cambió de 100 mg/dl a 400 mg/dl. Por el contrario, las VGF que contenía la mitad de cantidad de GOx mostraron una velocidad de liberación más lenta debido a la velocidad de consumo de oxígeno relativamente más lento, sugiriendo que la velocidad de liberación de insulina puede ajustarse variando la dosis de encapsulación de la enzima. Además, el perfil de liberación de insulina de las VGF presentó un patrón pulsátil cuando se expusieron de forma alternativa a un estado normal e hiperglucémico, cambiando los estados cada 20 min durante varios ciclos. Véase la figura 3C. Las VGF respondieron a cambios en las concentraciones de glucosa rápidamente en comparación a los sistemas de bucle cerrado sintéticos existentes. Véase Mo y col., ChSRv, 43(10):3595-3629 (2014); y Veisehy col., Nature Reviews Drug Discovery, 14(1):45-57 (2015). Por ejemplo, las VGF sensible a la hipoxia mostraron una velocidad de respuesta significativamente más rápida a los niveles hiperglucémicos cuando se compararon con nanopartículas sensibles a la glucosa desencadenadas por pH sensible previamente registradas (véase Gu y col., ACS nano; 7(5):4194-4201 (2013)), con la misma cantidad de enzimas. Sin quedar limitado a teoría alguna, se cree que la velocidad de respuesta más rápida de las VGF que ahora se desvelan puede atribuirse a un logro más rápido de un "punto de transformación estructural" para la disociación de la formulación desencadenada por el microentorno hipóxico al contrario de el desencademamiento por un entorno ácido. De forma colectiva, los resultados sugieren que el desensamblaje de las VGF y la

liberación de insulina es un procedimiento medido por glucosa y dependiente de la hipoxia. Adicionalmente, la estructura conformacional secundaria de la insulina liberada a partir de las VGF (0,1 mg/dl) se mantuvo a la de la insulina nativa, tal como se indica mediante el espectro de dicroísmo circular (DC). Véase la figura 3D.

EJEMPLO 4

FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE

10 PARCHE DE MATRIZ DE MICROAGUJAS (MA) CARGADO CON VGF

Para lograr una administración conveniente, se preparó un parche de matriz de microagujas (MA) que contiene VGF. El parche de matriz de microagujas puede ser indoloro y desechable.

En resumen, las VGF se cargaron en primer lugar en las puntas de un molde de silicona para las MA mediante centrifugación, seguido de la adición gota a gota de una solución de AH modificado con acrilato (HA-*m*) que contenía un reticulante de *N,N'*-metilenebisacrilamida (MBA) y un fotoiniciador. Véase la figura 4A. Con irradiación UV, la matriz de agujas a base de AH se fotoreticuló, lo que puede ayudar a aumentar la rigidez de las MA y evitar la pérdida indeseada de las VGF de las agujas. Las MA obtenidas tenían una forma cónica y las agujas se dispusieron en una matriz de 10 x 10 con un área de 6 x 6 mm (véase figura 4B), que inmovilizó posteriormente con una cinta médica. Cada aguja tenía un radio base de 150 μm , una altura de 600 μm , y un radio de punta de aproximadamente 10 μm . Véase la figura 4C. La figura 4D muestra la imagen de fluorescencia de una MA representativa que

contiene VGF cargadas con insulina FITC, indicando que las VGF se distribuyeron de forma uniforme en el interior. Además, midiendo la resistencia mecánica usando una máquina de compresión de tracción, la fuerza de fallo para la MA reticulada se determinó como 0,06 N/aguja, mientras que la fuerza de fallo era solo de 0,02 N/aguja para la MA no reticulada. Véase la figura 4E. En consecuencia, parece que la rigidez de las MA mejora con la reticulación, lo que puede proporcionar una resistencia suficiente para facilitar la inserción cutánea sin romperse.

Para investigar si las VGF encapsuladas en las MA mantenían la capacidad de respuesta a la glucosa después de las fabricaciones de las MA, las puentes de las agujas que contenían VGF se volvieron a disolver dentro de un tampón de PBS y se trataron con distintas soluciones de concentración de glucosa. Había una diferencia insignificante en el perfil de liberación en comparación con el perfil de liberación de insulina de las VGF originales.

EJEMPLO 5

ESTUDIOS *IN VIVO* de las microagujas para TRATAMIENTO DE LA DIABETES TIPO 1

Para evaluar el eficacia *in vivo* de los parches de matriz de MA para el tratamiento de la diabetes, se agruparon ratones diabéticos del tipo 1 inducidos con estreptozotocina (STZ) (machos C57B6, Jackson Lab, Bar Harbour, Maine, Estados Unidos de América) (cinco ratones por grupo) y se administró transcutáneamente distintas muestras de parche sobre su dorso (véase figura 5A, superior derecha), incluyendo: un parche de

MA vacío que contenía solo AH-*m*; un parche de MA cargado con insulina recombinante humana; una parche de MA cargado con VGF que contenía tanto insulina como enzima (VGF(E+I)); un parche de MA cargado con VGF que contenía insulina y media dosis de enzima (VGF(1/2E+I)); y un parche de MA cargado con VGF que contenía insulina solo (VGF(I)). La dosis de insulina aplicada para cada ratón fue de 10 mg/kg. La glucosa equivalente de plasma se midió a partir de muestras de vena caudal (aproximadamente 3 microlitros) usando un medidor de glucosa Clarity GL2Plus (Clarity Diagnostics, Boca Raton, Florida, Estados Unidos de América). Los niveles de glucosa del ratón se controlaron durante dos días antes de la administración, y todos los ratones estuvieron en ayunas durante la noche antes de la administración de los distintos parches. Los niveles de glucosa para cada ratón de controlaron (a 5, 15, 30, 60 minutos y una vez por hora después) hasta que volvieron a una hiperglucemia estable.

Para medir la concentración de insulina en plasma *in vivo*, se sacaron 25 microlitros de muestras de sangre a partir de la vena caudal de los ratones en puntos de tiempo indicados. El suero se aisló y almacenó a -20°C hasta su análisis. La concentración de insulina en plasma se midió usando el kit ELISA de Insulina Humana (Calbiotech, Spring Valley, California, Estados Unidos de América) según el protocolo del fabricante.

Los parches de matriz de MA que ahora se desvela pueden penetrar de forma eficaz la piel del dorso del ratón, como se evidencia por la mancha azul tripán (véase figura 5A, superior derecha) y la macha de hematoxilina y eosina (H&E). Véase la

figura 5A, inferior. La glucosa en sangre de los ratones tratados en cada grupo se controló durante el tiempo. La glucosa en sangre en ratones tratados con un parche de MA cargado con VGF(E+I) disminuyó rápidamente a casi 200 mg/dl a las 0,5 h y se mantuvo en un estado normoglucémico (< 200 mg/dl) hasta 4 h antes de aumentar gradualmente. Véase la figura 5B. Sin quedar limitado a teoría alguna, esta velocidad de respuesta rápida aparece atribuible a la generación rápida de un microentorno hipóxico que rápidamente activa la disociación de VGF; mientras que la velocidad relativamente lenta de oxígeno *in vivo* en comparación con los iones de hidrógeno puede facilitar adicionalmente este procedimiento. Cuando la dosis de enzima en las MA para cada ratón se redujo (de 1 mg/kg a 0,5 mg/kg), la glucosa en sangre de los ratones tratados con un parche de MA cargado con VGF(1/2E+I) disminuyó a aproximadamente 350 mg/dl a las 0,5 h, y aumentó de forma constante posteriormente. En la ausencia de la enzima, la glucosa de los ratones administrados con un parche de MA cargado con VGF(I) no mostraron una disminución notable, sugiriendo que las VGF fueron estables *in vivo*. De forma correspondiente, los ratones administrados con un parche cargado con VGF(E+I) presentaron una concentración de insulina en plasta consistentemente mayor durante al menos 24 horas en comparación con aquellos administrados con parches de MA cargados con VGF(I) o VGF(1/2E+I), como se cuantificó mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Véase la figura 5C. La imagen MEB de un parche de MA cargado con VGF(E+I) insertado dentro de la piel mostró puntas colapsadas después del tratamiento (véase figura 5D), indicando adicionalmente que las VGF cargadas se desensamblan y disuelven en los tejidos subcutáneos.

Se llevó a cabo una prueba de tolerancia a la glucosa para confirmar la capacidad de respuesta a la glucosa *in vivo* a MA una hora después de la administración de un parche de MA cargado con VGF(E + I) y un parche de MA cargado con insulina. En resumen, los ratones se dejaron en ayunas durante la noche y se administró un parche de MA cargado con VGF(E + I) o un parche de MA cargado con insulina, cada uno con una dosis de insulina de 10 mg/kg para cada ratón y a continuación una solución de glucosa en PBS se inyectó intraperitonealmente en todos los ratones a una dosis de 1,5 g/kg. Los niveles de glucosa se controlaron a los 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 y 120 minutos tras su inyección. La prueba de tolerancia a la glucosa sobre ratones sanos se usó como control. De manera similar, a los ratones sanos usados para evaluar la hipoglucemia se les administró un parche de MA cargado con insulina, un parche de MA cargado con VGF(I) o un parche de MA cargado con VGF(E + I), pero no se sometieron a una tolerancia a la glucosa.

En la prueba de tolerancia a la glucosa realizada 1 h después de la administración de los parches de MA, los ratones de control sanos mostraron un aumento rápido de glucosa en sangre después de la inyección de glucosa intraperitoneal, seguido de una disminución gradual hasta la normoglucemia. Véase la figura 5E. Los ratones diabéticos tratados con un parche de MA cargado con VGF(E+I) mostraron un aumento ralentizado de glucosa en sangre después de la inyección de glucosa y a continuación una rápida disminución a un estado normal a los 30 min. Sin embargo, la glucosa de los ratones administrados con un parche de MA cargado con insulina no disminuyó en 120 min. El área bajo la

curva se calculó entre 0 y 120 min para medir la capacidad de respuesta de la MA. Como se muestra en la figura 5F, el parche de MA cargado con VGF(E+I) tuvo una respuesta significativamente rápida hacia la tolerancia de glucosa.

5

Para evaluar adicionalmente la capacidad de control de glucosa *in vivo* de las MA, se realizó la administración en serie de parches de MA. El nivel de glucosa de ratones tratados con un primer parche de MA cargado con VGF(E+I) (dosis de insulina para cada ratón: 5 mg/kg) disminuyó rápidamente a aproximadamente 200 mg/dl a la 1 h. Véase figura 5G. No obstante, la glucosa no disminuyó adicionalmente a un nivel hipoglucémico al aplicar otro (es decir, un segundo) parche de MA cargado con VGF(E+I) (dosis de insulina para cada ratón: 5 mg/kg), y mantuvo las concentraciones de glucosa a aproximadamente 200 mg/dl durante otras 3 h. En contraste, los ratones administrados con un segundo parche de MA cargado con VGF(I) (dosis de insulina para cada ratón: 5 mg/kg) o que no recibieron ningún parche adicional mostraron un aumento rápido de glucosa a un estado hiperglucémico en 3 h. Otro grupo de ratos se administró posteriormente con un parche de MA cargado con insulina y su glucosa en sangre continuó disminuyendo, conduciendo a un riesgo potencial de hipoglucemia. El estudio sobre ratones sanos indicó adicionalmente que existe poca pérdida de insulina en los parches de MA cargados con insulina y que tenían un riesgo reducido de hipoglucemia en comparación con la MA cargada con insulina. Véase la figura 5H. El índice de hipoglucemia correspondiente (definido como la caída en glucosa desde la lectura inicial hasta el punto más bajo dividido por el tiempo sobre el cual se alcanzó esta caída) se calculó para medir cuantitativamente el alcance hasta el que

la insulina provoca la hipoglucemia. Las MA cargadas con VGF mostraron un índice hipoglucémico reducido en comparación con MA cargada con insulina cuando se administró en un estado normoglucémico. Véase la figura 5I. Además, Se encontró AH por todo el cuerpo humano y las VGF vacías no mostraron una toxicidad significativa en diversas concentraciones estudiadas.

EJEMPLO 6

DISCUSIÓN DE LOS EJEMPLOS 1-5

10

Los sistemas de suministro de insulina sensible a glucosa basados en Gox actuales usan principalmente matrices que consisten en materiales sensibles al pH, que liberan insulina por o bien pronación o bien degradación debido a la generación enzimático de ácido glucónico. No obstante, su eficacia puede estar limitada por una respuesta lenta en los cambios de glucosa en sangre, especialmente en un entorno fisiológico tamponado. Las VGF que ahora se desvelan se cree que son la primera demostración de una estrategia de suministro de insulina sensible a la glucosa basado en una formulación sensible a la hipoxia en lugar de una sensible al pH. Se generó rápidamente un microentorno hipóxico local en una solución de tampón de PBS debido al consumo enzimático de oxígeno, como se evidenció mediante una sonda fosforescente sensible al oxígeno. Posteriormente, las cadenas laterales hidrofóbicas de AH-SH se redujeron en cadenas hidrófilas, resultando en el desensamblaje de las VGF, aumentando posteriormente la velocidad de liberación de insulina. Se observó un cambio en la morfología de las VGF a los 20 min después de la incubación en tampón de PBS con 400 mg/de glucosa mediante MET, indicando el desensamblaje de VGF. El perfil de liberación de insulina *in*

vitro de VGF indicó una velocidad de liberación más rápida que las nanopartículas sensibles a glucosa basadas en pH sensible registradas previamente. Además, la cinética de liberación de insulina podría ajustarse variando la dosis de enzima tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que implica adicionalmente que la liberación de insulina a partir de las VGF se somete a un procedimiento mediado por glucosa y dependiente de la hipoxia.

Las VGF se integraron dentro de un parche de matriz de MA basado en AH para la administración conveniente, indolora y continua del suministro de insulina. La matriz de AH reticulada no solo ayudó a mejorar la resistencia mecánica y la capacidad de penetración cutánea, sino que también pareció que restringía la pérdida de insulina a partir de las VGF para evitar la liberación en explosión. Adicionalmente, el armazón de los parches de agujas y vesículas están ambos hechos a partir de AH, que es altamente biocompatible.

Las MA cargadas con VGF(E+I) mostraron una regulación excelente en un intervalo normal con capacidad de respuesta más rápida. Además, a partir de las vesículas altamente sensibles, la absorción rápida por los ganglios a través de la administración subcutánea también puede contribuir a los rápidos méritos. La prueba de tolerancia a la glucosa *in vivo* demostró que las MA cargadas con VGF eran más receptivas a la tolerancia de glucosa y podría evitar eficazmente un riesgo potencial de hipoglucemia. Además, los resultados de una administración en serie con MA demostraron que podrían controlar precisamente la glucosa en un intervalo normal por periodos más prolongados. Considerando que la insulina humana usada en estos ejemplos es relativamente insensible en ratones,

la dosis real para el uso humano potencial podría ser significativamente inferior. Se cree que el "parche de insulina inteligente" que ahora se desvela ofrece una oportunidad clínica para el suministro de bucle cerrado de insulina en de
5 un modo con una capacidad de respuesta de glucosa indolora y segura.

Se entenderá que diversos detalles de la materia objeto que ahora se desvela pueden cambiarse sin alejarse del ámbito de la materia objeto que ahora se desvela. Además, la anterior
10 descripción tiene únicamente fines ilustrativos y no fines limitativos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

(a) un material polimérico anfifílico, comprendiendo el

5 material polimérico anfifílico un polímero hidrófilo
conjugado con un grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia,
en donde el grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia
comprende un resto sensible a la hipoxia que puede
reducirse en la presencia de un entorno hipóxico para
10 formar un resto hidrófilo;

(b) un agente de tratamiento de la diabetes, siendo
opcionalmente el agente de tratamiento de la diabetes una
insulina o un derivado bioactivo de la misma; y

(c) un agente oxidante de glucosa.

15

2. La composición de la reivindicación 1, en la que el
polímero hidrófilo es biodegradable.

3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación
20 2, en la que el polímero hidrófilo es un poliaminoácido, tal
como ácido poliglutámico, un copolímero en bloque sintético o
un polisacárido, en la que opcionalmente el polímero hidrófilo
es un polisacárido, en la que opcionalmente de forma adicional
el polisacárido es un glucosaminoglicano.

25

4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones
1-3, en la que el polímero hidrófilo es ácido hialurónico.

5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones
30 1-4, en la que el resto sensible a la hipoxia comprende un
nitroimidazol.

6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el grupo hidrofóbico está unido de forma covalente al polímero hidrófilo.

5

7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicho material polimérico anfifílico comprende un polímero hidrófilo conjugado con un grupo amino de un precursor de grupo hidrofóbico sustituido con amino, formando de este modo una amida entre dicho grupo amino y un grupo de ácido carboxílico presente sobre el polímero hidrófilo.

10

8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el material polimérico anfifílico comprende ácido hialurónico conjugado con 6-(2-nitroimidazol)hexilamina.

15

9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el agente oxidante de glucosa es glucosa oxidasa (GOx).

20

10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el agente de tratamiento de la diabetes es una insulina o un derivado bioactivo de la misma, en la que la insulina o el derivado bioactivo de la misma se seleccionan a partir de insulina humana, una insulina humana recombinante, insulina a partir de un animal no humano, una insulina de acción rápida, un análogo de insulina de acción rápida, una insulina de acción intermedia y/o una insulina de acción prolongada.

25

30

11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones

1-10, en la que el agente de tratamiento de la diabetes es insulina humana recombinante.

12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones
5 1-11, en la que el material polimérico anfifílico forma una vesícula que encapsula dicho agente de tratamiento de la diabetes y dicho agente oxidante de glucosa.

13. Una nanopartícula que comprende la composición de una
10 cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

14. Una vesícula que comprende un material polimérico anfifílico que comprende un polímero hidrófilo conjugado con un grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia, en la que dicho
15 grupo hidrofóbico sensible a la hipoxia comprende un resto sensible a la hipoxia que es capaz de reducirse en un entorno hipóxico para formar un resto hidrófilo y adicionalmente en la que (i) un agente de tratamiento de la diabetes, opcionalmente una insulina o un derivado bioactivo de la misma y (ii) un
20 agente oxidante de glucosa están contenidos dentro de dicha vesícula.

15. La vesícula de la reivindicación 14, en la que el polímero hidrófilo es un poliaminoácido, tal como ácido poliglutámico,
25 un copolímero en bloque sintético o un polisacárido, tal como un glucosaminoglicano, opcionalmente en la que el polímero hidrófilo es ácido hialurónico.

16. La vesícula de las reivindicaciones 14 o 15, en la que el
30 resto sensible a la hipoxia comprende un nitroimidazol.

17. La vesícula de una cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en la que el agente de tratamiento de la diabetes es insulina humana recombinante.

5 18. La vesícula de una cualquiera de las reivindicaciones 14-17, en la que el agente oxidante de glucosa es glucosa oxidasa (GOx).

19. Una matriz de microagujas que comprende las vesículas de
10 una cualquiera de las reivindicaciones 14-18, en donde opcionalmente dicha matriz de microagujas comprende una pluralidad de microagujas en donde cada una de dicha pluralidad de microagujas tiene una longitud de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 1000 micrómetros, en donde opcionalmente de
15 forma adicional cada una de la pluralidad de microagujas tiene una longitud de aproximadamente 600 micrómetros.

20. La matriz de microagujas de la reivindicación 19, en donde la matriz de microagujas se proporciona como parte de un parche
20 cutáneo, en donde opcionalmente dicho parche comprende una o más capas de soporte y/o adhesivos compatibles con la piel.

21. Un sistema de suministro de insulina de bucle cerrado que comprende una matriz de microagujas de la reivindicación 19 o
25 la reivindicación 20.

22. Un procedimiento de suministro de un agente de tratamiento de la diabetes, opcionalmente una insulina o un derivado de insulina bioactivo, a un sujeto que lo necesite, comprendiendo
30 el procedimiento proporcionar una matriz de microagujas de las reivindicaciones 19 o 20 y aplicar dicha matriz a la superficie

cutánea de dicho sujeto, en donde cuando la glucosa entra en contacto con la matriz de microagujas se oxida, creando de este modo un entorno hipóxico que da como resultado la reducción del resto sensible a la hipoxia para formar un resto hidrófilo, conduciendo a la interrupción de las vesículas y la liberación del agente de tratamiento de la diabetes contenido en las vesículas.

23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que el suministro del agente de tratamiento de la diabetes se encuentra en una proporción que se corresponde con la concentración de glucosa que entra en contacto con la matriz de microagujas.

24. El procedimiento de las reivindicaciones 22 o 23, en el que el sujeto es un mamífero.

25. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22-24, en el que el sujeto es diabético.

26. Un procedimiento de preparación de una matriz de microagujas para el suministro sensible a glucosa de un agente de tratamiento de la diabetes, opcionalmente una insulina o un derivado bioactivo de la misma, comprendiendo el procedimiento:

(a) preparar una solución acuosa de una vesícula de una cualquiera de las reivindicaciones 14-18;

(b) dispersar dicha solución acuosa dentro de un molde que comprende una pluralidad de cavidades de microagujas, proporcionando de este modo un molde cargado;

(c) secar el molde cargado para retirar agua; y

(d) retirar el molde para proporcionar una matriz de

microagujas.

27. El procedimiento de la reivindicación 26, que comprende adicionalmente la reticulación de materiales poliméricos en la
5 matriz de microagujas.

28. El procedimiento de la reivindicación 26 o la reivindicación 27, en el que la etapa (b) se lleva a cabo al vacío.

10

29. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26-28, en el que después de la etapa (b), el molde se centrifuga para compactar las micelas dentro de las cavidades de las microagujas.

15

30. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26-29, en el que antes de la etapa (c), se añade al molde un polímero hidrófilo adicional y/o reticulante químico, en donde opcionalmente el molde se centrifuga después de la adición del
20 polímero hidrófilo adicional y/o del reticulante químico, en donde opcionalmente de forma adicional el polímero hidrófilo adicional es un ácido hialurónico modificado, tal como un ácido hialurónico modificado por alquilenos y/o modificado por acrilato.

25

31. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26-30, en el que la etapa (c) se realiza en un desecador al vacío.

30 32. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26-31, en el que el molde comprende silicona.

33. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 26-32, en el que la reticulación se realiza mediante exposición a irradiación UV.

RESUMEN**SISTEMA DE SUMINISTRO DE INSULINA SENSIBLE A LA GLUCOSA
USANDO NANOCOMPUESTOS SENSIBLES A LA HIPOXIA**

5

Se describe un sistema de suministro de insulina de bucle cerrado. De forma más particular, el sistema de suministro de insulina que ahora se desvela puede comprender vesículas sensibles a glucosa que liberan insulina en respuesta a la hipoxia desencadenada por la reducción enzimática de glucosa. Además o como alternativa a la insulina, el sistema de suministro puede liberar otros agentes de tratamiento de la diabetes, tales como agentes de tratamiento de la diabetes no basados en insulina. Las vesículas pueden prepararse a partir de un polímero sensible a la hipoxia, tal como un ácido hialurónico sensible a la hipoxia (AH-SH). El AH-SH puede comprender grupos hidrofóbicos que pueden reducirse en entornos hipóxicos para formar grupos hidrófilos. Las vesículas pueden cargarse en microagujas y parches de matriz de microagujas para su uso en el tratamiento de la diabetes o para regular de otro modo los niveles de glucosa en sangre en sujetos que necesiten tal tratamiento.

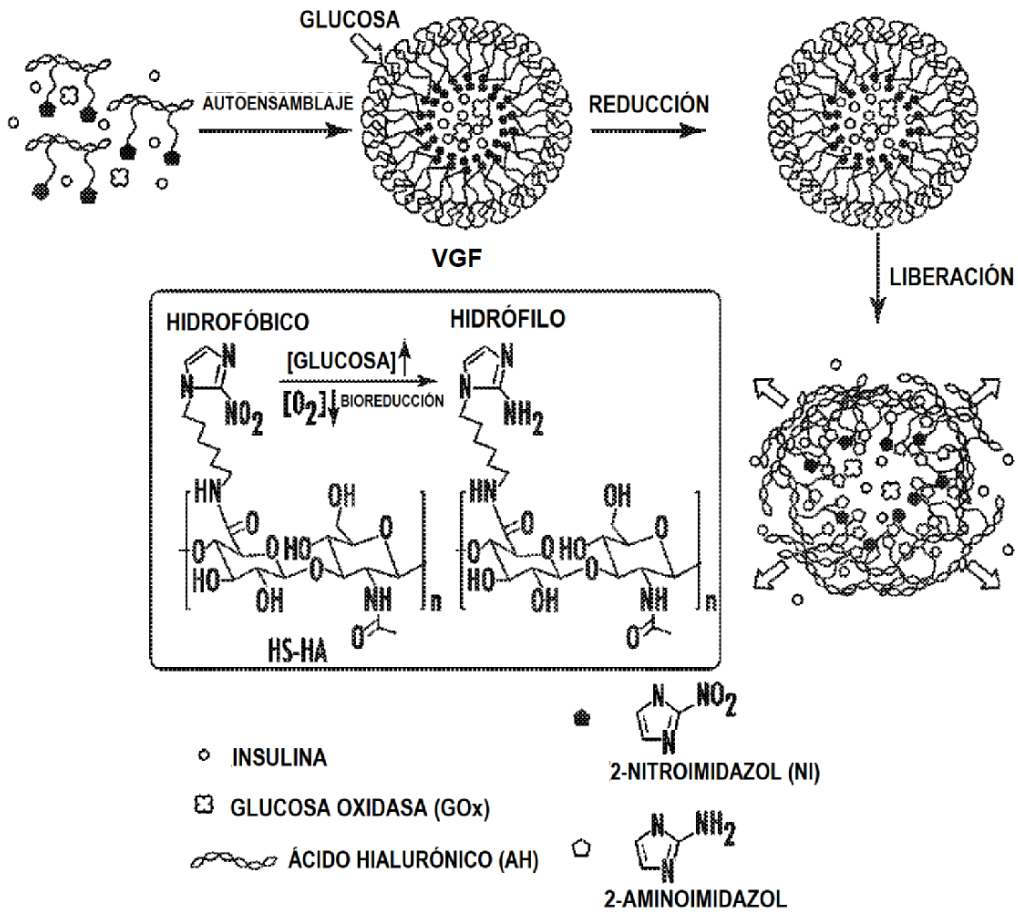


FIG 1A

INTEGRAR VGF CON MICROAGUJA

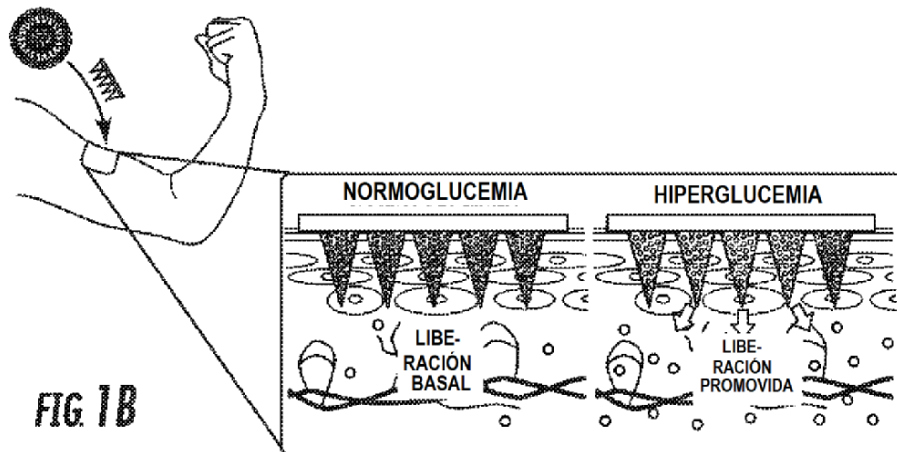


FIG 1B

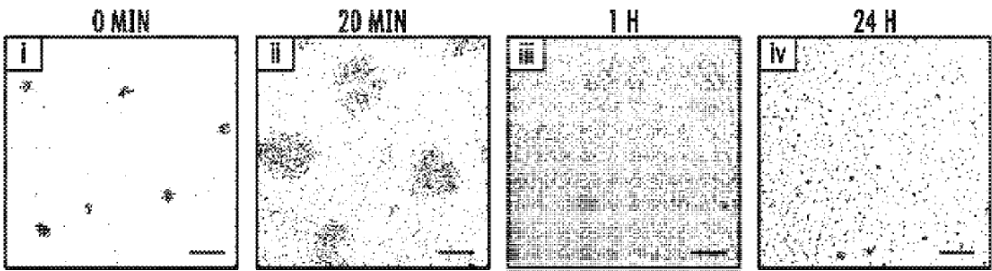
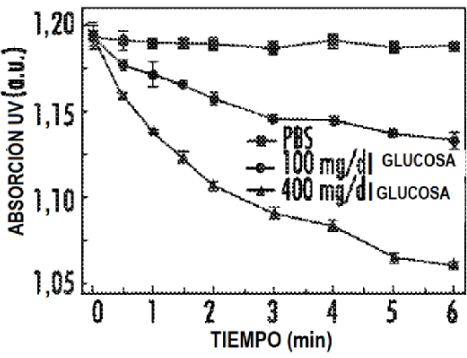
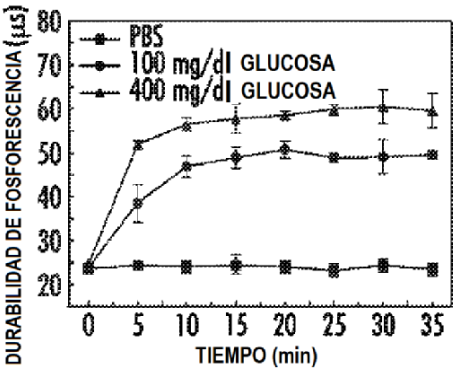
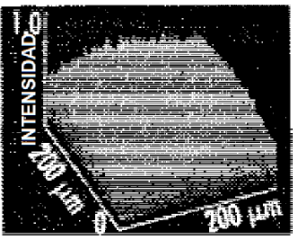
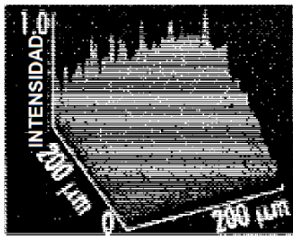
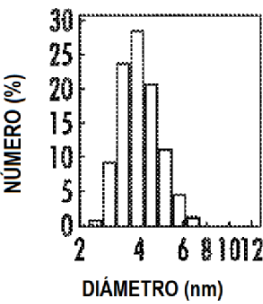
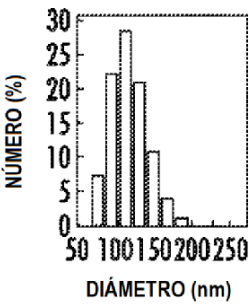


FIG 2A



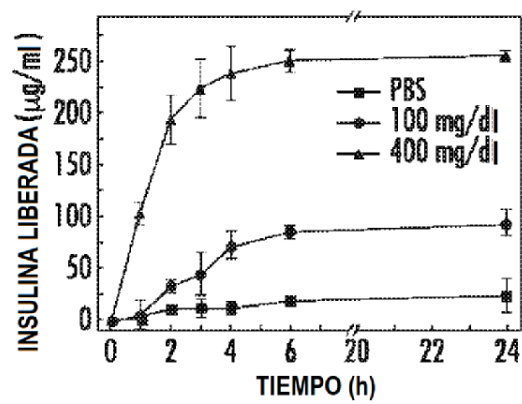


FIG. 3A

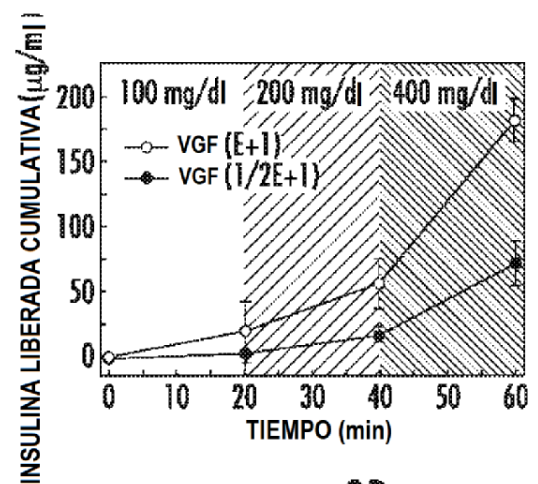


FIG. 3B

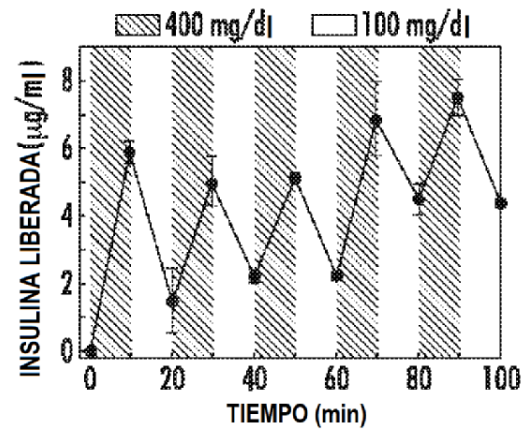


FIG. 3C

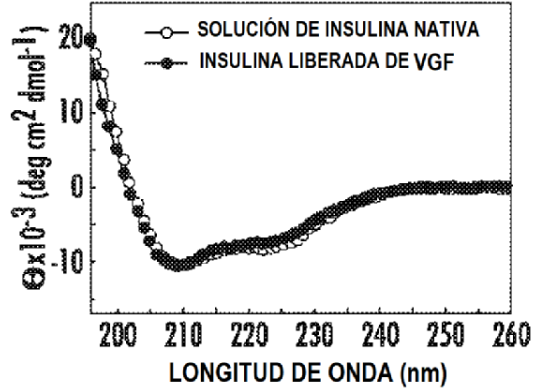


FIG. 3D

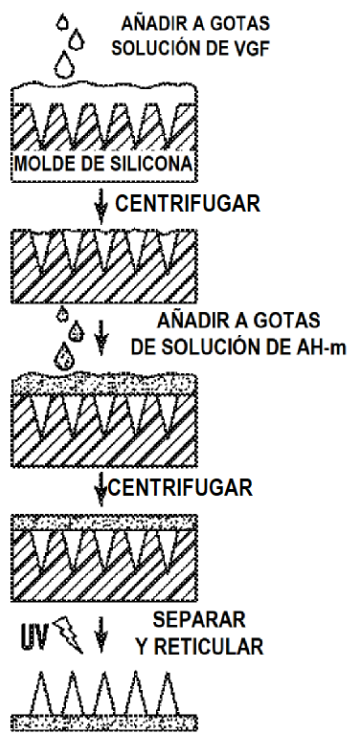


FIG. 4A

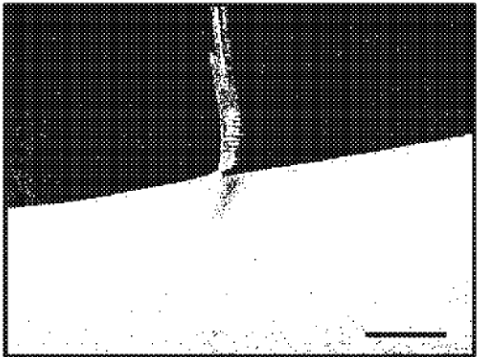


FIG. 4B

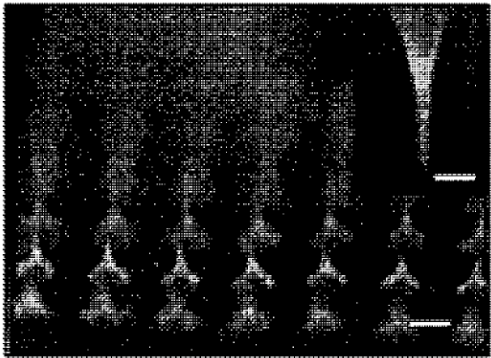


FIG. 4C

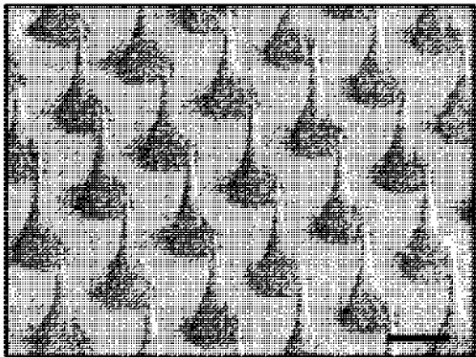


FIG. 4D

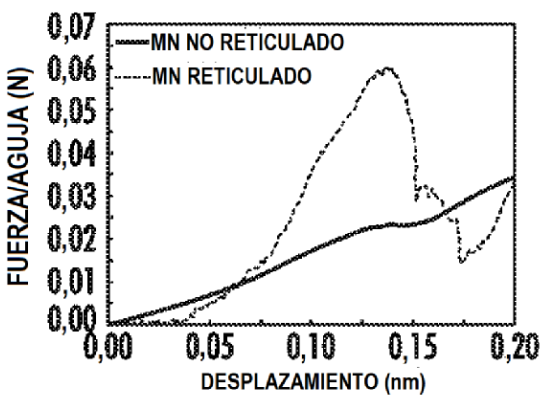


FIG. 4E

