

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 259**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2015 E 21156943 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024 EP 3906918**

54 Título: **Métodos y composiciones relacionadas con nanovehículos sintéticos con rapamicina en un estado sobresaturado estable**

30 Prioridad:

05.11.2014 US 201462075864 P

05.11.2014 US 201462075866 P

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

21.08.2024

73 Titular/es:

**CARTESIAN THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
704 Quince Orchard Road, Suite 210A
Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**O'NEIL, CONLIN;
GRISET, AARON, P. y
ALTREUTER, DAVID, H.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 977 259 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones relacionadas con nanovehículos sintéticos con rapamicina en un estado sobresaturado estable

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a nanovehículos sintéticos que comprenden un material vehículo de poliéster hidrófobo y rapamicina que está en una cantidad sobresaturada, estable. Preferiblemente, estos nanovehículos sintéticos inicialmente son esterilizables por filtración, y en algunas realizaciones presentan eficacia in vivo.

RESUMEN DE LA INVENCION

10 Se ha descubierto sorprendentemente que la concentración de rapamicina en la formulación durante la formación de nanovehículos sintéticos, en relación con el límite de solubilidad de la rapamicina en dicha formulación, puede tener un impacto significativo en la capacidad de los nanovehículos sintéticos resultantes para inducir inmunotolerancia. Además, la forma en que dicha rapamicina se dispersa por los nanovehículos sintéticos puede afectar a si los nanovehículos sintéticos resultantes son inicialmente esterilizables por filtración o no. Específicamente, se proporcionan composiciones de nanovehículos sintéticos y métodos relacionados creados en condiciones que dan como resultado una concentración de rapamicina que supera su solubilidad en la suspensión de nanovehículos formada. Dichos nanovehículos sintéticos pueden proporcionar una inmunotolerancia más duradera y ser inicialmente esterilizables por filtración.

15 En un aspecto, se proporciona una composición que comprende nanovehículos sintéticos que comprenden un material vehículo de poliéster hidrófobo y rapamicina, en donde la rapamicina está presente en los nanovehículos sintéticos en una cantidad sobresaturada, estable y, opcionalmente, en donde los nanovehículos sintéticos son inicialmente filtrables en condiciones estériles. En una realización específica, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada, estable, que es menos de 50% en peso basado en el peso de rapamicina con respecto al peso del material vehículo de poliéster hidrófobo.

20 En una realización de cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, los pesos son los pesos de receta de los materiales que se combinan durante la formulación de los nanovehículos sintéticos. En una realización de cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, los pesos son los pesos de los materiales en la composición de nanovehículos sintéticos resultante.

25 En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor de 45% en peso. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor de 40% en peso. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor de 35% en peso. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor de 30% en peso. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor de 25% en peso. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor de 20% en peso. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor de 15% en peso. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor de 10% en peso. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es mayor de 7% en peso.

30 En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, el material vehículo de poliéster hidrófobo comprende PLA, PLG, PLGA o policaprolactona. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, el material vehículo de poliéster hidrófobo comprende además PLA-PEG, PLGA-PEG o PCL-PEG.

35 En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad de material vehículo de poliéster hidrófobo en los nanovehículos sintéticos es de 5-95% en peso de material vehículo de poliéster hidrófobo/sólidos totales. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad de material vehículo de poliéster hidrófobo en los nanovehículos sintéticos es de 60-95% en peso de material vehículo de poliéster hidrófobo/sólidos totales.

5 En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, los nanovehículos sintéticos comprenden además un tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 comprende un éster de sorbitán, alcohol graso, éster de ácido graso, alcohol graso etoxilado, poloxámero, ácido graso, colesterol, derivado de colesterol o ácido o sal biliar. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 comprende SPAN 40, SPAN 20, alcohol oleílico, alcohol estearílico, palmitato de isopropilo, monoestearato de glicerol, BRIJ 52, BRIJ 93, Pluronic P-123, Pluronic L-31, ácido palmítico, ácido dodecanoico, tripalmitato de glicerilo o trilinoleato de glicerilo. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, el tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10 es SPAN 40.

15 En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, el tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10 está encapsulado en los nanovehículos sintéticos, presente en la superficie de los nanovehículos sintéticos, o en ambos. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10 es $\geq 0,1$ pero $\leq 15\%$ en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad de tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es ≥ 1 pero $\leq 13\%$ en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad de tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es ≥ 1 pero $\leq 9\%$ en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/material vehículo de poliéster hidrófobo.

20 En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la composición es inicialmente esterilizable por filtración a través de un filtro de 0,22 μm .

25 En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la media de una distribución de tamaños de partículas obtenida usando dispersión dinámica de luz de los nanovehículos sintéticos es un diámetro mayor que 120 nm. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, el diámetro es mayor que 150 nm. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, el diámetro es mayor que 200 nm. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, el diámetro es mayor que 250 nm. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, el diámetro es menor que 300 nm. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, el diámetro es menor que 250 nm. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, el diámetro es menor que 200 nm.

30 En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está encapsulada en los nanovehículos sintéticos.

35 En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la composición comprende además un antígeno. En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, el antígeno se mezcla con los nanovehículos sintéticos en la composición.

40 En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 En otro aspecto, se proporciona un kit que comprende una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento. En una realización de uno cualquiera de los kits proporcionados, el kit es para usar en uno cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento. En una realización de uno cualquiera de los kits proporcionados, cuando la composición no comprende antígeno, el kit comprende además un antígeno. En una realización de uno cualquiera de los kits proporcionados, la composición y el antígeno están contenidos en recipientes separados. En una realización de uno cualquiera de los kits proporcionados, la composición y el antígeno están contenidos en el mismo recipiente. En una realización de uno cualquiera de los kits proporcionados, el kit comprende además instrucciones de uso. En una realización de uno cualquiera de los kits proporcionados, las instrucciones de uso incluyen una descripción de uno cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento.

- 5 En otro aspecto, se proporciona un método para producir nanovehículos sintéticos que comprenden un material vehículo de poliéster hidrófobo y rapamicina, que comprende obtener o proporcionar el material vehículo de poliéster hidrófobo, obtener o proporcionar rapamicina en una cantidad que excede el límite de saturación de la rapamicina, combinar el material vehículo de poliéster hidrófobo y la rapamicina, y formando nanovehículos sintéticos tales como la rapamicina en una cantidad estable y sobresaturada.
- 10 En otro aspecto, se proporciona un método para producir nanovehículos sintéticos que comprenden un material vehículo de poliéster hidrófobo y rapamicina, que comprende obtener o proporcionar el material vehículo de poliéster hidrófobo, obtener o proporcionar rapamicina en una cantidad que excede el límite de saturación de la rapamicina, combinar el material vehículo de poliéster hidrófobo y la rapamicina, y estabilizar la rapamicina.
- 10 En una realización de uno cualquiera de los métodos de producción, los nanovehículos sintéticos se forman en presencia de, o la rapamicina se estabiliza añadiendo un tensioactivo no iónico con valores de HLB menores o iguales a 10.
- 15 En una realización de uno cualquiera de los métodos de producción, se forman los nanovehículos sintéticos o la rapamicina se estabiliza con una rápida evaporación del disolvente del material de vehículo de poliéster hidrófobo combinado y rapamicina, en presencia de un disolvente.
- 15 En una realización de uno cualquiera de los métodos de producción, se forman los nanovehículos sintéticos o la rapamicina se estabiliza con un procedimiento de fusión sólida y/o moldeo por inyección con enfriamiento.
- 20 En una realización de uno cualquiera de los métodos de producción, el método comprende además determinar el límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de uno cualquiera de los métodos de producción, la determinación se realiza usando una cualquiera de las fórmulas proporcionadas en el presente documento.
- 20 En una realización de uno cualquiera de los métodos de producción, el método comprende además filtrar la composición resultante. En una realización de uno cualquiera de los métodos de producción, la filtración comprende filtrar a través de un filtro de 0,22 μm .
- 25 En otro aspecto, se proporciona una composición producida por uno cualquiera de los métodos de producción proporcionados en el presente documento.
- 30 En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 1% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 5% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 10% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 15% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 20% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 25% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 30% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo.
- 35 En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 15% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 20% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 25% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 30% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo.
- 40 En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 10% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 15% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 20% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 25% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada que es al menos un 30% por encima del límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo.
- 45 En otra realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad de rapamicina excede el límite de saturación en al menos un 1%. En otra realización, la cantidad de rapamicina supera el límite de saturación en al menos un 5%. En otra realización, la cantidad de rapamicina supera el límite de saturación en al menos un 10%. En otra realización, la cantidad de rapamicina supera el límite de saturación en al menos un 15%. En otra realización, la cantidad de rapamicina supera el límite de saturación en al menos un 20%. En otra realización, la cantidad de rapamicina supera el límite de saturación en al menos un 25%. En otra realización, la cantidad de rapamicina supera el límite de saturación en al menos un 30%.
- 50 Se proporciona una cualquiera de las fórmulas en los Ejemplos. Uno cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento puede incluir una etapa de determinación de la concentración de rapamicina usando una cualquiera de las fórmulas proporcionadas. En uno cualquiera de los métodos proporcionados en el presente
- 55

documento, las fórmulas se usan para determinar el límite de saturación de rapamicina en un material vehículo de poliéster hidrófobo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 La fig. 1 muestra los resultados de un análisis de la pérdida y recuperación de rapamicina, que ilustra la determinación de la rapamicina en una cantidad sobresaturada.

La Fig. 2 muestra el nivel de IgG con la administración de nanovehículos sintéticos con una cantidad sobresaturada de rapamicina como se describe en el presente documento.

La Fig. 3 muestra el nivel de IgG con la administración de nanovehículos sintéticos con una cantidad sobresaturada de rapamicina como se describe en el presente documento.

10 La Fig. 4 muestra los títulos de anticuerpos usando un protocolo de administración con nanovehículos sintéticos preparados con un método de evaporación rápida del disolvente y con un tensioactivo de HLB bajo como se describe en el presente documento.

15 La figura 5 muestra la velocidad de evaporación del disolvente de las emulsiones de referencia en varios recipientes. Vaso de precipitados de 50 ml (muestra 1, diamantes); placa de 125 mm (muestra 4, cuadrados). Los resultados demuestran que la evaporación puede ser más rápida en recipientes con mayor superficie.

La Fig. 6 muestra los resultados que demuestran la capacidad del nanovehículo y KLH (hemocianina de lapa californiana) coadministrados con rapamicina (RAPA) para inducir tolerancia. Se analizó en los sueros de los ratones los anticuerpos contra KLH después de cada exposición a KLH.

20 La Fig. 7 muestra resultados que demuestran la reducción duradera del título de anticuerpos con nanovehículos con tensioactivos de bajo HLB. El acrónimo "tSIP" se refiere a los nanovehículos como se describen.

La Fig. 8 muestra resultados que demuestran la eficacia del nanovehículo sintético+KLH en comparación con la rapamicina libre+KLH en ratones. Títulos de anticuerpos CE50 del anti-KLH el día 35 y 42 (después de 2 o 3 exposiciones a KLH sola) para ratones tratados o no con nanovehículo sintético+KLH (los símbolos representan la media geométrica ± IC del 95%). El acrónimo "NV" se refiere a nanovehículos como se describen.

25 La Fig. 9 muestra los protocolos de tratamiento para el Ejemplo 13. El acrónimo "NC" se refiere a nanovehículos como se describen.

La Fig. 10 muestra la especificidad del antígeno de nanovehículo sintético+KLH en ratones. Títulos de anticuerpos CE50 anti-OVA el día 65 para ratones tratados o no con nanovehículo sintético+KLH (las barras representan la media geométrica ± IC del 95%). El acrónimo "NV" se refiere a nanovehículos como se describen.

30 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

A. INTRODUCCIÓN

35 Se ha encontrado que los nanovehículos sintéticos con rapamicina en cantidades sobresaturadas pueden promover la inmunotolerancia específica de antígeno, incluso inmunotolerancia específica de antígeno duradera. Sin embargo, con el fin de producir nanovehículos sintéticos con dichas cantidades, en algunas realizaciones, se requiere la incorporación estable de rapamicina. Sin una incorporación estable, en dichas realizaciones, los nanovehículos sintéticos pueden presentar pérdida de rapamicina y pueden ser difíciles de esterilizar por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. Sin desear estar ligados a ninguna teoría en particular, típicamente, la rapamicina que no se incorpora de manera estable en nanovehículos sintéticos puede formar agregados que pueden obstruir los filtros usados para eliminar bacterias de las composiciones de nanovehículos sintéticos. Dicha eliminación es importante para dar como resultado composiciones de nanovehículos sintéticos con un nivel deseable de bacterias y, por consiguiente, dar como resultado una composición que es más estéril, una característica beneficiosa para las composiciones usadas para la administración in vivo. Por lo tanto, es importante que las cantidades sobresaturadas de rapamicina en nanovehículos sintéticos sean estables con el fin de lograr efectos beneficiosos in vivo y que sean inicialmente esterilizables por filtración.

45 Sorprendentemente, y como se demuestra en los Ejemplos, se pueden producir composiciones de nanovehículos sintéticos con cantidades sobresaturadas estables de rapamicina y dichos nanovehículos sintéticos pueden proporcionar tolerancia específica de antígeno duradera en sujetos. Los métodos para producir dichos nanovehículos sintéticos incluyen el uso de tensioactivos de HLB bajo, así como los procedimientos para producir nanovehículos sintéticos que, por ejemplo, implican una rápida evaporación del disolvente. Los resultados de una serie de Ejemplos muestran que los nanovehículos sintéticos producidos con dichos métodos pueden dar como resultado nanovehículos sintéticos con cantidades sobresaturadas de rapamicina que inicialmente son esterilizables por filtración. También se

ha mostrado en los Ejemplos que dichos nanovehículos sintéticos dan como resultado composiciones de nanovehículos sintéticos que pueden presentar tolerancia específica de antígeno duradera en sujetos.

5 Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan composiciones y métodos relacionados de composiciones de nanovehículos sintéticos que comprenden rapamicina en cantidades sobresaturadas estables. Dichos nanovehículos sintéticos pueden ser, preferiblemente, inicialmente esterilizables por filtración. Además, preferiblemente, en algunas realizaciones, las composiciones de nanovehículos sintéticos proporcionadas en el presente documento no solo pueden promover la inmunotolerancia específica de antígeno, sino que pueden hacerlo en niveles mejorados con respecto a los nanovehículos sintéticos donde la rapamicina no está presente en una cantidad sobresaturada estable.

10 La invención se describirá ahora con más detalle a continuación.

B. DEFINICIONES

15 "Administrar" o "administración" o "administra" significa proporcionar un material a un sujeto de una manera que sea farmacológicamente útil. Se pretende que el término incluya en algunas realizaciones hacer que se administre. "Hacer que se administre" significa hacer que, instar, alentar, ayudar, inducir o dirigir, directa o indirectamente, a otra parte para que administre el material.

"Mezclado" se refiere a mezclar un componente, tal como un antígeno, con otro, tal como nanovehículos sintéticos, en una composición. Los componentes que se mezclan se fabrican u obtienen por separado y se ponen juntos. Por consiguiente, los componentes no se acoplan entre sí salvo por posibles interacciones no covalentes que pueden ocurrir cuando se ponen juntos en una composición.

20 "Cantidad eficaz" en el contexto de una composición o dosis para la administración a un sujeto se refiere a una cantidad de la composición o dosis que produce una o más respuestas deseadas en el sujeto, por ejemplo, la generación de una respuesta inmunitaria tolerogénica específica de antígeno. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz es una cantidad farmacodinámicamente eficaz. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una cantidad eficaz es cualquier cantidad de una composición o dosis proporcionada en el presente documento que produce uno o más de los efectos terapéuticos deseados y/o respuestas inmunitarias como se proporciona en el presente documento. Esta cantidad puede ser para propósitos in vitro o in vivo. Para propósitos in vivo, la cantidad puede ser una que un médico crea que puede tener un beneficio clínico para un sujeto que necesita tolerancia inmunitaria específica de antígeno. Una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento puede estar en una cantidad eficaz.

30 Las cantidades eficaces pueden implicar la reducción del nivel de una respuesta inmunitaria no deseada, aunque en algunas realizaciones, implica prevenir por completo una respuesta inmunitaria no deseada. Cantidades eficaces también pueden implicar retrasar la aparición de una respuesta inmunitaria no deseada. Una cantidad que es eficaz también puede ser una cantidad que produzca un criterio de valoración terapéutico deseado o un resultado terapéutico deseado. En otras realizaciones, las cantidades eficaces pueden implicar mejorar el nivel de una respuesta deseada, tal como un criterio de valoración o resultado terapéutico. Las cantidades eficaces, preferiblemente, dan como resultado una respuesta inmunitaria tolerogénica en un sujeto a un antígeno. El logro de cualquiera de los anteriores se puede controlar por métodos rutinarios.

40 Las cantidades eficaces dependerán, por supuesto, del sujeto particular que se esté tratando; la gravedad de una afección, enfermedad o trastorno; los parámetros individuales del paciente que incluyen la edad, condición física, tamaño y peso; la duración del tratamiento; la naturaleza de la terapia concurrente (si hubiera); la vía de administración específica y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del profesional sanitario. Estos factores son bien conocidos por los expertos en la técnica y se pueden abordar con sólo experimentación rutinaria. En general, se prefiere que se use una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta de acuerdo con el buen criterio médico. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que un paciente puede insistir en una dosis más baja o una dosis tolerable por razones médicas, psicológicas o por prácticamente cualquier otra razón.

45 En general, las dosis de los componentes en las composiciones de la invención se refieren a la cantidad de los componentes. Alternativamente, la dosis se puede administrar basándose en el número de nanovehículos sintéticos que proporcionan la cantidad deseada.

50 "Antígeno" significa un antígeno de célula B o antígeno de célula T. "Tipo(s) de antígenos" significa moléculas que comparten las mismas, o sustancialmente las mismas, características antigénicas. En algunas realizaciones, los antígenos pueden ser proteínas, polipéptidos, péptidos, lipoproteínas, glicolípidos, polinucleótidos, polisacáridos o están contenidos o son expresados en células. En algunas realizaciones, tal como cuando los antígenos no están bien definidos o caracterizados, los antígenos pueden estar contenidos dentro de una preparación celular o tisular, restos celulares, exosomas celulares, medios acondicionados, etc.

"Específico de antígeno" se refiere a cualquier respuesta inmunitaria que resulta de la presencia del antígeno, o parte del mismo, o que genera moléculas que reconocen o se unen específicamente al antígeno. Por ejemplo, cuando la respuesta inmunitaria es la producción de anticuerpos específicos de antígeno, se producen anticuerpos que se unen específicamente al antígeno. Como otro ejemplo, cuando la respuesta inmunitaria es la proliferación y/o actividad de células B o células T CD4+ específicas de antígeno, la proliferación y/o actividad resulta del reconocimiento del antígeno, o parte del mismo, solo o en complejo con moléculas MHC, células B, etc.

"Promedio", como se usa en el presente documento, se refiere a la media aritmética a menos que se indique lo contrario.

"Determinación" o "determinar" significa valorar una relación fáctica. La determinación se puede lograr en una serie de formas, que incluyen, pero no se limitan a llevar a cabo experimentos o hacer proyecciones. En realizaciones, "determinación" o "determinar" comprende "hacer que se determine". "Hacer que se determine" significa causar, instar, alentar, ayudar, inducir o dirigir o actuar en coordinación con una entidad para que la entidad determine una relación fáctica, que incluye directa o indirectamente, expresa o implícitamente.

"Encapsular" significa encerrar al menos una porción de una sustancia dentro de un nanovehículo sintético. En algunas realizaciones, una sustancia está completamente encerrada dentro de un nanovehículo sintético. En otras realizaciones, la mayor parte o la totalidad de una sustancia que está encapsulada no está expuesta al entorno local externo al nanovehículo sintético. En otras realizaciones, no más de 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o 5% (peso/peso) está expuesta al entorno local. La encapsulación es distinta de la absorción, la cual pone la mayor parte o la totalidad de una sustancia en una superficie de un nanovehículo sintético y deja la sustancia expuesta al entorno local externo al nanovehículo sintético. En realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la rapamicina y/o el tensioactivo no iónico con un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) menor o igual a 10 se encapsulan dentro de los nanovehículos sintéticos.

"Material vehículo de poliéster hidrófobo" se refiere a cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable que puede suministrar una o más moléculas (p. ej., rapamicina y un tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10) que comprende uno o más polímeros poliéster o unidades de los mismos y que tiene características hidrófobas. Los polímeros poliéster incluyen, pero no se limitan a PLA, PLGA, PLG y policaprolactona. Los materiales vehículos de polímeros poliéster incluyen materiales que pueden formar un nanovehículo sintético o una parte del mismo y que pueden incluir o estar cargados con una o más moléculas (p. ej., rapamicina y un tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10). Generalmente, los materiales vehículos pueden permitir el suministro de una o más moléculas (p. ej., rapamicina y un tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10) a un sitio objetivo o célula objetivo, la liberación controlada de uno o más moléculas y otras actividades deseadas. "Hidrófobo" se refiere a un material que no participa sustancialmente en la formación de enlace de hidrógeno con el agua. Dichos materiales son generalmente no polares, principalmente no polares o de carga neutra. Un material vehículo adecuado para las composiciones descritas en el presente documento se puede seleccionar basándose en que presente hidrofobicidad en algún nivel. Los materiales vehículos poliéster hidrófobos, por lo tanto, son aquellos que son hidrófobos en general y pueden estar compuestos completamente por poliésteres hidrófobos o unidades de los mismos. En algunas realizaciones, sin embargo, los materiales vehículos poliéster hidrófobos son hidrófobos en general y comprenden componentes poliésteres hidrófobos o unidades de los mismos, pero están combinados con otros polímeros o unidades de los mismos. Estos otros polímeros o unidades de los mismos pueden ser hidrófobos, pero no lo son obligatoriamente. Dicho material vehículo puede incluir uno o más de otros polímeros o unidades de los mismos con la condición de que la matriz de polímeros o unidades de los mismos se considere hidrófoba.

"Inicialmente esterilizable por filtración" se refiere a una composición de nanovehículos sintéticos que no se ha filtrado previamente pero que se puede filtrar a través de un filtro, tal como un filtro de 0,22 µm, con un rendimiento de al menos 50 gramos de nanovehículo/m² de área superficial de la membrana del filtro. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, el rendimiento se determina tomando un volumen de 9 ml de suspensión de nanovehículos sintéticos y poniéndolo en una jeringa de 10 ml con uno cualquiera de los filtros proporcionados en el presente documento. La suspensión de nanovehículos sintéticos se empuja entonces a través del filtro hasta que no pasan más materiales de suspensión a través del filtro. Después, el rendimiento se puede calcular en función del material que se empujó a través del filtro y el material de suspensión que queda en la jeringa. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la composición inicialmente esterilizable por filtración no es estéril y/o no es adecuada para la administración in vivo (es decir, no es sustancialmente pura y comprende componentes solubles que son menos que deseables para la administración in vivo). En otras realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la composición inicialmente esterilizable por filtración comprende nanovehículos sintéticos que se han producido pero que no se han procesado adicionalmente para producir un material de calidad clínica. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la composición inicialmente esterilizable por filtración no se ha filtrado previamente pero se puede filtrar a través de un filtro, tal como un filtro de 0,22 µm, con un rendimiento de al menos 60, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 160, 200, 250, 300, 350, 500, 750, 1000 o 1500 gramos de nanovehículo/m² de área superficial de una membrana

de filtro. El filtro de 0,22 μm puede ser cualquier filtro con un tamaño de poros de 0,22 μm . Dichos filtros pueden estar hechos de una variedad de materiales, tales como polietilensulfona, poli(fluoruro de vinilideno), ésteres de celulosa mixtos, acetato de celulosa sin disolventes, celulosa regenerada, nailon, etc. Los ejemplos específicos de filtros incluyen Millipore SLGPM33R, Millipore SLGVM33RS, Millipore SLGSM33SS, Sartorius 16534, Sartorius 17764, Sartorius 17845, etc.

"Dimensión máxima de un nanovehículo sintético" significa la dimensión más grande de un nanovehículo medida a lo largo de cualquier eje del nanovehículo sintético. "Dimensión mínima de un nanovehículo sintético" significa la dimensión más pequeña de un nanovehículo sintético medida a lo largo de cualquier eje del nanovehículo sintético. Por ejemplo, para un nanovehículo sintético esférico, la dimensión máxima y mínima de un nanovehículo sintético sería sustancialmente idéntica y sería el tamaño de su diámetro. De manera similar, para un nanovehículo sintético cuboidal, la dimensión mínima de un nanovehículo sintético sería la más pequeña de su altura, anchura o longitud, mientras que la dimensión máxima de un nanovehículo sintético sería la mayor de su altura, anchura o longitud. En una realización, una dimensión mínima de al menos 75%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% de los nanovehículos sintéticos en una muestra, basado en el número total de nanovehículos sintéticos en la muestra, es igual a o mayor que 100 nm. En una realización, una dimensión máxima de al menos 75%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% de los nanovehículos sintéticos en una muestra, basado en el número total de nanovehículos sintéticos en la muestra, es igual a o menor que 5 μm . Preferiblemente, una dimensión mínima de al menos 75%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% de los nanovehículos sintéticos en una muestra, basado en el número total de nanovehículos sintéticos en la muestra, es mayor que 110 nm, más preferiblemente mayor que 120 nm, más preferiblemente mayor que 130 nm, y más preferiblemente aún mayor que 150 nm. La relación entre dimensiones de las dimensiones máxima y mínima de los nanovehículos sintéticos puede variar dependiendo de la realización. Por ejemplo, la relación entre dimensiones de las dimensiones máxima y mínima de los nanovehículos sintéticos puede variar de 1:1 a 1.000.000:1, preferiblemente de 1:1 a 100.000:1, más preferiblemente de 1:1 a 10.000:1, más preferiblemente de 1:1 a 1000:1, aún más preferiblemente de 1:1 a 100:1, y todavía más preferiblemente de 1:1 a 10:1.

Preferiblemente, una dimensión máxima de al menos 75%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% de los nanovehículos sintéticos en una muestra, basado en el número total de nanovehículos sintéticos en la muestra es igual o menor que 3 μm , más preferiblemente igual o menor que 2 μm , más preferiblemente igual o menor que 1 μm , más preferiblemente igual o menor que 800 nm, más preferiblemente igual o menor que 600 nm, y aún más preferiblemente igual o menor que 500 nm. En realizaciones preferidas, una dimensión mínima de al menos 75%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% de los nanovehículos sintéticos en una muestra, basado en el número total de nanovehículos sintéticos en la muestra, es igual o mayor que 100 nm, más preferiblemente igual o mayor que 120 nm, más preferiblemente igual o mayor que 130 nm, más preferiblemente igual o mayor que 140 nm, y aún más preferiblemente igual o mayor que 150 nm. La medición de las dimensiones del nanovehículo sintético (p. ej., el diámetro efectivo) se puede obtener, en algunas realizaciones, suspendiendo los nanovehículos sintéticos en un medio líquido (normalmente acuoso) y usando dispersión dinámica de luz (DLS) (p. ej., usando un instrumento Brookhaven ZetaPALS). Por ejemplo, se puede diluir una suspensión de nanovehículos sintéticos de un tampón acuoso a agua purificada para lograr una concentración final de suspensión de nanovehículos sintéticos de aproximadamente 0,01 a 0,5 mg/ml. La suspensión diluida se puede preparar directamente en el interior o transferir a una cubeta adecuada para el análisis por DLS. La cubeta se puede poner en el DLS, dejar que se equilibre a la temperatura controlada y después escanear durante el tiempo suficiente para adquirir una distribución estable y reproducible basada en las entradas adecuadas para la viscosidad del medio y los índices de refracción de la muestra. Después se registra el diámetro efectivo, o la media de la distribución. La determinación de los tamaños efectivos de nanovehículos sintéticos de alta relación entre dimensiones o no esféricos puede requerir técnicas aumentativas, tales como microscopía electrónica, para obtener medidas más precisas. "Dimensión" o "tamaño" o "diámetro" de nanovehículos sintéticos significa la media de una distribución de tamaño de partículas, por ejemplo, obtenida usando dispersión dinámica de luz.

"Tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10", o "tensioactivo de HLB bajo", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula anfifílica no iónica que tiene una estructura que comprende al menos una cola hidrófoba y una cabeza hidrófila o que tiene grupos o regiones hidrófobas y grupos o regiones hidrófilas. La parte de cola de los tensioactivos generalmente consiste en una cadena de hidrocarburo. Los tensioactivos se pueden clasificar basándose en las características de carga de la parte o grupos o regiones de cabeza hidrófila. Como se usa en el presente documento, "HLB" se refiere al equilibrio hidrofílico-lipofílico o equilibrio hidrófilo-lipófilo de un tensioactivo y es una medida de la naturaleza hidrófila o lipófila de un tensioactivo.

El HLB de uno cualquiera de los tensioactivos proporcionados en el presente documento se puede calcular usando el método de Griffin o el método de Davie. Por ejemplo, usando el método de Griffin, el HLB de un tensioactivo es el producto de 20 multiplicado por la masa molecular de la parte hidrófila del tensioactivo dividida entre la masa molecular de todo el tensioactivo. El valor de HLB está en una escala de 0 a 20, donde 0 corresponde a una molécula completamente hidrófoba (lipófila) y 20 corresponde a una molécula completamente hidrófila (lipófila). En algunas realizaciones, el HLB del tensioactivo de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el

presente documento es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (p. ej., determinado por el Método de Griffin o Davie). Los ejemplos de dichos tensioactivos para usar en una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento incluyen, sin limitación, ésteres de sorbitán, tales como SPAN 40, SPAN 20; alcoholes grasos, tales como alcohol oleílico, alcohol estearílico; ésteres de ácidos grasos, tales como palmitato de isopropilo, monoestearato de glicerol; alcoholes grasos etoxilados, tales como BRIJ 52, BRIJ 93; poloxámeros, tales como Pluronic P-123, Pluronic L-31; ácidos grasos, tales como ácido palmítico, ácido dodecanoico; triglicéridos, tales como tripalmitato de glicerilo, trilinoleato de glicerilo; colesterol; derivados del colesterol, tales como colesteryl-sulfato de sodio, dodecanoato de colesteryl; y sales o ácidos biliares, tales como ácido litocólico, litocolato de sodio. Otros ejemplos de dichos tensioactivos incluyen monoestearato de sorbitán (SPAN 60), triestearato de sorbitán (SPAN 65), monooleato de sorbitán (SPAN 80), sesquioleato de sorbitán (SPAN 83), trioleato de sorbitán (SPAN 85), sesquioleato de sorbitán (Arlacel 83), dipalmitato de sorbitán, mono y diglicéridos de ácidos grasos, trioleato de sorbitán polioxietilénico (Tween 85), hexaoleato de sorbitán polioxietilénico (G 1086), monoisoestearato de sorbitán (Montane 70), alcoholes polioxietilénicos, polioxietilenglicol-alkuiléteres, polioxietilenglicol (2)-oleiléter (BRIJ 93), cetiléter polioxietilénico (BRIJ 52), dodeciléter de polietilenglicol (BRIJ L4); 1-monotetradecanoil-rac-glicerol; monoestearato de glicerilo; monopalmitato de glicerol; etilendiamina tetrakis-tetrol (Tetronic 90R4, Tetronic 701), nonilfeniléter polioxietilénico (5) (IGEPAL CA-520), tensioactivo MERPOL A, tensioactivo MERPOL SE y hexaoleato de poli(etilenglicol)sorbitol. Otros ejemplos también serán evidentes para un experto en la técnica.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un material farmacológicamente inactivo usado junto con un material farmacológicamente activo para formular las composiciones. Los excipientes farmacéuticamente aceptables comprenden una variedad de materiales conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a sacáridos (tales como glucosa, lactosa y similares), conservantes tales como agentes antimicrobianos, auxiliares de reconstitución, colorantes, solución salina (tal como solución salina tamponada con fosfato) y tampones.

"Proporcionar" significa una acción o conjunto de acciones que realiza un individuo que proporciona un artículo o conjunto de artículos o métodos necesarios para la práctica de la presente invención. La acción o el conjunto de acciones pueden considerarse directamente por sí mismas o indirectamente.

"Evaporación rápida del disolvente" se refiere a cualquier etapa de evaporación del disolvente que puede dar como resultado nanovehículos sintéticos que comprenden cantidades sobresaturadas estables de rapamicina cuando se usa como parte de un procedimiento de formulación de nanovehículos sintéticos. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, dicha etapa es una donde al menos 98% de un disolvente, tal como diclorometano, se evapora en el espacio de 45 minutos de haber sido combinado con el material vehículo de poliéster hidrófobo y la rapamicina como se proporciona en el presente documento. En otras realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, dicha etapa es una donde al menos 90% de un disolvente se evapora en el espacio de 30 minutos de haber sido combinado con el material vehículo de poliéster hidrófobo y la rapamicina como se proporciona en el presente documento. En otras realizaciones más de uno cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, dicha etapa es una donde al menos 90% de un disolvente se evapora en el espacio de 15 minutos de haber sido combinado con el material vehículo de poliéster hidrófobo y la rapamicina como se proporciona en el presente documento. Se proporcionan ejemplos de dicha etapa y procedimientos que usan dicha etapa en la formación de nanovehículos sintéticos en el presente documento en los Ejemplos. Los procedimientos que formulan nanovehículos sintéticos y que pueden incluir una o más etapas de evaporación de disolventes incluyen procedimientos de emulsión (tales como procedimientos de emulsión doble), nanoprecipitación, secado por atomización, sistemas de rotor y procedimientos de fluidos supercríticos, tales como CO₂ supercrítico. Como otro ejemplo, el procedimiento puede ser uno que incluya criomolienda. Por ejemplo, una cantidad de rapamicina que daría como resultado una sobresaturación se puede disolver en el polímero a granel con disolvente y evaporar el disolvente. Después, el material resultante se puede moler para producir nanovehículos sintéticos del tamaño deseado. Los expertos en la técnica conocerían también otros procedimientos.

"Límite de saturación", como se usa en el presente documento, es un punto en el que no se esperaría que un disolvente disolviera o absorbiera más de un soluto. Si se añade soluto adicional al disolvente más allá del límite de saturación, puede aparecer en una fase separada (p. ej., precipitado). El límite de saturación de un soluto en un disolvente en condiciones particulares se puede calcular basándose en la solubilidad del soluto. En algunas realizaciones, el límite de saturación se puede referir al límite de saturación de una fase sólida. Por ejemplo, un sólido se puede formar por solidificación a partir de una mezcla uniforme de dos o más componentes, pero por encima de una determinada proporción de materiales (es decir, el límite de saturación), se puede superar la capacidad para formar una fase molecularmente homogénea en condiciones normales o de equilibrio. En los Ejemplos se pueden encontrar ejemplos para determinar el límite de saturación de nanovehículos sintéticos para la rapamicina. Cuando se hace referencia a la rapamicina por encima de su límite de saturación, la cantidad de rapamicina (el soluto) está por encima de la cantidad de rapamicina que se esperaría que se dispersara en un material vehículo de poliéster hidrófobo o una composición de nanovehículos sintéticos (el disolvente). Las fórmulas para determinar este límite de saturación para la rapamicina se pueden encontrar a continuación en los Ejemplos.

"Disolvente" se refiere a una sustancia que puede disolver un soluto, tal como uno cualquiera o más de los componentes de los nanovehículos sintéticos como se proporcionan en el presente documento. En algunas realizaciones, los disolventes son aquellos que son útiles en la formación de nanovehículos sintéticos, tal como en un procedimiento de emulsión (p. ej., un procedimiento de doble emulsión). Los ejemplos de dichos disolventes incluyen diclorometano, acetato de etilo, cloroformo y carbonato de propileno. Los ejemplos también incluyen mezclas de disolventes que son una combinación de un disolvente orgánico de baja solubilidad en agua y un disolvente miscible con agua, tal como acetona, etanol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, formamida, etc. Los expertos en la técnica conocerán más ejemplos.

"Sujeto" significa animales, que incluyen mamíferos de sangre caliente tales como seres humanos y primates; aves; animales domésticos o de granja tales como gatos, perros, ovejas, cabras, vacas, caballos y cerdos; animales de laboratorio tales como ratones, ratas y cobayas; peces; reptiles; animales de zoológico y salvajes; y similares.

"Sobresaturación" se refiere a una composición (p. ej., una composición de nanovehículos sintéticos) que contiene más de un soluto (p. ej., rapamicina) de lo que se puede disolver en esta en condiciones de equilibrio. En otras palabras, una composición con una concentración de sobresaturación tiene una concentración que está más allá de la concentración de saturación. En algunas realizaciones, la rapamicina puede estar por encima de su límite de saturación para un material vehículo de poliéster hidrófobo (p. ej., solo o en combinación con un disolvente en la fase acuosa de un procedimiento de formulación). Se puede determinar que la cantidad de rapamicina en una composición está sobresaturada por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, determinando la concentración de la molécula en una composición y comparando esa concentración con la concentración de saturación predicha (véase, por ejemplo, los Ejemplos, donde se pueden usar detalles del procedimiento, materiales y cantidades, etc. para calcular el nivel de sobresaturación de la rapamicina).

Otros métodos para determinar si la rapamicina está o no en una cantidad sobresaturada incluyen el moldeo de películas, la dispersión de rayos X y la microscopía electrónica. Las formas de microscopía electrónica incluyen, pero no se limitan a microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de transmisión criogénica (crio-TEM). La sobresaturación también se puede determinar con observaciones físicas durante la formación de los nanovehículos sintéticos donde las emulsiones turbias que contienen un material vehículo de poliéster hidrófobo y rapamicina se volverán más transparentes cuando el disolvente orgánico volátil se haya evaporado casi por completo, y la solución se vuelva más turbia a medida que la rapamicina en una cantidad sobresaturada condensa en la formulación de nanovehículos. Como otro ejemplo, los materiales nanovehículos sintéticos secos se pueden dispersar en un disolvente orgánico volátil, tal como acetona, diclorometano, acetato de etilo, etc., de modo que todos los materiales sean solubles formando una solución transparente y se ponen en un portaobjetos de vidrio para que se sequen. Si está sobresaturada, la rapamicina se separa del material vehículo de poliéster hidrófobo. Otro método más que se puede usar para determinar la sobresaturación puede implicar el análisis de una porción de una muestra por extracción seguida de un método de HPLC para cuantificar la cantidad de rapamicina presente. El material vehículo se puede identificar con RMN de protones u otros métodos ortogonales, tales como MALDI-MS, etc. y/o cuantificar una vez identificado con HPLC. Se puede entonces determinar experimentalmente el límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo.

En algunas realizaciones, una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento puede comprender rapamicina en una cantidad de sobresaturación, tal como en una concentración de sobresaturación. En algunas realizaciones, la composición está sobresaturada hasta el punto en que la rapamicina está en al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o más por encima del límite de saturación de la composición. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento, una cantidad sobresaturada de rapamicina en nanovehículos sintéticos es ≥ 6 pero $\leq 50\%$ en peso de rapamicina/material vehículo de poliéster hidrófobo. En otras realizaciones de una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento, dicha cantidad es ≥ 6 pero ≤ 45 , ≥ 6 pero ≤ 40 , ≥ 6 pero ≤ 35 , ≥ 6 pero ≤ 30 , ≥ 6 pero ≤ 25 , ≥ 6 pero ≤ 20 , ≥ 6 pero $\leq 15\%$ en peso de rapamicina/material vehículo de poliéster hidrófobo. En otras realizaciones de una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento, dicha cantidad es ≥ 7 pero ≤ 45 , ≥ 7 pero ≤ 40 , ≥ 7 pero ≤ 35 , ≥ 7 pero ≤ 30 , ≥ 7 pero ≤ 25 , ≥ 7 pero ≤ 20 , ≥ 7 pero $\leq 15\%$ en peso de rapamicina/material vehículo de poliéster hidrófobo. En otras realizaciones más de una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento, dicha cantidad es ≥ 8 pero $\leq 24\%$ en peso de rapamicina/material vehículo de poliéster hidrófobo. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento, dicha cantidad es 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 27, 30, 35, 45% o más en peso de rapamicina/material vehículo de poliéster hidrófobo.

Una cantidad sobresaturada de rapamicina es preferiblemente "estable". Una cantidad sobresaturada de rapamicina es estable en nanovehículos sintéticos si los nanovehículos sintéticos retienen dicha cantidad cuando están en suspensión, en algunas realizaciones. Preferiblemente, los nanovehículos sintéticos con cantidades sobresaturadas estables de rapamicina son inicialmente esterilizables por filtración, y la capacidad de esterilización por filtración inicial puede servir como un ensayo de la estabilidad de una cantidad sobresaturada de rapamicina en nanovehículos sintéticos. En algunas realizaciones, se dice que una cantidad sobresaturada de rapamicina en nanovehículos

sintéticos es estable cuando los nanovehículos sintéticos se pueden usar para efectos tolerogénicos específicos de antígeno beneficiosos cuando se administran in vivo. Se pueden encontrar ejemplos de nanovehículos sintéticos con cantidades sobresaturadas de rapamicina a lo largo de los Ejemplos. Hay una serie de métodos mediante los cuales se pueden estabilizar cantidades sobresaturadas de rapamicina en nanovehículos sintéticos. Dichos métodos incluyen el uso de un tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10 en la producción de nanovehículos sintéticos, métodos de formación de nanovehículos sintéticos que incluyen una o más etapas de evaporación rápida del disolvente y métodos de formación de nanovehículos sintéticos que puede incluir moldeado por fundido de sólido y/o por inyección con enfriamiento.

"Tensioactivo" se refiere a un compuesto que puede reducir la tensión superficial entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. Los tensioactivos pueden actuar como detergentes, agentes humectantes, emulsionantes, agentes espumantes y dispersantes y se pueden usar en la formación de nanovehículos sintéticos como se proporciona en el presente documento. En algunas realizaciones, los tensioactivos son tensioactivos no iónicos con un valor de HLB menor o igual a 10.

"Nanovehículo(s) sintético(s)" significa un objeto discreto que no se encuentra en la naturaleza y que tiene al menos una dimensión que es menor o igual a 5 micrómetros de tamaño. Como se proporciona en el presente documento, los nanovehículos sintéticos comprenden un material vehículo de poliéster hidrófobo. Por consiguiente, un nanovehículo sintético puede ser, pero no se limita a nanovehículos sintéticos que comprenden nanopartículas de poliéster hidrófobas. Los nanovehículos sintéticos pueden tener una variedad de formas diferentes, que incluyen, pero no se limitan a esferoidales, cuboidales, piramidales, oblongos, cilíndricos, toroidales y similares. Los nanovehículos sintéticos según la invención comprenden una o más superficies. En realizaciones, los nanovehículos sintéticos pueden tener una relación entre dimensiones mayor que 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 o mayor que 1:10.

Los nanovehículos sintéticos según la invención que tengan una dimensión mínima igual o menor que aproximadamente 100 nm, preferiblemente igual o menor que 100 nm, no comprenden una superficie con grupos hidroxilo que activan el complemento o alternativamente comprenden una superficie que consiste esencialmente en restos que no son grupos hidroxilo que activan el complemento. En una realización preferida, los nanovehículos sintéticos de acuerdo con la invención que tienen una dimensión mínima igual o menor que aproximadamente 100 nm, preferiblemente igual o menor que 100 nm, no comprenden una superficie que activa sustancialmente el complemento o, alternativamente, comprenden una superficie que consiste esencialmente en restos que no activan sustancialmente el complemento. En una realización más preferida, los nanovehículos sintéticos según la invención que tienen una dimensión mínima igual o menor que aproximadamente 100 nm, preferiblemente igual o menor que 100 nm, no comprenden una superficie que activa el complemento o alternativamente comprenden una superficie que consiste esencialmente en restos que no activan el complemento.

"Sólidos totales" se refiere al peso total de todos los componentes contenidos en una composición o suspensión de nanovehículos sintéticos. En algunas realizaciones de cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad de sólidos totales se determina como la masa total del nanovehículo seco por ml de suspensión. Esto se puede determinar por un método gravimétrico.

"% En peso" se refiere a la relación de un peso a otro peso multiplicado por 100. Por ejemplo, el % en peso puede ser la relación del peso de un componente al otro multiplicado por 100 o la relación del peso de un componente a un peso total de más de un componente multiplicado por 100. Generalmente, el % en peso se mide como un promedio de una población de nanovehículos sintéticos o un promedio de los nanovehículos sintéticos en una composición o suspensión.

C. COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADOS

En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden nanovehículos sintéticos que comprenden un material vehículo de poliéster hidrófobo y rapamicina en una cantidad sobresaturada estable, y métodos relacionados. Dichas composiciones y métodos relacionados pueden dar como resultado efectos tolerogénicos específicos de antígeno. Por lo tanto, las composiciones y métodos relacionados proporcionados se pueden usar para cualquier sujeto que necesite inmunotolerancia específica de antígeno. Como se ha mencionado antes, se encontró que el suministro de una cantidad sobresaturada de rapamicina en nanovehículos sintéticos puede proporcionar una inmunotolerancia específica de antígeno más duradera. Sin embargo, también se ha descubierto que las cantidades sobresaturadas de rapamicina en general no son estables. La estabilización de la rapamicina en nanovehículos sintéticos puede ayudar a retener una cantidad adecuada en los nanovehículos sintéticos durante la formación, cantidades que han mostrado ser eficaces. Cantidades sobresaturadas estabilizadas de rapamicina en nanovehículos sintéticos también dan como resultado composiciones de nanovehículos sintéticos que tienen el efecto beneficioso adicional de ser inicialmente esterilizables por filtración.

Sorprendentemente, se ha encontrado que ciertos tensioactivos, tensioactivos no iónicos con un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) menor o igual a 10, estabilizan la rapamicina en nanovehículos sintéticos con materiales vehículo de poliéster hidrófobo y permiten una mejor filtrabilidad esterilizante inicial. Como se muestra en los Ejemplos, se

encontró un mayor rendimiento de las formulaciones de nanovehículos sintéticos que comprenden rapamicina, cuando se pasaron inicialmente a través de un filtro de 0,22 μm , cuando se incorporaron tensioactivos, como SPAN 40, en las formulaciones de nanovehículos sintéticos. Como también se muestra en los Ejemplos, una serie de dichos nanovehículos sintéticos formulados con un tensioactivo no iónico con un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) menor o igual a 10 también pudieron proporcionar tolerancia duradera específica de antígeno en sujetos.

También se han descubierto cantidades optimizadas del tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 en los nanovehículos sintéticos proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones de cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad de tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 en los nanovehículos sintéticos es $\geq 0,01$ pero $\leq 20\%$ en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/material vehículo de poliéster hidrófobo. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad del tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 en los nanovehículos sintéticos es $\geq 0,1$ pero ≤ 15 , $\geq 0,5$ pero ≤ 13 , ≥ 1 pero ≤ 9 o 10% en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/material vehículo de poliéster hidrófobo. En otras realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad del tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 en los nanovehículos sintéticos es $\geq 0,01$ pero ≤ 17 , $\geq 0,01$ pero ≤ 15 , $\geq 0,01$ pero ≤ 13 , $\geq 0,01$ pero ≤ 12 , $\geq 0,01$ pero ≤ 11 , $\geq 0,01$ pero ≤ 10 , $\geq 0,01$ pero ≤ 9 , $\geq 0,01$ pero ≤ 8 , $\geq 0,01$ pero ≤ 7 , $\geq 0,01$ pero ≤ 6 , $\geq 0,01$ pero $\leq 5\%$ en peso etc., de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/material vehículo de poliéster hidrófobo. En otras realizaciones más de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad del tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 en los nanovehículos sintéticos es $\geq 0,1$ pero ≤ 15 , $\geq 0,1$ pero ≤ 14 , $\geq 0,1$ pero ≤ 13 , $\geq 0,1$ pero ≥ 12 , $\geq 0,1$ pero ≤ 11 , $\geq 0,1$ pero ≤ 10 , $\geq 0,1$ pero ≤ 9 , $\geq 0,1$ pero ≤ 8 , $\geq 0,1$ pero ≤ 7 , $\geq 0,1$ pero ≤ 6 , $\geq 0,1$ pero $\leq 5\%$ en peso etc., de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/material vehículo de poliéster hidrófobo. En otras realizaciones más de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad del tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 en los nanovehículos sintéticos es $\geq 0,5$ pero ≤ 15 , $\geq 0,5$ pero ≤ 14 , $\geq 0,5$ pero ≤ 13 , $\geq 0,5$ pero ≤ 12 , $\geq 0,5$ pero ≤ 11 , $\geq 0,5$ pero ≤ 10 , $\geq 0,5$ pero ≤ 9 , $\geq 0,5$ pero ≤ 8 , $\geq 0,5$ pero ≤ 7 , $\geq 0,5$ pero ≤ 6 , $\geq 0,5$ pero $\leq 5\%$ en peso etc., de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/material vehículo de poliéster hidrófobo. En otras realizaciones más de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad del tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 en los nanovehículos sintéticos es ≥ 1 pero ≤ 9 , ≥ 1 pero ≤ 8 , ≥ 1 pero ≤ 7 , ≥ 1 pero ≤ 6 , ≥ 1 pero $\leq 5\%$ en peso etc., de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/material vehículo de poliéster hidrófobo. En otras realizaciones más de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad del tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 en los nanovehículos sintéticos es ≥ 5 pero ≤ 15 , ≥ 5 pero ≤ 14 , ≥ 5 pero ≤ 13 , ≥ 5 pero ≤ 12 , ≥ 5 pero ≤ 11 , ≥ 5 pero ≤ 10 , ≥ 5 pero ≤ 9 , ≥ 5 pero ≤ 8 , ≥ 5 pero ≤ 7 , ≥ 5 pero $\leq 6\%$ en peso etc. de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/material vehículo de poliéster hidrófobo. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad del tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 en los nanovehículos sintéticos es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20% en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/material vehículo de poliéster hidrófobo. Cualquiera de los valores de HLB proporcionados en el presente documento se puede determinar usando el método de Griffin o Davie.

Asimismo, también se ha encontrado que los métodos para producir nanovehículos sintéticos que usan una rápida evaporación del disolvente también pueden dar como resultado nanovehículos sintéticos que comprenden rapamicina en cantidades sobresaturadas estables. Cuando dicha evaporación se produce rápidamente, la rapamicina se incorpora de forma estable en los nanovehículos sintéticos y puede conducir a resultados beneficiosos como se describe en el presente documento. Por ejemplo, como se demuestra en los Ejemplos, los nanovehículos sintéticos producidos con dicho procedimiento eran inicialmente esterilizables por filtración y lograban efectos inmunitarios beneficiosos cuando se administraban in vivo. En los ejemplos se proporcionan métodos específicos para producir dichos nanovehículos sintéticos. Otros Ejemplos de dichos métodos incluyen cualquier procedimiento que tenga una o más etapas de evaporación del disolvente. Los procedimientos que pueden incluir una o más etapas de evaporación del disolvente incluyen procedimientos de emulsión (tal como procedimientos de emulsión doble), nanoprecipitación, secado por atomización y procedimientos de fluidos supercríticos. Otros procedimientos más serían evidentes para un experto en la técnica.

Además, los nanovehículos sintéticos proporcionados en el presente documento también se pueden producir usando un procedimiento que incluye moldeado de fundido sólido y por inyección con enfriamiento. Los expertos en la técnica conocerían otros procedimientos más.

Como se proporciona en el presente documento, la cantidad de rapamicina en los nanovehículos sintéticos se puede optimizar y estabilizar de manera que la cantidad produzca resultados eficaces (p. ej., tolerancia específica de antígeno duradera) cuando los nanovehículos sintéticos se administran a un sujeto. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento, los nanovehículos sintéticos que comprenden rapamicina en una cantidad sobresaturada estable comprenden ≥ 6 pero $\leq 50\%$ en peso de rapamicina/material

vehículo de poliéster hidrófobo. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento, los nanovehículos sintéticos comprenden ≥ 6 pero ≤ 45 , ≥ 6 pero ≤ 40 , ≥ 6 pero ≤ 35 , ≥ 6 pero ≤ 30 , ≥ 6 pero ≤ 25 , ≥ 6 pero ≤ 20 , ≥ 6 pero $\leq 15\%$ en peso de rapamicina/material vehículo de poliéster hidrófobo. En otras realizaciones de una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento, los nanovehículos sintéticos comprenden ≥ 7 pero ≤ 45 , ≥ 7 pero ≤ 40 , ≥ 7 pero ≤ 35 , ≥ 7 pero ≤ 30 , ≥ 7 pero ≤ 25 , ≥ 7 pero ≤ 20 , ≥ 7 pero $\leq 15\%$ en peso de rapamicina/material vehículo de poliéster hidrófobo. En otras realizaciones más de una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento, los nanovehículos sintéticos comprenden ≥ 8 pero $\leq 24\%$ en peso de rapamicina/material vehículo poliéster hidrófobo. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento, los nanovehículos sintéticos comprenden 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 27, 30, 35, 45% o más en peso de rapamicina/material vehículo de poliéster hidrófobo.

Además, también se han determinado cantidades optimizadas del material vehículo de poliéster hidrófobo en las composiciones de nanovehículos sintéticos. Preferiblemente, en algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, la cantidad del material vehículo de poliéster hidrófobo en la composición de nanovehículos sintéticos es 5-95% en peso de material vehículo de poliéster hidrófobo/sólidos totales. En otras realizaciones de una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento, la cantidad del material vehículo de poliéster hidrófobo en los nanovehículos sintéticos es 10-95, 15-90, 20-90, 25-90, 30-80, 30-70, 30-60, 30-50% en peso etc. de material vehículo de poliéster hidrófobo/sólidos totales. En otras realizaciones más de una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento, la cantidad de materiales vehículo de poliéster hidrófobos en los nanovehículos sintéticos es 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% en peso de material vehículo de poliéster hidrófobo/sólidos totales.

Las cantidades de componentes o materiales como se citan en el presente documento para una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento se pueden determinar usando métodos conocidos por los expertos en la técnica o proporcionados de otro modo en el presente documento. Por ejemplo, las cantidades del tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10 se pueden medir por extracción seguida de cuantificación por un método de HPLC. Las cantidades de material vehículo de poliéster hidrófobo se pueden determinar usando HPLC. La determinación de dicha cantidad, en algunas realizaciones, puede seguir el uso de RMN de protón u otros métodos ortogonales, tales como MALDI-MS, etc. para determinar la identidad de un material vehículo de poliéster hidrófobo. Se pueden usar métodos similares para determinar las cantidades de rapamicina en una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento. En algunas realizaciones, la cantidad de rapamicina se determina usando HPLC. Otros ejemplos de métodos para determinar cantidades de componentes o materiales se proporcionan en otra parte de este documento, tal como en los Ejemplos. Para una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, las cantidades de los componentes o materiales también se pueden determinar basándose en los pesos de la receta de una formulación de nanovehículo. Por consiguiente, en algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, las cantidades de uno cualquiera de los componentes proporcionados en el presente documento son las de los componentes en una fase acuosa durante la formulación de los nanovehículos sintéticos. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados en el presente documento, las cantidades de uno cualquiera de los componentes son las de los componentes en una composición de nanovehículos sintéticos que se produce y el resultado de un procedimiento de formulación.

Los nanovehículos sintéticos proporcionados en el presente documento comprenden materiales vehículo de poliéster hidrófobos. Dichos materiales comprenden poliésteres, que pueden incluir copolímeros que comprenden unidades de ácido láctico y ácido glicólico, tales como poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) y poli(lactida-co-glicólido), denominados colectivamente en el presente documento "PLGA"; y homopolímeros que comprenden unidades de ácido glicólico, denominados en el presente documento "PGA", y unidades de ácido láctico, tales como poli-ácido L-láctico, poli-ácido D-láctico, poli-ácido D,L-láctico, poli-L-lactida, poli-D-lactida y poli-D,L-lactida, denominadas colectivamente en el presente documento como "PLA". En algunas realizaciones, los poliésteres de ejemplo incluyen, por ejemplo, polihidroxiácidos; copolímeros de PEG y copolímeros de lactida y glicólido (p. ej., copolímeros de PLA-PEG, copolímeros de PGA-PEG, copolímeros de PLGA-PEG y derivados de los mismos. En algunas realizaciones, los poliésteres incluyen, por ejemplo, poli(caprolactona), copolímeros de poli(caprolactona)-PEG, poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster de serina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina), poli[ácido α -(4-aminobutil)-L-glicólico] y derivados de los mismos.

En algunas realizaciones, el poliéster puede ser PLGA. El PLGA es un copolímero biocompatible y biodegradable de ácido láctico y ácido glicólico, y varias formas de PLGA se caracterizan por la relación de ácido láctico:ácido glicólico. El ácido láctico puede ser ácido L-láctico, ácido D-láctico o ácido D,L-láctico. La velocidad de degradación del PLGA se puede ajustar alterando la relación de ácido láctico:ácido glicólico. En algunas realizaciones, el PLGA que se usa de acuerdo con la presente invención se caracteriza por una relación de ácido láctico:ácido glicólico de aproximadamente 85:15, aproximadamente 75:25, aproximadamente 60:40, aproximadamente 50:50, aproximadamente 40:60, aproximadamente 25:75, o aproximadamente 15:85.

El material vehículo de poliéster hidrófobo proporcionado en el presente documento puede comprender uno o más polímeros hidrófobos no poliésteres o unidades de los mismos y/o polímeros o unidades de los mismos que no son hidrófobos con la condición de que el material vehículo de poliéster hidrófobo en general sea hidrófobo y contenga uno o más poliésteres o unidades de los mismos.

5 Los materiales vehículo de poliéster hidrófobos como se proporcionan en el presente documento pueden comprender uno o más polímeros que son un polímero plurónico no terminado en metoxi, o una unidad del mismo. "Polímero no terminado en metoxi" significa un polímero que tiene al menos un extremo que termina con un resto distinto de metoxi. En algunas realizaciones, el polímero tiene al menos dos extremos que terminan con un resto distinto de metoxi. En otras realizaciones, el polímero no tiene extremos que terminen con metoxi. "Polímero plurónico no terminado en metoxi" significa un polímero distinto de un polímero plurónico lineal con metoxi en ambos extremos.

10 Los materiales vehículo de poliéster hidrófobos pueden comprender, en algunas realizaciones, polihidroxialcanoatos, poliamidas, poliéteres, poliolefinas, poliácridatos, policarbonatos, poliestireno, siliconas, fluoropolímeros o una unidad de los mismos. Otros ejemplos de polímeros que pueden estar comprendidos en los materiales vehículo de poliéster hidrófobos proporcionados en el presente documento incluyen policarbonato, poliamida o poliéter, o una unidad de los mismos. En otras realizaciones, los polímeros del material vehículo de poliéster hidrófobo pueden comprender poli(etilenglicol) (PEG), polipropilenglicol o una unidad de los mismos.

15 En algunas realizaciones, se prefiere que el material vehículo de poliéster hidrófobo comprenda polímero que es biodegradable. Por lo tanto, en dichas realizaciones, los polímeros de los materiales vehículos de poliéster hidrófobos pueden incluir un poliéter, tal como poli(etilenglicol) o polipropilenglicol o una unidad de los mismos. Además, el polímero puede comprender un copolímero de bloques de un poliéter y un polímero biodegradable de manera que el polímero sea biodegradable. En otras realizaciones, el polímero no comprende únicamente un poliéter o una unidad del mismo, tal como poli(etilenglicol) o polipropilenglicol o una unidad de los mismos.

20 Otros ejemplos de polímeros adecuados para usar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a polietilenos, policarbonatos (p. ej., poli(1,3-dioxan-2-ona)), polianhídridos (p. ej., poli(anhídrido sebácico)), poli(fumeratos de propilo), poliamidas (p. ej., policaprolactama), poliacetales, poliéteres, poliésteres (p. ej., polilactida, poliglicólido, polilactida-co-glicólido, policaprolactona, polihidroxiácido (p. ej., poli(β -hidroxialcanoato))), poli(ortoésteres), policianoacrilatos, poli(alcoholes vinílicos), poliuretanos, polifosfazenos, poliácridatos, polimetacrilatos, poliureas, poliestirenos y poliaminas, polilisina, copolímeros de polilisina-PEG y poli(etilenimina), copolímeros de poli(etilenimina)-PEG.

25 Otros ejemplos más de polímeros que se pueden incluir en un material vehículo hidrófobo incluyen polímeros acrílicos, por ejemplo, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), copolímero de alquilamida de ácido metacrílico, poli(metacrilato de metilo), poli(anhídrido de ácido metacrílico), metacrilato de metilo, polimetacrilato, copolímero de poli(metacrilato de metilo), poliácridamida, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, copolímeros de metacrilato de glicidilo, policianoacrilatos, y combinaciones que comprenden uno o más de los polímeros anteriores.

30 En algunas realizaciones, los polímeros de un nanovehículo sintético se asocian para formar una matriz polimérica. Se conocen convencionalmente una amplia variedad de polímeros y métodos para formar matrices poliméricas a partir de ellos. En algunas realizaciones, un nanovehículo sintético que comprende una matriz de poliéster hidrófobo genera un entorno hidrófobo dentro del nanovehículo sintético.

35 En algunas realizaciones, los polímeros se pueden modificar con uno o más restos y/o grupos funcionales. Se puede usar una variedad de restos o grupos funcionales de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, los polímeros se pueden modificar con polietilenglicol (PEG), con un carbohidrato y/o con poliacetales acíclicos derivados de polisacáridos (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786: 301). Se pueden hacer determinadas realizaciones usando las enseñanzas generales de la patente de EE.UU. nº 5543158 de Gref et al., o la publicación WO2009/051837 de Von Andrian et al.

40 En algunas realizaciones, los polímeros se pueden modificar con un grupo lípido o ácido graso. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico o lignocérico. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido palmitoleico, oleico, vaccénico, linoleico, alfa-linoleico, gamma-linoleico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico o erúcido.

45 En algunas realizaciones, se prefiere que el polímero sea biodegradable. En algunas realizaciones, los polímeros de acuerdo con la presente invención incluyen polímeros que han sido aprobados para su uso en seres humanos por la Administración de Medicamentos y Alimentos de EE.UU. (FDA) bajo 21 C.F.R. § 177.2600.

Los polímeros pueden ser polímeros naturales o no naturales (sintéticos). Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros que comprenden dos o más monómeros. En términos de secuencia, los copolímeros pueden ser aleatorios, de bloques o comprender una combinación de secuencias aleatorias y de bloques. Típicamente, los polímeros de acuerdo con la presente invención son polímeros orgánicos.

5 En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser polímeros lineales o ramificados. En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser dendrímeros. En algunas realizaciones, los polímeros se pueden reticular sustancialmente entre sí. En algunas realizaciones, los polímeros pueden estar sustancialmente exentos de reticulaciones. En algunas realizaciones, se pueden usar polímeros de acuerdo con la presente invención sin someterse a una etapa de reticulación. Además, debe entenderse que los nanovehículos sintéticos pueden comprender copolímeros de bloque,
10 copolímeros de injerto, combinaciones, mezclas y/o aductos de cualquiera de los polímeros anteriores y otros. Los expertos en la técnica reconocerán que los polímeros citados en el presente documento representan una lista ilustrativa, no completa, de polímeros que pueden ser útiles de acuerdo con la presente invención siempre que cumplan los criterios deseados.

15 Las propiedades de estos y otros polímeros y los métodos para prepararlos son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.123.727; 5.804.178; 5.770.417; 5.736.372; 5.716.404; 6.095.148; 5.837.752; 5.902.599; 5.696.175; 5.514.378; 5.512.600; 5.399.665; 5.019.379; 5.010.167; 4.806.621; 4.638.045; y 4.946.929; Wang et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:9480; Lim et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:2460; Langer, 2000, *Acc. Chem. Res.*, 33:94; Langer, 1999, *J. Control. Release*, 62:7; y Uhrich et al., 1999, *Chem. Rev.*, 99:3181). Más generalmente, se describe una variedad de métodos para sintetizar ciertos polímeros adecuados en la Concise
20 Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. de Goethals, Pergamon Press, 1980; Principles of Polymerization de Odian, John Wiley & Sons, Cuarta Edición, 2004; Contemporary Polymer Chemistry de Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, *Nature*, 390:386; y en las patentes de EE.UU. 6.506.577, 6.632.922, 6.686.446 y 6.818.732.

25 Se puede usar una amplia variedad de nanovehículos sintéticos según la invención. En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos son esferas o esferoides. En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos son planos o en forma de placa. En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos son cubos o cúbicos. En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos son ovalados o elipses. En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos son cilindros, conos o pirámides.

30 En algunas realizaciones, es deseable usar una población de nanovehículos sintéticos que sea relativamente uniforme en términos de tamaño o forma, de modo que cada nanovehículo sintético tenga propiedades similares. Por ejemplo, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de los nanovehículos sintéticos, basado en el número total de nanovehículos sintéticos, puede tener una dimensión mínima o dimensión máxima que se encuentra dentro del 5%, 10% o 20% del diámetro medio o dimensión media de los nanovehículos sintéticos.

35 Las composiciones de acuerdo con la invención pueden comprender elementos en combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como conservantes, tampones, solución salina o solución salina tamponada con fosfato. Las composiciones se pueden preparar usando técnicas de fabricación y composición farmacéuticas convencionales para llegar a formas farmacéuticas útiles. En una realización, las composiciones, tales como las que comprenden los nanovehículos sintéticos, se suspenden en una solución salina estéril para inyección junto con un conservante.

40 En algunas realizaciones, se puede aislar cualquier componente de los nanovehículos sintéticos como se proporciona en el presente documento. Aislado se refiere a que el elemento se separa de su entorno nativo y está presente en cantidades suficientes para permitir su identificación o uso. Esto significa, por ejemplo, que el elemento se puede purificar por cromatografía o electroforesis. Los elementos aislados pueden ser sustancialmente puros, pero no es necesario que lo sean. Debido a que un elemento aislado se puede mezclar con un excipiente farmacéuticamente
45 aceptable en una preparación farmacéutica, el elemento puede comprender solo un pequeño porcentaje en peso de la preparación. No obstante, el elemento está aislado en cuanto que se ha separado de las sustancias con las que puede estar asociado en los sistemas vivos, es decir, aislado de otros lípidos o proteínas. Cualquiera de los elementos proporcionados en el presente documento se puede aislar e incluir en las composiciones o usar en los métodos en forma aislada.

50 D. MÉTODOS DE FABRICACIÓN Y USO DE LAS COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADOS

Los nanovehículos sintéticos se pueden preparar usando una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los nanovehículos sintéticos se pueden formar por métodos tales como nanoprecipitación, enfoque de flujo usando canales fluidicos, secado por atomización, evaporación de disolvente de emulsión simple y doble, extracción de disolvente, separación de fases, molienda (incluyendo criomolienda), procesamiento de fluido
55 supercrítico (tal como dióxido de carbono supercrítico), procedimientos de microemulsión, microfabricación, nanofabricación, capas de sacrificio, coacervación simple y compleja y otros métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Alternativa o adicionalmente, se han descrito síntesis en disolventes acuosos y orgánicos para

nanomateriales semiconductores monodispersos, conductores, magnéticos, orgánicos y otros (Pellegrino et al., 2005, *Small*, 1:48; Murray et al., 2000, *Ann. Rev. Mat. Sci.*, 30:545; y Trindade et al., 2001, *Chem. Mat.*, 13:3843). Se han descrito métodos adicionales en la bibliografía (véase, p. ej., Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, *J. Control. Release*, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, *Reactive Polymers*, 6:275; y Mathiowitz et al., 1988, *J. Appl. Polymer Sci.*, 35:755; patentes de EE.UU. 5578325 y 6007845; P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" *Nanomedicine*. 5(6):843-853 (2010)).

Diversos materiales se pueden encapsular en nanovehículos sintéticos según sea conveniente usando una variedad de métodos que incluyen, pero no se limitan a C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, Vol. 17, No. 3, pág. 247-289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery" *Current Drug Delivery* 1:321-333 (2004); C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" *Nanomedicine* 2:8- 21 (2006); P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" *Nanomedicine*. 5(6):843-853 (2010). Se pueden usar otros métodos adecuados para encapsular materiales en nanovehículos sintéticos, incluyendo sin limitación métodos descritos en la patente de Estados Unidos 6.632.671 de Unger expedida el 14 de octubre, 2003.

En determinadas realizaciones, los nanovehículos sintéticos se preparan por un procedimiento de nanoprecipitación o secado por atomización. Las condiciones usadas en la preparación de nanovehículos sintéticos se pueden alterar para producir partículas de un tamaño o propiedad deseado (p. ej., hidrofobicidad, hidrofiliidad, morfología externa, "pegajosidad", forma, etc.). El método de preparación de los nanovehículos sintéticos y las condiciones (p. ej., disolvente, temperatura, concentración, caudal de aire, etc.) usadas pueden depender de los materiales que se van a incluir en los nanovehículos sintéticos y/o la composición de la matriz del vehículo.

Si los nanovehículos sintéticos preparados por cualquiera de los métodos anteriores tienen un intervalo de tamaños fuera del intervalo deseado, dichos nanovehículos sintéticos se pueden ajustar de tamaño, por ejemplo, usando un tamiz.

En realizaciones, los nanovehículos sintéticos se pueden combinar con un antígeno u otra composición mezclándolos en el mismo vehículo o sistema de suministro.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden comprender tampones inorgánicos u orgánicos (p. ej., sales de sodio o potasio de fosfato, carbonato, acetato o citrato) y agentes de ajuste de pH (p. ej., ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o potasio, sales de citrato o acetato, aminoácidos y sus sales) antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, alfa-tocoferol), tensioactivos (p. ej., polisorbato 20, polisorbato 80, polioxietileno-9-10 nonilfenol, desoxicolato de sodio), estabilizantes en solución y/o crio/lioestabilizantes (p. ej., sacarosa, lactosa, manitol, trehalosa), agentes de ajuste osmótico (p. ej., sales o azúcares), agentes antibacterianos (p. ej., ácido benzoico, fenol, gentamicina), agentes antiespumantes (p. ej., polidimetilsiloxano), conservantes (p. ej., timerosal, 2-fenoxietanol, EDTA), estabilizantes poliméricos y agentes de ajuste de la viscosidad (p. ej., polivinilpirrolidona, poloxámero 488, carboximetilcelulosa) y codisolventes (p. ej., glicerol, polietilenglicol, etanol).

Las composiciones según la invención pueden comprender excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones se pueden preparar usando técnicas de fabricación y composición farmacéuticas convencionales para llegar a formas farmacéuticas útiles. Las técnicas adecuadas para usar en la práctica de la presente invención se pueden encontrar en *Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice*, editado por Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng y Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc.; y *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*, 2ª ed. Editado por M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone. En una realización, las composiciones se suspenden en una solución salina estéril para inyección junto con un conservante.

Debe entenderse que las composiciones de la invención se pueden preparar de cualquier manera adecuada, y la invención no se limita de ninguna manera a las composiciones que se pueden producir usando los métodos descritos en el presente documento. La selección de un método de fabricación adecuado puede requerir atención a las propiedades de los elementos particulares que se asocian.

En algunas realizaciones, las composiciones se fabrican en condiciones estériles o se esterilizan inicial o terminalmente. Esto puede garantizar que las composiciones resultantes son estériles y no infecciosas, mejorando así la seguridad en comparación con composiciones no estériles. Esto proporciona una medida de seguridad valiosa, especialmente cuando los sujetos que reciben las composiciones tienen defectos inmunitarios, padecen una infección y/o son susceptibles a la infección. En algunas realizaciones, las composiciones se pueden liofilizar y almacenar en suspensión o como polvo liofilizado dependiendo de la estrategia de formulación, durante períodos prolongados sin perder actividad.

La administración puede ser por una variedad de vías, que incluyen, pero no se limitan a, las vías intradérmica, intramuscular, subcutánea, intravenosa e intraperitoneal. Las composiciones a las que se hace referencia en el presente documento se pueden fabricar y preparar para su administración usando métodos convencionales.

5 Las composiciones de la invención se pueden administrar en cantidades eficaces, tales como las cantidades eficaces descritas en otra parte del presente documento. Las dosis de formas farmacéuticas pueden contener cantidades variables de elementos según la invención. La cantidad de elementos presentes en las formas farmacéuticas de la invención se puede variar de acuerdo con su naturaleza, el beneficio terapéutico que se quiere conseguir y otros parámetros similares. Se pueden llevar a cabo estudios de intervalo de dosis para establecer cantidades terapéuticas óptimas que deben estar presentes en la forma farmacéutica. Los elementos pueden estar presentes en la forma farmacéutica en una cantidad eficaz para generar un efecto deseado y/o una respuesta inmunitaria reducida tras la administración a un sujeto. Puede ser posible determinar cantidades para lograr un resultado deseado usando estudios y técnicas convencionales de intervalos de dosis en sujetos. Las formas farmacéuticas de la invención se pueden administrar con una variedad de frecuencias. Al menos una administración de las composiciones proporcionadas en el presente documento puede ser suficiente para generar una respuesta farmacológicamente relevante.

15 Otro aspecto de la descripción se refiere a los kits. En algunas realizaciones, el kit comprende una cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, el kit comprende nanovehículos sintéticos que comprenden una cantidad sobresaturada estable de rapamicina. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, los nanovehículos sintéticos también son inicialmente esterilizables por filtración. En otras realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, el kit comprende un material vehículo de poliéster hidrófobo en una cualquiera de las cantidades proporcionadas en el presente documento y rapamicina en una cualquiera de las cantidades proporcionadas en el presente documento. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, dicho kit comprende además un tensioactivo no iónico con un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) menor o igual a 10 en una cualquiera de las cantidades proporcionadas en el presente documento. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, el kit comprende además un antígeno. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, las composiciones o elementos de las mismas pueden estar contenidos en recipientes separados o en el mismo recipiente en el kit. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, el recipiente es un vial o una ampolla. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, las composiciones o elementos de las mismas están contenidas en una solución separada del recipiente, de modo que las composiciones o elementos se pueden añadir al recipiente en un momento posterior. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, las composiciones o elementos de las mismas están en forma liofilizada, cada una en un recipiente separado o en el mismo recipiente, de modo que se puedan reconstituir en un momento posterior. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, el kit comprende además instrucciones para la reconstitución, mezcla, administración, etc. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, las instrucciones incluyen una descripción de los métodos descritos en el presente documento. Las instrucciones pueden estar en cualquier forma adecuada, p. ej., como un inserto impreso o una etiqueta. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados en el presente documento, el kit comprende además una o más jeringas u otro(s) dispositivo(s) que pueden suministrar nanovehículos sintéticos in vivo a un sujeto.

EJEMPLOS

40 Ejemplo 1 - Nanovehículos sintéticos con cantidades sobresaturadas de rapamicina

Las composiciones de nanovehículos que contienen los polímeros PLGA (lactida:glicólido 3:1, viscosidad inherente 0,39 dl/g) y PLA-PEG (bloque de PEG de 5 kDa, viscosidad inherente 0,36 dl/g) así como el agente rapamicina (RAPA) se sintetizaron usando un método de evaporación de emulsión de aceite en agua. La fase orgánica se formó resolviendo los polímeros y la RAPA en diclorometano. La emulsión se formó homogeneizando la fase orgánica en una fase acuosa que contenía el tensioactivo poli(alcohol vinílico) (PVA). Después, la emulsión se combinó con una mayor cantidad de tampón acuoso y se mezcló para permitir la evaporación del disolvente. El contenido de RAPA en las diferentes composiciones se varió de manera que las composiciones cruzaran el límite de saturación de la RAPA del sistema a medida que aumentaba el contenido de RAPA. El contenido de RAPA en el límite de saturación para la composición se calculó usando la solubilidad de la RAPA en la fase acuosa y en la fase de nanovehículos dispersa. Para las composiciones que contienen PVA como soluto primario en la fase acuosa, se encontró que la solubilidad de la RAPA en la fase acuosa es proporcional a la concentración de PVA, de manera que la RAPA es soluble en una relación de masa de 1:125 respecto al PVA disuelto. Para las composiciones que contienen el PLGA y PLA-PEG descritos como los polímeros de los nanovehículos, se encontró que la solubilidad de la RAPA en la fase de nanovehículos dispersa era de 7,2% p/p. Se puede utilizar la siguiente fórmula para calcular el contenido de RAPA en el límite de saturación para la composición:

$$\text{Contenido de RAPA} = V(0,008C_{PVA} + 0,072C_{pol})$$

donde C_{PVA} es la concentración de masa de PVA, C_{pol} es la concentración de masa combinada de los polímeros y V es el volumen de la suspensión de nanovehículos al final de la evaporación.

ID de muestra	Sobresaturación calc. (%)	Carga de RAPA (%)	Diámetro (nm)
1	-50	2,5	143
2	-25	3,8	146
3	1	4,9	147
4	23	4,9	130
5	48	8,1	160
6	73	9,8	189
7	98	12,4	203

5 Para 1, 2 y 3, no se recupera un 60% constante de RAPA, lo que indica un régimen de equilibrio de sub-saturación entre las fases acuosa y orgánica. Para el resto de los nanovehículos que contienen cantidades más altas de RAPA, no se recuperan 6,8 mg constantes de RAPA. Esta pérdida de masa absoluta constante indica que el sistema está en un régimen sobresaturado (es decir, está sobresaturado en una o más fases).

Ejemplo 2 - Los nanovehículos sintéticos con rapamicina sobresaturada eliminan o retrasan el desarrollo de anticuerpos

10 Las composiciones de nanovehículos que contienen los polímeros PLGA (lactida:glicólido 3:1, viscosidad inherente 0,39 dl/g) y PLA-PEG (bloque de PEG de 5 kDa, viscosidad inherente 0,36 dl/g) así como el agente RAPA se sintetizaron usando un método de evaporación de emulsión de aceite en agua descrito en el Ejemplo 1. El contenido de RAPA en las diferentes composiciones se varió de manera que las composiciones cruzaran el límite de saturación de la RAPA del sistema a medida que aumentaba el contenido de RAPA.

ID de muestra	Sobresaturación calc. (%)	Carga de RAPA (%)	Diámetro (nm)
1	-50	2,5	143
3	1	4,9	147
8	21	8,5	163
9	48	13,5	159

15 Para evaluar la capacidad de las composiciones para inducir inmunotolerancia, se inyectó por vía intravenosa a los ratones tres veces a la semana nanovehículo y hemocianina de lapa californiana (KLH) coadministrados y después se expusieron semanalmente solo a KLH. A continuación, se analizó en los sueros de los ratones los anticuerpos contra KLH después de la exposición a KLH. Las composiciones hechas en el estado sobresaturado, y que tenían una carga final de RAPA de 8% o mayor, condujeron a la ausencia o retraso del desarrollo de anticuerpos contra KLH en mayor medida que las composiciones creadas en o por debajo de la saturación y que tenían una carga final de RAPA de 5% o menor.

Ejemplo 3 - Nanovehículos sintéticos con cantidades sobresaturadas de rapamicina

25 Las composiciones de nanovehículos que contienen los polímeros PLA (viscosidad inherente 0,41 dl/g) y PLA-PEG (bloque de PEG de 5 kDa, viscosidad inherente 0,50 dl/g) así como el agente RAPA se sintetizaron usando el método de evaporación de emulsión de aceite en agua descrito en el Ejemplo 1. El contenido de RAPA en las diferentes composiciones se varió de manera que las composiciones cruzaran el límite de saturación de la RAPA del sistema a medida que aumentaba el contenido de RAPA. El contenido de RAPA en el límite de saturación para la composición se calculó usando el método descrito en el Ejemplo 1. Para las composiciones que contienen el PLA y PLA-PEG descritos como los polímeros nanovehículos, se encontró que la solubilidad de la RAPA en la fase nanovehículos dispersa era de 8,4% p/p. Se puede usar la siguiente fórmula para calcular el contenido de RAPA en el límite de saturación para la composición:

$$\text{Contenido de RAPA} = V(0,008C_{PVA} + 0,084C_{pol})$$

donde C_{PVA} es la concentración de masa de PVA, C_{pol} es la concentración de masa combinada de los polímeros y V es el volumen de la suspensión de nanovehículos al final de la evaporación. Todos los lotes de nanovehículos se filtraron a través de filtros de 0,22 μm al final de la formación.

ID de muestra	Sobresaturación calc. (%)	Carga de RAPA (%)	Diámetro sin lavar (nm)	Diámetro final (nm)	Capacidad de filtración (g/m ²)
10	-10	5,4	145	149	>171
11	0	6,2	150	155	>180
12	10	6,1	151	154	>170
13	20	6,1	148	148	80
14	30	6,2	171	151	28
15	40	5,8	202	154	16

- 5 A pesar de añadir una cantidad creciente de RAPA a los nanovehículos 12-15, el contenido final de RAPA en los nanovehículos no aumenta mientras que la capacidad de filtración disminuye. Esto indica que las composiciones estaban sobresaturadas con RAPA y el exceso de RAPA se eliminaba durante el lavado y/o filtración.

10 **Ejemplo 4 - Los nanovehículos sintéticos con cantidades sobresaturadas de rapamicina retrasaban la producción de anticuerpos en mayor medida que los nanovehículos sintéticos con una cantidad de rapamicina en la saturación**

15 Las composiciones de nanovehículos que contienen los polímeros PLA (viscosidad inherente 0,41 dl/g) y PLA-PEG (bloque de PEG de 5 kDa, viscosidad inherente 0,50 dl/g) así como el agente rapamicina (RAPA) se sintetizaron usando un método de evaporación de emulsión de aceite en agua. El contenido de RAPA en las diferentes composiciones se varió de modo que una composición se hizo en el límite de saturación de la RAPA del sistema y una composición se hizo con 33% de sobresaturación. En cada caso, la mitad del material se filtró a través de un filtro esterilizante de 0,22 μm y la mitad permaneció sin filtrar.

ID de muestra	Sobresaturación calc. (%)	Carga de RAPA (%)	Diámetro sin lavar (nm)	Diámetro final (nm)	Capacidad de filtración (g/m ²)
16	0	6,8	126	133	N/A
17	0	5,6	126	131	>148
18	33	9,8	142	149	N/A
19	33	7,9	142	138	37

- 20 Para evaluar la capacidad de las composiciones para inducir inmunotolerancia, se inyectó por vía intravenosa a los ratones tres veces a la semana nanovehículos y KLH coadministrados y después se expusieron semanalmente solo a KLH. Después, se analizó en los sueros de los ratones los anticuerpos contra KLH después de tres exposiciones a KLH. La composición preparada en estado sobresaturado retrasaba el desarrollo de anticuerpos en mayor medida que la composición creada en la saturación. Además, el retraso y la reducción en el título posterior a la exposición repetida eran evidentes tanto si la composición se había filtrado como si no.

- 25 **Ejemplo 5 - La evaporación de disolvente más rápida y el tensioactivo de HLB bajo dan como resultado nanovehículos sintéticos con cantidades sobresaturadas de rapamicina que también son inicialmente esterilizables por filtración**

Materiales y métodos

- 30 El PLA con una viscosidad inherente de 0,41 dL/g se adquirió de Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen Alemania), código de producto 100 DL 4A. El copolímero de bloques PLA-PEG-OMe con un bloque de PEG terminado en éter metílico de aproximadamente 5.000 Da y una viscosidad inherente total de 0,50 DL/g se adquirió de Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen Alemania), código de producto 100 DL mPEG 5000 5CE. La

rapamicina se adquirió en Concord Biotech Limited, 1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India. Código de producto SIROLIMUS. El poli(alcohol vinílico) EMPROVE® 4-88 (PVA), USP (85-89% hidrolizado, viscosidad de 3,4-4,6 mPa·s) se adquirió de EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027), código de producto 1.41350. Cellgro PBS 1X (PBS), se adquirió de Corning Incorporated, (One Riverfront Plaza Corning, NY 14831 EE.UU.), número de pieza 21-040-CV. La solución salina tamponada con fosfato 1X de Dulbecco (DPBS) se adquirió de Lonza (Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Suiza), código de producto 17-512Q. El monopalmitato de sorbitán se adquirió de Croda International (300-A Columbus Circle, Edison, NJ 08837), código de producto SPAN 40.

Para la muestra 1, las soluciones se prepararon como sigue:

- 10 **Solución 1:** Se preparó una mezcla de polímero y rapamicina disolviendo el PLA a 18,75 mg por ml, PLA-PEG-Ome a 6,25 mg por ml y la rapamicina a 4,7 mg por ml de diclorometano. **Solución 2:** Se preparó PVA a 50 mg/ml en tampón de fosfato 100 mM a pH 8.

15 Se preparó una emulsión de Ac/Ag combinando la Solución 1 (1,0 ml) y la Solución 2 (3,0 ml) en un pequeño tubo de presión de vidrio, se mezcló con vórtice durante 10 segundos y después se emulsionó por sonicación a una amplitud de 30% durante 1 minuto con el tubo de presión sumergido en un baño de agua helada usando un Branson Digital Sonifier 250. Después, se añadió la emulsión a un vaso de precipitados abierto de 500 ml que contenía DPBS (30 ml). Se preparó una segunda emulsión de Ac/Ag usando los mismos materiales y método que antes y después se añadió al mismo recipiente que contenía la primera emulsión y DPBS. Después esta se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que se evaporara el diclorometano y se formaran los nanovehículos. Una porción de los nanovehículos se lavó transfiriendo la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrifuga y centrifugando a 75.600xg y 4°C durante 50 minutos, eliminando el líquido sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en DPBS que contenía PVA al 0,25% p/v. Se repitió el procedimiento de lavado y después el sedimento se resuspendió en DPBS que contenía PVA al 0,25% p/v para lograr una suspensión de nanovehículos que tenía una concentración nominal de 10 mg/ml basado en el polímero. Se preparó una formulación idéntica en un vaso de precipitados de 500 ml separado, se procesó igual y se combinó con la primera formulación justo antes de la filtración estéril. La suspensión de nanovehículos después se filtró usando un filtro de jeringa de membrana de PES de 33 mm de diámetro y 0,22 µm (número de pieza de Millipore SLGP033RB). La suspensión de nanovehículos filtrada después se almacenó a -20°C.

Para la muestra 2, las soluciones se prepararon como sigue:

- 30 **Solución 1:** Se preparó una mezcla de polímero y rapamicina disolviendo PLA a 75 mg por ml, PLA-PEG-Ome a 25 mg por ml y rapamicina a 16 mg por ml en diclorometano. **Solución 2:** Se preparó una mezcla de monopalmitato de sorbitán disolviendo Span 40 a 20 mg/ml en diclorometano. **Solución 3:** El poli(alcohol vinílico) se preparó a 50 mg por ml en tampón de fosfato 100 mM a pH 8. **Solución 4:** Se filtró el diclorometano usando un filtro de jeringa de membrana de PTFE de 0,20 µm (número de pieza VWR 28145-491).

35 Se preparó una emulsión de Ac/Ag combinando la Solución 1 (0,5 ml), la Solución 2 (0,125 ml) y la Solución 4 (0,375 ml) y la Solución 3 (3,0 ml) en un tubo de presión de vidrio pequeño, agitando con vórtice durante 10 segundos, y después se emulsionó mediante sonicación al 30% de amplitud durante 1 minuto con el tubo de presión sumergido en un baño de agua helada usando un Branson Digital Sonifier 250. Después la emulsión se añadió a un vaso de precipitados de 50 ml que contenía DPBS (30 ml). Se preparó una segunda emulsión de Ac/Ag usando los mismos materiales y método que antes y después se añadió al mismo vaso de precipitados que contenía la primera emulsión y DPBS. La suspensión del nanovehículo se procesó luego de la misma manera que la muestra 1.

Para la muestra 3, las soluciones se prepararon como sigue:

- Solución 1:** Se preparó una mezcla de polímero y rapamicina disolviendo PLA a 37,5 mg por ml, PLA-PEG-Ome a 12,5 mg por ml y rapamicina a 8 mg por ml en diclorometano. **Solución 2:** Se preparó poli(alcohol vinílico) a 75 mg por ml en tampón de fosfato 100 mM a pH 8.

45 Se preparó una emulsión de Ac/Ag combinando la Solución 1 (1 ml) y la Solución 2 (3,0 ml) en un tubo de presión de vidrio pequeño, se mezcló con vórtice durante 10 segundos y después se emulsionó por sonicación a 30% de amplitud durante 1 minuto con el tubo de presión sumergido en un baño de agua helada usando un Branson Digital Sonifier 250. Se formó una emulsión de Ac/Ag usando el mismo método descrito antes para la muestra 1. Después de emulsión por sonicación, la emulsión se añadió a un vaso de precipitados de 50 ml que contenía DPBS (30 ml). Se preparó una segunda emulsión de Ac/Ag usando los mismos materiales y método que antes y después se añadió al mismo recipiente de evaporación de disolvente. Se dejó agitar la emulsión durante 2 horas para permitir que se evaporara el disolvente orgánico y se formaran los nanovehículos. A continuación, se lavó una porción de los nanovehículos transfiriendo la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrifuga y centrifugando a 75.600xg durante 50 minutos, eliminando el líquido sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en PBS. Se repitió el procedimiento de lavado y después el sedimento se resuspendió en PBS para lograr una suspensión de nanovehículos que tenía una concentración nominal de 10 mg/ml basada en el polímero. La suspensión de nanovehículos después se filtró usando

un filtro de jeringa de membrana de PES de 33 mm de diámetro y 0,22 µm (número de pieza de Millipore SLGP033RB). Después la suspensión de nanovehículos filtrada se almacenó a -20°C.

El tamaño de los nanovehículos se determinó por dispersión dinámica de la luz. La cantidad de rapamicina en el nanovehículo se determinó por análisis por HPLC. La masa total de nanovehículos seca por ml de suspensión se determinó mediante un método gravimétrico.

5

Número de lote	Recipiente SE	Tensioactivo de HLB bajo	Área superficial del recipiente (cm ²)	Capacidad de filtración calculada (g NP/m ²)	Carga de rapamicina (%)	Tamaño (nm)	Rendimiento (%)
1	Vaso de precipitados de 500 ml	Ninguno	64	>133	9.84	148	81
2	Vaso de precipitados de 500 ml	SPAN 40	14	>178	9.32	165	93
3	Vaso de precipitados de 500 ml	Ninguno	14	47	7.38	119	73

Ratones hembra C57BL/6 de 6 semanas de edad se trataron por vía intravenosa los días 0, 7 y 14 con los nanovehículos mezclados con 200 µl de KLH (hemocianina de lapa californiana) disueltos en PBS a 1 mg/ml. Los ratones se reforzaron con 200 µg de KLH los días 21, 28, 35 y 42. Los títulos de IgG anti-KLH se leyeron los días 26, 40 y 47. Los resultados se muestran en la Fig. 4 y demuestran que los nanovehículos sintéticos que comprenden cantidades sobresaturadas estables de rapamicina, ya sea producidos con evaporación rápida del disolvente o con tensioactivo de HLB bajo, reducen significativamente la producción de anticuerpos específicos de antígeno in vivo.

10

Grupo	ID de lote	Recipiente SE	Tensioactivo HLB bajo	Diámetro DLS (nm)	Carga de RAPA (%)	Filtrabilidad (g NP/m ²)
1	PBS	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
6	Muestra 1	Vaso de precipitados de 500 ml	Ninguno	148	9,8	>133
12	Muestra 2	Vaso de precipitados de 500 ml	SAPN 40	165	9,3	>178
Todos	KLH, Sigma n° H7017					

Ejemplo 6 - La evaporación de disolvente más rápida conduce a una mayor filtrabilidad de los nanovehículos sintéticos

15

Materiales y métodos

Para las muestras 1, 2 y 4, las soluciones se prepararon de la siguiente manera:

Solución 1: Se preparó una mezcla de polímero y rapamicina disolviendo PLA a 18,8 mg por ml, PLA-PEG-Ome a 6,25 mg por ml y rapamicina a 4,7 mg por ml en diclorometano. **Solución 2:** Se preparó poli(alcohol vinílico) a 50 mg por ml en tampón de fosfato 100 mM a pH 8.

20

Se formó una emulsión de Ac/Ag de forma similar a la descrita antes para el Ejemplo 5, muestra 1. Después de la sonicación, la emulsión se añadió a un vaso de precipitados que contenía DPBS (30 ml). Se preparó una segunda emulsión de Ac/Ag usando los mismos materiales y método que antes y después se añadió al mismo recipiente que

5 contenía la primera emulsión y DPBS. La muestra 1 usaba un vaso de precipitados de 50 ml, la muestra 2 usaba un vaso de precipitados de 250 ml y las muestras 4 usaban un plato de evaporación de 125 mm. Para cada lote, se repitió la doble emulsión individual usando un nuevo recipiente de evaporación de disolvente del mismo tamaño y tipo, y se combinó con el primero después de la etapa de lavado. Después la suspensión de nanovehículos se procesó de la misma manera que en el Ejemplo 5, muestra 1.

10 El tamaño de los nanovehículos se determinó por dispersión dinámica de la luz. La cantidad de rapamicina en el nanovehículo se determinó por análisis por HPLC. La masa total de nanovehículos seca por ml de suspensión se determinó por un método gravimétrico. La capacidad de filtración se midió como g/m² de masa de nanovehículos a través de un filtro de 0,22 µm. Además, en una concentración nominal de 10 mg/ml de polímero añadido a la formulación, la solución probablemente pasaba a través de solo un filtro de jeringa de membrana PES de 33 mm y 0,22 µm que tiene un área de superficie de filtro de 4,5 cm. El porcentaje de disolvente evaporado de los vasos de precipitados se calculó midiendo la pérdida de agua de los mismos recipientes de evaporación de disolvente con 36 ml del tampón SE a lo largo del mismo tiempo que las formulaciones (2 horas). Después, la pérdida de agua (g) se restó de la pérdida medida en las formulaciones para calcular la evaporación del disolvente orgánico diclorometano.

Número de lote	Recipiente de SE	SA del recipiente (cm ²)	Capacidad calculada (g Np/m ²)	Número de filtros estériles requerido	Carga de rapamicina	Tamaño (nm)	Rendimiento
1	Vaso de precipitados de 50 ml	14	121	2	11,37	173	71
2	Vaso de precipitados de 250 ml	33	>146	1	11,66	156	72
4	Placa de evaporación de 125 mm	123	>148	1	11,74	142	73

15

Ejemplo 7 - Método para determinar la sobresaturación

Materiales y métodos

20 El PLA con una viscosidad inherente de 0,41 dL/g se adquirió de Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen Alemania), código de producto 100 DL 4A. La rapamicina se adquirió en Concord Biotech Limited, 1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India. Código de producto SIROLIMUS.

Las soluciones se prepararon como sigue:

Solución 1: Se preparó una solución de polímero disolviendo PLA a 100 mg por ml de diclorometano. **Solución 2:** Se preparó una solución de rapamicina disolviendo rapamicina a 100 mg por ml de diclorometano.

25 Los portaobjetos de vidrio para microscopio se limpiaron con isopropanol al 70% y se dejaron secar sobre una superficie limpia y plana en una campana extractora de productos químicos. La mezcla 1 se preparó mezclando 100 µl de Solución 1 con 100 µl de diclorometano en un vial de vidrio con un tapón de rosca resistente a los disolventes y se mezcló por agitación con vórtice. La mezcla 2 se preparó usando el mismo método que la mezcla 1, con 100 µl de Solución 1, 33,3 µl de Solución 2 y 66,7 µl de diclorometano. La mezcla 3 se preparó usando el mismo método que la mezcla 1, usando 100 µl de Solución 1 con 66,7 µl de Solución 2 y 33,3 µl de diclorometano. A continuación, se aplicaron 50 µl de cada mezcla en lugares separados de los portaobjetos de vidrio limpios y se dejaron secar durante la noche en la campana extractora a temperatura ambiente. Se tomó una imagen digital de cada película seca y se analizó usando un software de análisis de imágenes. Los aumentos de intensidad media normalizados pueden mostrar que la película se vuelve opaca por encima del punto de saturación.

30

Mezcla	Película					Fondo					
	Área	Intensidad media	Desviación estándar	Mín.	Máx.	Área	Intensidad media	Desviación estándar	Mín.	Máx.	Intensidad normalizada
1	45153	39,9	7,3	18	174	45538	38,6	6	18	123	1,3
2	43444	47,6	7,7	16	148	49688	40,5	5,7	19	95	7,1
3	63895	57,1	35,9	12	232	64441	23,4	4,4	8	85	33,7

Ejemplo 8 - Tensioactivo de bajo HLB, SM, aumenta la carga de RAPA y la filtrabilidad de nanovehículos sintéticos

Se sintetizaron composiciones de nanovehículos que contenían los polímeros PLA (viscosidad inherente 0,41 dl/g) y PLA-PEG (bloque de PEG de 5 kDa, viscosidad inherente 0,50 dl/g), así como el fármaco hidrófobo rapamicina (RAPA), con o sin la adición del tensioactivo de HLB bajo monopalmitato de sorbitán (SM), usando el método de evaporación de emulsión de aceite en agua. La fase orgánica se formó disolviendo los polímeros y RAPA en diclorometano. La emulsión se formó homogeneizando la fase orgánica en una fase acuosa que contenía el tensioactivo PVA usando un dispositivo de ultrasonidos de punta de sonda. Después, la emulsión se combinó con una mayor cantidad de tampón acuoso y se mezcló para permitir la disolución y evaporación del disolvente. Los nanovehículos resultantes se lavaron y filtraron a través de un filtro de 0,22 µm. Todas las composiciones contenían 100 mg de polímero. Se varió el contenido de RAPA en las diferentes composiciones.

ID de muestra	RAPA añadida a la composición (mg)	SM añadido a la composición (mg)	Diámetro sin lavar (nm)	Diámetro final (nm)	Carga de RAPA (%)	Capacidad de filtración (g/m ²)
1	12,2	0	148	148	6,1	80
2	13,3	0	171	151	6,2	28
3	14,3	0	202	154	5,8	16
4	13,6	5	156	161	9,2	>174
5	17	5	168	170	11,8	>184
6	20,4	5	181	179	14,9	77

Para las composiciones que no contienen el tensioactivo SM (muestras 1, 2 y 3), se observaron varias indicaciones de una capacidad limitante para incorporar completamente la RAPA en la composición de nanovehículos a medida que se añadían cantidades crecientes de RAPA. La diferencia creciente entre los tamaños de nanovehículos prefiltración y posfiltración en los niveles más altos de formulación de RAPA en ausencia de SM indicaba la presencia de partículas más grandes (partículas individuales o agregados) que se eliminaban durante los procedimientos de lavado y/o filtración. Esto también lo indicaba la menor capacidad de filtración antes de la obstrucción. Finalmente, la adición de cantidades crecientes de RAPA a las composiciones de nanovehículos sin SM no daba como resultado una mayor carga de RAPA (por ejemplo, muestra 1 en comparación con muestra 3), lo que indicaba que la RAPA adicional era separable de la masa de nanovehículos y era eliminada durante las etapas de lavado y/o filtración.

Por el contrario, las composiciones que contenían el tensioactivo SM incorporaban fácilmente mayores cantidades de RAPA. El tamaño del nanovehículo no se afectaba por la filtración, y el aumento de la cantidad de RAPA añadida a la composición daba como resultado mayor carga de RAPA de los nanovehículos. Se observó cierta reducción de la capacidad de filtración en el nivel de carga más alto (muestra 6), pero esto puede deberse al tamaño del nanovehículo inherentemente mayor. En resumen, la incorporación de SM ayudó a aumentar la carga de RAPA y la filtrabilidad de las composiciones de nanovehículos sintéticos.

Ejemplo 9 - Filtrabilidad y carga de RAPA mayor con SM y colesterol

Las composiciones de nanovehículos se produjeron usando los materiales y métodos descritos en el Ejemplo 8. Se produjeron nanovehículos que contenían polímero y RAPA con diferentes niveles de carga de RAPA. Además, también se produjeron nanovehículos altamente cargados con RAPA usando un excipiente, el tensioactivo SM o colesterol, en una relación en masa de excipiente:RAPA de 3,2:1.

ID de muestra	Excipiente	Diámetro (nm)	Carga de RAPA (%)	Capacidad de filtración (g/m ²)
7	-	131	5,6	>148
8	-	138	7,9	37
9	SM	165	9,3	>178
10	colesterol	166	14,3	>180

Las muestras de nanovehículos producidas en ausencia de excipientes (muestras 7 y 8) demostraron que el aumento de carga de RAPA más allá de un punto de saturación aparente de nanovehículos tiende a conducir a una reducción de la capacidad de filtración. La adición de SM o colesterol daba como resultado una mayor carga de RAPA mientras se mantenía la estabilidad (muestras 9 y 10).

- 5 Para evaluar la capacidad de las composiciones para inducir inmunotolerancia, se inyectaron por vía intravenosa a ratones tres veces por semana nanovehículos coadministrados y KLH (hemocianina de lapa californiana) con la misma dosis de RAPA, y después se expusieron semanalmente solo a KLH. Después, se analizaron en los sueros de los ratones los anticuerpos contra KLH después de cada exposición a KLH (**Fig. 6**).

10 Aunque todos los ratones que recibieron el tratamiento con nanovehículos con RAPA recibieron las mismas dosis de RAPA, los diferentes grupos muestran diferentes grados de tolerancia a la KLH. Los 5 ratones que recibieron las composiciones de nanovehículos con la carga más baja (muestra 7) tenían títulos cuantificables de anticuerpos anti-KLH después de la tercera exposición a KLH (el día 40). Este grupo de ratones desarrolló títulos menores de anticuerpos anti-KLH en comparación con los ratones que recibieron solo PBS, pero presentaron la menor tolerancia en comparación con los otros grupos de nanovehículos. El aumento de la carga de RAPA de los nanovehículos en ausencia de un excipiente (SM o colesterol) (muestra 8) mejoró significativamente la tolerancia, con solo 2 de 5 ratones demostrando títulos cuantificables después de 3 exposiciones a KLH (el día 40). La composición que contenía colesterol como excipiente (muestra 10), a pesar de la alta carga de RAPA de los nanovehículos, daba como resultado que cuatro de cinco ratones demostraban títulos de anticuerpos anti-KLH significativos después de solo dos exposiciones (el día 33). La composición de nanovehículos que contenía SM (muestra 9) demostró tanto alta capacidad de la capacidad de filtración de 0,22 μm durante la producción como una tolerabilidad superior, y solo uno de cinco ratones desarrolló un título de anticuerpos anti-KLH cuantificable después de tres exposiciones a KLH (en el día 40). Los resultados de este estudio indican que ambos excipientes (SM y colesterol) permitían mayor carga de nanovehículos de acuerdo con el rendimiento de inducción de tolerancia y la favorabilidad de procesamiento, como lo indica la capacidad de filtración. El tensioactivo de HLB bajo SM proporcionaba las propiedades necesarias para aumentar la estabilidad de los nanovehículos y demostraba mayor rendimiento.

Ejemplo 10: Efectos del tensioactivo de HLB bajo en la carga de RAPA y la filtrabilidad

Materiales y métodos

El PLA con una viscosidad inherente de 0,41 dL/g se adquirió de Lakeshore Biomaterials (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211), código de producto 100 DL 4A. El copolímero de bloques de PLA-PEG-OMe con un bloque de PEG terminado en éter metílico de aproximadamente 5.000 Da y una viscosidad inherente global de 0,50 dL/g se adquirió de Lakeshore Biomaterials (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211), código de producto 100 DL mPEG 5000 5CE. La rapamicina se adquirió de Concord Biotech Limited (1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India), código de producto SIROLIMUS. El poli(alcohol vinílico) 4-88 EMPROVE®, USP (85-89% hidrolizado, viscosidad de 3,4-4,6 mPa·s) se adquirió de EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027), código de producto 1.41350. La solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco 1X (DPBS) se adquirió de Lonza (Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Suiza), código de producto 17-512Q. El monopalmitato de sorbitán se adquirió de Croda International (300-A Columbus Circle, Edison, NJ 08837), código de producto SPAN 40. El polisorbato 80 se adquirió de NOF America Corporation (One North Broadway, Suite 912 White Plains, NY 10601), código de producto Polysorbate80 (HX2). El monolaurato de sorbitán (SPAN 20) se adquirió de Alfa Aesar (26 Parkridge Rd Ward Hill, MA 01835), código de producto L12099. El estearato de sorbitán (SPAN 60) se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto S7010. El monooleato de sorbitán (SPAN 80) se adquirió de Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (9211 North Harborgate Street Portland, OR 97203), código de producto S0060. El octil- β -D-glucopiranosido se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto 08001. El alcohol oleílico se adquirió de Alfa Aesar (26 Parkridge Rd Ward Hill, MA 01835), código de producto A18018. El palmitato de isopropilo se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto W515604. El polietilenglicol-hexadecil-éter (BRIJ 52) se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto 388831. El polietilenglicol-oleil-éter (BRIJ 93) se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto 388866. El poli(etilenglicol)-*bloque*-poli(propilenglicol)-*bloque*-poli(etilenglicol) (Pluronic L-31) se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto 435406. El poli(etilenglicol)-*bloque*-poli(propilenglicol)-*bloque*-poli(etilenglicol) (Pluronic P-123) se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto 435465. El ácido palmítico se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto P0500. La DL- α -palmitina se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto M1640. El tripalmitato de glicerilo se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto T5888.

- 55 Para la muestra 11, las soluciones se prepararon como sigue:

Solución 1: Se preparó una mezcla de polímero y rapamicina disolviendo PLA a 75 mg/ml, PLA-PEG-Ome a 25 mg/ml y rapamicina a 16 mg/ml en diclorometano. **Solución 2:** Se preparó una mezcla de Polisorbato80 disolviendo

Polisorbato80 a 80 mg/ml en diclorometano. **Solución 3:** Se preparó poli(alcohol vinílico) a 50 mg/ml en tampón de fosfato 100 mM a pH 8.

Se preparó una emulsión de Ac/Ag combinando la Solución 1 (0,5 ml), la Solución 2 (0,1 ml), el diclorometano (0,4 ml) y la Solución 3 (3,0 ml) en un tubo de presión de vidrio pequeño, se mezcló con vórtice durante 10 segundos y después se sometió a ultrasonidos al 30% de amplitud durante 1 minuto con el tubo de presión sumergido en un baño de agua helada, usando un Branson Digital Sonifier 250. Después se añadió la emulsión a un vaso de precipitados de 50 ml que contenía DPBS (30 ml). Se preparó una segunda emulsión de Ac/Ag usando los mismos materiales y método que antes y después se añadió al mismo recipiente que contenía la primera emulsión y DPBS. A continuación, esto se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que se evaporara el diclorometano y se formaran los nanovehículos. Una porción de los nanovehículos se lavó transfiriendo la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrífuga y centrifugando a 75.600xg y 4°C durante 50 minutos, eliminando el líquido sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en DPBS que contenía PVA al 0,25% en p/v. Se repitió el procedimiento de lavado y después se resuspendió el sedimento en DPBS que contenía PVA al 0,25% en p/v para lograr una suspensión de nanovehículos que tenía una concentración nominal de 10 mg/ml sobre una base de polímero. La suspensión de nanovehículos después se filtró usando un filtro de jeringa de membrana de PES de 0,22 µm (número de pieza de Millipore SLGP033RB). La suspensión de nanovehículos filtrada después se almacenó a -20°C.

Para las muestras 12-25, las soluciones se prepararon como sigue:

Solución 1: Se preparó una mezcla de polímero y rapamicina disolviendo PLA a 75 mg/ml, PLA-PEG-Ome a 25 mg/ml y rapamicina a 16 mg/ml en diclorometano. **Solución 2:** La mezcla de HLB se preparó disolviendo el tensioactivo HLB a 5,0 mg/ml en diclorometano. Los tensioactivos HLB incluyen SPAN 20, SPAN 40, SPAN 60, SPAN 80, octil-β-D-glucopiranosido, ácido oleílico, palmitato de isopropilo, BRIJ 52, BRIJ 93, Pluronic L-31, Pluronic P-123, ácido palmítico, DL-α-palmitina y tripalmitato de glicerilo. **Solución 3:** Se preparó poli(alcohol vinílico) a 62,5 mg/ml en tampón de fosfato 100 mM a pH 8.

Se preparó una emulsión de Ac/Ag combinando la Solución 1 (0,5 ml), la Solución 2 (0,5 ml) y la Solución 3 (3,0 ml) en un tubo de presión de vidrio pequeño, se mezcló con vórtice durante 10 segundos y después se sometió a ultrasonidos al 30% de amplitud durante 1 minuto con el tubo de presión sumergido en un baño de agua helada usando un Branson Digital Sonifier 250. Después, se añadió la emulsión a un vaso de precipitados de 50 ml que contenía DPBS (30 ml). Se preparó una segunda emulsión de Ac/Ag usando los mismos materiales y método que antes y después se añadió al mismo vaso de precipitados que contenía la primera emulsión y DPBS. Esta después se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que se evaporara el diclorometano y se formaran los nanovehículos. Una porción de los nanovehículos se lavó transfiriendo la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrífuga y centrifugando a 75.600xg y 4°C durante 50 minutos, eliminando el líquido sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en DPBS que contenía PVA al 0,25% en p/v. Se repitió el procedimiento de lavado y después se resuspendió el sedimento en DPBS que contenía PVA al 0,25% en p/v para lograr una suspensión de nanovehículos que tenía una concentración nominal de 10 mg/ml sobre una base de polímero. La suspensión de nanovehículos después se filtró usando un filtro de jeringa de membrana de PES de 0,22 µm (número de pieza de Millipore SLGP033RB). La suspensión de nanovehículos filtrada después se almacenó a -20°C.

Muestra	Tensioactivo de la fase orgánica	HLB del tensioactivo	Tamaño (nm)	Filtración	Número de filtros	Calculado g de NP/m ²	Rendimiento (%)	Carga de rapamicina (%)
11	Polisorbato 80	15	184	Millex 0,22 µm	>1	22	91	9,7
12	SPAN 20	8,6	148	Millex 0,22 µm	1	>144	71	11,2
13	SPAN 40	6,7	149	Millex 0,22 µm	1	>154	77	11,2
14	SPAN 60	4,7	151	Millex 0,22 µm	1	>154	77	11,0
15	SPAN 80	4,3	144	Millex 0,22 µm	1	>169	85	11,1
16	octil β-D-glucopiranosido	12	127	Millex 0,22 µm	3	47	64	6,7

Muestra	Tensioactivo de la fase orgánica	HLB del tensioactivo	Tamaño (nm)	Filtración	Número de filtros	Calculado g de NP/m ²	Rendimiento (%)	Carga de rapamicina (%)
17	alcohol oleílico	1,3	165	Millex 0,22 µm	1	>157	78	12,5
18	palmitato de isopropilo	2,9	171	Millex 0,22 µm	1	>144	71	10,9
19	Brij 52	5	182	Millex 0,22 µm	1	>138	77	11,2
20	Brij 93	4	174	Millex 0,22 µm	1	>158	79	11,9
21	Pluronic L-31	1-7	169	Millex 0,22 µm	4	31	70	8,5
22	Pluronic P-123	7-9	162	Millex 0,22 µm	1	>145	72	10,7
23	Ácido palmítico	3,2	132	Millex 0,22 µm	1	>141	71	1,0
24	DL-α-palmitina	7,2	153	Millex 0,22 µm	3	51	68	7,4
25	Tripalmitato de glicerilo	4,3	168	Millex 0,22 µm	1	>146	73	10,0

El HLB para la mayoría de los tensioactivos de HLB bajo se determinó usando información disponible al público. Para la DL-α-palmitina, el HLB se calculó usando la siguiente fórmula: $M_w = 330,5 \text{ g/mol}$, parte hidrófila = 119,0 g/mol; $HLB = 119,0/330,5 * 100/5 = 7,2$. Para el palmitato de glicerilo, el HLB se calculó usando la siguiente fórmula: $M_w = 807,3 \text{ g/mol}$, parte hidrófila = 173,0 g/mol; $HLB = 173,0/807,3 * 100/5 = 4,3$. Para el palmitato de isopropilo, el HLB se calculó usando la siguiente fórmula: $M_w = 298,5 \text{ g/mol}$, parte hidrófila = 44,0 g/mol; $HLB = 44,0/298,5 * 100/5 = 2,9$. Para el alcohol oleílico, el HLB se calculó usando la siguiente fórmula: $M_w = 268,5 \text{ g/mol}$, parte hidrófila = 17,0 g/mol; $HLB = 17,0/268,5 * 100/5 = 1,3$. Además, la carga de tensioactivo de HLB bajo se midió por extracción seguida de cuantificación por un método de HPLC.

- 5 Antes de la inyección en animales, la suspensión de nanovehículos en masa se descongeló en un baño de agua a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los nanovehículos se diluyeron con DPBS para alcanzar una concentración deseada de rapamicina de 278 µg/ml. Se trataron ratones hembra C57BL/6 de 6 semanas de edad por vía intravenosa los días 0, 7 y 14 con nanovehículos (1,17 ml) mezclados con 130 µl de 10x KLH (hemocianina de lapa californiana). Se dio a los ratones un refuerzo de 200 µg de KLH los días 21, 28, 35 y 42. Los títulos de IgG anti-KLH (medidos por ELISA) se leyeron los días 40, 47 y 61. Los resultados demuestran que el tensioactivo de HLB bajo puede dar como resultado sustanciales cargas de rapamicina y filtrabilidad de nanovehículos sintéticos. Además, todos los nanovehículos con tensioactivos de HLB bajo como se muestra en la Fig. 7 dieron como resultado títulos de anticuerpos menores durante al menos 40 y 47 días.

Ejemplo 11 - Efecto del tensioactivo de HLB bajo en la filtrabilidad de nanovehículos sintéticos

20 Materiales y métodos

El copolímero de bloques de PLA-PEG-OME con un bloque de PEG terminado en éter metílico de aproximadamente 5.000 Da y una viscosidad inherente total de 0,50 dl/g se adquirió de Evonik Industries (Rellinghauser Straße 1-11 45128 Essen, Alemania), código de producto 100 DL mPEG 5000 5CE. El PLA con una viscosidad inherente de 0,41 dl/g se adquirió de Evonik Industries (Rellinghauser Straße 1-11 45128 Essen Alemania), código de producto 100 DL 4A. La rapamicina se adquirió de Concord Biotech Limited, 1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India. Código de producto SIROLIMUS. El monopalmitato de sorbitán se adquirió de Croda (315 Cherry Lane New Castle Delaware 19720), código de producto SPAN 40. El diclorometano se adquirió de Spectrum (14422 S San Pedro Gardena CA, 90248-2027). Número de pieza M1266. El poli(alcohol vinílico) 4-88 EMPROVE®, USP (85-89% hidrolizado, viscosidad de 3,4-4,6 mPa·s) se adquirió de EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown,

NJ 08027), código de producto 1.41350, la solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, 1X, 0,0095 M (PO₄), sin calcio ni magnesio, se adquirió de BioWhittaker (8316 West Route 24 Mapleton, IL 61547), número de pieza nº 12001, código de producto Lonza DPBS. La emulsión se llevó a cabo usando un dispositivo de ultrasonidos Branson Digital Sonifier 250 con una sonda de titanio de punta cónica de 3,17 mm (1/8 pulgada).

5 Las soluciones se prepararon como sigue:

Solución 1: Se preparó una mezcla de polímero disolviendo PLA-PEG-OMe (100 DL mPEG 5000 5CE) a 50 mg por 1 ml y PLA (100 DL 4A) a 150 mg por ml en diclorometano. **Solución 2:** se disolvió rapamicina a 160 mg por 1 ml en diclorometano. **Solución 5:** Se disolvió monopalmitato de sorbitán (SPAN 40) a 50 mg por 1 ml en diclorometano. **Solución 6:** El diclorometano se esterilizó por filtración usando un filtro de jeringa de membrana de PTFE de 0,2 µm (número de pieza VWR 28145-491). **Solución 7:** Se preparó una solución de poli(alcohol vinílico) disolviendo poli(alcohol vinílico) (poli(alcohol vinílico) 4-88 EMPROVE®) a 75 mg por 1 ml en tampón de fosfato 100 mM a pH 8. **Solución 8:** Se preparó una mezcla de poli(alcohol vinílico) y solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, 1X, 0,0095 M (PO₄) disolviendo poli(alcohol vinílico) (poli(alcohol vinílico) 4-88 EMPROVE®) a 2,5 mg por 1 ml en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, 1X, 0,0095 M (PO₄) (Lonza DPBS).

10
15 Para la muestra 26, se preparó una emulsión de Ac/Ag combinando la Solución 1 (0,5 ml), la Solución 2 (0,1 ml), la Solución 5 (0,1 ml) y la Solución 6 (0,30 ml) en un tubo de presión de vidrio pequeño. La solución se mezcló pipeteando repetidamente. A continuación, se añadió la Solución 7 (3,0 ml) y la formulación se mezcló con vórtice durante diez segundos. Después la formulación se sometió a ultrasonidos con el tubo de presión sumergido en un baño de hielo durante 1 minuto al 30% de amplitud. Después, se añadió la emulsión a un vaso de precipitados de 50 ml abierto que
20 contenía Lonza DPBS (30 ml). Esta después se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que se evaporara el diclorometano y se formaran los nanovehículos. Una porción de los nanovehículos se lavó transfiriendo la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrífuga y centrifugando a 75.600xg y 4°C durante 50 minutos, eliminando el líquido sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en Solución 8. Se repitió el procedimiento de lavado y después el sedimento se resuspendió en Solución 8 para lograr una suspensión de nanovehículos que tenía una
25 concentración nominal de 10 mg por ml sobre una base de polímero. La formulación de nanovehículos se filtró usando un filtro de jeringa de membrana de PES de 0,22 µm (número de pieza de Millex SLGP033RS). Se midió la masa de la capacidad de filtración de solución de nanovehículos. La solución de nanovehículos filtrada después se almacenó a -20°C.

30 Para la muestra 27, se preparó una emulsión de Ac/Ag combinando la Solución 1 (0,5 ml), la Solución 2 (0,1 ml) y la Solución 6 (0,40 ml) en un tubo de presión de vidrio pequeño. La solución se mezcló pipeteando repetidamente. A continuación, se añadió la Solución 7 (3,0 ml) y la formulación se mezcló con vórtice durante diez segundos. Después la formulación se sometió a ultrasonidos con el tubo de presión sumergido en un baño de hielo durante 1 minuto al 30% de amplitud. Después, se añadió la emulsión a un vaso de precipitados de 50 ml abierto que contenía Lonza
35 DPBS (30 ml). Esta después se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que se evaporara el diclorometano y se formaran los nanovehículos. Una porción de los nanovehículos se lavó transfiriendo la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrífuga y centrifugando a 75.600xg y 4°C durante 50 minutos, eliminando el líquido sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en Solución 8. Se repitió el procedimiento de lavado y después el sedimento se resuspendió en Solución 8 para lograr una suspensión de nanovehículos que tenía una concentración nominal de 10 mg por ml sobre una base de polímero. La formulación de nanovehículos se filtró usando un filtro de
40 jeringa de membrana de PES de 0,22 µm (número de pieza de Millex SLGP033RS). Se midió la masa de la capacidad de filtración de solución de nanovehículos. La solución de nanovehículos filtrada después se almacenó a -20°C.

45 El tamaño de los nanovehículos se determinó por dispersión dinámica de la luz. La cantidad de rapamicina en el nanovehículo se determinó por análisis de HPLC. La masa total de nanovehículo seco por mL de suspensión se determinó por un método gravimétrico. La filtrabilidad se evaluó por la cantidad de filtrado que pasaba a través del primer filtro.

Los datos muestran que para la rapamicina, la incorporación de SPAN 40 en los nanovehículos sintéticos daba como resultado un aumento de la filtrabilidad de las composiciones de nanovehículos sintéticos.

ID de nanovehículo	Rapamicina	Tensioactivo de HLB bajo	Diámetro efectivo (nm)	Contenido de rapamicina (% p/p)	Rendimiento de nanovehículos (%)	Capacidad de filtración de 0,22 µm (g/m ²)
26	Rapamicina	SPAN 40	179	17,19	80	98
27	Rapamicina	Ninguno	226	17,56	75	10

Ejemplo 12: SPAN 40 aumenta considerablemente la filtrabilidad de nanovehículos sintéticos que comprenden polímeros de poliéster**Materiales y métodos**

5 El PLA (100 DL 4A), con una viscosidad inherente de 0,41 dl/g se adquirió de Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen Alemania), código de producto 100 DL 4A. El copolímero de bloques de PLA-PEG-OMe con un bloque de PEG terminado en éter metílico de aproximadamente 5.000 Da y una viscosidad inherente total de 0,50 dl/g se adquirió de Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen Alemania), código de producto 100 DL mPEG 5000 5CE. La rapamicina se adquirió de Concord Biotech Limited (1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India), código de producto SIROLIMUS. El poli(alcohol vinílico) 4-88 (PVA) EMPROVE®, USP (85-89% hidrolizado, viscosidad de 3,4-4,6 mPa·s) se adquirió de EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027), código de producto 1.41350. La solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco 1X (DPBS) se adquirió de Lonza (Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Suiza), código de producto 17-512Q. El monopalmitato de sorbitán (SPAN 40), se adquirió de Croda International (300-A Columbus Circle, Edison, NJ 08837), código de producto Span 40. El PLGA (5050 DLG 2.5A), con aproximadamente 54% en peso de lactida y 46% en peso de glicólido, y una viscosidad inherente de 0,24 dl/g se adquirió de Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen Alemania), código de producto 5050 DLG 2.5A. El PLGA (7525 DLG 4A), con aproximadamente 73% en peso de lactida y 27% en peso de glicólido, y una viscosidad inherente de 0,39 dl/g se adquirió de Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen Alemania), código de producto 7525 DLG 4A. La policaprolactona (PCL), Mw medio de 14.000 Da y Mn de 10.000 Da, se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto 440752.

20 Para las muestras 1, 3, 5 y 7, las soluciones se prepararon como sigue:

Solución 1: PLA-PEG-Ome a 50 mg por ml, Span 40 a 10 mg por ml y rapamicina a 32 mg por ml se disolvieron en diclorometano. Solución 2: Se disolvieron 100 DL 4A en diclorometano a 150 mg por ml. Solución 3: Se disolvió 5050 DLG 2.5A en diclorometano a 150 mg por ml. Solución 4: Se disolvió 7525 DLG 4A en diclorometano a 150 mg por ml. Solución 5: Se disolvió PCL en diclorometano a 150 mg por ml. Solución 6: Se preparó PVA a 75 mg por ml en tampón de fosfato 100 mM a pH 8.

Se preparó una emulsión de Ac/Ag transfiriendo la Solución 1 (0,5 ml) a un tubo de presión de vidrio de pared gruesa.

A esto, al lote 1 se añadió la Solución 2 (0,5 ml), al lote 3 se añadió la Solución 3 (0,5 ml), al lote 5 se añadió 4 (0,5 ml) y al lote 7 se añadió la Solución 5 (0,5 ml). Después, las dos soluciones se mezclaron pipeteando repetidamente. A continuación, se añadió la Solución 6 (3,0 ml), el tubo se mezcló con vórtice durante 10 segundos y después se emulsionó por ultrasonidos a una amplitud del 30% durante 1 minuto con el tubo de presión sumergido en un baño de agua helada usando un Branson Digital Sonifier 250. La emulsión después se añadió a un vaso de precipitados de 50 ml que contenía DPBS (30 ml). Esta después se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que se evaporara el diclorometano y se formaran los nanovehículos. Una porción de los nanovehículos se lavó transfiriendo la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrifuga y centrifugando a 75.600xg durante 50 minutos, eliminando el líquido sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en DPBS. Se repitió el procedimiento de lavado y después se resuspendió el sedimento en DPBS para lograr una suspensión de nanovehículos que tenía una concentración nominal de 10 mg/ml sobre un polímero base. La suspensión de nanovehículos después se filtró usando un filtro de jeringa de membrana de PES de 0,22 µm (número de pieza de Millipore SLGP033RB) y, si es necesario: filtro de jeringa de membrana de PES de 0,45 µm (número de pieza de PALL 4614) y/o un filtro de jeringa de membrana de PES de 1,2 µm (número de pieza PALL 4656). La suspensión de nanovehículos filtrada después se almacenó a -20°C.

El tamaño del nanovehículo se determinó por dispersión dinámica de la luz. La cantidad de rapamicina en el nanovehículo se determinó por análisis de HPLC. La filtrabilidad se determinó comparando el peso del flujo a través del primer filtro estéril de 0,22 µm con el rendimiento para determinar la masa real de nanovehículos que pasaban antes de bloquear el filtro, o el total a través del primer y único filtro. La masa total de nanovehículo seco por ml de suspensión se determinó por un método gravimétrico.

Para las muestras 2, 4, 6 y 8, se prepararon soluciones como sigue:

Solución 1: Se preparó una mezcla de polímero y rapamicina disolviendo PLA-PEG-Ome a 50 mg por ml y rapamicina a 32 mg por ml en diclorometano. Solución 2: Se disolvieron 100 DL 4A en diclorometano a 150 mg por ml. Solución 3: Se disolvió 5050 DLG 2.5A en diclorometano a 150 mg por ml. Solución 4: Se disolvió 7525 DLG 4A en diclorometano a 150 mg por ml. Solución 5: Se disolvió PCL en diclorometano a 150 mg por ml. Solución 6: Se preparó poli(alcohol vinílico) a 75 mg por ml en tampón de fosfato 100 mM a pH 8.

Se preparó una emulsión de Ac/Ag transfiriendo la Solución 1 (0,5 ml) a un tubo de presión de vidrio de pared gruesa. A esto, al lote 2 se añadió la Solución 2 (0,5 ml), al lote 4 se añadió la Solución 3 (0,5 ml), al lote 6 se añadió 4 (0,5 ml) y al lote 8 se añadió la Solución 5 (0,5 ml). Después, las dos soluciones se mezclaron pipeteando repetidamente. La adición de la solución de PVA, el lavado, filtración y almacenamiento son iguales que los anteriores.

El tamaño del nanovehículo se evaluó igual que antes.

Los resultados muestran un aumento significativo en la filtrabilidad de los nanovehículos sintéticos que comprenden polímeros de poliéster con la inclusión de SPAN 40 en los nanovehículos sintéticos.

Número de lote	Polímero del núcleo	Excipiente	Tamaño (nm)	Capacidad de filtración (g de NP/m ²)	Carga de Rapa (%)	Rendimiento NP (%)
1	100 DL4A	SPAN 40	160	>148	12,65	75
2	100 DL 4A	Ninguno	197	17	10,88	71
3	5050 DLG 2.5A	SPAN 40	153	>139	13,09	70
4	5050 DLG 2.5A	Ninguno	188	59	13,40	64
5	7525 DLG 4A	SPAN 40	164	>158	11,81	78
6	7525 DLG 4A	Ninguno	196	28	11,64	73
7	Policaprolactona	SPAN 40	164	112	10,62	75
8	Policaprolactona	Ninguno	173	52	10,29	78

5 Ejemplo 13: Nanovehículos sintéticos con tensioactivo de HLB bajo y carga de RAPA significativa dan como resultado tolerancia específica de antígeno duradera

Materiales y métodos

El PLA con una viscosidad inherente de 0,41 dl/g se adquirió de Lakeshore Biomaterials (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211), código de producto 100 DL 4A. El copolímero de bloques de PLA-PEG-OME con un bloque de PEG terminado en éter metílico de aproximadamente 5.000 Da y una viscosidad inherente total de 0,50 dl/g se adquirió de Lakeshore Biomaterials (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211), código de producto 100 DL mPEG 5000 5CE. La rapamicina se adquirió de Concord Biotech Limited (1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India), código de producto SIROLIMUS. El monopalmitato de sorbitán se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St., St. Louis, MO 63103), código de producto 388920. El poli(alcohol vinílico) 4-88 EMPROVE® (PVA), USP (85-89% hidrolizado, viscosidad de 3,4-4,6 mPa·s) se adquirió de EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027), código de producto 1.41350. La solución salina tamponada con fosfato 1X de Dulbecco (DPBS) se adquirió de Lonza (Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Suiza), código de producto 17-512Q.

Las soluciones se prepararon como sigue:

Solución 1: Se preparó una mezcla de polímero, rapamicina y monopalmitato de sorbitán disolviendo PLA a 37,5 mg/ml, PLA-PEG-Ome a 12,5 mg/ml, rapamicina a 8 mg/ml y monopalmitato de sorbitán a 2,5 en diclorometano.
Solución 2: Se preparó poli(alcohol vinílico) a 50 mg/ml en tampón de fosfato 100 mM a pH 8.

Se preparó una emulsión de Ac/Ag combinando la Solución 1 (1,0 ml) y la Solución 2 (3 ml) en un tubo de presión de vidrio pequeño, mezclado con vórtice durante 10 segundos. Después la formulación se homogeneizó mediante ultrasonidos a una amplitud del 30% durante 1 minuto. Después, la emulsión se añadió a un vaso de precipitados abierto que contenía DPBS (30 ml). Se preparó una segunda emulsión de Ac/Ag usando los mismos materiales y método que antes y después se añadió al mismo vaso de precipitados que contenía la primera emulsión y DPBS. Después, la emulsión combinada se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que se evaporara el diclorometano y se formaran los nanovehículos. Una porción de los nanovehículos se lavó transfiriendo la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrifuga y centrifugando a 75.600xg y 4°C durante 50 minutos, eliminando el líquido sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en DPBS que contenía PVA al 0,25% en p/v. Se repitió el procedimiento de lavado y después el sedimento se resuspendió en DPBS que contenía PVA al 0,25% en p/v para lograr una suspensión de nanovehículos que tenía una concentración nominal de 10 mg/ml sobre un polímero base. La suspensión de nanovehículos después se filtró usando un filtro de jeringa de membrana de PES de 0,22 µm (número de pieza de Millipore SLGP033RB). La suspensión de nanovehículos filtrada después se almacenó a -20°C.

El tamaño del nanovehículo se determinó por dispersión dinámica de la luz. La cantidad de rapamicina en el nanovehículo se determinó por análisis de HPLC. La masa total de nanovehículo seco por mL de suspensión se determinó por un método gravimétrico.

Diámetro efectivo (nm)	Contenido de rapamicina (% p/p)	Conc. de nanovehículos (mg/ml)
150	11,5	11,1

Se evaluó la capacidad de los nanovehículos sintéticos, frente a la rapamicina libre, para inducir inmunotolerancia duradera frente al antígeno modelo KLH. A grupos de ratones C57BL/6 sin tratamiento previo (n = 10 por grupo) se les administró por vía intravenosa los días 0, 7 y 14 PBS (grupo 1), 50 µg (~2 mg/kg) de rapamicina libre sola o mezclada con KLH (grupos 2 y 3, respectivamente), o 50 µg de rapamicina encapsulada en nanovehículos sintéticos sola (grupo 6) o mezclada con KLH (grupos 7 y 8) (Fig. 8). Para determinar los efectos de la administración crónica de rapamicina, el grupo 4 recibió rapamicina libre sola cinco veces por semana (50 µg/día) desde el día 0 al día 20 o en combinación con KLH administrada una vez por semana (grupo 5). Posteriormente, todos los grupos se expusieron a 200 µg de KLH los días 21, 28 y 35. Se recogieron los sueros y se midieron las respuestas de anticuerpos anti-KLH los días 35 y 42 (después de 2 y 3 inyecciones, respectivamente). La eficacia se evaluó como la CE50 para el título de anticuerpos anti-KLH determinado por ELISA. La figura 9 ilustra el protocolo.

Los ratones de control tratados con PBS desarrollaron niveles elevados de anticuerpos anti-KLH los días 35 y 42, después de 2 y 3 inyecciones de exposición de KLH, respectivamente. Los ratones tratados con rapamicina libre (semanal o diaria) en ausencia de KLH desarrollaron niveles similares de anticuerpos anti-KLH como el grupo tratado con PBS. Los ratones tratados con nanovehículos sintéticos solos o con rapamicina libre diaria y KLH mostraron una respuesta retardada en comparación con el grupo de control de PBS, pero los títulos se reforzaron con cada exposición con KLH. Estos resultados indican que el tratamiento con nanovehículos sintéticos solos no induce inmunosupresión crónica, y que la KLH administrada con rapamicina libre diaria, incluso en 5 veces la dosis semanal total de rapamicina administrada en nanovehículos sintéticos, no induce tolerancia inmunológica duradera.

Por el contrario, los ratones tratados con nanovehículos sintéticos+KLH (grupos 7 y 8), que comprendían una cantidad significativa de rapamicina, desarrollaron pocos anticuerpos anti-KLH o no detectables, incluso después de recibir tres exposiciones de KLH postratamiento semanales (para un total de 6 inyecciones de KLH), lo que indica una inmunotolerancia duradera. Ambos lotes de nanovehículos sintéticos fueron igualmente efectivos. Todos los grupos, excepto los tratados con nanovehículo sintético+KLH, desarrollaron reacciones anafilácticas el día 42. Estos resultados indican que la tolerancia a la KLH inducida por el tratamiento con nanovehículos sintéticos que comprenden una cantidad significativa de rapamicina y KLH prevenían el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad.

Para evaluar la especificidad antigénica de la tolerancia a la KLH, todos los animales se expusieron a OVA+CpG s.c. (35 µg+20 µg) en la extremidad trasera los días 49 y 56. La Fig. 10 muestra que todos los animales desarrollaron niveles similares de títulos contra la OVA, lo que demuestra que la administración concomitante del antígeno con nanovehículo sintético puede producir tolerancia inmunológica y que el tratamiento con nanovehículo sintético no induce inmunosupresión crónica. Estos resultados demuestran que la rapamicina encapsulada en nanovehículos, en lugar de rapamicina libre, (cuando está presente en una cantidad significativa, induce inmunotolerancia duradera y específica de antígeno cuando se administra de forma concomitante con un antígeno diana.

Ejemplo 14: SPAN 40 aumenta la filtrabilidad de la rapamicina

35 Materiales y métodos

El PLA con una viscosidad inherente de 0,41 dl/g se adquirió de Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen, Alemania), código de producto 100 DL 4A. El copolímero de bloques de PLA-PEG-OMe con un bloque de PEG terminado en éter metílico de aproximadamente 5.000 Da y una viscosidad inherente total de 0,50 dl/g se adquirió de Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen, Alemania), código de producto 100 DL mPEG 5000 5CE. La rapamicina se adquirió de Concord Biotech Limited (1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India), código de producto SIROLIMUS. El poli(alcohol vinílico) 4-88 EMPROVE®, USP (85-89% hidrolizado, viscosidad de 3,4-4,6 mPa·s) se adquirió de EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027), código de producto 1.41350. La solución salina tamponada con fosfato 1X de Dulbecco (DPBS) se adquirió de Lonza (Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Suiza), código de producto 17-512Q. El monopalmitato de sorbitán se adquirió de Croda International (300-A Columbus Circle, Edison, NJ 08837), código de producto SPAN 40.

Las soluciones se prepararon como sigue. **Solución 1:** Se preparó una mezcla de polímero y rapamicina disolviendo PLA a 150 mg/ml y PLA-PEG-Ome a 50 mg/ml. **Solución 2:** Se preparó una solución de rapamicina a 100 mg/ml en diclorometano. **Solución 6:** Se preparó una solución de monopalmitato de sorbitán disolviendo SPAN 40 a 50 mg/ml en diclorometano. **Solución 7:** Se preparó poli(alcohol vinílico) a 75 mg/ml en tampón de fosfato 100 mM a pH 8.

Se prepararon emulsiones de Ac/Ag añadiendo la Solución 1 (0,5 ml) a un tubo de presión de pared gruesa. Para los lotes 1, 3, 5 y 7, esta se combinó con la Solución 6 (0,1 ml) y diclorometano (0,28 ml). Después, el lote 1 se combinó esta con la solución 2 (0,12 ml). De manera similar, el lote 2 se combinó con diclorometano (0,38 ml) y después el lote 2 se combinó con la solución 2 (0,12 ml). Por lo tanto, para cada lote individual, el volumen total de la fase orgánica era de 1 ml. Las

soluciones de fase orgánica combinadas se mezclaron pipeteando repetidamente. A continuación, se añadió la Solución 7 (3,0 ml), el tubo de presión se mezcló con vórtice durante 10 segundos y después se sometió a ultrasonidos a una amplitud del 30% durante 1 minuto con el tubo de presión sumergido en un baño de agua helada usando un Branson Digital Sonifier 250. La emulsión después se añadió a un vaso de precipitados de 50 ml que contenía DPBS (30 ml). Después esta se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el diclorometano se evaporara rápidamente para que se formaran los nanovehículos. Una porción de los nanovehículos se lavó transfiriendo la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrífuga y centrifugando a 75.600xg y 4°C durante 50 minutos, eliminando el líquido sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en DPBS que contenía PVA al 0,25% en p/v. Se repitió el procedimiento de lavado y después se resuspendió el sedimento en DPBS que contenía PVA al 0,25% en p/v para lograr una suspensión de nanovehículos que tenía una concentración nominal de 10 mg/ml sobre un polímero base. Después, la suspensión de nanovehículos se filtró usando un filtro de jeringa de membrana de PES de 0,22 µm (número de pieza de Millipore SLGP033RB). La suspensión de nanovehículos filtrada después se almacenó a -20°C.

Los resultados muestran que la incorporación de SPAN 40 en nanovehículos sintéticos aumentó la filtrabilidad de los rapalogos, rapamicina y everolimus.

Número de lote	Rapamicina	Tensioactivo de HLB bajo	Capacidad de filtración calculada (g de NP/m ²)	Tamaño (nm)	Rendimiento (%)	Carga de rapamicina (%)
1	Rapamicina	SPAN 40	>117	163	60	10,41
2	Rapamicina	Ninguno	21	189	58	11,38

Ejemplo 15: Muestra los efectos de las cantidades de los componentes en la carga de rapamicina y la filtrabilidad del nanovehículo sintético

Materiales y métodos

El copolímero de bloques de PLA-PEG-OMe con un bloque de PEG terminado en éter metílico de aproximadamente 5.000 Da y una viscosidad inherente total de 0,50 dl/g se adquirió de Evonik Industries (Rellinghauser Straße 1-11 45128 Essen, Alemania), código de producto 100 DL mPEG 5000 5CE. El PLA con una viscosidad inherente de 0,41 dl/g se adquirió de Evonik Industries (Rellinghauser Straße 1-11 45128 Essen, Alemania), código de producto 100 DL 4A. La rapamicina se adquirió en Concord Biotech Limited, 1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India. Código de producto SIROLIMUS. El monopalmitato de sorbitán se adquirió de Croda (315 Cherry Lane New Castle Delaware 19720), código de producto SPAN 40. El diclorometano se adquirió de Spectrum (14422 S San Pedro Gardena CA, 90248-2027). Número de pieza M1266. El poli(alcohol vinílico) 4-88 EMPROVE®, (PVA), USP (85-89% hidrolizado, viscosidad de 3,4-4,6 mPa·s) se adquirió de EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027), código de producto 1.41350. La solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), 1X, 0,0095 M (PO₄), sin calcio ni magnesio, se adquirió de BioWhittaker (8316 West Route 24 Mapleton, IL 61547), número de pieza 12001, código de producto Lonza DPBS. La emulsión se llevó a cabo usando un Branson Digital Sonifier 250 con una sonda de titanio de punta cónica de 3,17 mm (1/8 pulgadas).

Las soluciones se prepararon de la siguiente manera:

Solución de polímero: Se preparó una mezcla de polímero disolviendo PLA-PEG-OMe (100 DL mPEG 5000 5CE) y PLA (100 DL 4A) en los mg indicados por ml en diclorometano en una proporción 1:3 de PLA-PEG a PLA. **Solución de rapamicina:** se disolvió rapamicina a los mg indicados por 1 ml en diclorometano. **Solución de SPAN 40:** se disolvió monopalmitato de sorbitán (SPAN 40) a los mg indicados por ml en diclorometano. **Solución de CH₂Cl₂:** El diclorometano (CH₂Cl₂) se esterilizó por filtración usando un filtro de jeringa de membrana de PTFE de 0,2 µm (número de pieza VWR 28145-491). **Solución de PVA:** Se preparó una solución de poli(alcohol vinílico) disolviendo poli(alcohol vinílico) (poli(alcohol vinílico) 4-88 EMPROVE®) a los mg indicados por 1 ml en tampón de fosfato 100 mM a pH 8. **Solución de DPBS PVA:** Se preparó una mezcla de poli(alcohol vinílico) y solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, 1X, 0,0095 M (PO₄) disolviendo poli(alcohol vinílico) (poli(alcohol vinílico) 4-88 EMPROVE®) a 2,5 mg por 1 ml en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, 1X, 0,0095 M (PO₄) (Lonza DPBS).

Se preparó una emulsión de Ac/Ag combinando la solución de polímero, solución de rapamicina, solución de SPAN 40 y/o solución de CH₂Cl₂ (volumen total 1-2 ml) en un tubo de presión de vidrio de pared gruesa. La solución se mezcló pipeteando repetidamente. A continuación, se añadió solución de PVA (3 a 6 ml) (éter como una única emulsión con 1 ml de fase orgánica y 3 ml de solución acuosa de PVA, o como dos emulsiones individuales preparadas una tras otra). La formulación se mezcló con vórtice durante diez segundos y después se sometió a ultrasonidos con el tubo de presión sumergido en un baño de hielo durante 1 minuto al 30% de amplitud. La emulsión después se añadió a un vaso de precipitados abierto de 50 ml que contenía Lonza DPBS (30 ml). Esta después se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que se evaporara el diclorometano y se formaran los nanovehículos. Una porción de los nanovehículos se lavó transfiriendo la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrífuga y

ES 2 977 259 T3

5 centrifugando a 75.600xg y 4°C durante 50 minutos, eliminando el líquido sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en solución de DPBS PVA. Se repitió el procedimiento de lavado y después se resuspendió el sedimento en solución de DPBS PVA para lograr una suspensión de nanovehículos con una concentración nominal de 10 mg por ml sobre un polímero base. La formulación de nanovehículos se filtró usando un filtro de jeringa de membrana de PES de 0,22 µm (número de pieza Millex SLGP033RS). Se midió la masa de la capacidad de filtración de la solución de nanovehículos. La solución de nanovehículos filtrada después se almacenó a -20°C.

La filtrabilidad se da como g/m² de área superficial de la membrana de filtración, del nanovehículo medido que pasa a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm de membrana de PES de 33 mm de Millipore, número de pieza SLGP033RB.

10 Los resultados muestran la cantidad de varios componentes en una serie de nanovehículos sintéticos que pueden dar como resultado nanovehículos sintéticos esterilizables por filtración inicial con una cantidad de rapamicina que se espera que sea eficaz in vivo.

Lote nº	Polímero (mg por mL)	SPAIN 40 (mg por mL)	Rapamicina (mg por mL)	PVA (mg por mL)	Tamaño (nm)	Filtrabilidad (g NP/m ²)	Rendimiento	HLB/Rapa % en peso	HLB/Polímero % en peso
1 ^a	50	0	8	62,5	135	52	70,7	0,00	0,00
2 ^a	50	0,1	8	62,5	135	26	68,6	1,23	0,20
3 ^a	50	0,25	8	62,5	148	27	70,9	3,03	0,50
4 ^a	50	0,5	8	62,5	166	146	73,2	5,88	0,99
5 ^a	50	1	8	62,5	147	151	75,7	11,11	1,96
6 ^a	50	1,5	8	62,5	161	146	72,2	15,79	2,91
7 ^a	50	2,5	8	62,5	149	176	85,0	23,81	4,76
8 ^a	50	2,5	8	50	182	209	103,5	23,81	4,76
9 ^a	50	2,5	8	75	132	155	76,7	23,81	4,76
10 ^a	50	3	8	62,5	143	140	69,4	27,27	5,66
11 ^a	62,5	3	8	62,5	151	205	80,9	27,27	4,58
12 ^a	37,5	3	8	62,5	139	203	60,9	27,27	7,41
13 ^a	50	4,5	8	62,5	149	149	73,6	36,00	8,26
14 ^a	50	5	6,66	50	148	193	94,4	42,88	9,09
15 ^a	50	5	8,33	50	176	176	86,2	37,48	9,09
16 ^a	50	10	8	50	173	38	66,1	55,56	16,67
17	100	10	11,32	75	153	178	88,2	46,90	909
18	100	10	14,16	75	160	200	98,9	41,39	909
19	100	10	17	75	177	182	101,0	3704	909
20	100	7,5	24	75	188	125	70,4	23,81	6,98
21	75	11,25	30	75	197	17	82,5	27,27	13,04
22	100	15	32	75	201	17	108,1	31,91	13,04
23	100	15	40	75	217	9	82,6	27,27	13,04
24	100	15	40	75	193	14	116,5	27,27	13,04
^a Estas formulaciones se prepararon con 2 ml de fase orgánica, 6 ml de solución de PVA									

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

nanovehículos sintéticos que comprenden un material vehículo de poliéster hidrófobo y rapamicina;

5 en donde la rapamicina está presente en los nanovehículos sintéticos en una cantidad sobresaturada estable y, opcionalmente, en donde los nanovehículos sintéticos son inicialmente esterilizables por filtración.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde:

i) la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor que 50% en peso;

ii) la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor que 45% en peso;

iii) la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor que 40% en peso;

10 iv) la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor que 35% en peso;

v) la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor que 30% en peso;

vi) la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor que 25% en peso;

vii) la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor que 20% en peso;

viii) la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor que 15% en peso; o

15 ix) la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es menor que 10% en peso; o

ix) la rapamicina está presente en una cantidad sobresaturada estable que es mayor que 7% en peso.

3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el material vehículo de poliéster hidrófobo en los nanovehículos sintéticos es 5-95% en peso de material vehículo de poliéster hidrófobo/sólidos totales, preferiblemente en donde la cantidad de material vehículo de poliéster hidrófobo en los nanovehículos sintéticos es 60-95% en peso de material vehículo de poliéster hidrófobo/sólidos totales.

4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición es esterilizable por filtración inicialmente a través de un filtro de 0,22 µm.

5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la media de una distribución de tamaños de partículas obtenida usando la dispersión dinámica de luz de los nanovehículos sintéticos es un diámetro mayor que 120 nm, preferiblemente en donde el diámetro es mayor que 150 nm.

6. La composición de la reivindicación 5, en donde el diámetro es mayor que 200 nm.

7. La composición de la reivindicación 6, en donde el diámetro es mayor que 250 nm.

8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde el diámetro es menor que 300 nm.

30 9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en donde el diámetro es menor que 250 nm.

10. La composición de la reivindicación 5, en donde el diámetro es menor que 200 nm.

11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la rapamicina está encapsulada en los nanovehículos sintéticos.

12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:

35 i) la composición comprende además un antígeno; o

ii) la composición comprende además un antígeno y en donde el antígeno se mezcla con los nanovehículos sintéticos en la composición.

13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los nanovehículos sintéticos comprenden además un tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10.

15. La composición de la reivindicación 14, en donde el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 está encapsulado en los nanovehículos sintéticos, presente en la superficie de los nanovehículos sintéticos o ambos.
16. Un método para producir nanovehículos sintéticos que comprenden un material vehículo de poliéster hidrófobo y rapamicina que comprende:
- 5 obtener o proporcionar el material vehículo de poliéster hidrófobo,
 obtener o proporcionar rapamicina en una cantidad que supera el límite de saturación de la rapamicina,
 combinar el material vehículo de poliéster hidrófobo y la rapamicina, y
 estabilizar la rapamicina.
- 10 17. El método de la reivindicación 16, en donde la rapamicina se estabiliza por adición de un tensioactivo no iónico con valores de HLB menores o iguales a 10.
18. El método de la reivindicación 17 o la composición de las reivindicaciones 14 o 15, en donde:
- i) el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 comprende un éster de sorbitán, alcohol graso, éster de ácido graso, alcohol graso etoxilado, poloxámero o un ácido graso;
- 15 ii) el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 comprende un éster de sorbitán, alcohol graso, éster de ácido graso, alcohol graso etoxilado, poloxámero o un ácido graso, y en donde el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 comprende SPAN 40, SPAN 20, alcohol oleílico, alcohol estearílico, palmitato de isopropilo, monoestearato de glicerol, BRIJ 52, BRIJ 93, Pluronic P-123, Pluronic L-31, ácido palmítico, ácido dodecanoico, tripalmitato de glicerilo o trilinoleato de glicerilo; o
- iii) el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es SPAN 40.
- 20 19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16-18 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 14, 15 o 18, en donde:
- i) la cantidad de tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es $\geq 0,1$ pero $\leq 15\%$ en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/peso de material vehículo de poliéster hidrófobo;
- 25 ii) la cantidad de tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es ≥ 1 pero $\leq 13\%$ en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/peso de material vehículo de poliéster hidrófobo; o
- iii) la cantidad de tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es ≥ 1 pero $\leq 9\%$ en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/peso de material vehículo de poliéster hidrófobo.
- 30 20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16-19 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, 18 o 19, en donde:
- i) el material vehículo de poliéster hidrófobo comprende PLA, PLG, PLGA o policaprolactona; o
- ii) el material vehículo de poliéster hidrófobo comprende PLA, PLG, PLGA o policaprolactona y en donde el material vehículo de poliéster hidrófobo comprende además PLA-PEG, PLGA-PEG o PCL-PEG.
- 35 21. El método de la reivindicación 16, en donde la rapamicina se estabiliza con evaporación de disolvente rápida del material vehículo de poliéster hidrófobo y la rapamicina en presencia de un disolvente.
22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16-21, en donde el método comprende además determinar el límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo.
23. El método de la reivindicación 20, en donde el método comprende además determinar el límite de saturación de la rapamicina en el material vehículo de poliéster hidrófobo usando las fórmulas:
- 40 $Contenido\ de\ RAPA = V(0,008C_{PVA} + 0,072C_{pol})$ o $Contenido\ de\ RAPA = V(0,008C_{PVA} + 0,084C_{pol})$;
- en las que donde C_{PVA} es la concentración de masa de PVA, C_{pol} es la concentración de masa combinada de los polímeros y V es el volumen de la suspensión de nanovehículos al final de la evaporación.
24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16-23, en donde:
- i) la cantidad de rapamicina supera el límite de saturación en más de 1%;

- ii) la cantidad de rapamicina supera el límite de saturación en al menos 5%;
 - iii) la cantidad de rapamicina supera el límite de saturación en al menos 10%;
 - iv) la cantidad de rapamicina supera el límite de saturación en al menos 15%;
 - v) la cantidad de rapamicina supera el límite de saturación en al menos 20%;
 - 5 vi) la cantidad de rapamicina supera el límite de saturación en al menos 25%;
 - vii) la cantidad de rapamicina supera el límite de saturación en al menos 30%; o
 - viii) la cantidad de rapamicina supera el límite de saturación en al menos 35%.
25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16-24, en donde:
- i) el método comprende además filtrar la composición resultante; o
 - 10 ii) el método comprende además filtrar la composición resultante y en donde la filtración comprende filtrar a través de un filtro de 0,22 μm .
26. La composición producida por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 16-25.
27. Un kit que comprende:
- la composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 15 28. El kit de la reivindicación 27, en donde, cuando la composición no comprende antígeno, el kit comprende además un antígeno.
29. El kit de la reivindicación 28, en donde la composición y el antígeno están contenidos en recipientes separados o en donde la composición y el antígeno están contenidos en el mismo recipiente.
30. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 27-29, que comprende además instrucciones para usar.

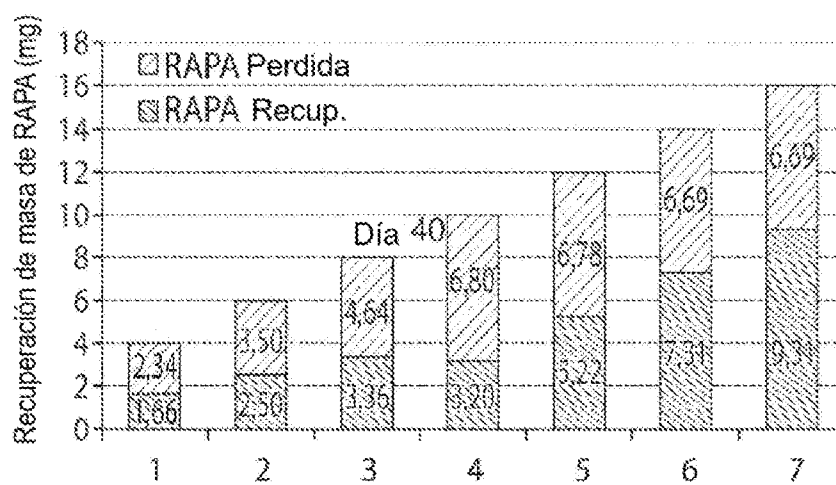


Fig. 1

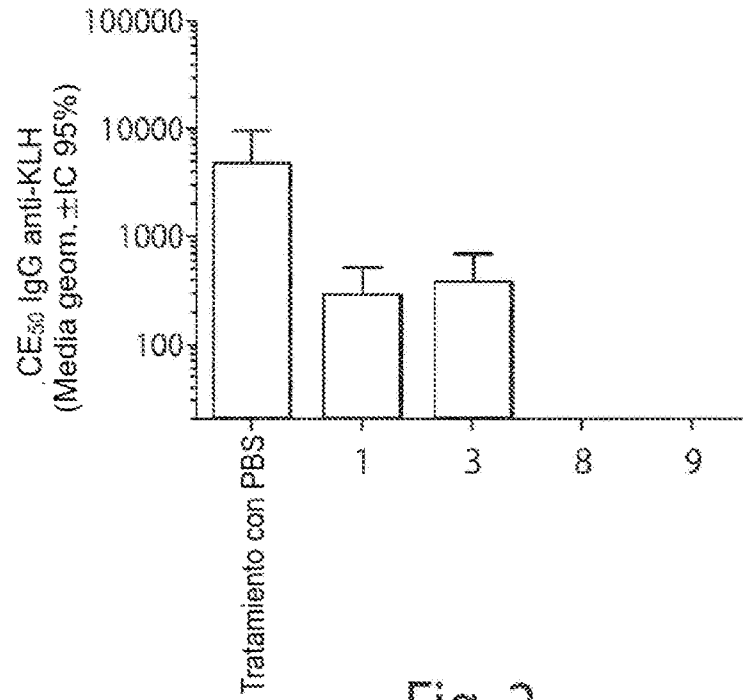


Fig. 2

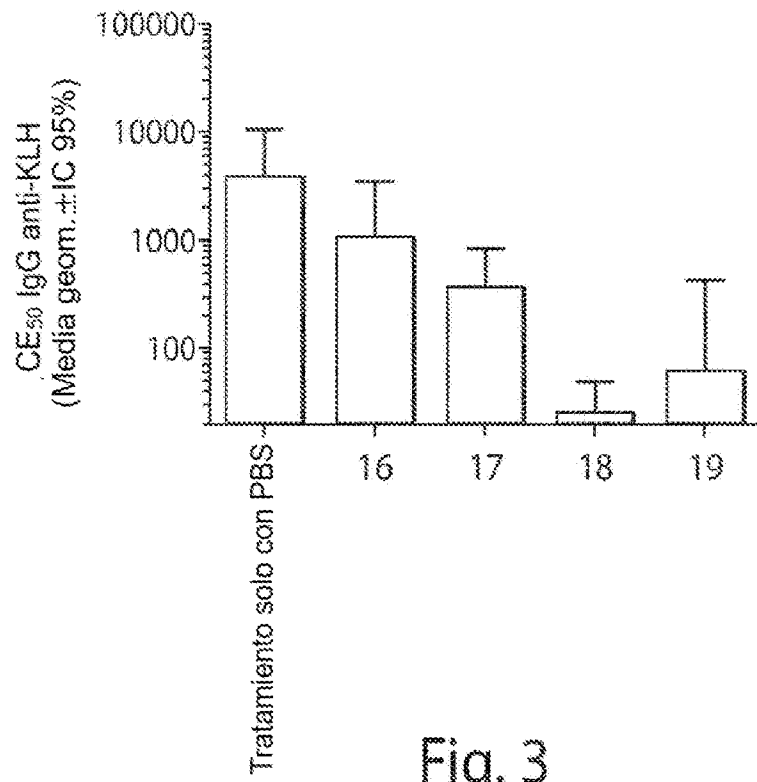


Fig. 3

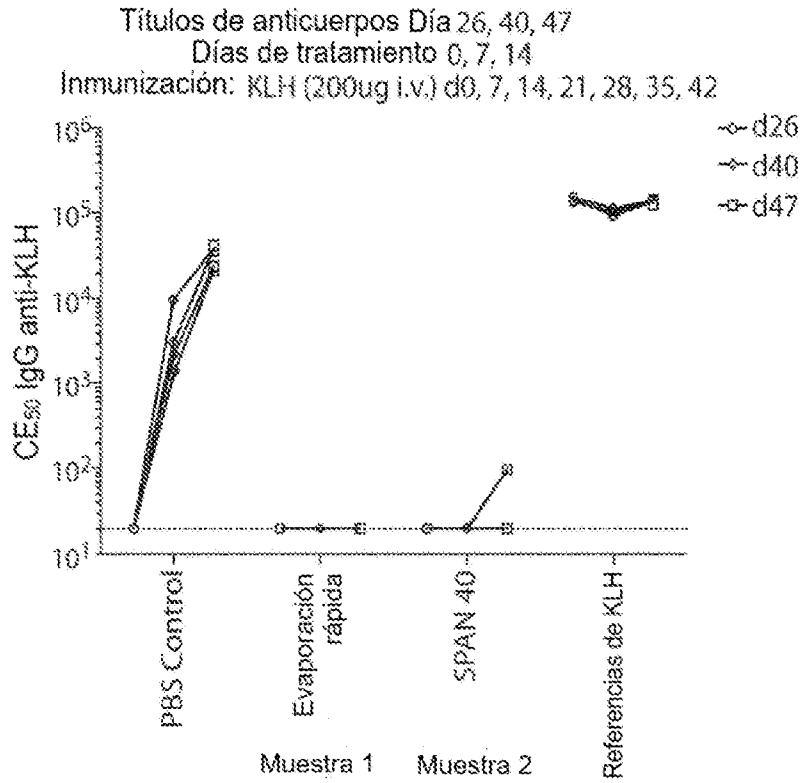


Fig. 4

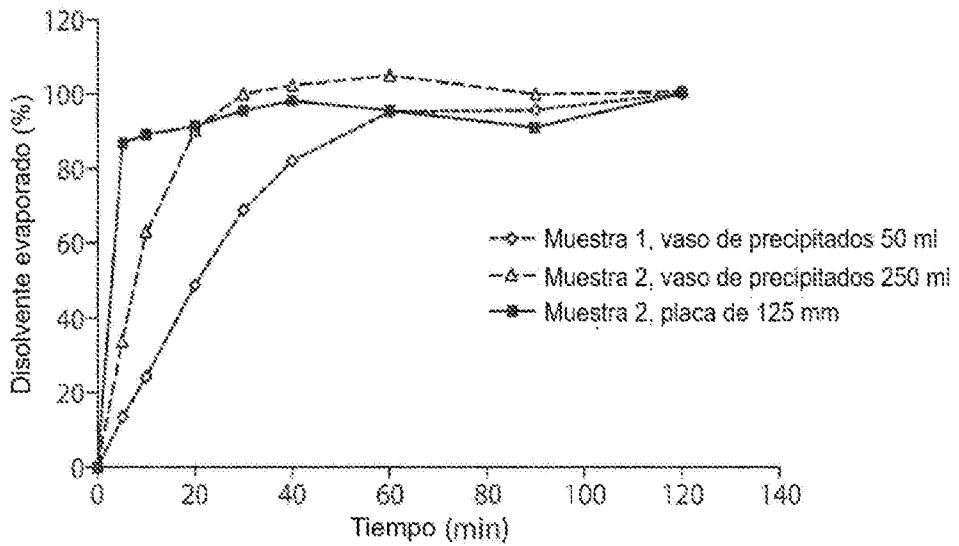
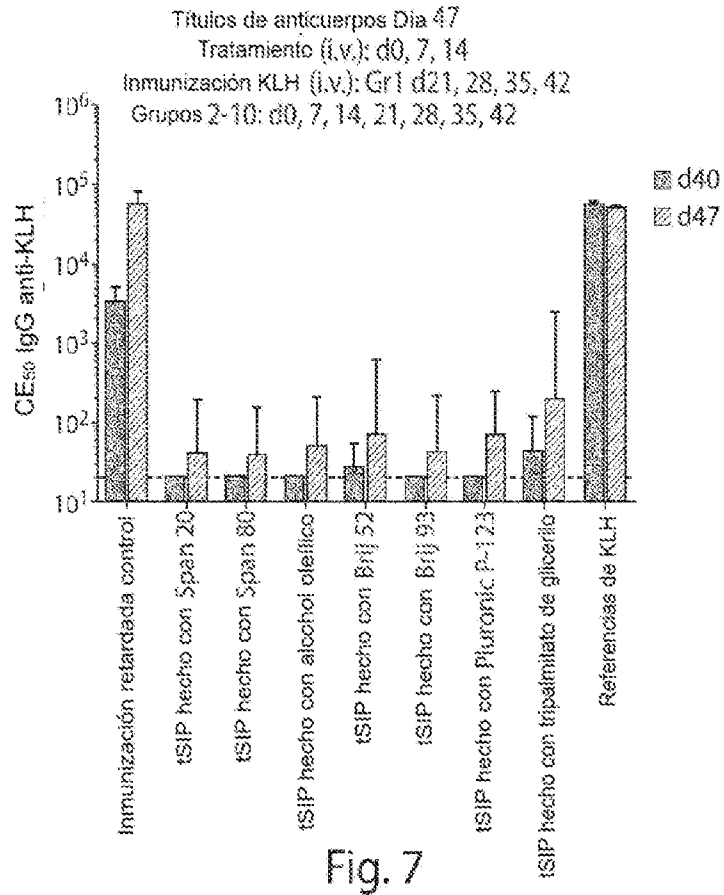
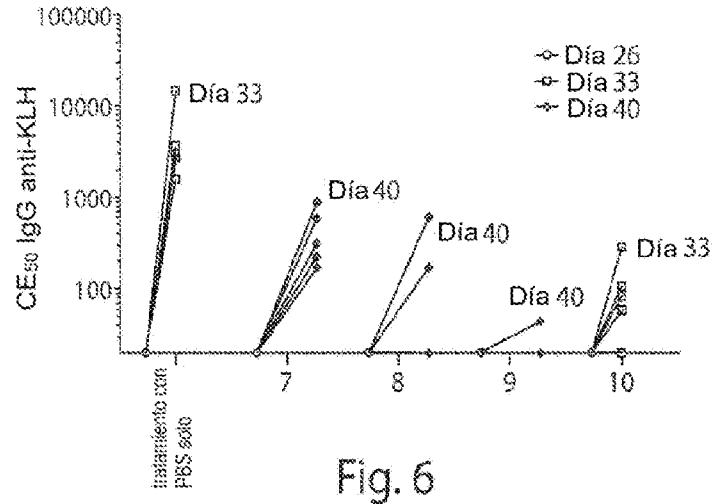


Fig. 5



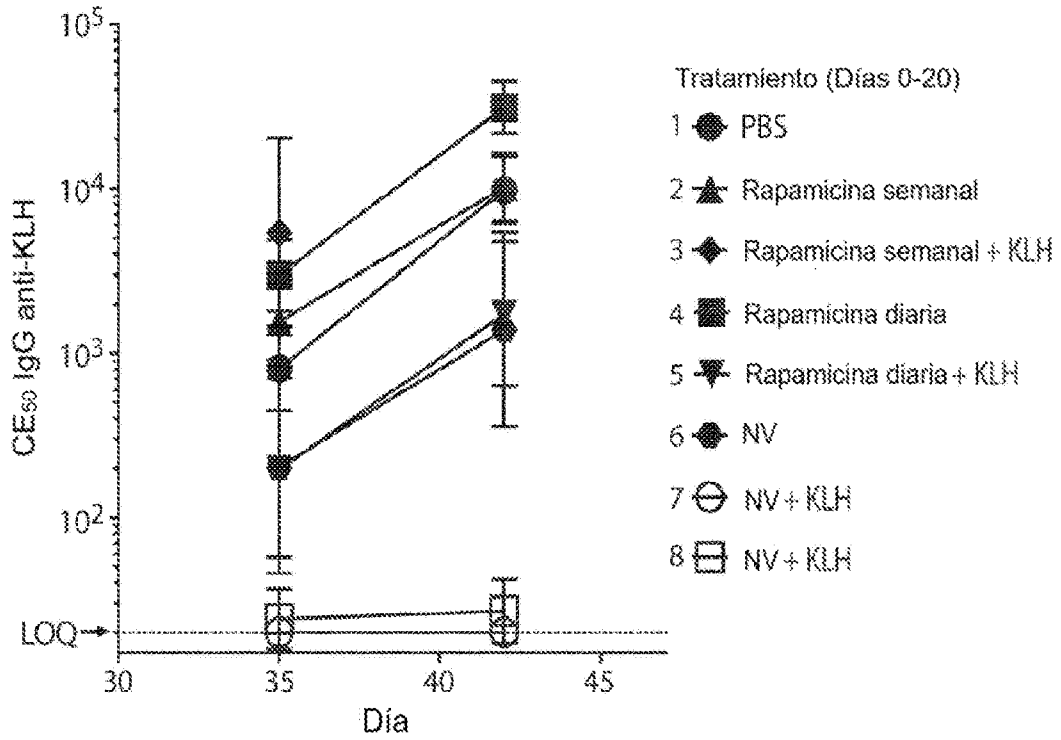


Fig. 8

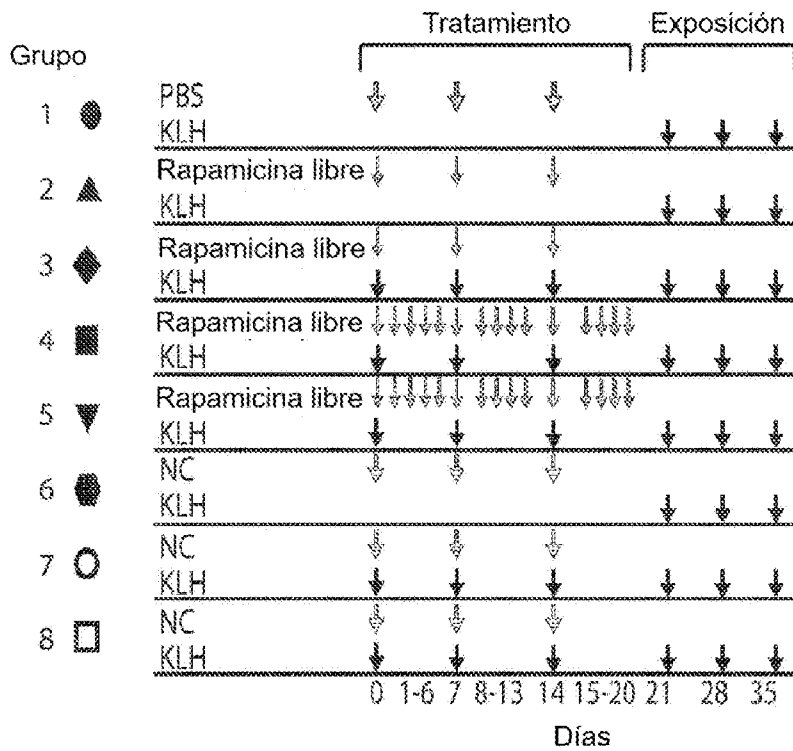


Fig. 9

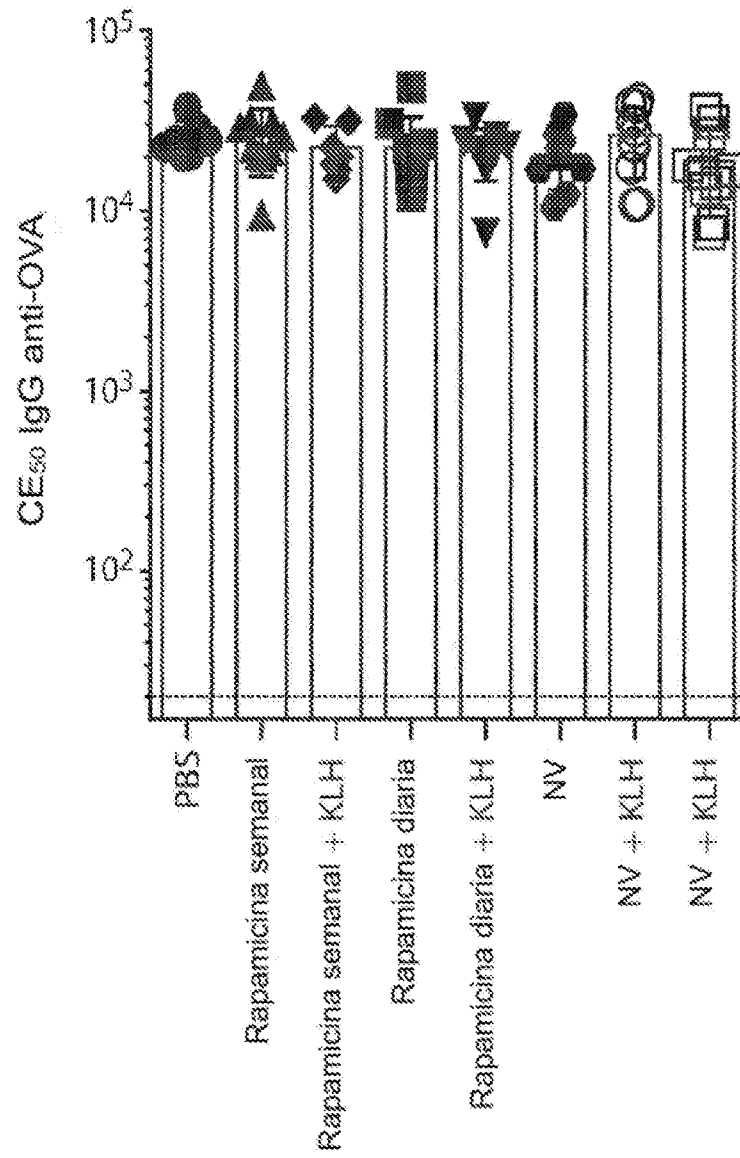


Fig. 10