

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 964 536**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51	(2006.01)	C07C 59/06	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)	C07C 59/08	(2006.01)
C08G 59/06	(2006.01)	A61K 47/62	(2007.01)
C08G 59/08	(2006.01)	A61K 47/69	(2007.01)
A61L 17/12	(2006.01)		
A61K 47/34	(2007.01)		
A61Q 17/00	(2006.01)		
A61K 31/4178	(2006.01)		
A61K 31/427	(2006.01)		
A61K 31/4745	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2015** **E 20166770 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2023** **EP 3721875**

54 Título: **Partículas recubiertas con poliglicerol hiperramificado y métodos para su preparación**

30 Prioridad:

09.05.2014 US 201461991025 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2024

73 Titular/es:

**YALE UNIVERSITY (100.0%)
2 Whitney Avenue
New Haven, CT 06510, US**

72 Inventor/es:

**DENG, YANG;
EDIRIWICKREMA, ASIRI y
SALTZMAN, WILLIAM M**

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 964 536 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

Partículas recubiertas con poliglicerol hiperramificado y métodos para su preparación

5 **Campo de la invención**

Esta invención se encuentra en el campo de partículas, tales como micropartículas y/o nanopartículas, recubiertas con poliglicerol hiperramificado, en las que el recubrimiento puede ajustarse para proporcionar propiedades de sigilo o adhesivas.

10

Antecedentes de la invención

A lo largo de la última década, se ha explorado la nanotecnología para mejorar la biodisponibilidad, reducir los efectos secundarios y potenciar el direccionamiento de agentes terapéuticos para una amplia variedad de enfermedades. Cuando se administran agentes de manera sistémica, normalmente el efecto terapéutico se reduce por un rápido aclaramiento mediante digestión enzimática, filtración renal y captación de sistema fagocítico mononuclear (MPS). Se ha investigado la encapsulación del agente en nanopartículas (NP) para modular estos factores, ya que las NP diseñadas por ingeniería de manera precisa pueden proteger el agente frente al rápido aclaramiento, pero también ayudarse a alcanzar el sitio diana de manera más eficiente y preferente. Los materiales ampliamente usados para producir NP incluyen polímeros, lípidos y algunos materiales inorgánicos. Sin embargo, la encapsulación de agentes terapéuticos en NP no garantiza una administración satisfactoria. De hecho, con frecuencia los materiales particulados se aclaran de manera más eficiente a partir de la sangre mediante captación de MPS, particularmente por células fagocíticas en el hígado, conduciendo a una rápida pérdida de NP y sus fármacos asociados a partir de la circulación, lo cual limita su capacidad para alcanzar dianas distintas del hígado.

25

Se conoce que la modificación en superficie de las NP con sustancias que previenen la adsorción no específica puede reducir su interacción con proteínas séricas y aumentar la circulación en sangre de las NP. Un recubrimiento de superficie ideal resiste a la adsorción no específica de proteínas y facilita la unión de otras funcionalidades, tales como ligandos de direccionamiento, a la partícula. Para resistir a la adsorción no específica en condiciones fisiológicas, los materiales para recubrimiento habitualmente presentan carga neutra, son hidrófilos y estables en entornos fisiológicos. Entre los pocos materiales usados para recubrimiento para NP, PEG se ha vuelto ubicuo. Las ventajas de PEG como recubrimiento de NP para la administración de fármacos incluyen su baja toxicidad, baja inmunogenicidad y resistencia a la adsorción no específica de biomoléculas. PEG ha dominado tanto el campo de los recubrimientos de superficie que pocas veces se investigan nuevos enfoques.

30

Sin embargo, PEG tiene limitaciones considerables. Por ejemplo, se sabe que las cadenas de PEG pueden adoptar una variedad de configuraciones en la superficie, dependiendo de la densidad en superficie de PEG, y con frecuencia es difícil alcanzar las densidades más eficaces.

Documentos relevantes de la técnica anterior son: Mugabe C., *et al.*, "In vivo evaluation of mucoadhesive nanoparticulate docetaxel for intravesical treatment of non-muscle-invasive bladder cancer", Clin. Cancer Res., vol. 17, n.º 9, págs. 2788-2798, 2011; Li M., *et al.*, "Methotrexate-conjugated and hyperbranched polyglycerol-grafted Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for targeted anticancer effects", Eur. J. of Pharm. Sci., vol. 48, págs. 111-120, 2013; Bao H., *et al.*, "OX26 modified hyperbranched polyglycerol-conjugated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: synthesis, characterization and evaluation of its brain delivery ability", J. Mater. Sci. Mater. Med., vol. 23, págs. 1891-1901, 2012; Gao X., *et al.*, "Synthesis and physicochemical characterization of a novel amphiphilic polylactic acid-hyperbranched polyglycerol conjugate for protein delivery", J. of Controlled Release, vol. 140, págs. 141-147, 2009; y el documento WO2012/156094A1.

Existe una necesidad de partículas con propiedades de sigilo.

Por tanto, un objetivo de la invención es proporcionar partículas con propiedades de sigilo.

Sumario de la invención

55

En el presente documento se describen partículas de núcleo-cubierta, tales como micropartículas y nanopartículas, y métodos de preparación y uso. El núcleo está formado por, o contiene, un biodegradable que es más hidrófobo que el poliglicerol hiperramificado y que está unido de manera covalente al poliglicerol hiperramificado.

La cubierta está formada por, o contiene, poliglicerol hiperramificado (HPG). Tras el autoensamblaje, se forman partículas en las que el uno o más polímeros biodegradables hidrófobos forman el núcleo y el HPG forma un recubrimiento sobre la partícula.

Los recubrimientos de HPG sin modificar confieren propiedades de sigilo a las partículas que resisten a la absorción de proteínas no específica y aumentan la circulación en la sangre.

65

Las partículas contienen un agente anticancerígeno. El agente anticancerígeno puede estar asociado de manera covalente o no covalente con las partículas. El agente anticancerígeno puede estar encapsulado dentro de la partícula, por ejemplo, dispersado dentro del núcleo; asociado de manera no covalente con la superficie de las partículas, asociado de manera covalente con la superficie de las partículas, o combinaciones de los mismos.

5

Las partículas son útiles en métodos para el tratamiento de cáncer.

Breve descripción de los dibujos

10 La figura 1 es un esquema que muestra la síntesis de nanopartículas sigilosas y nanopartículas pegajosas.

Las figuras 2A, 2B, 2C y 2D son gráficos que muestran la frecuencia (%) en función del tamaño de partícula para nanopartículas de PLA-HPG.

15 La figura 3 es un gráfico que muestra la liberación de fármaco (%) en función del tiempo (horas) para nanopartículas de PLA-HPG/camptotecina (CPT) y PLA-PEG/CPT.

La figura 4A es un gráfico que muestra la viabilidad celular (%) en función de la concentración de camptotecina (CPT) (μM) para CPT libre, nanopartículas de PLA-HPG/CPT y nanopartículas de PLA-PEG/CPT. La figura 4B es un gráfico que muestra la viabilidad celular (%) en función de la concentración nanopartículas (NP) (mg/ml) para nanopartículas de PLA-HPG y nanopartículas de PLA-PEG.

20

La figura 5 es un gráfico que muestra la retención de colorante (%) de nanopartículas de PLA-HPG y de PLA-PEG en función del tiempo de incubación en PBS.

25

La figura 6A es un gráfico que muestra la dosis en sangre (%) en función del tiempo (horas) para nanopartículas de PLA-HPG y de PLA-PEG. La figura 6B es un gráfico que muestra la dosis en sangre (%) en función del tiempo (horas) para nanopartículas de PLA-HPG y de PLA-PEG. Las figuras 6C y 6D son gráficos que muestran la dosis de NP de PLA-HPG o de PLA-PEG por gramo de tejido (%) en función del tejido a las 12 horas (figura 6C) y 24 horas (figura 6D). Las figuras 6E y 6F son gráficos que muestran la dosis de NP de PLA-HPG o de PLA-PEG por órgano (%) en función del órgano a las 12 horas (figura 6E) y 24 horas (figura 6F).

30

La figura 7A es un gráfico que muestra el volumen tumoral (mm^3) en función del tiempo tras la inoculación de tumor (días) para nanopartículas de PLA-HPG, PBS, nanopartículas de PLA-PEG/CPT, nanopartículas de PLA-HPG/CPT y CPT libre. La figura 7B es un gráfico que muestra el peso de ratones (gramos) en función del tiempo tras la inoculación de tumor (días) para nanopartículas de PLA-HPG, PBS, nanopartículas de PLA-PEG/CPT, nanopartículas de PLA-HPG/CPT y CPT libre.

35

La figura 8 es un gráfico que muestra el porcentaje de dosis en sangre (%) en función del tiempo (horas) para nanopartículas de PLA-HPG (PH), PLA-PEG (PP), PLA-HPG_{ALD} (PA) y PLA-HPG_{Revertido} (NP de PLA-HPG revertidas a partir de NP de PLA-HPG_{ALD}) (PR).

40

La figura 9A es un gráfico que muestra el número de grupos aldehído/ nm^2 en NP sigilosas en función del tiempo de incubación con NaIO_4 . Los datos se muestran como media $\pm$ DE ($n = 4$). La figura 9B es un gráfico que muestra la inmovilización en superficie de NP de PLA-HPG cargadas con DiD tratadas con NaIO_4 durante diferentes periodos de tiempo en portaobjetos recubiertos con lisina. Los datos se muestran como media $\pm$ DE ($n = 4$). La figura 9C es un gráfico de fluorescencia relativa (%) obtenida a partir de secciones de cordón umbilical incubadas con NP de PLA-HPG_{ALD} y de PLA-HPG cargadas con DiD a 1 mg/ml en el lado de luz de la vena umbilical durante 2 horas en tampón de Ringer a 37°C . Se cuantificó la fluorescencia y se normalizó con respecto a la fluorescencia promedio de PLA-HPG_{ALD} en la vena umbilical. Los datos se muestran como media $\pm$ DE ($n = 6$).

45

50

La figura 10A es un diagrama de NP de PLA-HPG_{ALD} adheridas a la superficie de tejidos abdominales y NP de PLA-HPG difundidas hasta la cavidad abdominal y extraídas mediante drenaje linfático. La figura 10B es un diagrama de células tumorales metastatizadas unidas a la superficie de tejidos abdominales. La figura 10C es un diagrama que muestra que el crecimiento de células tumorales se suprime mediante NP de PLA-HPG_{ALD}/EB en los tejidos abdominales.

55

La figura 11A es un gráfico de la liberación de fármaco en (%) a partir de NP de EB/PLA-HPG_{ALD} (EB/BNP) y NP de EB/PLA-HPG (EB/NNP) a lo largo del tiempo. Los datos se muestran como media $\pm$ DE ($n=4$). La figura 11B es un gráfico de la viabilidad celular (%) de células de USPC tras la incubación con EB libre, NP de EB/PLA-HPG (EB/NNP) y NP de EB/PLA-HPG_{ALD} (EB/BNP) durante 3 días. Los datos se muestran como media $\pm$ DE ($n=8$). La figura 11C es un gráfico de la viabilidad celular (%) de células de USPC tras la incubación con NP de PLA-HPG_{ALD} vacías (BNP) y NP de PLA-HPG vacías (NNP) durante 3 días. Los datos se muestran como media $\pm$ DE ($n=8$). La figura 11D es un gráfico de la viabilidad celular (%) de células Hela y HUVEC tras la incubación con NP de PLA-HPG_{ALD} vacías (BNP) y NP de PLA-HPG vacías (NNP) durante 3 días. Los datos se muestran como media $\pm$ DE ($n=8$). La figura 11E es un gráfico de la viabilidad celular (%) de múltiples líneas celulares tras la incubación con NP

60

65

de PLA-HPG_{ALD} vacías (BNP) y NP de PLA-HPG vacías (NNP) durante 3 días. Los datos se muestran como media $\pm$ DE (n=8).

La figura 12 es un gráfico de la densidad de superficie en porcentaje (%) de células de USPC unidas a portaobjetos recubiertos con NP de EB/PLA-HPG_{ALD} (EB/BNP), NP de PLA-HPG_{ALD} (BNP), NP de EB/PLA-HPG (EB/NNP) o PBS (control). La densidad de superficie de células se normalizó con respecto al control de PBS. Los datos se muestran como media $\pm$ DE (n=3).

La figura 13 es una curva de supervivencia de Kaplan Meier de ratones que portan tumores de USPC intraperitoneales y tratados con inyección intraperitoneal de PBS (1), NP de PLA-HPG_{ALD} en PBS (BNP, (2)), EB libre (3), NP de EB/PLA-HPG en PBS (EB/NNP, (4)) y NP de EB/PLA-HPG_{ALD} en PBS (EB/BNP, (5)).

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

“Cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de fármaco eficaz para aliviar, retrasar la aparición de, o prevenir uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno.

Los términos “tratar” o “prevenir”, tal como se usan en el presente documento, pueden incluir prevenir que se produzca una enfermedad, trastorno o estado condición en un animal que puede tener predisposición a la enfermedad, trastorno y/o estado pero aún no se le ha diagnosticado que lo tiene; inhibir la enfermedad, trastorno o estado, por ejemplo, impedir su progresión; y aliviar la enfermedad, trastorno o estado, por ejemplo, provocar la regresión de la enfermedad, trastorno y/o estado. Tratar la enfermedad, trastorno o estado puede incluir mejorar al menos un síntoma de la enfermedad, trastorno o estado particular, aunque la fisiopatología subyacente no se vea afectada, tal como tratar el dolor de un sujeto mediante administración de un agente analgésico aunque tal agente no trate la causa del dolor.

“Administración parenteral”, tal como se usa en el presente documento, significa administración mediante cualquier método distinto de a través del tubo digestivo o vías tópicas o regionales no invasivas. Por ejemplo, la administración parenteral puede incluir administración a un paciente por vía intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, intrapleural, intratraqueal, intramuscular, subcutánea, subconjuntival, mediante inyección y mediante infusión.

“Administración enteral”, tal como se usa en el presente documento, significa administración mediante absorción a través del tracto gastrointestinal. La administración enteral puede incluir administración oral y sublingual, administración gástrica o administración rectal.

“Administración pulmonar”, tal como se usa en el presente documento, significa administración en los pulmones mediante inhalación o administración endotraqueal. Tal como se usa en el presente documento, el término “inhalación” se refiere a la entrada de aire a los alveolos. La entrada de aire puede producirse a través de la boca o la nariz.

Los términos “agente bioactivo” y “agente activo”, tal como se usan de manera intercambiable en el presente documento, son un agente anticancerígeno.

“Biocompatible” y “biológicamente compatible”, tal como se usan en el presente documento, se refieren de manera general a materiales que, junto con cualquier metabolito o producto de degradación de los mismos, generalmente no son tóxicos para el receptor, y no provocan ningún efecto adverso significativo en el receptor. En términos generales, los materiales biocompatibles son materiales que no provocan una respuesta inflamatoria o inmunitaria significativa cuando se administran a un paciente.

El término “biodegradable” tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a un material que se degradará o erosionará en condiciones fisiológicas para dar unidades más pequeñas o especies químicas que son capaces de metabolizarse, eliminarse o excretarse por el sujeto. El tiempo de degradación depende de la composición y la morfología. Los tiempos de degradación pueden ser de desde horas hasta semanas.

El término “farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del criterio médico razonable, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones proporcionales a una razón de riesgo/beneficio razonable, según las directrices de agencias tales como la Food and Drug Administration. Un “portador farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a todos los componentes de una formulación farmacéutica que facilitan la administración de la composición *in vivo*. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, conservantes, aglutinantes, lubricantes, disgregantes, agentes de hinchamiento, cargas, estabilizantes y combinaciones de los mismos.

El término “peso molecular”, tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a la masa o la masa promedio de un material. Si es un polímero u oligómero, el peso molecular puede referirse a la longitud de cadena promedio relativa o a la masa de cadena relativa del polímero a granel. En la práctica, el peso molecular de polímeros y oligómeros puede estimarse o caracterizarse de diversas maneras incluyendo cromatografía de permeación en gel (GPC) o viscosimetría capilar. Los pesos moleculares de GPC se notifican como peso molecular promedio en peso (M_w) en contraposición al peso molecular promedio en número (M_n). La viscosimetría capilar proporciona estimaciones de peso molecular como la viscosidad inherente determinada a partir de una disolución de polímero diluida usando un conjunto particular de condiciones de concentración, temperatura y disolvente.

El término “molécula pequeña”, tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a una molécula orgánica que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2000 g/mol, menos de aproximadamente 1500 g/mol, menos de aproximadamente 1000 g/mol, menos de aproximadamente 800 g/mol o menos de aproximadamente 500 g/mol. Las moléculas pequeñas no son poliméricas y/o no son oligoméricas.

El término “copolímero” tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a un único material polimérico que está compuesto por dos o más monómeros diferentes. El copolímero puede tener cualquier forma, tal como al azar, en bloque, de injerto, etc. Los copolímeros pueden tener cualquier grupo terminal, incluyendo grupos terminales ácidos o con los centros reactivos ocupados.

“Hidrófilo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la propiedad de tener afinidad por el agua. Por ejemplo, los polímeros hidrófilos (o segmentos de polímeros hidrófilos) son polímeros (o segmentos de polímeros) que son principalmente solubles en disoluciones acuosas y/o tienen una tendencia a absorber agua. En general, cuanto más hidrófilo es un polímero, más tiende ese polímero a disolverse en, mezclarse con o humedecerse por agua.

“Hidrófobo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero biodegradable que es más hidrófobo que el poliglicerol hiperramificado.

El término “lipófilo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que tienen afinidad por lípidos.

El término “anfífilo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que combina propiedades hidrófilas y lipófilas (hidrófobas).

“Nanopartícula”, tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a una partícula que tiene un diámetro, tal como un diámetro promedio, de desde aproximadamente 10 nm hasta, pero sin incluir, aproximadamente 1 micrómetro, preferiblemente desde 100 nm hasta aproximadamente 1 micrómetro. Las partículas pueden tener cualquier forma. Las nanopartículas que tienen una forma esférica se denominan generalmente “nanoesferas”.

“Micropartícula”, tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a una partícula que tiene un diámetro, tal como un diámetro promedio, de desde aproximadamente 1 micrómetro hasta aproximadamente 100 micrómetros, preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 50 micrómetros, más preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 30 micrómetros, lo más preferiblemente desde aproximadamente 1 micrómetro hasta aproximadamente 10 micrómetros. Las micropartículas pueden tener cualquier forma. Las micropartículas que tienen una forma esférica se denominan generalmente “microesferas”.

“Tamaño medio de partícula” tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a la media estadística del tamaño de partícula (diámetro) de las partículas en una población de partículas. El diámetro de una partícula esencialmente esférica puede referirse al diámetro físico o hidrodinámico. El diámetro de una partícula no esférica puede referirse preferiblemente al diámetro hidrodinámico. Tal como se usa en el presente documento, el diámetro de una partícula no esférica puede referirse a la distancia lineal más grande entre dos puntos en la superficie de la partícula. El tamaño medio de partícula puede medirse usando métodos conocidos en la técnica, tales como dispersión de luz dinámica.

“Monodispersión” y “distribución de tamaño homogénea” se usan de manera intercambiable en el presente documento y describen una población de nanopartículas o micropartículas en la que todas las partículas tienen el mismo o casi el mismo tamaño. Tal como se usa en el presente documento, una distribución monodispersada se refiere a distribuciones de partículas en las que el 90 % o más de la distribución se encuentra dentro del 15 % de la mediana del tamaño de partícula, más preferiblemente dentro del 10 % de la mediana del tamaño de partícula, lo más preferiblemente dentro del 5 % de la mediana del tamaño de partícula.

“Farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, portadores, excipientes, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del criterio médico razonable, son adecuados para su uso contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación,

respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcionales a una razón de riesgo/beneficio razonable.

“Punto de ramificación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una porción de un conjugado de polímero-fármaco que sirve para conectar uno o más segmentos de polímeros hidrófilos a uno o más segmentos de polímeros hidrófobos.

“Implante”, tal como se usa de manera general en el presente documento, se refiere a un dispositivo o elemento polimérico que está estructurado, dimensionado o configurado de otro modo para implantarse, preferiblemente mediante inyección o implantación quirúrgica, en una región específica del cuerpo para proporcionar beneficio terapéutico liberando uno o más agentes a lo largo de un periodo de tiempo prolongado en el sitio de implantación.

II. Micropartículas y nanopartículas de núcleo-cubierta

A. Núcleo

El núcleo de las partículas está formado por, o contiene, uno o más polímeros biodegradables (por ejemplo homopolímero, copolímero, terpolímero, etc.) más hidrófobos que el poliglicerol hiperramificado, y unidos de manera covalente al poliglicerol hiperramificado.

A partir de las siguientes listas de polímeros, sólo los polímeros que se sabe que son biodegradables y más hidrófobos que poliglicerol hiperramificado corresponden a la definición de “polímero biodegradable” según las reivindicaciones. En general, polímeros sintéticos son: polihidroxiácidos tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), polilactida, poliglicolida, poli(lactida-co-glicolida), polianhídridos, poliortoésteres, poliamidas, policarbonatos, polialquilenos tales como polietileno y polipropileno, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, poli(óxidos de alquilenos) tales como poli(óxido de etileno), poli(tereftalatos de alquilenos) tales como poli(tereftalato de etileno), poli(alcoholes vinílicos), poli(vinil éteres), poli(ésteres vinílicos), poli(haluros de vinilo) tales como poli(cloruro de vinilo), polivinilpirrolidona, polisiloxanos, poli(alcoholes vinílicos), poli(acetato de vinilo), poliestireno, poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas derivatizadas tales como alquilcelulosa, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato-butilato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa, carboxietilcelulosa, triacetato de celulosa y sal de sodio de sulfato de celulosa (denominadas conjuntamente en el presente documento “celulosas sintéticas”), polímeros de ácido acrílico, ácido metacrílico o copolímeros o derivados de los mismos incluyendo ésteres, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo) y poli(acrilato de octadecilo) (denominados conjuntamente en el presente documento “poli(ácidos acrílicos)”), poli(ácido butírico), poli(ácido valérico) y poli(lactida-co-caprolactona), copolímeros y combinaciones de los mismos.

Los polímeros naturales son proteínas tales como albúmina, colágeno, gelatina y prolaminas, por ejemplo, zeína, y polisacáridos tales como alginato, derivados de celulosa y polihidroxialcanoatos, por ejemplo, polihidroxibutirato. La estabilidad *in vivo* de las micropartículas se ajusta durante la producción usando polímeros tales como poli(lactida-co-glicolida) copolimerizada con poliglicerol hiperramificado. El poliglicerol hiperramificado se expone en la superficie externa y aumenta el tiempo que circulan estos materiales debido a la hidrofilia de PEG.

En determinadas realizaciones, el polímero hidrófobo es un poliéster alifático. En realizaciones preferidas, el polímero hidrófobo es poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico).

Las partículas están diseñadas para liberar moléculas que van a encapsularse o unirse a lo largo de un periodo de días a semanas. Los factores que afectan a la duración de la liberación incluyen el pH del medio circundante (tasa de liberación superior a pH 5 e inferior debido a la hidrólisis catalizada por ácido de PLGA) y la composición de polímero. Los poliésteres alifáticos difieren en cuanto a la hidrofobia y eso, a su vez, afecta a la tasa de degradación. El poli(ácido láctico) (PLA) hidrófobo, el poli(ácido glicólico) PGA más hidrófilo y sus copolímeros, poli(lactida-co-glicolida) (PLGA) tienen diversas tasas de liberación. La tasa de degradación de estos polímeros, y con frecuencia la tasa de liberación de fármaco correspondiente, puede variar desde días (PGA) hasta meses (PLA) y se manipula fácilmente haciendo variar la razón de PLA con respecto a PGA.

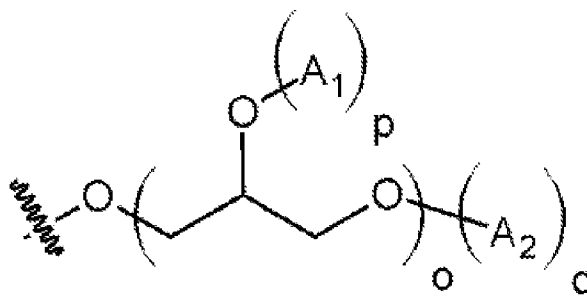
B. Cubierta

Las partículas descritas en el presente documento contienen una cubierta o recubrimiento que contiene poliglicerol hiperramificado (HPG).

El poliglicerol hiperramificado es un poliol altamente ramificado que contiene una estructura principal de poliéter. El poliglicerol hiperramificado puede prepararse usando técnicas conocidas en la técnica. Puede formarse a partir de la eterificación controlada de glicerol mediante polimerización de glicidol de multirramificación con apertura de anillo catiónica o aniónica. Por ejemplo, se hace reaccionar un iniciador que tiene múltiples reactivos con glicidol en

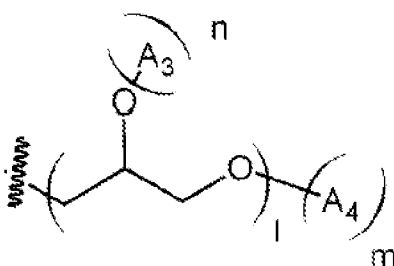
presencia de una base para formar poliglicerol hiperramificado (HPG). Los iniciadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, polioles, por ejemplo, trioles, tetraoles, pentaoles o más y poliaminas, por ejemplo, triaminas, tetraaminas, pentaaminas, etc. En una realización, el iniciador es 1,1,1-trihidroximetilpropano (THP).

- 5 Una fórmula para poliglicerol hiperramificado tal como se describe en el documento EP 2754684 es



Fórmula I

- 10 en la que o, p y q son independientemente números enteros de desde 1-100,
en la que A₁ y A₂ son independientemente

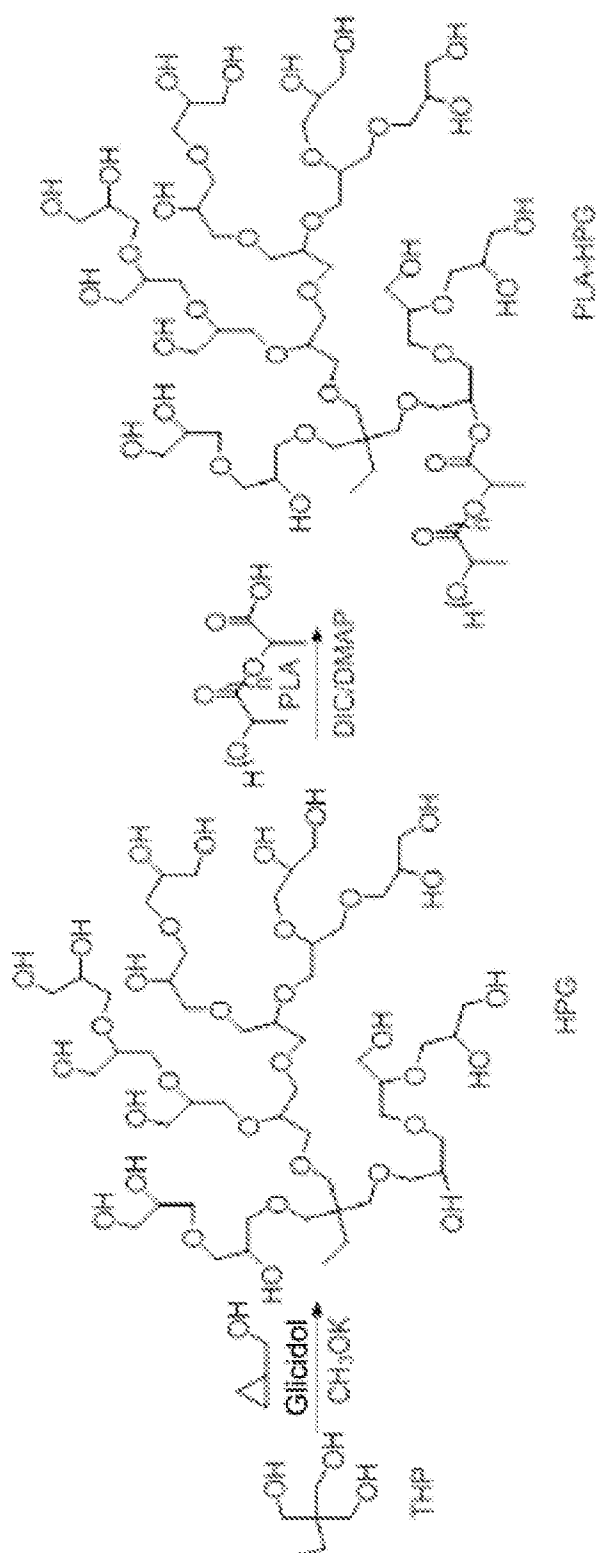


Fórmula II

- 15 en la que l, m y n son independientemente números enteros de desde 1-100;
20 en la que A₃ y A₄ se definen como A₁ y A₂, con la condición de que A₃ y A₄ son hidrógeno, n y m son cada uno 1 para residuos terminales.

Las propiedades de superficie del HPG no se modifican para proporcionar partículas sigilosas, es decir, partículas que no se aclaran por el MPS debido a la presencia de los grupos hidroxilo.

- 25 El peso molecular del HPG puede variar. Por ejemplo, en las realizaciones en las que el HPG está unido de manera covalente a los polímeros biodegradables hidrófobos que forman el núcleo, el peso molecular puede variar dependiendo del peso molecular y/o la hidrofobia de los materiales de núcleo. El peso molecular del HPG es generalmente de desde aproximadamente 1.000 hasta aproximadamente 1.000.000 Dalton, desde
30 aproximadamente 1.000 hasta aproximadamente 500.000 Dalton, desde aproximadamente 1.000 hasta aproximadamente 250.000 Dalton o desde aproximadamente 1.000 hasta aproximadamente 100.000 Dalton. En las realizaciones en las que el HPG está unido de manera covalente a los materiales de núcleo, el porcentaje en peso de HPG del copolímero es de desde aproximadamente el 1 % hasta aproximadamente el 50 %, tal como aproximadamente el 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 %.
- 35 El HPG está acoplado de manera covalente al polímero biodegradable que es más hidrófobo que el poliglicerol hiperramificado. Tras el autoensamblaje, se forman partículas que contienen un núcleo que contiene el polímero biodegradable hidrófobo y una cubierta o recubrimiento de HPG. A continuación se muestra HPG acoplado al polímero PLA:



C. Moléculas que van a encapsularse o unirse a la superficie de las partículas

- 5 Las partículas descritas en el presente documento comprenden un agente anticancerígeno encapsulado dentro de, y/o unido a, la superficie de las partículas.

2. Agente terapéutico, agentes de diagnóstico, agentes profilácticos y/o compuestos nutracéuticos

Los agentes que van a administrarse son agentes anticancerígenos (denominados en el presente documento "agentes quimioterápicos", incluyendo fármacos citotóxicos tales como doxorubicina, ciclosporina, mitomicina C, cisplatino y carboplatino, BCNU, 5FU, metotrexato, adriamicina, camptotecina, epotilonas A-F y taxol).

- 5 Los fármacos particularmente preferidos que van a administrarse incluyen agentes antiangiogénicos, agentes antiproliferativos y agentes quimioterápicos tales como rampamicina. Incorporados en micropartículas, estos agentes pueden usarse para tratar cáncer.

El agente anticancerígeno está encapsulado sobre, en o incorporado en las micropartículas o nanopartículas.

- 10 Los agentes anticancerígenos representativos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes (tales como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo, dacarbazina, lomustina, carmustina, procarbazona, clorambucilo e ifosfamida), antimetabolitos (tales como fluorouracilo (5-FU), gemcitabina, metotrexato, arabinósido citosina, fludarabina y floxuridina), antimitóticos (incluyendo taxanos tales como paclitaxel y decetaxel, epotilonas A-F y alcaloides de la vinca tales como vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina), antraciclinas (incluyendo doxorubicina, daunorubicina, valrubicina, idarubicina y epirubicina, así como actinomicinas tales como actinomicina D), antibióticos citotóxicos (incluyendo mitomicina, plicamicina y bleomicina), inhibidores de la topoisomerasa (incluyendo camptotecinas tales como camptotecina, irinotecán y topotecán, así como derivados de epipodofilotoxinas tales como amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido y tenipósido) y combinaciones de los mismos. Otros agentes anticancerígenos adecuados incluyen inhibidores de la angiogénesis incluyendo anticuerpos frente al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tales como bevacizumab (AVASTIN®), otros compuestos anti-VEGF; talidomida (THALOMID®) y derivados de la misma tales como lenalidomida (REVLIMID®); endostatina; angiostatina; inhibidores de receptor tirosina cinasa (RTK) tales como sunitinib (SUTENT®); inhibidores de tirosina cinasa tales como sorafenib (Nexavar®), erlotinib (Tarceva®), pazopanib, axitinib y lapatinib; inhibidores de factor de crecimiento transformante α o factor de crecimiento transformante β , y anticuerpos frente al receptor de factor de crecimiento epidérmico tales como panitumumab (VECTIBIX®) y cetuximab (ERBITUX®).
- 25

III. Composiciones farmacéuticas

- 30 Las partículas pueden formularse con portadores farmacéuticamente aceptables apropiados para dar composiciones farmacéuticas para su administración a un individuo que lo necesita. Las formulaciones pueden administrarse por vía enteral (por ejemplo, oral) o parenteral (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Otras vías de administración incluyen, pero no se limitan a, transdérmica.
- 35 Los compuestos pueden formularse para su administración parenteral. "Administración parenteral", tal como se usa en el presente documento, significa administración mediante cualquier método distinto de a través del tubo digestivo o vías tópicas o regionales no invasivas. Por ejemplo, la administración parenteral puede incluir la administración a un paciente por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intravítrea, intratumoral, intramuscular, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, intrapericárdica, intraumbilical, mediante inyección y mediante infusión.
- 40

Pueden prepararse formulaciones parenterales como composiciones acuosas usando técnicas conocidas en la técnica. Normalmente, tales composiciones pueden prepararse como formulaciones inyectables, por ejemplo, disoluciones o suspensiones; formas sólidas adecuadas para su uso para preparar disoluciones o suspensiones tras la adición de un medio de reconstitución antes de la inyección; emulsiones, tales como emulsiones de agua en aceite (w/o), emulsiones de aceite en agua (o/w), y microemulsiones de las mismas, liposomas o emulsomas.

45

El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, uno o más polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), aceites, tales como aceites vegetales (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de maíz, aceite de sésamo, etc.), y combinaciones de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y/o mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio.

50

- 55 Disoluciones y dispersiones de los compuestos activos como ácido o base libre o sales farmacológicamente aceptables de los mismos pueden prepararse en agua u otro disolvente o medio de dispersión mezclado de manera adecuada con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo, pero sin limitarse a, tensioactivos, dispersantes, emulsionantes, agentes de modificación del pH, agentes de modificación de la viscosidad y combinación de los mismos.
- 60

Los tensioactivos adecuados pueden ser agentes activos en superficie aniónicos, catiónicos, anfóteros o no iónicos. Los tensioactivos aniónicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los que contienen iones carboxilato, sulfonato y sulfato. Los ejemplos de tensioactivos aniónicos incluyen sodio, potasio, amonio de sulfonatos de alquilo de cadena larga y sulfonatos de alquil-arilo tales como dodecilmecenosulfonato de sodio; dialquilsulfosuccinatos de sodio, tales como dodecilmecenosulfonato de sodio; dialquilsulfosuccinatos de sodio, tales como bis-(2-etiltioxil)-sulfosuccinato de sodio; y alquilsulfatos tales como laurilsulfato de sodio. Los tensioactivos catiónicos incluyen, pero

65

no se limitan a, compuestos de amonio cuaternario tales como cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, bromuro de cetrimonio, cloruro de estearil-dimetilbencil-amonio, polioxietileno y amina de coco. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen monoestearato de etilenglicol, miristato de propilenglicol, monoestearato de glicerilo, estearato de glicerilo, oleato de poliglicerilo 4, acilato de sorbitano, acilato de sacarosa, laurato de PEG-150, monolaurato de PEG-400, monolaurato de polioxietileno, polisorbatos, octilfenil éter de polioxietileno, cetil éter de PEG-1000, tridecil éter de polioxietileno, butil éter de polipropilenglicol, Poloxamer® 401, estearoil-monoisopropanolamida y amida de sebo hidrogenada con polioxietileno. Los ejemplos de tensioactivos anfóteros incluyen N-dodecil-.beta.-alanina de sodio, N-lauril-.beta.-iminodipropionato de sodio, miristoanfoacetato, lauril-betaína y lauril-sulfobetaína.

La formulación puede contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. Los conservantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y timerosal. La formulación también puede contener un antioxidante para prevenir la degradación del/de los agente(s) activo(s).

Normalmente, la formulación se tampona a un pH de 3-8 para administración parenteral tras su reconstitución. Los tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, tampones de fosfato, tampones de acetato y tampones de citrato.

Con frecuencia se usan polímeros solubles en agua en formulaciones para administración parenteral. Los polímeros solubles en agua adecuados incluyen, pero no se limitan a, polivinilpirrolidona, dextrano, carboximetilcelulosa y polietilenglicol.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente o medio de dispersión apropiado con uno o más de los excipientes indicados anteriormente, según se requiera, seguido por filtración por esterilización. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás componentes requeridos de los indicados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado a vacío y liofilización que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo. Los polvos pueden prepararse de tal manera que las partículas son de naturaleza porosa, lo cual puede aumentar la disolución de las partículas. En la técnica se conocen métodos para producir partículas porosas.

Se preparan formulaciones enterales usando portadores farmacéuticamente aceptables. Tal como se usa de manera general en el presente documento, "portador" incluye, pero no se limita a, diluyentes, conservantes, aglutinantes, lubricantes, disgregantes, agentes de hinchamiento, cargas, estabilizantes y combinaciones de los mismos. Los polímeros usados en la forma de dosificación incluyen polímeros hidrófobos o hidrófilos y polímeros dependientes o independientes del pH. Los polímeros hidrófobos e hidrófilos preferidos incluyen, pero no se limitan a, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, etilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), poli(acetato de vinilo) y resinas de intercambio iónico.

El portador también incluye todos los componentes de la composición de recubrimiento que puede incluir plastificantes, pigmentos, colorantes, agentes estabilizantes y deslizantes. Pueden prepararse formulaciones usando uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo diluyentes, conservantes, aglutinantes, lubricantes, disgregantes, agentes de hinchamiento, cargas, estabilizantes y combinaciones de los mismos.

Pueden prepararse formulaciones de dosificación de liberación controlada tal como se describe en referencias convencionales tales como "Pharmaceutical dosage form tablets", eds. Liberman *et al.* (Nueva York, Marcel Dekker, Inc., 1989), "Remington-The science and practice of pharmacy", 20ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, y "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems", 6ª edición, Ansel *et al.*, (Media, PA: Williams and Wilkins, 1995). Estas referencias proporcionan información sobre excipientes, materiales, equipos y procedimientos para preparar comprimidos y cápsulas y formas de dosificación de liberación retardada de comprimidos, cápsulas y gránulos. Estas referencias proporcionan información sobre portadores, materiales, equipos y procedimientos para preparar comprimidos y cápsulas y formas de dosificación de liberación retardada de comprimidos, cápsulas y gránulos.

Se usan estabilizantes para inhibir o retardar reacciones de descomposición de fármaco que incluyen, a modo de ejemplo, reacciones oxidativas. Los estabilizantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes, hidroxitolueno butilado (BHT); ácido ascórbico, sus sales y ésteres; vitamina E, tocoferol y sus sales; sulfitos tales como metabisulfito de sodio; cisteína y sus derivados; ácido cítrico; galato de propilo e hidroxianisol butilado (BHA).

IV. Métodos de preparación de partículas

A. Poliglicerol hiperramificado (HPG)

Puede prepararse poliglicerol hiperramificado usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se hace reaccionar un iniciador que tiene múltiples sitios reactivos con glicidol en presencia de una base para formar poliglicerol hiperramificado (HPG). Los iniciadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, polioles, por ejemplo, trioles, tetraoles, pentaoles o más y poliaminas, por ejemplo, triaminas, tetraaminas, pentaaminas, etc. En una realización, el iniciador es 1,1,1-trihidroximetilpropano (THP).

B. Conjugados de polímero-RPG

Poliglicerol hiperramificado (HPG) se une de manera covalente a un polímero biodegradable, que es más hidrófobo que HPG, y que forma el núcleo de las partículas usando metodologías conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede acoplarse HPG de manera covalente a un polímero que tiene grupos ácido carboxílico, tales como PLA, PGA o PLGA, usando DIC/DMPAP.

Las partículas recubiertas con HPG previenen la adsorción no específica de proteínas séricas y aumentan la circulación en sangre de las partículas. Tales partículas se denominan partículas sigilosas.

C. Partículas

En la técnica se conocen métodos de preparación de partículas poliméricas. Las técnicas de microencapsulación comunes incluyen, pero no se limitan a, secado por pulverización, polimerización interfacial, encapsulación por fusión en caliente, encapsulación por separación de fases (microencapsulación por emulsión espontánea, microencapsulación por evaporación de disolvente y microencapsulación por eliminación de disolvente), coacervación, formación de microesferas a baja temperatura y nanoencapsulación por inversión de fase (PIN). A continuación se presenta un breve resumen de estos métodos.

En algunas realizaciones, las partículas se preparan usando una técnica basada en emulsión. En realizaciones particulares, las partículas se preparan usando una técnica de evaporación de disolvente de doble emulsión. Por ejemplo, se disuelven el material anfífilo y el material catiónico hidrófobo en un disolvente orgánico adecuado, tal como cloruro de metileno o diclorometano (DCM), con o sin un agente terapéutico. Se reconstituye el ARNip en agua purificada, tal como agua de calidad para biología molecular Hypure™ (Hyclone Laboratories, Inc., Logan, Utah). Se añade la disolución de ARNip gota a gota a la disolución del material anfífilo y el material catiónico hidrófobo y se emulsiona para formar una primera emulsión. Se añade la emulsión a una disolución acuosa de tensioactivo, tal como PVA, para formar una doble emulsión. Se añade la emulsión final a agua y se agita durante un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, 3 horas) para permitir que el disolvente orgánico se evapore y las partículas se endurezcan. Se retiran el disolvente orgánico residual y/o las moléculas no encapsuladas mediante lavado. A continuación se describen otros procedimientos basados en emulsión de emulsión.

1. Microencapsulación por separación de fases

En las técnicas de microencapsulación por separación de fases, se agita una disolución de polímero, opcionalmente en presencia de uno o más agentes activos que van a encapsularse. Mientras se sigue suspendiendo de manera uniforme el material mediante agitación, se añade lentamente un no disolvente para el polímero a la disolución para reducir la solubilidad del polímero. Dependiendo de la solubilidad del polímero en el disolvente y el no disolvente, el polímero o bien precipita o bien experimenta separación de fases para dar una fase rica en polímero y una pobre en polímero. En condiciones apropiadas, el polímero en la fase rica en polímero migrará a la interfase con la fase continua, encapsulando el/los agente(s) activo(s) en una gotita con una cubierta de polímero exterior.

2. Microencapsulación por emulsión espontánea

La emulsificación espontánea implica solidificar gotitas de polímero líquido emulsionado formadas anteriormente mediante cambio de temperatura, evaporación de disolvente o adición de agentes de reticulación químicos. Las propiedades físicas y químicas del encapsulante, así como las propiedades del uno o más agentes activos opcionalmente incorporados en las partículas nacientes, dictan los métodos de encapsulación adecuados. Factores tales como hidrofobia, peso molecular, estabilidad química y estabilidad térmica afectan a la encapsulación.

3. Microencapsulación por evaporación de disolvente

Métodos para formar microesferas usando técnicas de evaporación de disolvente se describen en E. Mathiowitz *et al.*, *J. Scanning Microscopy*, 4:329 (1990); L.R. Beck *et al.*, *Fertil. Steril.*, 31:545 (1979); L.R. Beck *et al.*, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 135(3) (1979); S. Benita *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 73: 1721 (1984); y la patente estadounidense n.º 3.960.757 a nombre de Morishita *et al.* Se disuelve el polímero en un disolvente orgánico volátil, tal como cloruro de metileno. Opcionalmente se añade el agente anticancerígeno que va a incorporarse a la disolución y se suspende la mezcla en una disolución acuosa que contiene un agente activo en superficie tal como poli(alcohol vinílico). Se agita la emulsión resultante hasta que la mayor parte del disolvente orgánico se ha evaporado, dejando micropartículas/nanopartículas sólidas. Este método es útil para polímeros relativamente estables tales como poliésteres y poliestireno.

4. Nanoencapsulación por inversión de fase (PIN)

También pueden formarse nanopartículas usando el método de nanoencapsulación por inversión de fases (PIN), en el que se disuelve un polímero en un disolvente "bueno", se mezclan o disuelven partículas finas de una sustancia que va a incorporarse, tal como un fármaco, en la disolución de polímero y se vierte la mezcla en un no disolvente fuerte para el polímero, para producir de manera espontánea, en condiciones favorables, microesferas poliméricas, en las que o bien el polímero está recubierto con las partículas o bien las partículas están dispersadas en el polímero. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.143.211 a nombre de Mathiowitz, *et al.* El método puede usarse para producir poblaciones monodispersadas de nanopartículas y micropartículas en un amplio intervalo de tamaños, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 100 nanómetros a aproximadamente 10 micrómetros.

5. Microfluidos

Pueden prepararse nanopartículas usando dispositivos de microfluidos. Se mezcla un material polimérico con el agente anticancerígeno en un disolvente orgánico miscible con agua. El disolvente orgánico miscible con agua puede ser uno o más de los siguientes: acetona, etanol, metanol, alcohol isopropílico, acetonitrilo y dimetilsulfóxido (DMSO). Después se añade la disolución de mezcla resultante a una disolución acuosa para proporcionar una disolución de nanopartículas. Los péptidos o fluoróforos o fármacos seleccionados como diana pueden asociarse con la superficie de, encapsularse dentro de, rodearse por y/o distribuirse a través de la matriz polimérica de las partículas.

Propiedades de partículas

Las partículas pueden tener cualquier potencial zeta. Las partículas pueden tener un potencial zeta de desde -300 mV hasta +300 mV, de -100 mV a +100 mV, desde -50 mV hasta +50 mV, desde -40 mV hasta +40 mV, desde -30 mV hasta +30 mV, desde -20 mV hasta +20 mV, desde -10 mV hasta +10 mV o desde -5 mV hasta +5 mV. Las partículas pueden tener un potencial zeta negativo o positivo. En algunas realizaciones las partículas tienen un potencial zeta sustancialmente neutro, es decir que el potencial zeta es de aproximadamente 0 mV. En realizaciones preferidas, las partículas tienen un potencial zeta de aproximadamente -30 a aproximadamente 30 mV, preferiblemente desde aproximadamente -20 hasta aproximadamente 20 mV, más preferiblemente desde aproximadamente -10 hasta aproximadamente 10 mV.

Las partículas pueden tener cualquier diámetro. Las partículas pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 1000 micrómetros, aproximadamente 1 nm y aproximadamente 100 micrómetros, aproximadamente 1 nm y aproximadamente 10 micrómetros, aproximadamente 1 nm y aproximadamente 1000 nm, aproximadamente 1 nm y aproximadamente 500 nm, aproximadamente 1 nm y aproximadamente 250 nm o aproximadamente 1 nm y aproximadamente 100 nm. En realizaciones preferidas, la partícula es una nanopartícula que tiene un diámetro de desde aproximadamente 25 nm hasta aproximadamente 250 nm. En realizaciones más preferidas, las partículas son nanopartículas que tienen un diámetro de desde aproximadamente 180 nm hasta aproximadamente 250 nm, preferiblemente desde aproximadamente 180 nm hasta aproximadamente 230 nm. El tamaño de las partículas se basa normalmente en una población, en la que el 60, 70, 80, 85, 90 ó 95 % de la población tiene el intervalo de tamaño deseado.

La polidispersidad es de desde aproximadamente 0,05 hasta 0,30, preferiblemente desde aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 0,25, más preferiblemente desde aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 0,20, más preferiblemente desde aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 0,15, lo más preferiblemente desde aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 0,10.

V. Métodos de usar partículas

Las partículas descritas en el presente documento pueden usarse para la administración de un agente anticancerígeno. Las partículas son partículas "sigilosas", en las que los grupos hidroxilo en HPG aumentan la circulación en el torrente sanguíneo al resistir a la absorción de proteínas séricas no específica y posterior captación por el MPS.

A. Administración de fármacos

PEG se ha usado ampliamente como recubrimiento en biomateriales y sistemas de administración de fármacos. Se acepta habitualmente que las propiedades de PEG resultan de una combinación de su carga neutra, flexibilidad molecular e hidrofilia. El uso de PEG se ha vuelto tan dominante en el campo de la administración de fármacos particulados que pocas veces se examinan alternativas.

HPG es un polímero hidrófilo hiperramificado con una alta densidad de grupos hidroxilo en su superficie: es más hidrófilo que PEG y se ha demostrado que tiene una mejor compatibilidad y resistencia no específica a biomoléculas

que PEG en determinadas aplicaciones. HPG se conoce por tener una viscosidad intrínseca inferior a PEG lineal, lo cual disminuye la posibilidad de agregación de glóbulos rojos cuando está presente en la circulación.

5 Se ha explorado HPG en una variedad de entornos biomédicos, principalmente para recubrimientos sobre materiales implantados. Los ejemplos demuestran que HPG tiene propiedades sustancialmente mejoradas en comparación con PEG cuando se conjuga a NP y que estas propiedades resultan de su hidrofilia superior que conduce a un mejor efecto y más estabilidad en suspensión. Por tanto, las NP recubiertas con HPG deben ser más eficaces en medicina clínica que las NP recubiertas con PEG.

10 Determinadas propiedades del conjugado de PLA-HPG son importantes para los efectos observados. Dado que HPG de alto peso molecular tiene mejor resistencia de adsorción no específica a biomoléculas, los componentes de bajo peso molecular se retiraron del HPG sintetizado mediante precipitaciones en múltiples disolvente y diálisis.

15 Se seleccionó PLA como material de núcleo hidrófobo porque es biodegradable, tiene una larga historia de uso clínico y es el principal componente de un sistema de NP que está avanzando en ensayos clínicos. Para unir de manera covalente el PLA a HPG, el enfoque anterior fue funcionalizar en primer lugar el HPG con una amina y después conjugar el grupo carboxílico en PLA a la amina. Este enfoque es eficiente, pero no puede usarse para producir HPG como recubrimientos de superficie ya que cualquier amina que no reaccione con PLA conducirá a una carga positiva neta en la superficie de HPG neutra y reducirá la capacidad de HPG para resistir a la adsorción de otras moléculas en la superficie. Para evitar esto, el enfoque en los ejemplos usó una esterificación de una etapa entre PLA y HPG, que mantuvo el estado de carga neutra del HPG.

25 La circulación en sangre y biodistribución son métodos convencionales usados para examinar el efecto de superficie *in vivo*. Las NP recubiertas con determinados recubrimientos tienden a escapar del MPS y circular durante más tiempo en sangre. Aunque se sabe que los recubrimientos de PEG pueden potenciar significativamente la circulación en sangre de las NP y reducir la acumulación en el hígado, la mayor parte de las NP recubiertas con PEG inyectadas todavía se acumulan en el hígado. En cambio, el recubrimiento de HPG sobre NP de PLA produjo una acumulación de NP mucho menor en el hígado. Con diferentes marcadores, métodos de etiquetado y detección, el valor absoluto de la biodistribución de las NP varía. Esto hace que sea difícil comparar los datos con otras formulaciones de NP. Sin embargo, la razón de hígado con respecto a sangre de NP de PLA-HPG, aproximadamente 1/3 a las 12 h y aproximadamente 1 a las 24 h, es comparable a la de BIND-014, una formulación de NP de PLA-PEG en ensayos clínicos, que se optimizó a partir de más de 100 formulaciones de NP. Sorprendentemente, la razón de bazo con respecto a sangre de las NP de PLA-HPG, aproximadamente 2/3 a las 12 h y ~1 a las 24 h, es incluso menor que la de BIND-014.

35 Las nanopartículas se acumulan en tumores mediante el efecto de permeabilidad y retención potenciada (EPR), que resulta de vasculatura con fugas del tumor. Tanto las NP de PLA-HPG como las NP de PLA-PEG tienen un diámetro hidrodinámico de 100 nm. De manera notable, la acumulación en tumor de las NP de PLA-HPG es ~3 veces mayor que la acumulación de las NP de PLA-PEG. Esta acumulación en tumor potenciada de las NP de PLA-HPG con respecto a las NP de PLA-PEG puede deberse al tiempo de circulación en sangre potenciado, que se confiere por sus recubrimientos de superficie. La penetración de las NP de PLA-HPG se confirmó adicionalmente mediante inmunohistoquímica.

45 Para demostrar que las NP de PLA-HPG eran portadores mejorados para fármacos, se realizaron estudios terapéuticos de NP de PLA-HPG que tenían encapsulado en las mismas el fármaco de quimioterapia camptotecina (CPT) con ratones que portaban tumores de LLC subcutáneos. Se seleccionó CPT porque se sabe que es eficaz frente a una amplia variedad de tumores, pero está limitado en su uso clínico por una solubilidad muy baja y efectos secundarios. Las NP de PLA-HPG/CPT proporcionaron un tratamiento del tumor significativamente mejor que las NP de PLA-PEG/CPT. En la mayoría de los aspectos, las dos NP eran similares: Las NP de PLA-HPG y de PLA-PEG tenían un porcentaje en peso similar de recubrimiento de superficie; tanto las NP de PLA-HPG/CPT como las NP de PLA-PEG/CPT tenían citotoxicidad *in vitro* potenciada; las NP de PLA-HPG/CPT tenían un tamaño similar a las NP de PLA-PEG/CPT; las NP de PLA-HPG/CPT y de PLA-PEG/CPT mostraron perfiles de liberación *in vitro* similares de CPT. La diferencia más notable entre las dos formulaciones de NP es la presencia de HPG frente a PEG. Por tanto, se cree que la eficacia terapéutica mejorada de las NP de PLA-HPG/CPT se debe a la mayor estabilidad en emulsión, tiempo de circulación en sangre mejorado, biodistribución mejorada y penetración en tumor mejorada que resulta de HPG.

60 El tamaño submicrométrico de los materiales nanoparticulados ofrece claras ventajas con respecto a sistemas más grandes. En primer lugar, el pequeño tamaño les permite extravasar a través de vasos sanguíneos y tejido. Esto es especialmente importante para vasos de tumores, que con frecuencia están dilatados y perforados con un tamaño de poro promedio menor de un micrómetro, en comparación con tejido normal. En segundo lugar, las nanopartículas sólidas preparadas a partir de polímeros biodegradables y que encapsulan fármaco son ideales para la administración de fármacos intracelular sostenida, especialmente para fármacos cuyas dianas son citoplasmáticas. Un ejemplo de esta aplicación con nanopartículas cargadas con dexametasona administradas localmente a células de músculo liso vascular mostró una actividad antiproliferativa mayor y sostenida en comparación con fármaco libre, lo que indica una interacción más eficiente de los fármacos con receptores de glucocorticoides citoplasmáticos. La

carga de dosificación varía dependiendo de la naturaleza del encapsulante. Hasta el 80 % de la cantidad total inicial de agente que va a incorporarse puede encapsularse en las micropartículas.

Las micropartículas son útiles en la administración de agentes anticancerígenos, ya sea inyectados por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular, administrados al sistema nasal o pulmonar, administrados a una superficie mucosa (vaginal, rectal, bucal, sublingual) o encapsulados para administración oral. Tal como se indicó anteriormente, el término "micropartícula" incluye "nanopartículas" a menos que se mencione lo contrario. La dosificación se determina usando técnicas convencionales basándose en el agente anticancerígeno que va a administrarse y el método y la forma de administración. Las micropartículas pueden administrarse como un polvo seco, como una suspensión acuosa (en agua, solución salina, solución salina tamponada, etc.), en un hidrogel, organogel o liposoma, en cápsulas, comprimidos, trociscos u otro excipiente farmacéutico convencional.

2. Tratamiento de tumores

La administración pasiva también puede dirigirse a tumores. Los tumores agresivos desarrollan de manera inherente vasculatura con fugas con poros de 100 a 800 nm debido a la rápida formación de vasos que deben dar servicio al tumor de rápido crecimiento. Este defecto en la vasculatura acoplado con un mal drenaje linfático sirve para potenciar la permeación y retención de nanopartículas dentro de la región de tumor. Con frecuencia, esto se denomina el efecto de EPR. Este fenómeno es una forma de "direccionamiento pasivo". La base para la especificidad de tumor aumentada es la acumulación diferencial de nanopartículas cargadas con fármaco en tejido tumoral frente a células normales, lo cual resulta del tamaño de partícula en vez de la unión. Los tejidos normales contienen capilares con estrechas uniones que son menos permeables a las partículas de tamaño nanométrico. Por tanto, el direccionamiento pasivo puede dar como resultado aumentos en las concentraciones de fármaco en tumores sólidos de varias veces con respecto a las obtenidas con fármacos libres.

La administración pasiva también puede dirigirse a órganos linfoides del sistema inmunitario de mamífero, tal como vasos linfáticos y bazo. Estos órganos están finamente estructurados y especializados en la eliminación de invasores que han logrado entrar a líquidos de tejido. Las nanopartículas pueden penetrar fácilmente en vasos linfáticos aprovechando las paredes delgadas y la arquitectura perforada de los microvasos linfáticos. El direccionamiento pasivo al bazo es mediante un procedimiento de filtración. De hecho, el bazo filtra la sangre para eliminar partículas foráneas mayores de 200 nm. Esta función facilita el direccionamiento esplénico con nanopartículas que encapsulan fármaco para tratamientos eficaces contra varias enfermedades hematológicas.

Las formulaciones de nanopartículas tanto liposómicas como sólidas han recibido aprobación clínica para la administración de fármacos anticancerígenos. Las formulaciones liposómicas incluyen las de doxorubicina (DOXIL®/CAELYX®1 Y MYOCET®1) y daunorubicina (DAUNOSOME®1). El mecanismo de liberación de fármaco a partir de los liposomas no queda claro, pero se piensa que depende de la difusión del fármaco a partir del portador al interior del intersticio de tumor. Esto va seguido por la captación posterior del fármaco liberado por células tumorales. El mecanismo de liberación todavía no se entiende bien, lo cual dificulta aplicaciones avanzadas que impliquen la adición de ligandos activos para direccionamiento celular *in vivo*. Recientemente, la FDA aprobó ABRAXANE®, una formulación de nanopartículas de paclitaxel unido a albúmina como suspensión inyectable para el tratamiento de cáncer de mama metastásico. Además, otras terapias contra el cáncer basadas en nanopartículas sólidas se han aprobado para ensayos clínicos, por ejemplo se ha aprobado un ensayo clínico de fase 1 que evaluará la seguridad de la infusión en arterias hepáticas de REXIN-G™ (un sistema de vector de nanopartículas dirigidas con un gen de control del ciclo celular mutante patentado, es decir un gen anticancerígeno) como intervención para cáncer colorrectal.

Ejemplos

De los siguientes ejemplos, los únicos abarcados por la redacción de las reivindicaciones son los referentes a partículas que comprenden un agente anticancerígeno (camptotecina, epotilona B), en las que el poliglicerol hiperramificado está unido de manera covalente al polímero biodegradable más hidrófobo (PLA) y por lo demás no está modificado. Los demás ejemplos no quedan abarcados por la redacción de las reivindicaciones pero se considera que son útiles para entender la invención.

Materiales y métodos

Se obtuvo poli(ácido láctico) (Mw = 20,2 kDa, Mn = 12,4 kDa) de Lactel.

Se obtuvo H₂N-PEG(5000)-OCH₃ de Laysan.

Se obtuvieron dimetilformida anhidra, diclorometano, diisopropilcarboimida, dimetilaminopiridina, metóxido de potasio, camptotecina, poli(alcohol vinílico), paraformaldehído, TWEEN® 80 y 1,1,1-trihidroximetilpropano de Sigma-Aldrich.

Se obtuvieron éter seco anhidro, metanol, acetonitrilo y dimetilsulfóxido de J.T. Baker.

Se obtuvieron sal de 4-clorobencenosulfonato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindodicarbocianina (DiD) y tinción de DAPI de Invitrogen.

5 Se obtuvieron portaobjetos de microscopio Super frost de Thermo Scientific.

Se obtuvieron suero normal de burro y anticuerpo de conejo anti-CD31 de Abeam y se obtuvo el anticuerpo secundario de burro anti-conejo marcado con fluoróforo Alexa488 de Invitrogen.

10 Se obtuvo CellTiter blue de Promega.

Los tubos de microdiálisis fueron de Thermo Scientific.

12-Miristato y 13-acetato de forbol (PMA) era de Abeam.

15 Líneas celulares

Se obtuvo línea celular de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC) de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC) (Manassa, VA). Se mantuvieron células de LLC en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con el 10 % de suero bovino fetal (FBS) y el 1 % de penicilina-estreptomicina a 37 °C bajo una atmósfera humidificada con el 5 % de CO₂. Se mantuvieron U937 en RPMI1640 complementado con el 10 % de FBS. Se indujo la diferenciación de U937 para dar macrófagos mediante PMA (50 ng/ml).

25 Ejemplo 1. Síntesis de poliglicerol hiperramificado

Se sintetizó poliglicerol hiperramificado (HPG) mediante polimerización aniónica. En resumen, se añadieron 4,6 mmol de 1,1,1-trihidroxipropano (THP) a un matraz protegido por argón en un baño de aceite a 95 °C y se añadieron 1,5 mmol de KOCH₃. Se conectó el sistema a una bomba de vacío y se dejó a vacío durante 30 min. volvió a llenarse el sistema con argón y se añadieron 25 ml de glicidol mediante una bomba de jeringa a lo largo de 12 horas. Se disolvió el HPG en metanol y se precipitó mediante adición de acetona. Se purificó HPG 2-3 veces con precipitación con metanol/acetona. Para retirar adicionalmente el HPG de bajo peso molecular, se colocaron 2-5 ml de HPG en un tubo de diálisis de 10 ml (punto de corte de 0,5-1 k) y se sometió a diálisis frente a agua desionizada (DI). Se reemplazó el agua dos veces cada 12 horas. Se precipitó HPG con acetona y después se secó a vacío a 80 °C durante 12 h.

35 Ejemplo 2. Síntesis de copolímeros de PLA-HPG y PLA-PEG

Se disolvieron PLA (5 g) y 2,15 g de HPG en dimetilformamida (DMF) y se secaron sobre tamices moleculares durante la noche. Se añadieron 0,06 ml de diisopropilcarboimida (DIC) y 10 mg de 4-(N,N-dimetilamino)piridina (DMAP) y la reacción avanzó durante 5 días a temperatura ambiente con agitación. Se precipitó el producto vertiendo la reacción en dietil éter frío (éter) y recogiendo el precipitado mediante centrifugación. Volvió a disolverse el producto en diclorometano (DCM) y se precipitó de nuevo con una mezcla fría de éter y metanol. Se lavó el producto con una mezcla fría de éter y metanol. Se secó el polímero a vacío durante 2 días.

45 Para sintetizar PLA-PEG, se disolvieron 2,6 g de PLA y 1,0 g de MPEG-NH₂ en DMF y se secaron sobre tamices moleculares durante la noche. Se añadieron 0,038 ml de DIC y la reacción avanzó durante 2 días a temperatura ambiente con agitación. Se precipitó el producto vertiendo la reacción en éter frío y recogiendo el precipitado mediante centrifugación. Volvió a disolverse el producto en DCM y se precipitó de nuevo con éter frío, se lavó con una mezcla fría de éter y metanol y se secó a vacío durante 2 días.

50 Ejemplo 3. Fabricación de nanopartículas (NP)

Se añadieron cincuenta mg de copolímero de PLA-HPG, disueltos en 1,5-3,0 ml de acetato de etilo/dimetilsulfóxido (DMSO) (4:1), a 4 ml de agua DI con agitación con vórtex y se sometieron a sonicación con sonda durante 3 ciclos a 10 s cada uno. Se diluyó la emulsión resultante en 20 ml de agua DI con agitación. Se agitó durante al menos 5 horas o se conectó a un evaporador rotatorio para evaporar el acetato de etilo y después se aplicó a una unidad de filtración por ultracentrifugación AMICO® (punto de corte de 100 k). Se lavaron las NP mediante filtración 2 veces y después se suspendieron en una disolución de sacarosa al 10 %. Se mantuvieron las NP congeladas a -20 °C.

60 Las NP de PLA-PEG se prepararon usando una técnica de una única emulsión. Se añadieron 50 mg de copolímero de PLA-PEG, disueltos en 1,5-3,0 ml de acetato de etilo/DMSO (4:1), a 4 ml de agua DI con PVA al 2,5 % con agitación con vórtex y se sometieron a sonicación con sonad durante 3 ciclos de 10 s cada uno. Se diluyó la emulsión resultante en 20 ml de agua DI con TWEEN® 80 al 0,1 % con agitación. Se agitó la emulsión durante al menos 5 horas o se conectó a un evaporador rotatorio para evaporar el acetato de etilo y después se aplicó la disolución a una unidad de filtración por ultracentrifugación Amico (punto de corte de 100 k). Se lavaron las NP mediante filtración 2 veces y después se suspendieron en una disolución de sacarosa al 10 %.

Se registraron espectros de ^1H -RMN para HPG y copolímero en bloque de PLA-HPG en un instrumento Agilent de 400 MHz usando DMSO- d_6 como disolvente. Se registraron espectros de ^{13}C -RMN de polarización inversa para HPG en un instrumento Agilent de 600 MHz con metanol- d_4 como disolvente.

Se calculó el $\overline{DP_n}$ (grado de polimerización promedio en número) para HPG según los espectros de ^{13}C -RMN de polarización inversa para HPG con la siguiente ecuación:

$$\overline{DP_n} = \frac{(T + L_{13} + L_{14} + D)}{(T - D)} f_c$$

La funcionalidad de la molécula de núcleo (TMP), f_c , es 3.

El Mn de HPG se calcula con la siguiente ecuación:

$M_n = \text{Peso molecular de glicidol} \times \overline{DP_n} \text{ de HPG} + \text{peso molecular de TMP}.$

Ambas partículas tienen un núcleo de PLA biodegradable, que puede usarse para cargar agentes hidrófobos, y una cubierta hidrófila de HPG o PEG. Se produjo HPG mediante polimerización aniónica y se caracterizó mediante ^1H -RMN y ^{13}C -RMN. Se sintetizó copolímero de PLA-HPG mediante esterificación y la conjugación de PLA-HPG se confirmó mediante ^1H -RMN. El porcentaje en peso de HPG en PLA-HPG era de aproximadamente el 29 % tal como se calculó a partir de los resultados de RMN.

Se produjeron NP de PLA-HPG a partir de una única emulsión tal como se describió anteriormente. Se sintetizó copolímero de PLA-PEG mediante la conjugación de PLA-COOH con mPEG terminado en amina y también se caracterizó con ^1H -RMN. El porcentaje en peso de PEG era de aproximadamente el 26 % tal como se calculó a partir de los resultados de RMN.

Ejemplo 4. Caracterización de nanopartículas (NP) mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM)

30 Materiales y métodos

Se caracterizaron las NP con TEM. Se aplicó una gota de suspensión de nanopartículas encima de las rejillas de cobre recubiertas con carbono y se retiró la mayor parte de la gotita con un fragmento de papel de filtro. Se secó la capa fina de suspensión de NP durante 5-10 min y después se aplicó una gotita de acetato de uranilo. Se retiró la mayor parte de la gotita con un papel de filtro y se dejó secar durante 5 min. Se montó la muestra para obtención de imágenes con TEM. Se analizó la distribución de tamaño de las NP en Image J. Se determinó el tamaño hidrodinámico de las NP mediante dispersión de láser dinámica (DLS). Se diluyó la suspensión de NP con agua DI hasta 0,05 mg/ml y se cargó 1 ml en la célula para la detección.

Para determinar la concentración del colorante en las NP, se añadieron 990 μl de DMSO a 10 μl de NP en disolución acuosa. Se agitó la disolución con vórtex y se dejó en la oscuridad durante 10 min. Se cuantificó la concentración del colorante con un lector de placas mediante fluorescencia del colorante de DiD a 670 nm con una longitud de onda de excitación a 644 nm.

Se determinó la cantidad de CPT encapsulada en NP mediante fluorescencia de CPT a 428 nm con una longitud de onda de excitación a 370 nm. Se diluyó un volumen de suspensión de NP en DMSO acidificado (HCl 1 N:DMSO = 1:100, razón en volumen) al menos 10 veces. Se midió la fluorescencia de CPT y se determinó la cantidad de CPT mediante comparación con una curva patrón.

50 Resultados

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) confirmó la forma esférica de las NP de PLA-HPG y PLA-PEG (figuras 2A, 2B, 2C y 2D). El diámetro hidrodinámico de las NP era de 100 nm tal como se midió mediante dispersión de luz dinámica (DLS) (tabla 1). En este estudio, la carga de CPT de las NP tanto de PLA-HPG como de PLA-PEG es del 5 %. Las NP cargadas con CPT tienen una mayor fracción en el intervalo de tamaño superior y un mayor tamaño de diámetros hidrodinámicos mediante obtención de imágenes de TEM. Cuando se cargaron las NP con CPT y se incubaron en agua tamponada, el agente se liberó a lo largo de un periodo de aproximadamente 1 semana (figura 3). Ambas NP mostraron patrones similares de liberación de CPT. Tras 24 h de incubación, se liberó más de la mitad de CPT a partir de NP de PLA-HPG (59 %) y de PLA-PEG (56 %). El resto del fármaco encapsulado se liberó lentamente a lo largo de un periodo de 1 semana. Las NP de PLA-HPG/CPT permanecen suspendidas en disolución significativamente más tiempo que las NP de PLA-PEG/CPT, indicando una mayor estabilidad de las NP de PLA-HPG/CPT en suspensión.

Table 1. Diámetro promedio de nanopartículas de PLA-HPG, nanopartículas de PLA-PEG, nanopartículas de PLA-HPG/camptotecina (CPT) y nanopartículas de PLA-PEG/CPT.

NP	Diámetro (nm)
PLA-HPG	102,1±3,1
PLA-PEG	103,3 ± 1,0
PLA-HPG/CPT	158,4 ± 8,8
PLA-PEG/CPT	142,3 ± 5,2

Ejemplo 5. Evaluación de NP *in vitro*

Materiales y métodos

Se dializó una suspensión que contenía 3 mg de NP en un tubo de diálisis (punto de corte de 10 K) frente a 40 ml de PBS. En cada punto de tiempo, se retiraron 970 µl de disolución y volvió a colocarse el resto con 40 ml de PBS nuevo. Para cuantificar la CPT en los 970 µl de dializado, se añadieron 30 µl de líquido de cuantificación (DMSO:SDS al 10 %:HCl 1 N = 1:1:1, razón en volumen) y se cuantificó la concentración de CPT a EX/EM de 370/428 nm con un lector de placas.

Se llenaron tubos de microdiálisis con 100 µl de NP cargadas con sal de 4-clorobencenosulfonato de 1,1'-diocetadecil-3,3',3',3'-tetrametilindodicarbocianina (DiD) y se colocaron en un dispositivo de flotación en un vaso de precipitados grande con 4 l de PBS a 37 °C. Se retiraron los tubos por triplicado en diferentes puntos de tiempo. Se cambió la PBS cada 12 horas. Se cuantificó el colorante que quedaba en el tubo de diálisis mediante fluorescencia.

Se sembraron 180 µl de células de LLC en cada pocillo de una placa de 96 pocillos a una densidad de 5.000/pocillo y se dejaron en una incubadora a 37 °C durante la noche. Se añadieron 20 µl de CPT libre o NP en medio a cada pocillo. Se incubaron las células durante 72 h y se cuantificó la viabilidad celular con CellTiter Blue.

Las propiedades en superficie de las NP de PLA-HPG se evaluaron *in vitro* midiendo la captación celular mediante macrófagos. Tanto las NP de PLA-HPG como las NP de PLA-PEG mostraron una captación celular significativamente inferior en comparación con la de las NP de PLA simples. Se evaluaron las NP de PLA-HPG /CPT para determinar la toxicidad celular frente a células de LLC. Los controles elegidos para este estudio fueron las NP de PLA-PEG /CPT y CPT libre.

Resultados

Ambas formulaciones de NP mostraron el perfil de citotoxicidad significativamente mejorado (figura 4A). Para mostrar que esta toxicidad se debe a la CPT, y no a los polímeros, se examinó el efecto de NP vacías sobre células de LLC: ambas formulaciones de NP vacías mostraron ausencia de toxicidad (figura 4B).

Ejemplo 6. Evaluación de las NP en circulación en sangre y biodistribución

Materiales y métodos

El cuidado de los animales y los estudios los aprobó el Comité institucional sobre el uso y cuidado de animales (IACUC) de Yale. Se cargaron ambas NP con colorante de fluorescencia al 0,2 % (DiD de Invitrogen). 14 ratones C57BL/6 (n=7 por grupo) recibieron inyección en la vena de la cola de 150 µl de NP cargadas con DiD (3 mg/ml en disolución de PBS). A los 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h y 72 h se extrajeron 10-20 µl de sangre de cada ratón mediante punción en la vena de la cola. Se liofilizó la sangre. Para cuantificar la fluorescencia en la sangre, se añadieron 100 µl de DMSO y 1 ml de acetonitrilo y se homogeneizaron con un homogenizador. Se centrifugó la disolución homogeneizada en una centrifuga de sobremesa a 13.000 RPM y después se retiraron 0,8 ml de sobrenadante y se añadieron a un tubo de Eppendorf. Se evaporó todo el acetonitrilo con un dispositivo SpeedVac y se cuantificó el colorante en el DMSO a Ex/Em de 644/670 nm con un lector de placas.

Se evaluó la biodistribución de NP cargadas con DiD en ratones Balb/C que portaban tumores de LLC subcutáneos. Se inyectaron células de LLC (1 x 10⁶ células, 0,1 ml) por vía subcutánea en ratones hembra Balb/C (6 semanas de edad, Charles River Laboratories), y se inició la administración de nanopartículas después de 7 días, un momento en el que el volumen tumoral promedio alcanzó aproximadamente 100 mm³.

Se dividieron treinta ratones en cuatro grupos con 7-8 animales en cada grupo. El tamaño promedio y la variación de tamaño de los tumores en todos los grupos fueron comparables. Se administraron 150 µl de NP cargadas con DiD (3 mg/ml en disolución de PBS) por vía intravenosa a través de la vena de la cola. A las 12 h y 24 h, se sacrificaron los ratones y se extrajo la sangre con punción cardíaca. Tras la perfusión a través del ventrículo izquierdo con PBS, se extrajeron los órganos. Se liofilizaron la sangre y los órganos.

Para cuantificar el colorante en los órganos y tumores excepto el pulmón y el bazo, se añadió 1 ml de DMSO y se homogeneizó. Se centrifugó la disolución homogeneizada en una centrífuga de sobremesa a 13.000 RPM y después se añadieron 0,1 ml del sobrenadante a una placa de 96 pocillos y se cuantificó el colorante en el DMSO a Ex/Em de 644/670 nm con un lector de placas.

Para cuantificar el colorante en el pulmón y el bazo, se añadió 1 ml de DMSO y se homogeneizó. Se centrifugó la disolución homogeneizada en una centrífuga de sobremesa a 13.000 RPM y después se añadieron 0,1 ml de sobrenadante a 1 ml de acetonitrilo. Se centrifugó la disolución en una centrífuga de sobremesa a 13.000 RPM y después se retiraron 0,8 ml de sobrenadante y se añadieron a un tubo Eppendorf.

Se evaporó todo el acetonitrilo con un dispositivo SpeedVac y se cuantificó el colorante en el DMSO a Ex/Em de 644/670 nm con un lector de placas. Se realizó un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) para determinar la significación estadística de la distribución de dosis en órganos y sangre, se consideró que $p < 0,05$ era significativo.

Para demostrar el efecto del recubrimiento de HPG sobre la superficie de nanopartículas *in vivo*, se inyectaron NP por vía intravenosa y se analizó periódicamente la sangre para determinar la presencia de partículas. Para permitir la cuantificación de la concentración de NP en la sangre, se cargaron las NP con sal de 4-clorobenzenosulfonato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindo-dicarbocianina (DiD) al 0,2 %. DiD es un colorante hidrófobo, que se ha usado ampliamente como marcador para NP.

Resultados

Las NP cargadas con DiD liberan una cantidad mínima de colorante (aproximadamente el 20 %) a lo largo de 5 días de incubación continua en PBS (figura 5). Se cargaron NP tanto de PLA-HPG como de PLA-PEG con cantidades equivalentes de DiD. En comparación con las NP de PLA-PEG, las de PLA-HPG mostraron un tiempo de circulación más prolongado tras la administración (figura 6A). La semivida de eliminación de las NP de PLA-HPG (10,3 h) fue significativamente más prolongada que las NP de PLA-PEG (6,8 h): las semividas se determinaron mediante ajuste con un modelo de dos compartimentos (figura 6B). Se encontró una cantidad despreciable de cualquier NP en circulación 2 días tras la administración.

Para demostrar adicionalmente el efecto de las NP de PLA-HPG, se estudió la biodistribución de las NP en ratones con tumores de LLC subcutáneos. Se normalizó la fluorescencia medida en tejidos con respecto a porcentaje de dosis/gramo de tejido (figuras 6C y 6D). No hubo ninguna diferencia significativa en la acumulación de NP de PLA-HPG o de PLA-PEG en el cerebro, corazón, riñón, pulmón y bazo a las 12 y 24 h. Sin embargo, en comparación con las NP de PLA-PEG, las NP de PLA-HPG estaban presentes en una concentración significativamente superior en el tumor y la sangre, pero una concentración significativamente inferior en el hígado a las 12 h tras la inyección. Estas diferencias persistieron a las 24 h (aunque no fueron estadísticamente significativas en la sangre y el tumor). Para entender mejor el impacto de la distribución de NP global se calculó la masa total de NP en cada órgano, tumor y la sangre completa multiplicando el porcentaje de dosis/gramo de tejido por el peso de tejido (figuras 6E y 6F). La mayor parte de las NP estaban o bien en el hígado o bien en la sangre en ambos puntos de tiempo. A las 12 horas, estaban presentes dos veces más NP de PLA-HPG que NP de PLA-PEG en sangre completa y un tercio de NP de PLA-HPG, en comparación con NP de PLA-PEG, estaban presentes en el hígado. A las 24 horas, la acumulación de PLA-HPG en el hígado era la mitad de PLA-PEG aunque ambas NP estaban presentes en cantidades similares en la sangre.

Ejemplo 7. Inmunohistoquímica

Materiales y métodos

Se sometieron nueve ratones balb/c ($n=3$ por grupo) que portaban tumores de LLC a inyección en la vena de la cola de 150 μ l de NP (3 mg/ml en disolución de PBS) o control de PBS. A las 12 h, se sacrificaron los animales. Tras la perfusión a través del ventrículo izquierdo con PBS, se disecaron los tumores y se congelaron en OCT. Se seccionaron los tumores con un grosor de 10 μ m y se inmovilizaron sobre portaobjetos de microscopio SUPERFROST®. Se fijaron las secciones de tumor en formaldehído al 4 % en PBS durante 30 min y después se lavaron con TBS (Tris 20 mM PLA-HPG 7,6, NaCl 140 mM) 3 veces de 5 min cada vez. Se bloquearon las muestras en TBS con BSA al 1 % y suero normal de burro al 5 % durante 1 h y después se incubaron con anticuerpo de conejo anti-CD31 (dilución 1:50 en TBS con BSA al 1 % y suero normal de burro al 5 %). Se lavaron las secciones con TBS 3 veces de 5 min cada vez y después se incubaron con anticuerpo secundario de burro anti-conejo marcado con fluoróforo Alexa488 (Invitrogen, dilución 1:200 en TBS con BSA al 1 % y suero normal de burro al 5 %) durante 1 hora y se lavaron de nuevo con TBS 3 veces, 5 min cada vez. Se colocaron varias gotas de DAPI en cada portaobjetos y se cubrieron los portaobjetos con un cubreobjetos. Se tomaron imágenes con un microscopio de fluorescencia Zeiss.

Resultados

Para visualizar la penetración de las NP en tumores, se realizó inmunohistoquímica en criosecciones de tumores que se trataron con NP de PLA-HPG. Se encontraron NP más allá de los límites de las luces de vasos sanguíneos, indicando que las NP penetraron profundamente en el tejido tumoral tras la extravasación a través de la parte vascular del tumor tras la administración intravenosa.

Ejemplo 8. Estudios terapéuticos

Materiales y métodos

A cuarenta ratones C57BL/6 (6 semanas de edad, Charles River Laboratories) se les inyectaron por vía subcutánea 1×10^6 células de LLC. Tras 7 días, un tiempo en el que el volumen tumoral promedio alcanzó aproximadamente 100 mm^3 , se dividieron por igual 40 ratones en 5 grupos con distribución de tamaño promedio de los tumores comparable. Tras agrupar los ratones, se iniciaron inmediatamente los farmacológicos con control de PBS, control de NP de PLA-HPG vacías y 3 formulaciones de CPT: 1) PBS (PLA-HPG=7,4); 2) NP de PLA-HPG vacías en PBS; 3) disolución de CPT en DMSO (2,5 mg/ml, DMSO:PBS 10x = 9:1, razón en volumen); 4) NP de PLA-PEG/CPT en PBS; 5) NP de PLA-HPG/CPT en PBS. Se administraron los tratamientos 2 veces a 7 y 11 días con una dosis de CPT (5 mg/kg) cada vez. Se midieron los volúmenes tumorales y los pesos corporales de los ratones y se registraron cada dos días. Se calcularon los volúmenes tumorales con la fórmula: volumen = $LW^2/2$, donde L y W son el diámetro largo y corto de un tumor, respectivamente. Se sacrificaron los animales cuando el tamaño de tumor superó 2000 mm^3 , la pérdida de peso corporal total superó el 20 % o cuando se observaron otras señales de enfermedad, tales como problemas para respirar, incapacidad para comer y beber, letargo o postura anómala. Se realizó un análisis de ANOVA de un factor para determinar la significación estadística de los cambios relacionados con el tratamiento en el volumen tumoral de los animales y se consideró que $p < 0,05$ era significativo.

Resultados

Para comparar el efecto terapéutico de las NP de PLA-HPG con las NP de PLA-PEG optimizadas, se inyectaron NP cargadas con CPT por vía intravenosa en ratones que portaban tumores subcutáneos de LLC a una dosis de CPT de 5 mg/kg a 7 y 11 días tras la inoculación de tumor (figura 7 A). La tasa de crecimiento de tumores tratados con las NP de PLA-HPG vacías no se distinguía de la de los tumores tratados con control de PBS, indicando que PLA-HPG solo no tiene ningún efecto sobre el crecimiento tumoral, tal como se preveía. La tasa de crecimiento tumoral en ratones a los que se les administraron NP de PLA-HPG/CPT fue significativamente inferior a la de los ratones tratados con PBS, CPT libre o NP de PLA-PEG/CPT. De manera interesante, no se observó ninguna toxicidad *in vivo* significativa para ninguna de las formulaciones (figura 7B).

Ejemplo 9. Síntesis de nanopartículas recubiertas con HPG funcionalizadas y evaluación de la reversibilidad de las propiedades de sigilo de nanopartículas en circulación en sangre

Materiales y métodos

Síntesis de nanopartículas funcionalizadas con aldehído

NP de PLA-HPG (0,1 mg/ml) en una placa de 96 pocillos (vial pequeño) se ® con Na_2SO_3 2 mM. Se lavaron las NP dos veces con agua DI en una placa de filtro ACROPREP con un punto de corte de 100 k (o ultrafiltro AMICON® de 0,5 ml con un punto de corte de 100 k) y después se suspendieron en agua DI.

Se cuantificaron los aldehídos en las NP con un kit de ensayo de cuantificación de aldehído (ABCAM®). Se usaron las NP de PLA-HPG como control de sustracción de fondo. Se calculó la cantidad de aldehído mediante comparación con una curva de referencia. La curva de referencia se preparó usando el patrón de aldehído proporcionado con el kit. Se calculó la cantidad de aldehído en cada partícula basándose en un diámetro hidrodinámico de 100 nm de las NP y una densidad de NP supuesta de $1,0 \text{ g/cm}^3$. Para la impresión de micromatriz, se suspendieron NP cargadas con colorante de DiD en tampón de PBS que contenía glicerol al 15 % y TRITON®-X100 al 0,01 % a una concentración de 1 mg/ml en una placa de 384 pocillos. Se dispusieron las NP en matriz sobre portaobjetos recubiertos con lisina usando un dispositivo de disposición en micromatriz SPOTBOT® de ARRAYIT®. Después de 1 hora de incubación en una cámara de humedad, se lavaron extensamente los portaobjetos impresos con PBS 3 veces, 5 min cada vez. Tras un rápido aclarado con agua DI, se secaron los portaobjetos con argón y se sometieron a obtención de imágenes.

Unión de ligando

Para la unión de ligando o proteína, en una placa de 96 pocillos (o viales pequeños), se incubaron NP de PLA-HPG_{ALD} con ligandos o proteínas (debe añadirse NaCNBH_4 para proteínas o ligandos modificados con aminos o hidrazinas) durante 1 min-12 horas y se extinguió la reacción con una cantidad en exceso de disolución de hidroxilamina (o etanolamina para proteínas o ligandos modificados con aminos o hidrazinas) en tampón de TRIS (pH=7,4). Se transfirieron las NP a una placa de filtro AcroPrep con un punto de corte de 100 k (o ultrafiltro amicon de 0,5 ml con un punto de corte de 100 k o filtración en gel para proteínas y otras moléculas grandes) y se lavó dos

veces con agua DI o tampón.

Para reducir las NP de PLA-HPG_{ALD} para dar de nuevo NP de PLA-HPG (también denominadas en el presente documento nanopartículas no bioadhesivas, NNP), se incubaron NP de PLA-HPG_{ALD} con NaBH₄ en NaH₂PO₄ (0,2 M, pH=8,0) y se extinguió la reacción con ácido acético y se neutralizó con tampón de PBS. Se lavaron las NP con agua DI dos veces. Se realizaron experimentos de circulación de sangre usando el método en el ejemplo 6.

Se usaron portaobjetos de vidrio recubiertos con polilisina como compuesto de imitación de tejido para evaluar la propiedad bioadhesiva de las NP de PLA-HPG_{ALD} (BNP). Se prepararon NP de PLA-HPG_{ALD} con diferentes concentraciones de aldehídos usando un procedimiento de alto rendimiento, en el que se usaron placas de 96 pocillos regulares y placas de filtro de 96 pocillos para preparar las NP y se imprimieron sobre portaobjetos recubiertos con polilisina con un dispositivo de disposición en micromatriz.

Para la impresión en micromatriz, se suspendieron las NP cargadas con colorante de DiD en tampón de PBS que contenía glicerol al 15 % y TRITON®-X100 al 0,01 % a una concentración de 1 mg/ml en una placa de 384 pocillos. Se dispusieron las NP en matriz sobre portaobjetos recubiertos con lisina usando un dispositivo de disposición en micromatriz SPOTBOT® de ARRAYIT®. Después de 1 hora de incubación en una cámara de humedad, se lavaron extensamente los portaobjetos impresos con PBS 3 veces, 5 min cada vez. Tras un rápido aclarado con agua DI, se secaron los portaobjetos con argón y se sometieron a obtención de imágenes.

Se evaluó la propiedad bioadhesiva de las NP de PLA-HPG sobre tejidos aplicando NP en suspensión *ex vivo* a la superficie luminal de vena umbilical humana. Se obtuvo el cordón umbilical de la Vascular Biology & Therapeutics Core Facility en la Universidad de Yale y se usó dentro del plazo de 12 horas.

Se cortó el cordón umbilical en una longitud de 10 cm y se lavó con tampón de Ringer. Se sometió la vena a perfusión con 30 ml de tampón de Ringer. Se inyectaron NP de PLA-HPG y NP de PLA-HPG_{ALD} (1 mg/ml) en tampón de Ringer en la vena y se sellaron ambos extremos de la vena. Se sumergieron los cordones umbilicales sellados en tampón de Ringer y se incubaron a 37 °C durante 2 h. Tras la incubación, se sometió la vena en el cordón a perfusión con una gran cantidad de tampón de Ringer y se congeló en OCT. Se seccionaron los cordones congelados en secciones de 10-20 µm y se montaron sobre portaobjetos de vidrio. Se visualizaron los portaobjetos con un microscopio de fluorescencia. Se realizó un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) para determinar la significación estadística, se consideró que $p < 0,05$ era significativo.

Resultados

Las NP de PLA-HPG_{ALD} (pegajosas, también denominadas en el presente documento nanopartículas bioadhesivas, BNP) pueden revertirse para dar NP de PLA-HPG_{Revertido} (sigilosas) mediante tratamiento con NaBH₄, aunque se pierde un grupo alcohol con el ciclo de reducción-retorno dado que cada diol vecinal en HPG se oxida mediante NaIO₄ para dar un aldehído y cada aldehído se reduce para dar un único alcohol mediante NaBH₄. Los resultados se muestran en la figura 8. La circulación de sangre confirmó que las NP de PLA-HPG_{ALD} perdieron casi toda su pegajosidad tras el tratamiento con NaBH₄. La capacidad de ajuste en un sentido y otro también demostró la robustez del recubrimiento de HPG sobre las nanopartículas.

Las NP de PLA-HPG (NNP) sin tratamiento con NaIO₄ no se adhirieron a portaobjetos de vidrio y sólo se detectó una señal de fondo. Sin embargo, transformando la propiedad de superficie con NaIO₄, la cantidad de NP inmovilizadas sobre el portaobjetos de vidrio aumentó en función de la duración del tratamiento con NaIO₄, indicando que la propiedad bioadhesiva de las NP de PLA-HPG puede ajustarse mediante control del tratamiento con NaIO₄.

Los resultados se muestran en las figuras 9A, 9B y 9C. Tras la incubación durante 2 horas con ambas NP y lavado extenso, PLA-HPG_{ALD} mostró una retención sustancialmente superior sobre el lado luminal de la vena umbilical en comparación con la de las NP de PLA-HPG ($p < 0,05$). Se cuantificó la intensidad de fluorescencia a partir de las imágenes de fluorescencia.

Se evaluó la propiedad bioadhesiva de las NP de PLA-HPG sobre tejidos aplicando NP en suspensión *in vivo* a la cavidad peritoneal de ratones desnudos. Se dividieron seis ratones desnudos BALB/c en 2 grupos, 3 ratones por grupo. Se administraron NP de PLA-HPG_{ALD} cargadas con IR-780 (BNP) y NP de PLA-HPG cargadas con IR-780 (NNP) por vía intraperitoneal en dos grupos de ratones respectivamente. Cada ratón recibió 100 µl de suspensiones de NP. Se monitorizó la fluorescencia con obtención de imágenes en directo (Xenogen) a lo largo del tiempo. Se determinó la cuantificación de la fluorescencia retenida en la cavidad intraperitoneal a lo largo del tiempo. Tras la administración i.p., la mayor parte de las NP de PLA-HPG desaparecieron de la cavidad IP dentro del plazo de las primeras 24 horas. En cambio, las NP de PLA-HPG_{ALD} se retuvieron en la cavidad intraperitoneal durante al menos 5 días. Incluso al final del 10º día, todavía podían detectarse NP de PLA-HPG_{ALD} en la cavidad intraperitoneal. También se usó colorante libre como control, pero se aclaró en su totalidad en menos de 4 horas.

Este resultado indica la aplicación de NP de PLA-HPG en administración local cuando se necesita una retención prolongada en sitios de administración. La densidad de los aldehídos en las NP puede controlarse proporcionando

de ese modo una capacidad de ajuste del comportamiento de PLA-HPG_{ALD} para su administración local.

Estos ejemplos muestran que las NP de PLA-HPG_{ALD} interaccionarán con tejidos dado que la propiedad bioadhesiva de las NP de PLA-HPG_{ALD} resulta del enlace de base de Schiff entre los grupos aldehído en las NP de PLA-HPG_{ALD} y los grupos amina en la superficie de tejido.

Ejemplo 10. Citotoxicidad *in vitro* de nanopartículas cargadas con epotilona B

Materiales y métodos

Caracterización de nanopartículas

Se caracterizaron las nanopartículas con TEM con el método descrito por Deng *et al.*, *Biomaterials* 35:6595-6602 (2014). Se determinó el tamaño hidrodinámico de las NP mediante dispersión de láser dinámica (DLS).

Se determinó la cantidad de EB encapsulada en las NP mediante HPLC con una columna analítica C18 (PHENOMENEX®). Se usaron acetonitrilo/agua como fase móvil y se estableció la longitud de onda del detector de UV a 240 nm.

Liberación de fármaco in vitro

Se dializó una suspensión de NP cargadas con EB (10 mg) en un tubo de diálisis (punto de corte de 10 K) frente a 40 ml de PBS. En cada punto de tiempo, se retiró la disolución de PBS y se sustituyó por 40 ml de PBS nuevo. Se extrajo la EB liberada en PBS con acetato de etilo (EA) dos veces, 5 ml cada vez. Se evaporó el EA para concentrar los extractos que después se liofilizaron. Se disolvieron los extractos liofilizados en una mezcla de acetonitrilo/agua (50:50, volumen) para análisis mediante HPLC.

Citotoxicidad in vitro de EB libre y nanopartículas cargadas con EB.

Se sembraron células de UPSC (180 µl) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos a una densidad de 2.000/pocillo y se dejaron en una incubadora a 37 °C durante la noche. Se añadieron 20 µl de EB libres, NP de EB/PLA-HPG o NP de EB/PLA-HPG_{ALD} en el medio a cada pocillo. Se incubaron las células durante 72 h y se cuantificó la viabilidad celular con CellTiter Blue.

Supresión del crecimiento celular mediante NP de EB/PLA-HPG_{ALD} unidas a portaobjetos recubiertos con lisina.

Se dividieron seis portaobjetos recubiertos con lisina (25 mm x 75 mm) en dos grupos y se dividió cada portaobjetos en cuatro cuadrantes con un lápiz PAP (Abeam). Para el primer grupo, se aplicaron 100 µl de NP de EB/PLA-HPG_{ALD} (1 mg/ml), NP de EB/PLA-HPG (1 mg/ml), NP de PLA-HPG_{ALD} vacías (1 mg/ml) y PBS; y para el segundo grupo, se aplicó PBS a los cuadrantes de cada portaobjetos. Después de 30 min de incubación, se lavó extensamente cada portaobjetos con una gran cantidad de PBS y se colocó en una placa de 10 cm llena con 20 ml de medio con una densidad de células de UPSC a 2x10⁵/ml. Tras la incubación at 37 °C durante 24 horas, se aspiró el medio y se lavaron los portaobjetos con 20 ml de PBS 4 veces. Se tiñeron las células con Hoechst (para núcleos, azul) y tinción de células vivas/muertas (verde para células vivas y rojo para células muertas) y después se obtuvieron imágenes con microscopio de fluorescencia. Se contó el número de células mediante el número de núcleos con análisis de partículas de Image J.

Resultados

Pueden usarse NP de PLA-HPG_{ALD} como nuevo vehículo de fármacos de quimioterapia en administración intraperitoneal dado que las NP de PLA-HPG_{ALD} tienen una retención prolongada significativa en la cavidad intraperitoneal (figura 10). Para demostrar este uso de NP de PLA-HPG_{ALD}, se usó epotilona B (EB) como fármaco de modelo. Se encapsuló EB en el copolímero de PLA-HPG para producir las NP de EB/PLA-HPG y después se oxidaron las NP de EB/PLA-HPG mediante NaIO₄ para dar NP de EB/PLA-HPG_{ALD}. La eficiencia de encapsulación fue de aproximadamente el 50 % y la carga de EB en las NP de EB/PLA-HPG y las NP de EB/PLA-HPG_{ALD} fueron del 2,5 % y el 1,2 % respectivamente. No hubo ninguna diferencia significativa de tamaño o morfología entre las NP de EB/PLA-HPG y las NP de EB/PLA-HPG_{ALD} a partir de ambas mediciones de DLS (tabla 2).

Table 2. Diámetro e índice de polidispersidad (PDI) de nanopartículas que contienen EB.

Nanopartículas	Diámetro (nm)	PDI
EB/PLA-HPG	127	0,225
EB/PLA-HPG _{ALD}	127	0,233

Se midió la curva de liberación de control frente a PBS. La mayor parte (aproximadamente el 80 %) de la EB se liberó después de ocho horas y no hay ninguna diferencia significativa entre las NP de EB/PLA-HPG y las NP de

EB/PLA-HPG_{ALD} (figura 11A). También se investigó la citotoxicidad *in vitro* de las NP de EB/PLA-HPG_{ALD} frente a células de carcinoma seroso papilar uterino (UPSC), usándose NP de EB/PLA-HPG y EB libre como controles. La EB libre mostró la toxicidad más alta (figura 11B). La citotoxicidad de las NP de EB/PLA-HPG_{ALD} era comparable a la de las NP de EB/PLA-HPG. La diferencia entre la EB libre y formulaciones de NP de EB podía deberse a la retención de la EB en las NP, dando como resultado una baja concentración de EB en las formulaciones de NP en comparación con EB libre. La toxicidad potenciada de NP de EB/PLA-HPG_{ALD} se debió a la interacción entre las NP de PLA-HPG_{ALD} y las células, dando como resultado una captación celular mucho mayor de NP de PLA-HPG_{ALD} en comparación con NP de PLA-HPG.

Para confirmar que la citotoxicidad se debe a EB, y no a los polímeros, se examinó el efecto de NP de PLA-HPG_{ALD} y NP de PLA-HPG vacías sobre células de UPSC. Ninguna de las NP vacías mostró ninguna toxicidad hasta 1 mg/ml de NP, tal como se muestra en la figura 11C (esta concentración de NP vacías era muy superior a la concentración de las NP cargadas con EB usadas en los estudios anteriores). Para demostrar la seguridad de las NP de PLA-HPG_{ALD}, se examinó la citotoxicidad de NP de PLA-HPG_{ALD} vacías (se usaron NP de PLA-HPG como control) sobre células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y células Hela. Ninguna de las NP vacías mostró ninguna toxicidad (figura 11D). Además, se sometió a prueba la citotoxicidad de NP de PLA-HPG_{ALD} vacías a 1 mg/ml sobre una variedad de líneas celulares de laboratorio y no se observó ninguna citotoxicidad sobre todas estas líneas celulares (figura 11E).

Se evaluó la eficiencia citotóxica de NP de EB/PLA-HPG_{ALD} *in vitro* usando portaobjetos recubiertos con lisina con NP de EB/PLA-HPG_{ALD} unidas en superficie y células de UPSC. Se dividió cada portaobjetos recubierto con lisina en cuatro cuadrantes con un lápiz hidrófobo y se aplicaron NP de EB/PLA-HPG_{ALD}, NP de EB/PLA-HPG, NP de PLA-HPG_{ALD} vacías y PBS a cada uno de los cuadrantes. También se preparó un portaobjetos de control con PBS aplicado a los cuatro cuadrantes. Tras la incubación y lavados extensos, se expusieron los portaobjetos a medio de cultivo celular con UPSC. Tras 24 horas, se obtuvieron imágenes de las células en cada cuadrante y se cuantificaron. No hubo ninguna diferencia significativa entre NP de EB/PLA-HPG, NP de PLA-HPG_{ALD} vacías y PBS. Sin embargo, la unión celular sobre la zona recubierta con NP de EB/PLA-HPG_{ALD} se suprimió significativamente (figura 12). La EB liberada a partir de NP no tuvo ningún efecto sobre células en el medio ya que la densidad celular de control de PBS era similar a la del control de PBS en portaobjetos en los que se aplicó PBS a los cuatro cuadrantes. Este resultado puede deberse al hecho que la EB se libera lentamente a partir de las NP de EB/PLA-HPG_{ALD} y forma una alta concentración de fármaco local alrededor de las células que interaccionan estrechamente con NP de EB/PLA-HPG_{ALD}.

Estos estudios confirmaron que cambiar la propiedad de superficie de las NP a bioadhesividad puede prolongar la retención de las NP administradas por vía intraperitoneal. Además, los vehículos, las NP de PLA-HPG_{ALD} vacías, no mostraron ninguna citotoxicidad sobre múltiples líneas celulares durante 3 días y hasta 1 mg/ml de partículas. Además, no se observó ninguna pérdida de peso o enfermedad cuando se inyectaron a los ratones 5 mg de NP de PLA-HPG_{ALD} vacías por vía intraperitoneal, una vez por semana durante 3 semanas. Se cree que la ausencia de toxicidad de las NP de PLA-HPG_{ALD} puede deberse a varios factores: 1) los aldehídos están ampliamente presentes en alimentos, fragancias y metabolitos, por lo tanto se espera una alta tolerancia a aldehídos, lo cual se sugiere adicionalmente por la amplia existencia de aldehído deshidrogenasa que puede detoxificar de manera eficiente (Vasiliou *et al.*, *Chem Biol Interact* 202:2-10 (2013)); 2) los aldehídos están unidos de manera covalente sobre nanopartículas, aunque se conoce la toxicidad de aldehídos libres de bajo peso molecular (O'Brien *et al.*, *Crit. Rev. Toxicol.* 35:609-662 (2005)); y 3) la mayor parte de la interacción de aldehídos con proteínas u otras moléculas se realiza mediante enlaces de base de Schiff reversibles de modo que no puede modificar o dañar de manera permanente las biomoléculas.

Tanto las NP de EB/PLA-HPG_{ALD} como las NP de EB/PLA-HPG tienen un tamaño, morfología y perfil de liberación controlada similares. En el ensayo de *in vitro* regular, ambas NP muestran un perfil de citotoxicidad idéntico. Sin embargo, en el ensayo de *in vitro* con portaobjetos de vidrio recubiertos con lisina, el crecimiento de células de UPSC sobre portaobjetos de lisina recubiertos con NP de EB/PLA-HPG_{ALD} se suprimió significativamente en comparación con los portaobjetos tratados con NP de EB/PLA-HPG, NP de PLA-HPG_{ALD} vacías y portaobjetos de lisina de control. La cantidad de NP de EB/PLA-HPG_{ALD} unidas sobre portaobjetos era muy pequeña y, salvo por la zona que contenía las NP de EB/PLA-HPG_{ALD}, ninguna otra zona tuvo ningún efecto sobre el crecimiento celular. La adherencia al peritoneo es un requisito previo para que células cancerosas diseminadas establezcan carcinomatosis peritoneal ("PC") en la cavidad peritoneal (Aoyagi *et al.*, *World journal of gastroenterology*: WJG 20:12493-12500 (2014)). Además de liberar fármacos lentamente a toda la cavidad peritoneal, las NP de EB/PLA-HPG_{ALD} pueden lograr una concentración local mucho mayor de fármacos sobre la superficie del peritoneo, lo cual puede suprimir el crecimiento de las células cancerosas adheridas al peritoneo y, por tanto, eliminar la PC. Además, a diferencia de las micropartículas, que tienden a acumularse en la parte inferior del abdomen, el pequeño tamaño de las NP de PLA-HPG_{ALD} permite la difusión de las NP a toda la cavidad intraperitoneal.

Es importante enfatizar que la pegajosidad única de las NP divulgadas en el presente documento a tejidos o compuestos de imitación de tejido es el resultado de una interacción entre la pegajosidad del grupo aldehído y la densidad extremadamente alta de aldehídos inmovilizados sobre las NP. La estructura hiperramificada de HPG permite que la razón de aldehído/PLA llegue a 17.

Estudios *ex vivo* confirmaron la pegajosidad de las NP con respecto a diversas superficies de tejido, tales como la superficie luminal de la vena umbilical. No se observó ninguna penetración profunda de NP en estos entornos, lo cual sugiere una alta localización de NP tras la administración tópica. La inyección de NP de PLA-HPG_{ALD} en la cavidad intraperitoneal o el tejido subcutáneo dio como resultado una retención mucho más prolongada en estos sitios. La administración i.p. de fármacos quimioterápicos tales como paclitaxel se ha convertido en un tratamiento convencional para determinados cánceres de ovarios y de colon (Armstrong, *et al.*, *ANZ J Surg*, 77:209-213 (2007); Gervais *et al.*, *Journal of surgical oncology*, 108:438-443 (2013)). El procedimiento i.p. convencional se realiza mediante un catéter implantado de manera quirúrgica que permite el paso de líquidos que contienen fármaco quimioterápico disuelto o en suspensión al interior del abdomen de un paciente. En esta situación, la retención del fármaco depende principalmente de la duración de la infusión. Las NP de PLA-HPG_{ALD} encapsuladas con fármacos deben tener una gran aplicación en este campo prolongando significativamente la retención de fármacos en el sitio de administración.

Ejemplo 11. Citotoxicidad *in vivo* de nanopartículas cargadas con epotilona B

Materiales y métodos

A cuarenta ratones desnudos BALB/c (5-6 semanas de edad, Charles River Laboratories) se les inyectaron por vía intraperitoneal 1×10^6 células de UPSC. Tras 1 semana, se iniciaron los tratamientos con fármaco con control de PBS, control de PLA-HPG_{ALD} vacío y 3 formulaciones de EB. Las formulaciones inyectadas fueron las siguientes: 1) PBS (pH=7,4); 2) PLA-HPG_{ALD} vacío en PBS; 3) disolución de EB libre (disolución madre 5 mg/ml en el 30 % de PEG400/el 0,5 % de TWEEN® 80/el 5 % de propilenglicol/el 64,5 % de agua, diluida hasta la concentración necesaria con PBS antes de su uso); 4) NP de EB/PLA-HPG en PBS; 5) NP de EB/PLA-HPG_{ALD} en PBS. Se administraron los tratamientos por vía intraperitoneal con una dosis de EB (0,5 mg/kg) cada semana durante 5 semanas. Se midieron los pesos corporales de los ratones dos veces por semana. Se sacrificaron los animales cuando la pérdida de peso corporal superó el 20 %, o cuando se observaron otros signos de enfermedad, tales como problemas para respirar, incapacidad para comer y beber, letargo o postura anómala.

Resultados

En la figura 13 se presenta la curva de supervivencia de Kaplan-Meier que refleja la eficacia de cada una de las formulaciones de tratamiento.

Además de la introducción de un nuevo vehículo de administración, este estudio demuestra que puede establecerse un nuevo modelo de animal de PC mediante inoculación i.p. de células de UPSC. Las características altamente agresivas de UPSC incluyen una diseminación peritoneal o linfática temprana así como resistencia innata a quimioterapia. La línea celular de USPC usada en este estudio es una línea celular primaria procedente de un paciente. Debido a la sobreexpresión de β -tubulina III, esta línea celular es resistente a platino/taxano pero no a EB (Rogue *et al.*, *Cancer*, 119(14):2582-2592 (2013)). EB, un policétido macrocíclico, ha mostrado una potencia significativamente mejorada para destruir UPSC en comparación con paclitaxel. Sin embargo, el efecto de la administración i.p. de EB para el tratamiento de PC es transitorio porque es un fármaco de molécula pequeña. Por tanto, en el presente documento se divulga un vehículo con un perfil de liberación controlada de EB que puede lograr una mejor biodisponibilidad de EB para su administración i.p.

Aspectos de la invención incluyen:

Aspecto 1. Partículas que comprenden

(a) un núcleo que comprende uno o más materiales hidrófobos o más hidrófobos; y

(b) una cubierta que comprende poliglicerol hiperramificado.

2. Partículas según el aspecto 1, en las que el uno o más materiales hidrófobos o más hidrófobos son un polímero.

Aspecto 3. Partículas según el aspecto 2, en las que el polímero es biodegradable.

Aspecto 4. Partículas según el aspecto 3, en las que el polímero biodegradable es un poliéster alifático.

Aspecto 5. Partículas según el aspecto 4, en las que el poliéster alifático se selecciona del grupo que consiste en poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y copolímeros de los mismos.

Aspecto 6. Partículas según el aspecto 5, en las que el poliéster alifático es poli(ácido láctico).

Aspecto 7. Partículas según uno cualquiera de los aspectos 1-6, en las que el poliglicerol hiperramificado está unido de manera covalente al uno o más materiales hidrófobos.

Aspecto 8. Partículas según el aspecto 7, en las que el poliglicerol hiperramificado está funcionalizado con uno o más grupos funcionales reactivos que se adhieren a tejido, células y/o proteínas.

- 5 Aspecto 9. Partículas según el aspecto 8, en las que el uno o más grupos funcionales reactivos se seleccionan del grupo que consiste en aldehídos, aminas, oximas sustituidas en O y combinaciones de los mismos.

- 10 Aspecto 10. Partículas según uno cualquiera de los aspectos 1-8, que comprende además uno o más agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico, agentes profilácticos, compuestos nutracéuticos o combinaciones de los mismos.

Aspecto 11. Partículas según el aspecto 10, en las que el uno o más agentes están encapsulados dentro de la partícula, asociados con la superficie de la partícula o combinaciones de los mismos.

- 15 Aspecto 12. Partículas según el aspecto 11, en las que el uno o más agentes están encapsulados dentro de la partícula.

- 20 Aspecto 13. Partículas según uno cualquiera de los aspectos 1-12, en las que la partícula comprende además uno o más agentes de direccionamiento.

Aspecto 14. Partículas según el aspecto 13, en las que el uno o más agentes de direccionamiento están unidos de manera covalente a la cubierta.

- 25 Aspecto 15. Partículas según uno cualquiera de los aspectos 1-14, en las que el diámetro promedio de las partículas es de desde aproximadamente 1 nm hasta aproximadamente 1 mm.

Aspecto 16. Composición farmacéutica que comprende las partículas según uno cualquiera de los aspectos 1-15 y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

- 30 Aspecto 17. Composición de aspecto 16, en la que el uno o más portadores son adecuados para administración parenteral.

- 35 Aspecto 18. Composición de aspecto 16, en la que el uno o más portadores son adecuados para administración enteral.

Aspecto 19. Composición de aspecto 16, en la que el uno o más portadores son adecuados para administración tópica.

- 40 Aspecto 20. Método para administrar uno o más agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico, agentes profilácticos, compuestos nutracéuticos o combinaciones de los mismos a un paciente que lo necesita, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de las partículas según uno cualquiera de los aspectos 10-15 o la composición según uno cualquiera de los aspectos 16-19.

- 45 Aspecto 21. Método de reducción de la captación de partículas por el MPS, comprendiendo el método administrar las partículas según uno cualquiera de los aspectos 1-7 y 10-15.

Aspecto 22. Método de adherencia de partículas a tejido, comprendiendo el método administrar las partículas según uno cualquiera de los aspectos 8-15.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y partículas que comprenden
 - (a) un núcleo que comprende uno o más polímeros biodegradables;
 - (b) una cubierta que comprende poliglicerol hiperramificado; y
 - (c) un agente anticancerígeno;
 en la que el uno o más polímeros biodegradables son más hidrófobos que el poliglicerol hiperramificado; y
 en la que el poliglicerol hiperramificado está unido de manera covalente al uno o más polímeros biodegradables, y por lo demás el poliglicerol hiperramificado no está modificado.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el polímero biodegradable es un poliéster alifático.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en la que el poliéster alifático se selecciona de poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y copolímeros de los mismos.
4. Composición farmacéutica según cualquier reivindicación anterior, en la que el agente anticancerígeno está encapsulado dentro de las partículas.
5. Composición farmacéutica según cualquier reivindicación anterior, en la que el diámetro promedio de las partículas es de desde 25 nm hasta 250 nm.
6. Composición farmacéutica según cualquier reivindicación anterior, en la que el agente anticancerígeno se selecciona de agentes alquilantes, antimetabolitos, antimitóticos, antraciclinas, actinomicinas, antibióticos citotóxicos, inhibidores de la topoisomerasa y combinaciones de los mismos.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que el agente alquilante se selecciona de cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo, dacarbazina, lomustina, carmustina, procarbazona, clorambucilo e ifosfamida; el antimetabolito se selecciona de fluorouracilo (5-FU), gemcitabina, metotrexato, arabinósido citosina, fludarabina y floxuridina; el antimitótico se selecciona de taxanos, epotilonas A-F y alcaloides de la vinca; la antraciclina se selecciona de doxorubicina, daunorubicina, valrubicina, idarubicina y epirubicina; la actinomicina es actinomicina D; el antibiótico citotóxico se selecciona de mitomicina, plicamicina y bleomicina; y el inhibidor de la topoisomerasa se selecciona de camptotecinas, amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido y tenipósido.
8. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que el agente anticancerígeno es un inhibidor de la topoisomerasa, preferiblemente una camptotecina.
9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el agente anticancerígeno se selecciona de inhibidores de la angiogénesis que son compuestos anti-factor de crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF), talidomida, lenalidomida, endostatina, angiostatina, inhibidores de receptor tirosina cinasa (RTK), inhibidores de tirosina cinasa, inhibidores de factor de crecimiento transformante α , inhibidores de factor de crecimiento transformante β y anticuerpos frente al receptor de factor de crecimiento epidérmico.
10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que el agente anticancerígeno se selecciona de bevacizumab, talidomida, lenalidomida, endostatina, angiostatina, sunitinib, sorafenib, erlotinib, pazopanib, axitinib, lapatinib, panitumumab y cetuximab.
11. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el agente anticancerígeno se selecciona de doxorubicina, ciclosporina, mitomicina C, cisplatino, carboplatino, BCNU, 5-FU, metotrexato, adriamicina, camptotecina, epotilonas A-F y taxol.
12. Composición farmacéutica según cualquier reivindicación anterior para su uso en el tratamiento de cáncer.

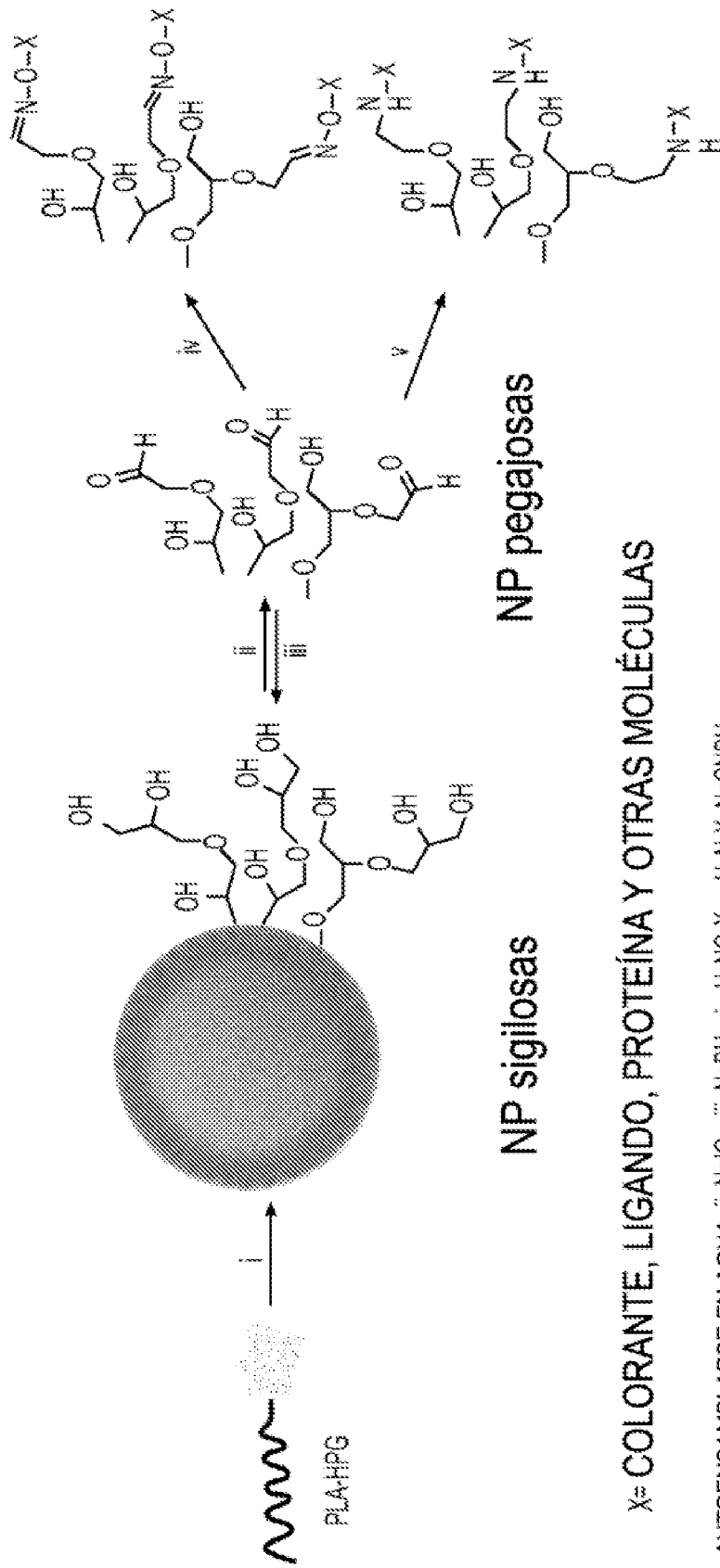


FIG. 1

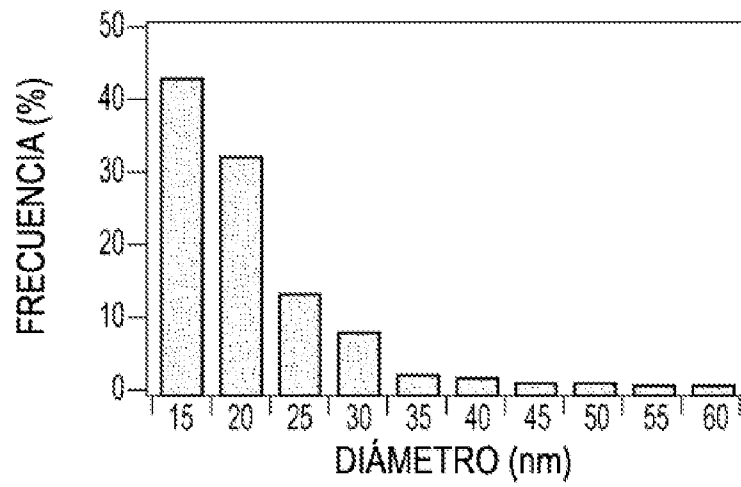


FIG. 2A

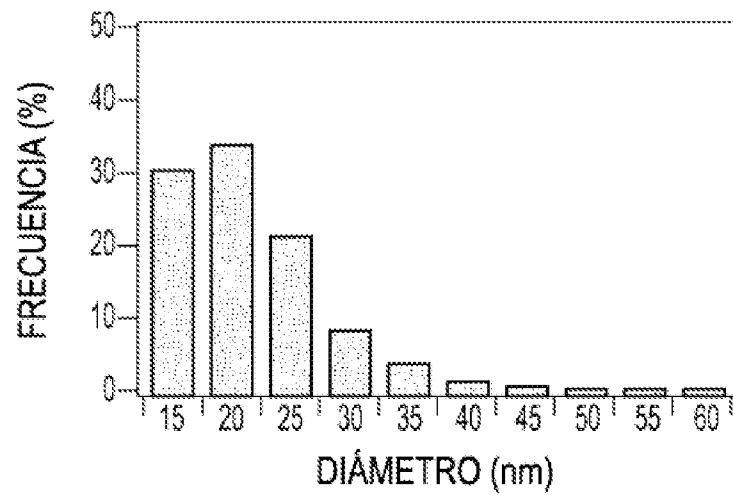


FIG. 2B

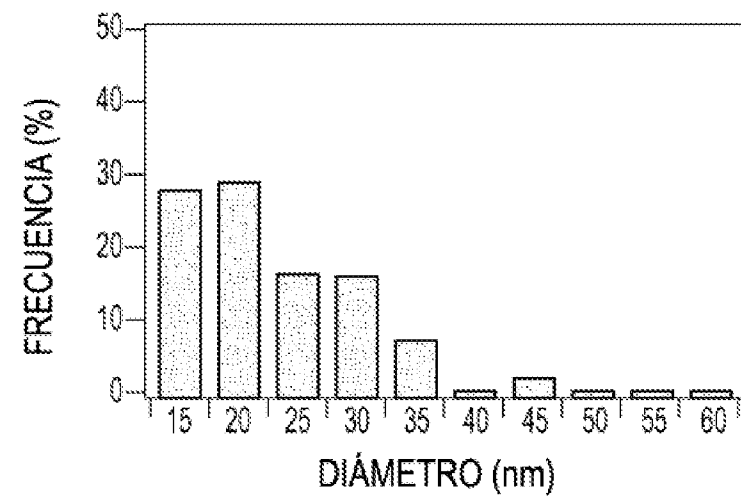


FIG. 2C

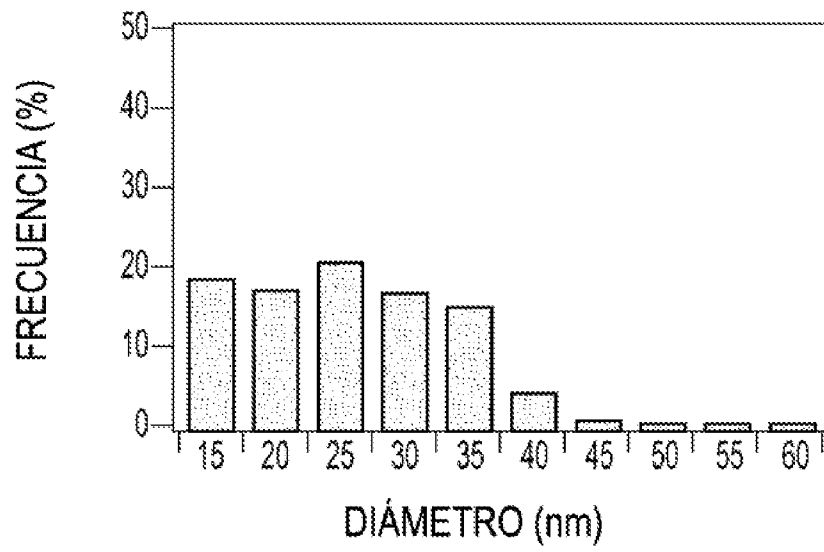


FIG. 2D

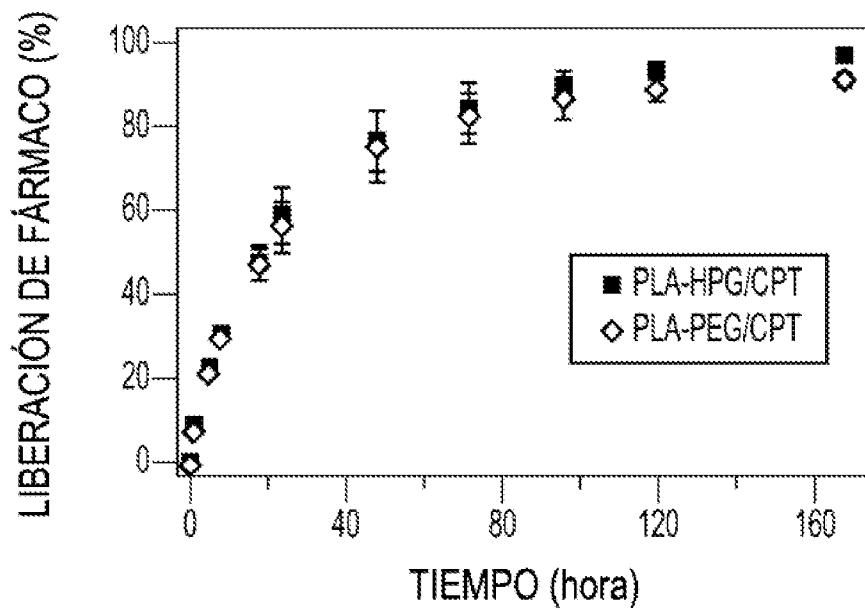


FIG. 3

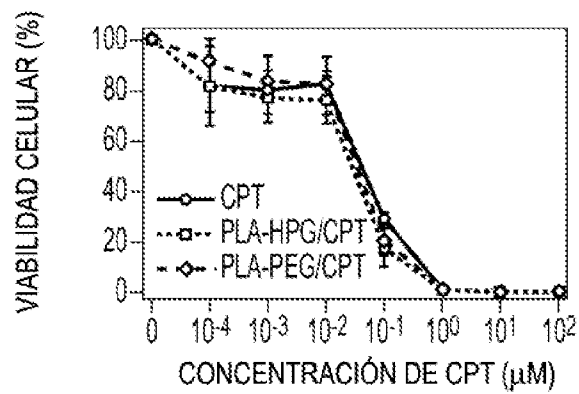


FIG. 4A

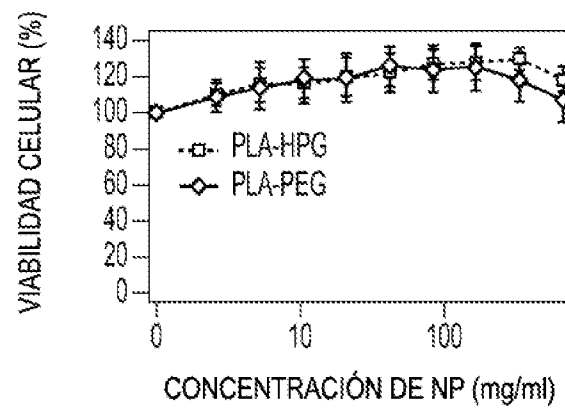


FIG. 4B

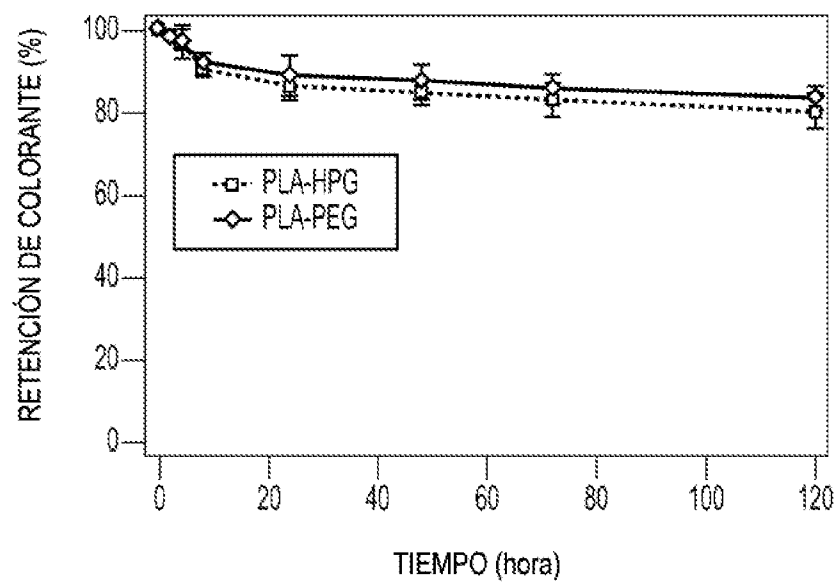


FIG. 5

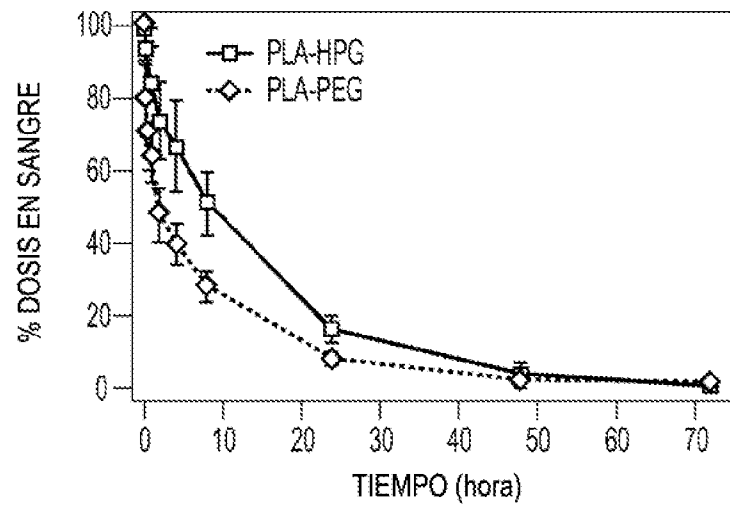


FIG. 6A

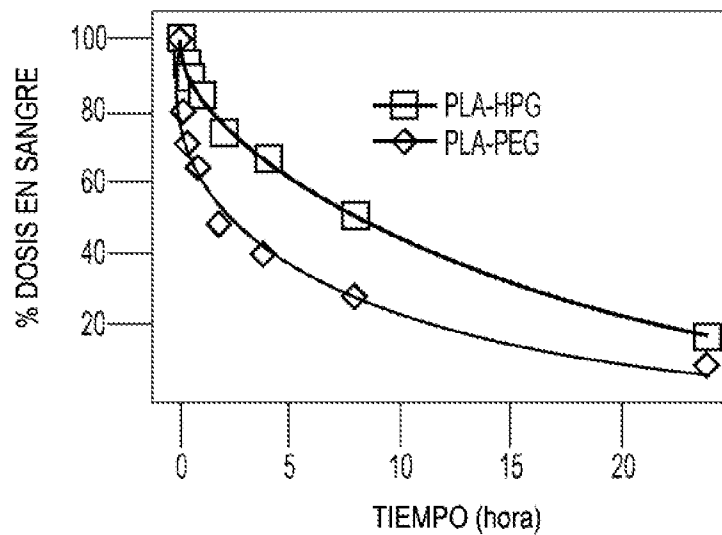


FIG. 6B

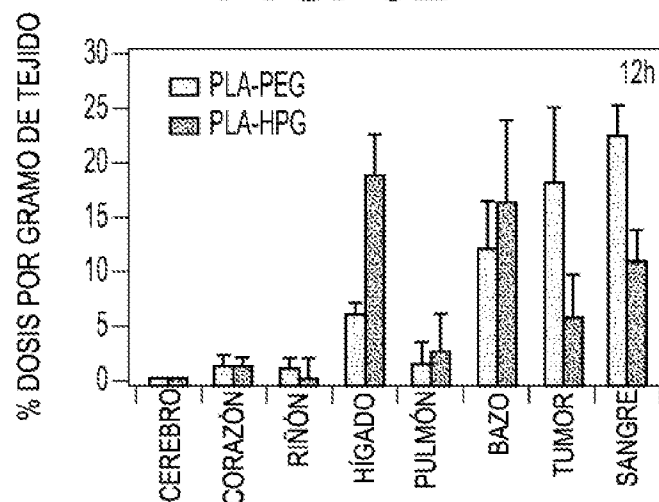


FIG. 6C

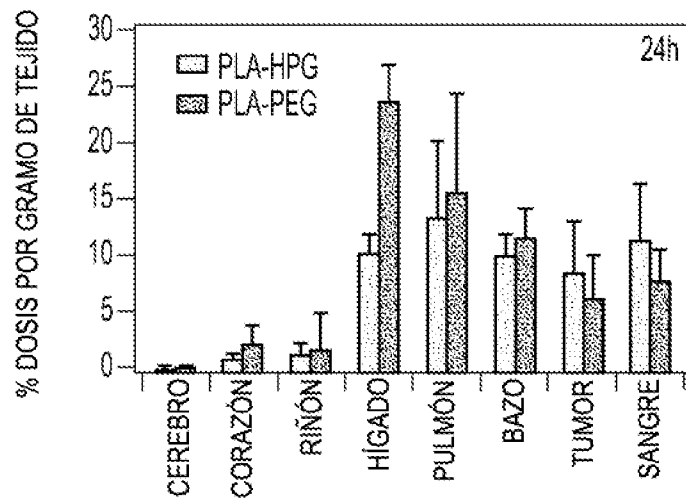


FIG. 6D

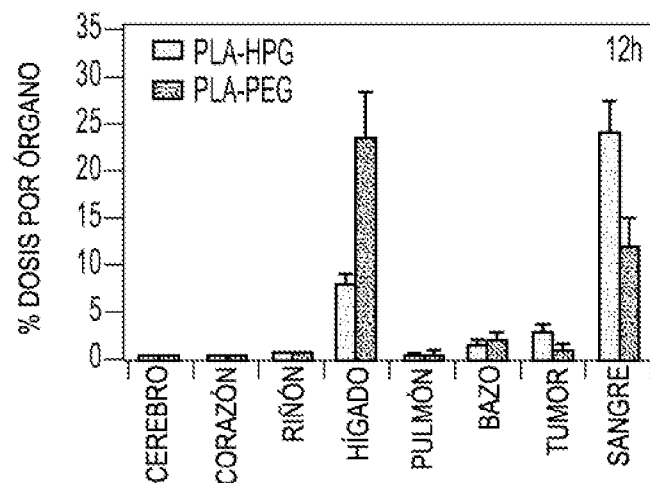


FIG. 6E

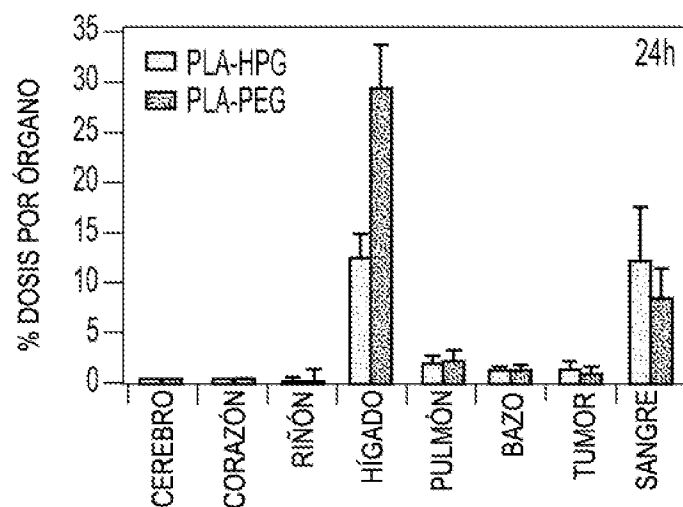


FIG. 6F

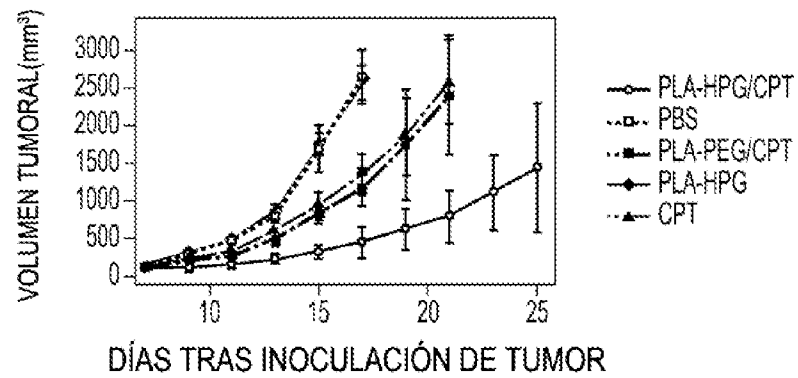


FIG. 7A

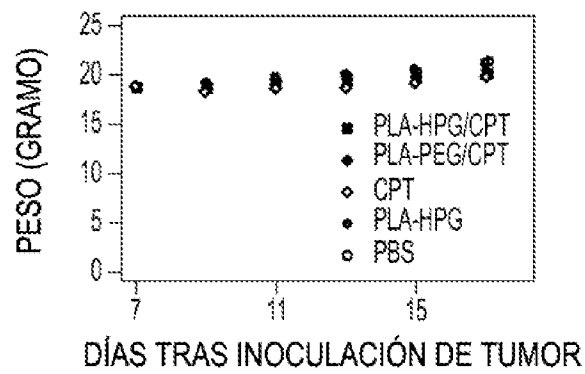


FIG. 7B

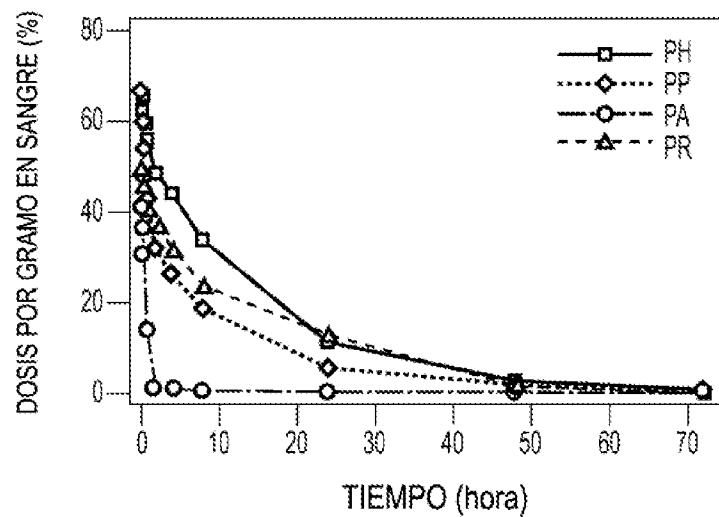


FIG. 8

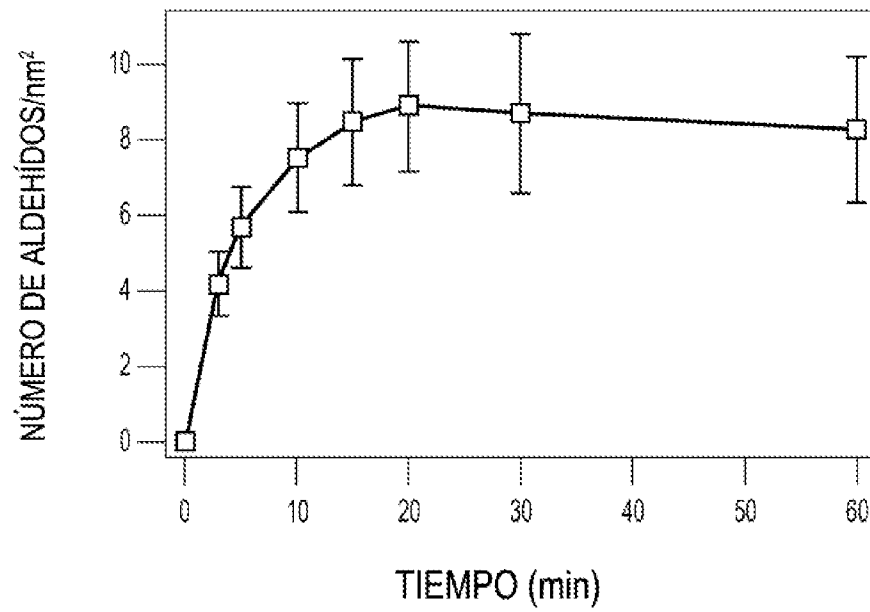


FIG. 9A

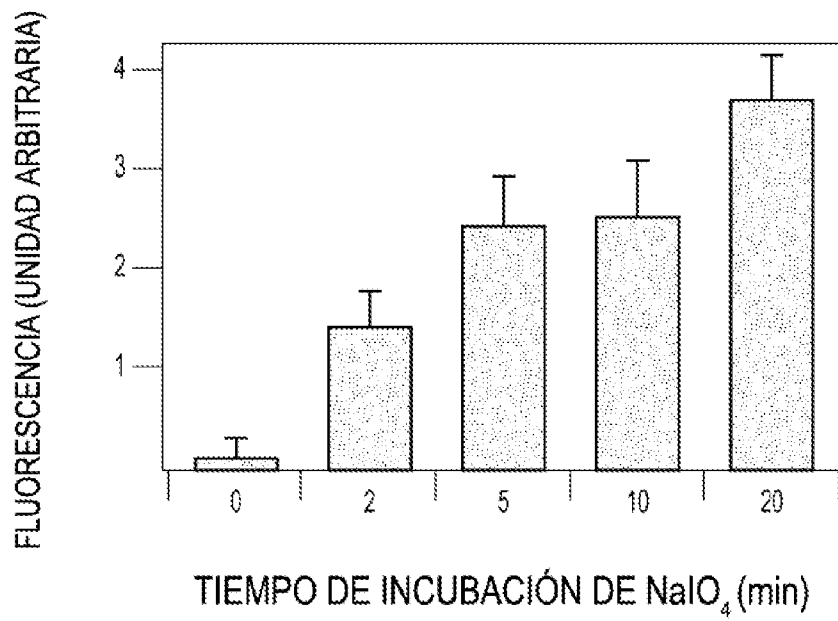


FIG. 9B

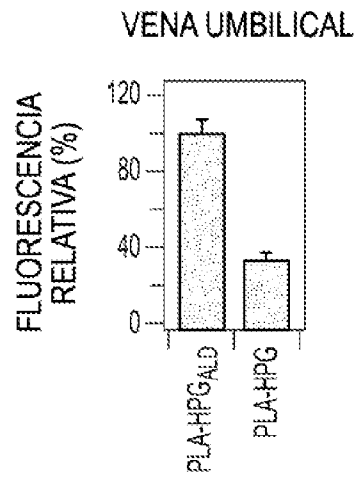


FIG. 9C

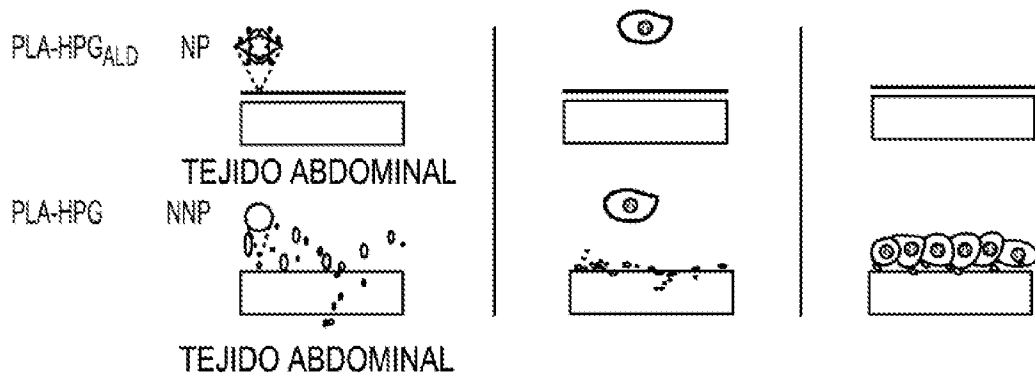


FIG. 10A

FIG. 10B

FIG. 10C

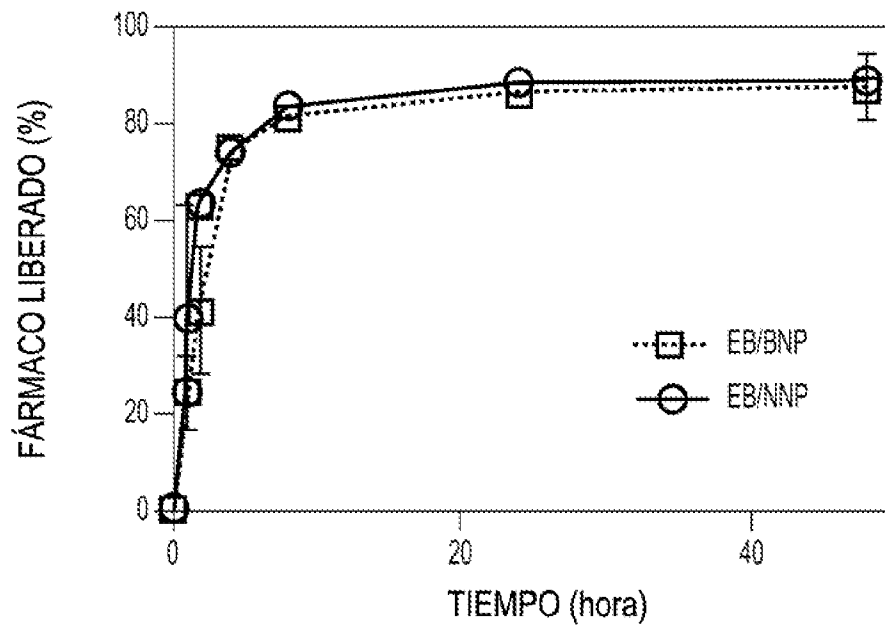


FIG. 11A

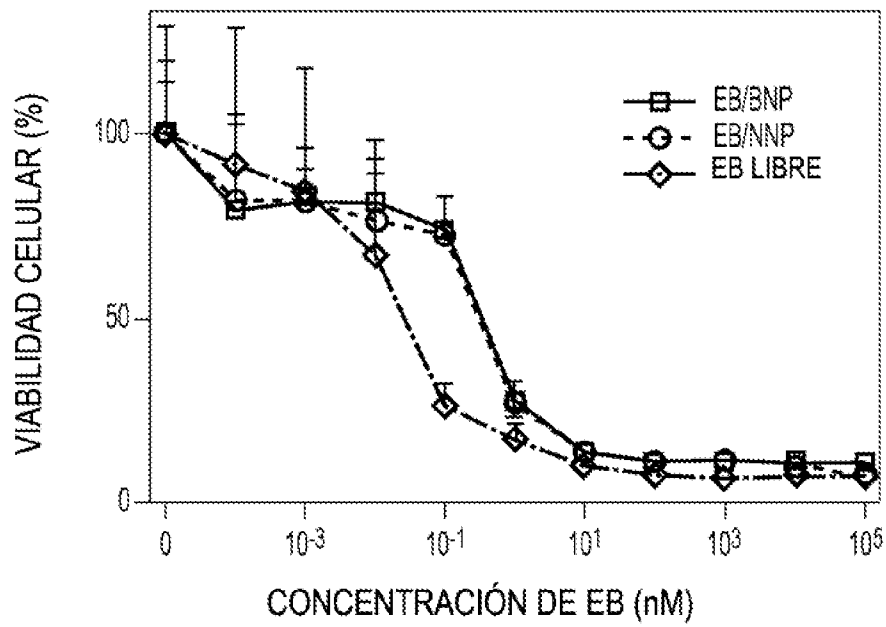


FIG. 11B

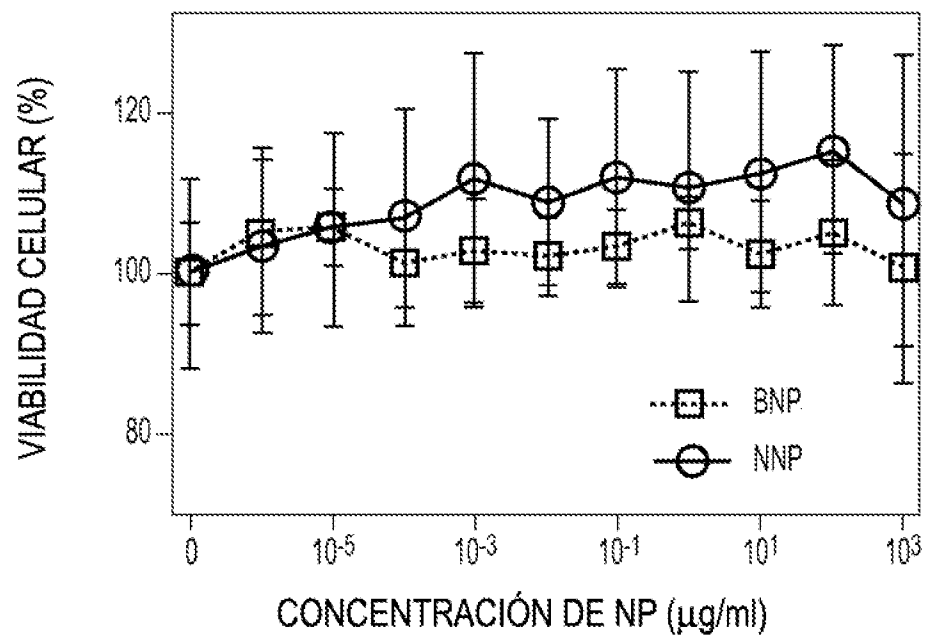


FIG. 11C

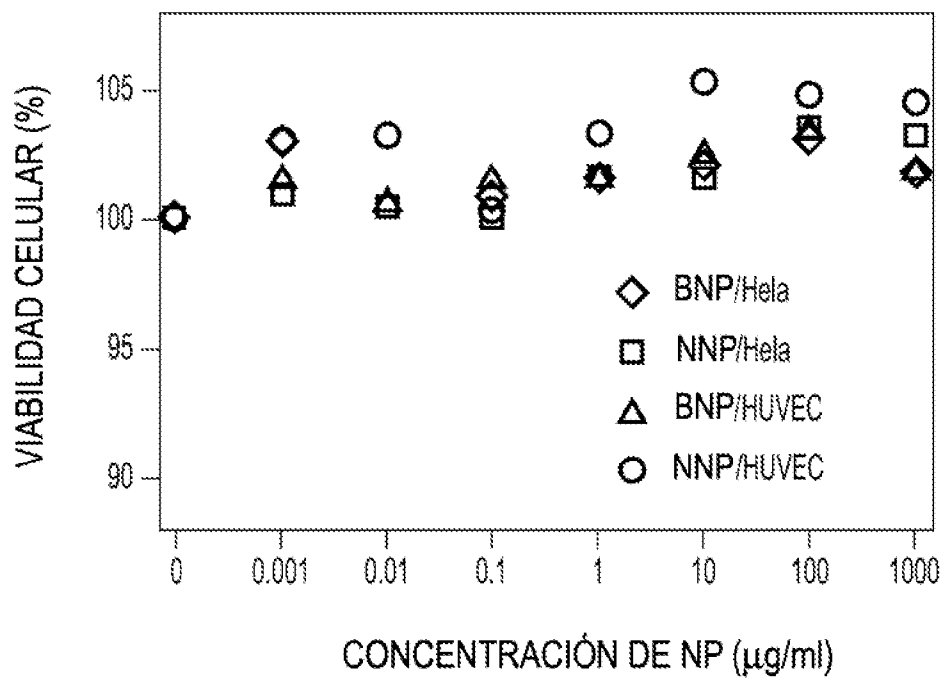


FIG. 11D

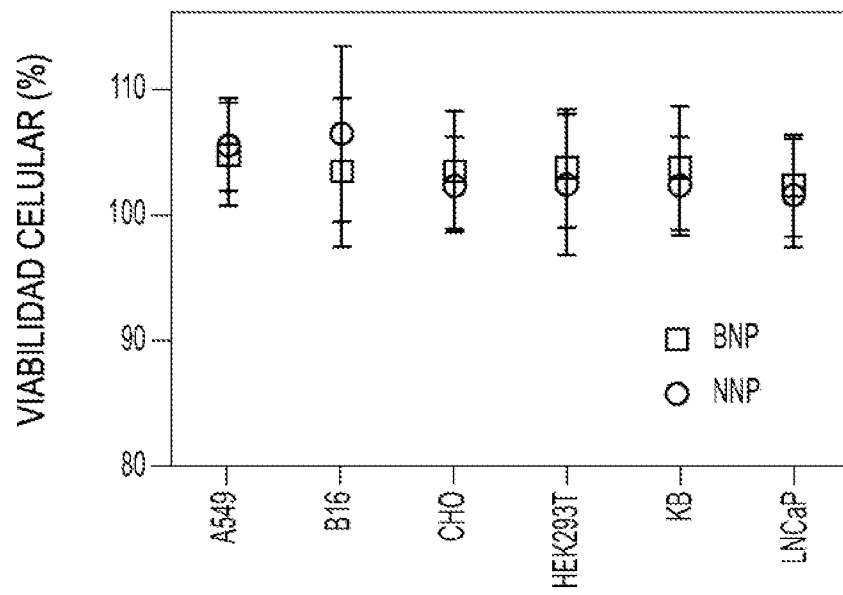


FIG. 11E

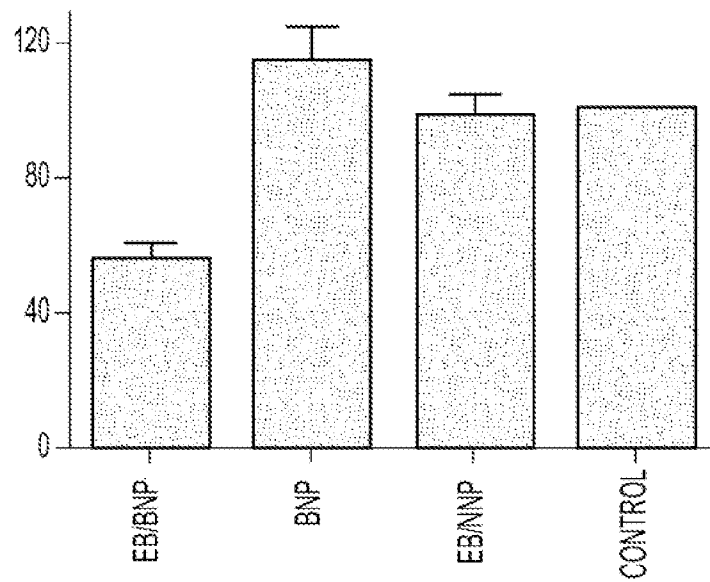


FIG. 12

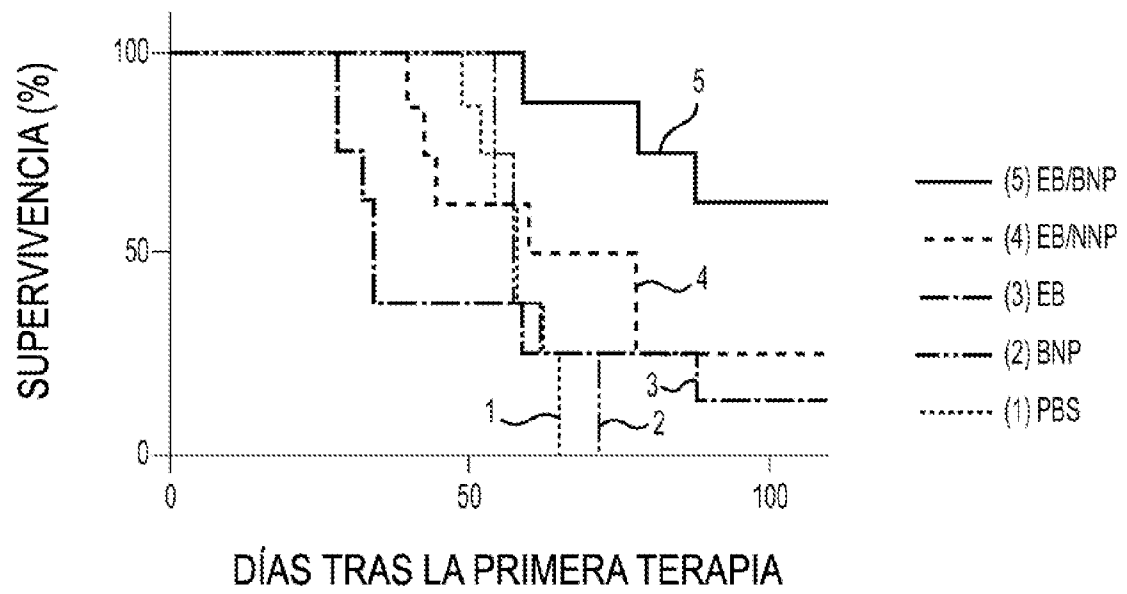


FIG. 13