

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 158**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2015** **E 20204014 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024** **EP 3834823**

54 Título: **Métodos y composiciones relacionadas con el uso de tensioactivos de HLB bajo en la producción de nanosportes sintéticos que comprenden un rapalogo**

30 Prioridad:

05.11.2014 US 201462075864 P

05.11.2014 US 201462075866 P

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

20.08.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 977 158 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones relacionadas con el uso de tensioactivos de HLB bajo en la producción de nanosopores sintéticos que comprenden un rapalogo

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere a nanosopores sintéticos, y a composiciones y métodos relacionados, que comprenden un material de soporte hidrófobo, un rapalogo y un tensioactivo no iónico con un valor de balance hidrófilo-lipófilo (HLB) menor o igual a 10.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan aquí nanosopores sintéticos que pueden inhibir o reducir la respuesta inmunitaria a un antígeno, tal como un antígeno coadministrado. Los nanosopores sintéticos comprenden un material de soporte hidrófobo, un rapalogo, y un tensioactivo no iónico con un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) menor o igual a 10. Se ha descubierto sorprendentemente que el uso de tal tensioactivo no iónico en la formulación durante la formación de nanosopores sintéticos puede dar como resultado nanosopores sintéticos con estabilidad y rendimiento mejorados.

En un aspecto, se proporciona una composición que comprende nanosopores sintéticos que comprenden un material de soporte hidrófobo, un rapalogo, y un tensioactivo no iónico con un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) menor o igual a 10; opcionalmente en el que la composición es inicialmente filtrable de manera estéril a través de un filtro de 0,22 μm . En una realización, la cantidad de tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es $\geq 0,01$ pero ≤ 20 % en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/peso de material de soporte hidrófobo.

En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, los pesos son los pesos de receta de los materiales que se combinan durante la formulación de los nanosopores sintéticos. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, los pesos son los pesos de los materiales en la composición de nanosopores sintéticos resultante. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, los pesos son los pesos de receta de los materiales que se combinan durante la formulación de los nanosopores sintéticos. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, los pesos son los pesos de los materiales en la composición de nanosopores sintéticos resultante.

En otro aspecto, se proporciona un kit que comprende una cualquiera de las composiciones proporcionadas aquí. En una realización de uno cualquiera de los kits proporcionados, la composición es para uso en uno cualquiera de los métodos proporcionados aquí.

En otro aspecto, se proporciona un método para producir nanosopores sintéticos que comprenden un tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 y un rapalogo, que comprende obtener o proporcionar un material de soporte hidrófobo, obtener o proporcionar un tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10, obtener o proporcionar un rapalogo, y combinar el material de soporte hidrófobo, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 y el rapalogo para formar nanosopores sintéticos. En una realización, la cantidad de tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 en los nanosopores sintéticos es $\geq 0,01$ pero ≤ 20 % en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/material de soporte hidrófobo. En una realización de uno cualquiera de los métodos de producción proporcionados aquí, el método comprende además disolver el material de soporte hidrófobo, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 y el rapalogo en un disolvente, obtener o proporcionar otro tensioactivo, que forma una primera y después una segunda emulsión de Ac/Ag con el material de soporte hidrófobo, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 y el rapalogo disueltos, y otro tensioactivo, mezclar la primera y segunda emulsiones de Ac/Ag, y permitir que el disolvente se evapore. En una realización de uno cualquiera de los métodos de producción proporcionados aquí, el disolvente es diclorometano, acetato de etilo, cloroformo, o carbonato de propileno. En una realización de uno cualquiera de los métodos de producción proporcionados aquí, el método comprende además filtrar la composición resultante. En una realización de uno cualquiera de los métodos de producción proporcionados aquí, la filtración comprende filtrar a través de un filtro de 0,22 μm .

En otro aspecto, se proporciona una composición producida por uno cualquiera de los métodos de producción proporcionados aquí. El método de producción puede ser uno cualquiera de los métodos de producción proporcionados, tal como uno de los métodos ilustrados en los Ejemplos.

En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la composición de nanosopores sintéticos es inicialmente filtrable de forma estéril a través de un filtro de 0,22 μm .

En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es un tensioactivo no iónico con valor de HLB menor que 10. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el tensioactivo no iónico con valor de HLB

- menor o igual a 10 es un tensioactivo no iónico con valor de HLB menor que 9. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es un tensioactivo no iónico con valor de HLB menor que 8. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es un tensioactivo no iónico con valor de HLB menor que 7. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es un tensioactivo no iónico con valor de HLB menor que 6. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es un tensioactivo no iónico con valor de HLB menor que 5.
- En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 comprende un éster de sorbitán, alcohol graso, éster de ácido graso, alcohol graso etoxilado, poloxámero, o un ácido graso. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 comprende SPAN 40, SPAN 20, alcohol oleílico, alcohol estearílico, palmitato de isopropilo, monoestearato de glicerol, BRIJ 52, BRIJ 93, Pluronic P-123, Pluronic L-31, ácido palmítico, ácido dodecanoico, tripalmitato de glicerilo, o trilinoleato de glicerilo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es SPAN 40.
- En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 está encapsulado en los nanosportes sintéticos, está presente en la superficie de los nanosportes sintéticos, o ambos.
- En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la cantidad de tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es $\geq 0,1$ pero ≤ 15 % en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/material de soporte hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la cantidad de tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es ≥ 1 pero ≤ 13 % en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/material de soporte hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la cantidad de tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es ≥ 1 pero ≤ 9 % en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/material de soporte hidrófobo.
- En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el material de soporte hidrófobo comprende uno o más polímeros hidrófobos o lípidos. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el material de soporte hidrófobo comprende uno o más polímeros hidrófobos, y en los que el uno o más polímeros hidrófobos comprenden un poliéster. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el poliéster comprende PLA, PLG, PLGA, o policaprolactona. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el material de soporte hidrófobo comprende, o comprende además, PLA-PEG, PLGA-PEG, o PCL-PEG.
- En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la cantidad de material de soporte hidrófobo en los nanosportes sintéticos es 5-95 % en peso de material de soporte hidrófobo/sólidos totales. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la cantidad de material de soporte hidrófobo en los nanosportes sintéticos es 60-95 % en peso de material de soporte hidrófobo/sólidos totales.
- En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la cantidad de rapalogo es ≥ 6 pero ≤ 50 % en peso de rapalogo/material de soporte hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la cantidad de rapalogo es ≥ 7 pero ≤ 30 % en peso de rapalogo/material de soporte hidrófobo. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la cantidad de rapalogo es ≥ 8 pero ≤ 24 % en peso de rapalogo/material de soporte hidrófobo.
- En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el rapalogo está encapsulado en los nanosportes sintéticos.
- En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el rapalogo es rapamicina.
- En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la composición comprende además un antígeno.
- En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el antígeno se mezcla con los nanosportes sintéticos en la composición.
- En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la media de una distribución de tamaños de partículas obtenida usando dispersión dinámica de luz de los nanosportes sintéticos es un diámetro mayor que 120 nm. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados

aquí, el diámetro es mayor que 150 nm. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el diámetro es mayor que 200 nm. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el diámetro es mayor que 250 nm. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el diámetro es menor que 300 nm. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el diámetro es menor que 250 nm. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, el diámetro es menor que 200 nm.

En una realización de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados aquí, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados, en los que el rapalogo es rapamicina, el material de soporte hidrófobo comprende PLA o PLGA y PLA-PEG, y el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es monopalmitato de sorbitán, el diámetro de los nanosoposites sintéticos es como se proporciona en una cualquiera de las composiciones proporcionadas aquí, tal como una cualquiera de las composiciones de los Ejemplos. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados, en los que el rapalogo es rapamicina, el material de soporte hidrófobo comprende PLA o PLGA y PLA-PEG, y el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es monopalmitato de sorbitán, el diámetro de los nanosoposites sintéticos y/o el % en peso de la rapamicina es como se proporciona en una cualquiera de las composiciones proporcionadas aquí, tal como una cualquiera de las composiciones de los Ejemplos. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados, en los que el rapalogo es rapamicina, el material de soporte hidrófobo comprende PLA o PLGA y PLA-PEG, y el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es monopalmitato de sorbitán, el diámetro de los nanosoposites sintéticos es como se proporciona en una cualquiera de las composiciones proporcionadas aquí, tal como una cualquiera de las composiciones de los Ejemplos, y/o el % en peso de la rapamicina es como se proporciona en una cualquiera de las composiciones proporcionadas aquí, tal como una cualquiera de las composiciones de los Ejemplos, y/o la cantidad del o de los polímeros es como se proporciona en una cualquiera de las composiciones proporcionadas aquí, tal como una cualquiera de las composiciones de los Ejemplos. En una realización de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados, en los que el rapalogo es rapamicina, el material de soporte hidrófobo comprende PLA o PLGA y PLA-PEG, y el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es monopalmitato de sorbitán, el diámetro de los nanosoposites sintéticos es como se proporciona en una cualquiera de las composiciones proporcionadas aquí, tal como una cualquiera de las composiciones de los Ejemplos, y/o el % en peso de la rapamicina es como se proporciona en una cualquiera de las composiciones proporcionadas aquí, tal como una cualquiera de las composiciones de los Ejemplos, y/o la cantidad del o de los polímeros es como se proporciona en una cualquiera de las composiciones proporcionadas aquí, tal como una cualquiera de las composiciones de los Ejemplos, y/o la cantidad de monopalmitato de sorbitán es como se proporciona en una cualquiera de las composiciones proporcionadas aquí, tal como una cualquiera de las composiciones de los Ejemplos.

En otro aspecto, se proporciona una cualquiera de las composiciones proporcionadas aquí, tal como una cualquiera de las composiciones de los Ejemplos.

En otro aspecto, se proporciona un método de fabricación de una cualquiera de las composiciones proporcionadas aquí. En una realización, el método de fabricación comprende las etapas de uno cualquiera de los métodos proporcionados aquí, tales como las etapas de una cualquiera de los métodos proporcionados en los Ejemplos.

En otro aspecto, se proporciona un uso de una cualquiera de las composiciones o kits proporcionados aquí para la fabricación de un medicamento para promover la tolerancia inmunitaria en un sujeto. En otra realización de uno cualquiera de los usos proporcionados aquí, el uso es para lograr uno cualquiera de los métodos proporcionados aquí.

En otro aspecto, uno cualquiera de la composición o kits proporcionados aquí se puede usar en uno cualquiera de los métodos proporcionados aquí.

En otro aspecto, se proporciona un método de fabricación de un medicamento destinado a promover la tolerancia inmunitaria. En una realización, el medicamento comprende una cualquiera de las composiciones proporcionadas aquí.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 muestra los resultados que demuestran la capacidad del nanosoposite y KLH (hemocianina de lapa californiana) coadministrados con rapamicina (RAPA) para inducir tolerancia. Se analizaron los sueros de los ratones para determinar los anticuerpos contra KLH después de cada exposición a KLH.

La Fig. 2 muestra resultados que demuestran la reducción duradera de títulos de anticuerpos con nanosoposites con tensioactivos de HLB bajo. El acrónimo "tSIP" se refiere a los nanosoposites como se describen.

La Fig. 3 muestra resultados que demuestran la eficacia del nanosoposite sintético+KLH en comparación con la rapamicina libre+KLH en ratones. Títulos de anticuerpos CE50 del anti-KLH en el día 35 y 42 (después de

2 o 3 exposiciones a KLH sola) para ratones tratados o no con nanosoporte sintético+KLH (los símbolos representan la media geométrica $\pm$ IC del 95%). El acrónimo "NC" se refiere a nanosportes como se describen.

5 La Fig. 4 muestra los protocolos de tratamiento para el Ejemplo 7. El acrónimo "NC" se refiere a nanosportes como se describen.

10 La Fig. 5 muestra la especificidad del nanosoporte sintético+antígeno KLH en ratones. Títulos de anticuerpos CE50 anti-OVA en el día 65 para ratones tratados o no con nanosoporte sintético+KLH (las barras representan la media geométrica $\pm$ IC del 95%). El acrónimo "NC" se refiere a nanosportes como se describen.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a materiales o parámetros de procedimiento particularmente ejemplificados, ya que tales, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada aquí tiene el propósito únicamente de describir realizaciones particulares de la invención, y no pretende limitar el uso de terminología alternativa para describir la presente invención.

20 Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "un polímero" incluye una mezcla de dos o más de tales moléculas, o una mezcla de diferentes pesos moleculares de una única especie de polímero; la referencia a "un nanosoporte sintético" incluye una mezcla de dos o más de tales nanosportes sintéticos, o una pluralidad de tales nanosportes sintéticos, y similares.

25 Como se usa aquí, el término "comprender", o variaciones del mismo tales como "comprende" o "que comprende", deben leerse para indicar la inclusión de cualquier número entero mencionado (por ejemplo, un aspecto, elemento, característica, propiedad, etapa o limitación del método/procedimiento) o grupo de números enteros (por ejemplo, aspectos, elementos, características, propiedades, etapas o limitaciones del método/procedimiento) pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros. Por lo tanto, como se usa aquí, el término "que comprende" es inclusivo, y no excluye números enteros o etapas del método/procedimiento adicionales no citados.

30 En realizaciones de una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados aquí, "que comprende" se puede reemplazar por "que consiste esencialmente en" o "que consiste en". La frase "que consiste esencialmente en" se usa aquí para requerir el o los números enteros o etapas especificados, así como aquellos que no afectan materialmente al carácter o la función de la invención reivindicada. Como se usa aquí, la expresión "que consiste" se usa para indicar la presencia sola del número entero (por ejemplo, una aspecto, elemento, característica, propiedad, etapa o limitación del método/procedimiento) o grupo de números enteros (por ejemplo, aspectos, elementos, características, propiedades, etapas o limitaciones del método/procedimiento) mencionados.

40 A. INTRODUCCIÓN

Se ha encontrado que los nanosportes sintéticos que comprenden material de soporte hidrófobo en combinación con un rapalogo, tal como rapamicina, pueden ser inicialmente difíciles de filtrar de forma estéril a través de un filtro de 0,22 μ m. El uso de tal filtro en la producción de nanosportes sintéticos es importante, ya que los filtros pueden eliminar bacterias a un nivel deseable y dar como resultado una composición que es más estéril, una característica beneficiosa para las composiciones usadas para la administración *in vivo*. Sorprendentemente, debido a la naturaleza de los dos componentes hidrófobos de tales nanosportes sintéticos, se ha descubierto que la incorporación de un tensioactivo no iónico, tal como monopalmitato de sorbitán, en los nanosportes sintéticos puede dar como resultado nanosportes sintéticos con mejor filtrabilidad y, en algunas realizaciones, mejor carga de rapalogo, y por lo tanto eficacia cuando se administra a un sujeto. Por consiguiente, se ha encontrado que el uso de tensioactivos no iónicos con un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) menor o igual a 10 puede permitir una carga más eficaz de un rapalogo, preferiblemente uno hidrófobo, a la vez que también mejora la filtrabilidad esterilizante.

55 Como se muestra en los Ejemplos, una serie de tales tensioactivos aumentaron el rendimiento de las formulaciones de nanosportes sintéticos cuando se hacen pasar inicialmente a través de un filtro de 0,22 μ m. También se encontró que los nanosportes sintéticos con tales tensioactivos proporcionaron cargas más altas de rapalogo, tal como rapalogo hidrófobo, que podían proporcionar tolerancia duradera específica del antígeno en sujetos. Aunque el uso de tensioactivos de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) mayor es típico para la suspensión o disolución de agentes hidrófobos en disolventes, la introducción de tales agentes en la fase soluble en aceite durante la formulación del nanosoporte puede no respaldar la fabricación optimizada de alta carga de rapalogo, tal como rapalogo hidrófobo, en nanosportes. Más bien, los tensioactivos no iónicos con $HLB \leq 10$, tales como monopalmitato de sorbitán (SPAN 40) (HLB 6,7), representan una clase de tensioactivos que ayudan a dicha optimización.

65 Por consiguiente, se proporcionan composiciones, y métodos relacionados con los mismos, de nanosportes sintéticos que comprenden un material de soporte hidrófobo, un rapalogo, preferiblemente uno hidrófobo, y un tensioactivo no iónico con un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) menor o igual a 10. Tales composiciones pueden presentar una

mejor filtrabilidad esterilizante inicial y, en algunas realizaciones, mejor carga y rendimiento del rapalogo, tal como rapalogo hidrófobo, y se pueden usar en métodos para reducir la activación indeseada del sistema inmunitario específico del antígeno y/o para promover la tolerancia específica del antígeno.

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

B. DEFINICIONES

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

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

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

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

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

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

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

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

65 "Promedio", como se usa aquí, se refiere a la media aritmética a menos que se indique lo contrario.

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

"Material de soporte hidrófobo" se refiere a cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable que puede suministrar una o más moléculas (por ejemplo, un rapalogo y un tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10) y que tiene características hidrófobas. Tales materiales incluyen materiales que pueden formar un nanosoporte sintético o una parte del mismo, y que pueden incluir o estar cargados con una o más moléculas (por ejemplo, un rapalogo y un tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10). Generalmente, los materiales de soporte pueden permitir el suministro de una o más moléculas (por ejemplo, un rapalogo y un tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10) a un sitio diana o célula diana, la liberación controlada de uno o más moléculas, y otras actividades deseadas. Los ejemplos de materiales de soporte hidrófobos incluyen, sin limitación, materiales que se pueden usar para formar nanosoportes sintéticos y que comprenden componentes hidrófobos, tales como polímeros hidrófobos, tales como poliésteres, o lípidos. "Hidrófobo" se refiere a un material que no participa sustancialmente en la formación de enlace de hidrógeno con el agua. Tales materiales son generalmente no polares, principalmente no polares, o de carga neutra. Un material de soporte adecuado para las composiciones descritas aquí se puede seleccionar basándose en que presente hidrofobia en algún nivel. Los materiales de soporte hidrófobos, por lo tanto, son aquellos que son hidrófobos en general y pueden estar compuestos completamente por componentes hidrófobos, tales como polímeros hidrófobos o lípidos. En algunas realizaciones, sin embargo, los materiales de soporte hidrófobos son hidrófobos en general y comprenden componentes hidrófobos, tales como polímeros hidrófobos o lípidos, en combinación con componentes no hidrófobos.

"Inicialmente filtrable de forma estéril" se refiere a una composición de nanosoportes sintéticos que no se ha filtrado previamente pero que se puede filtrar a través de un filtro, tal como un filtro de 0,22 μm , con una producción de al menos 50 gramos de nanosoporte/ m^2 de área superficial de la membrana del filtro. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la producción se determina tomando un volumen de 9 ml de suspensión de nanosoportes sintéticos y poniéndolo en una jeringa de 10 ml con uno cualquiera de los filtros proporcionados aquí. La suspensión de nanosoportes sintéticos se empuja entonces a través del filtro hasta que no pasan más materiales de suspensión a través del filtro. Después, la producción se puede calcular en función del material que se empujó a través del filtro y el material de suspensión que queda en la jeringa. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la composición inicialmente filtrable de forma estéril no es estéril y/o no es adecuada para la administración *in vivo* (es decir, no es sustancialmente pura, y comprende componentes solubles que son muy poco deseables para la administración *in vivo*). En otras realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la composición inicialmente filtrable de forma estéril comprende nanosoportes sintéticos que se han producido pero que no se han procesado adicionalmente para producir un material de calidad clínica. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la composición inicialmente filtrable de forma estéril no se ha filtrado previamente pero se puede filtrar a través de un filtro, tal como un filtro de 0,22 μm , con una producción de al menos 60, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 160, 200, 250, 300, 350, 500, 750, 1000 o 1500 gramos de nanosoporte/ m^2 de área superficial de la membrana del filtro. El filtro de 0,22 μm puede ser cualquier filtro con un tamaño de poros de 0,22 μm . Tales filtros pueden estar hechos de una variedad de materiales, tales como polietilensulfona, poli(fluoruro de vinilideno), ésteres de celulosa mixtos, acetato de celulosa sin disolventes, celulosa regenerada, nailon, etc. Los ejemplos específicos de filtros incluyen Millipore SLGPM33R, Millipore SLGVM33RS, Millipore SLGSM33SS, Sartorius 16534, Sartorius 17764, Sartorius 17845, etc.

"Dimensión máxima de un nanosoporte sintético" significa la dimensión más grande de un nanosoporte medida a lo largo de cualquier eje del nanosoporte sintético. "Dimensión mínima de un nanosoporte sintético" significa la dimensión más pequeña de un nanosoporte sintético medida a lo largo de cualquier eje del nanosoporte sintético. Por ejemplo, para un nanosoporte sintético esférico, la dimensión máxima y mínima de un nanosoporte sintético sería sustancialmente idéntica, y sería el tamaño de su diámetro. De manera similar, para un nanosoporte sintético cuboidal, la dimensión mínima de un nanosoporte sintético sería la más pequeña de su altura, anchura o longitud, mientras que la dimensión máxima de un nanosoporte sintético sería la mayor de su altura, anchura o longitud. En una realización, una dimensión mínima de al menos 75 %, preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 90 % de los nanosoportes sintéticos en una muestra, en base al número total de nanosoportes sintéticos en la muestra, es igual o mayor que 100 nm. En una realización, una dimensión máxima de al menos 75 %, preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 90 % de los nanosoportes sintéticos en una muestra, en base al número total de nanosoportes sintéticos en la muestra, es igual o menor que 5 μm . Preferiblemente, una dimensión mínima de al menos 75 %, preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 90 % de los nanosoportes sintéticos en una muestra, en base al número total de nanosoportes sintéticos en la muestra, es mayor que 110 nm, más preferiblemente mayor que 120 nm, más preferiblemente mayor que 130 nm, y más preferiblemente aún mayor que

150 nm. La relación de aspectos de las dimensiones máxima y mínima de los nanosoposites sintéticos puede variar dependiendo de la realización. Por ejemplo, la relación de aspecto de las dimensiones máxima y mínima de los nanosoposites sintéticos puede variar de 1:1 a 1.000.000:1, preferiblemente de 1:1 a 100.000:1, más preferiblemente de 1:1 a 10.000:1, más preferiblemente de 1:1 a 1000:1, aún más preferiblemente de 1:1 a 100:1, y todavía más preferiblemente de 1:1 a 10:1.

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

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

El HLB de uno cualquiera de los tensioactivos proporcionados aquí se puede calcular usando el método de Griffin o el método de Davie. Por ejemplo, usando el método de Griffin, el HLB de un tensioactivo es el producto de 20 multiplicado por la masa molecular de la parte hidrófila del tensioactivo dividida entre la masa molecular de todo el tensioactivo. El valor de HLB está en una escala de 0 a 20, en la que 0 corresponde a una molécula completamente hidrófoba (lipófila) y 20 corresponde a una molécula completamente hidrófila (lipófila). En algunas realizaciones, el HLB del tensioactivo de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 (por ejemplo, determinado por el método de Griffin o de Davie). Los ejemplos de tales tensioactivos para uso en una cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados aquí incluyen, sin limitación, ésteres de sorbitán, tales como SPAN 40, SPAN 20; alcoholes grasos, tales como alcohol oleílico, alcohol estearílico; ésteres de ácidos grasos, tales como palmitato de isopropilo, monoestearato de glicerilo; alcoholes grasos etoxilados, tales como BRIJ 52, BRIJ 93; poloxámeros, tales como Pluronic P-123, Pluronic L-31; ácidos grasos, tales como ácido palmítico, ácido dodecanoico; triglicéridos, tales como tripalmitato de glicerilo, trilinoleato de glicerilo; colesterol; derivados del colesterol, tales como colesteryl-sulfato de sodio, dodecanoato de colesteryl; y sales o ácidos biliares, tales como ácido litocólico, litocolato de sodio. Otros ejemplos de dichos tensioactivos incluyen monoestearato de sorbitán (SPAN 60), triestearato de sorbitán (SPAN 65), monooleato de sorbitán (SPAN 80), sesquioleato de sorbitán (SPAN 83), trioleato de sorbitán (SPAN 85), sesquioleato de sorbitán (Arlacel 83), dipalmitato de sorbitán, mono- y diglicéridos de ácidos grasos, trioleato de sorbitán polioxietilenado (Tween 85), hexaoleato de sorbitán polioxietilenado (G 1086), monoisoestearato de sorbitán (Montane 70), alcoholes polioxietilenados, polioxietilenglicol alquil éteres, polioxietilenglicol (2) oleil éter (BRIJ 93), polioxietilenglicol cetil éter (BRIJ 52), polioxietilenglicol dodecil éter (BRIJ L4); 1-monotetradecanoil-rac-glicerol; monoestearato de glicerilo; monopalmitato de glicerilo; etilendiamina tetraquis tetrol (Tetronic 90R4, Tetronic 701), polioxietilenglicol (5) nonilfenil éter (IGEPAL CA-520), tensioactivo MERPOL A, tensioactivo MERPOL SE, y hexaoleato de poli(etilenglicol)sorbitol. Otros ejemplos también serán evidentes para un experto en la técnica.

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

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

"Rapalogo" se refiere a rapamicina y moléculas que están estructuralmente relacionadas con (un análogo de) la rapamicina (sirolimus), y son preferiblemente hidrófobas. Los ejemplos de rapalogos incluyen, sin limitación, temsirolimus (CCI-779), deforolimus, everolimus (RAD001), ridaforolimus (AP-23573), zotarolimus (ABT-578). Se pueden encontrar ejemplos adicionales de rapalogos, por ejemplo, en la publicación WO WO 1998/002441 y la patente de EE. UU. núm. 8.455.510, cuya descripción de rapalogos se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

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

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

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

"Nanosoporte(s) sintético(s)" significa un objeto discreto que no se encuentra en la naturaleza, y que tiene al menos una dimensión que es menor o igual a 5 micrómetros de tamaño. Como se proporciona aquí, los nanosopores sintéticos comprenden un material de soporte hidrófobo. Por consiguiente, un nanosoporte sintético puede ser, pero no se limita a, nanosopores sintéticos que comprenden nanopartículas poliméricas hidrófobas así como nanopartículas basadas en lípidos. Los nanosopores sintéticos pueden tener una variedad de formas diferentes, que incluyen, pero no se limitan a, esferoidales, cuboidales, piramidales, oblongas, cilíndricas, toroidales, y similares. Los nanosopores sintéticos según la invención comprenden una o más superficies. En realizaciones, los nanosopores sintéticos pueden tener una relación de aspecto mayor que 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, o mayor que 1:10.

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

"Sólidos totales" se refiere al peso total de todos los componentes contenidos en una composición o suspensión de nanosopores sintéticos. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la cantidad de sólidos totales se determina como la masa total de nanosopores secos por ml de suspensión. Esta se puede determinar por un método gravimétrico.

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

C. COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADOS

Se proporcionan aquí composiciones de nanosopores sintéticos con mejor filtrabilidad estéril inicial y, en algunas realizaciones, mejor carga de rapalogo y, por lo tanto, eficacia cuando se administran a un sujeto. Tales nanosopores sintéticos comprenden un material de soporte hidrófobo así como un rapalogo, que es preferiblemente hidrófobo. Sorprendentemente, se encontró que una cierta clase de tensioactivos, tensioactivos no iónicos con un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) menor o igual a 10, eran capaces de permitir una mejor filtrabilidad estéril inicial y, en

algunas realizaciones, cargas de rapalogos más eficaces en nanosopores sintéticos. Como se muestra en los Ejemplos, se encontró una mayor producción de composiciones de nanosopores sintéticos, cuando se hicieron pasar inicialmente a través de un filtro de 0,22 μm , cuando se incorporaron tensioactivos, como SPAN 40, en las composiciones de nanosopores sintéticos. Como también se muestra en los Ejemplos, una serie de tales nanosopores sintéticos formulados con un tensioactivo no iónico con un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) menor o igual a 10 también pudieron proporcionar tolerancia duradera específica del antígeno en sujetos.

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

También se han determinado las cantidades optimizadas del material de soporte hidrófobo en las composiciones de nanosopores sintéticos. Preferiblemente, en algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la cantidad de material de soporte hidrófobo en la composición de nanosopores sintéticos es 5-95 % en peso de material de soporte hidrófobo/sólidos totales. En otras realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la cantidad de material de soporte hidrófobo en los nanosopores sintéticos es 10-95, 15-90, 20-90, 25-90, 30-80, 30-70, 30-60, 30-50, etc., % en peso de material de soporte hidrófobo/sólidos totales. En todavía otras realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, la cantidad de materiales de soporte hidrófobos en los nanosopores sintéticos es 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % en peso de material de soporte hidrófobo/sólidos totales.

Además, la cantidad de rapalogo, tal como rapamicina, en los nanosopores sintéticos también se puede optimizar. Preferiblemente, tales cantidades pueden producir resultados eficaces (por ejemplo, tolerancia duradera específica del antígeno) cuando los nanosopores sintéticos se administran a un sujeto. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, los nanosopores sintéticos comprenden ≥ 6 pero ≤ 50 % en peso de rapalogo/material de soporte hidrófobo. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, los nanosopores sintéticos comprenden ≥ 6 pero ≤ 45 , ≥ 6 pero ≤ 40 , ≥ 6 pero ≤ 35 , ≥ 6 pero ≤ 30 , ≥ 6 pero ≤ 25 , ≥ 6 pero ≤ 20 , ≥ 6 pero ≤ 15 % en peso de rapalogo/material de soporte hidrófobo. En otras realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, los nanosopores sintéticos comprenden ≥ 7 pero ≤ 45 , ≥ 7 pero ≤ 40 , ≥ 7 pero ≤ 35 , ≥ 7 pero ≤ 30 , ≥ 7 pero ≤ 25 , ≥ 7 pero ≤ 20 , ≥ 7 pero ≤ 15 % en peso de rapalogo/material de soporte hidrófobo. En todavía otras realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, los nanosopores sintéticos comprenden ≥ 8 pero ≤ 24 % en peso de rapalogo/material de soporte hidrófobo. En algunas realizaciones de una cualquiera de las composiciones o métodos proporcionados aquí, los nanosopores sintéticos comprenden 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 27, 30, 35, 45 % en peso o más de rapalogo/material de soporte hidrófobo.

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

Los nanosopos sintéticos como se proporcionan aquí comprenden materiales de soporte hidrófobos, tales como polímeros hidrófobos o lípidos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los nanosopos sintéticos proporcionados aquí comprenden uno o más lípidos. En algunas realizaciones, un nanosopo sintético puede comprender una bicapa lipídica. En algunas realizaciones, un nanosopo sintético puede comprender un núcleo que comprende una matriz polimérica rodeada por una capa lipídica (por ejemplo, bicapa lipídica, monocapa lipídica, etc.). Otros materiales de soporte hidrófobos incluyen lípidos (sintéticos y naturales), conjugados lípido-polímero, conjugados lípido-proteína, y aceites reticulables, ceras, grasas, etc. Ejemplos adicionales de materiales lipídicos para uso como materiales de soporte hidrófobos como se proporciona aquí se pueden encontrar, por ejemplo, en la publicación PCT núm. WO2000/006120 y WO2013/056132, incorporándose aquí las descripciones de tales materiales como referencia en su totalidad.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, los nanosopos sintéticos proporcionados aquí pueden ser liposomas. Los liposomas se pueden producir por métodos convencionales tales como los dados a conocer por Kim et al. (1983, Biochim. Biophys. Acta 728, 339-348); Liu et al. (1992, Biochim. Biophys. Acta 1104, 95-101); Lee et al. (1992, Biochim. Biophys. Acta. 1103, 185-197); Brey et al. (Pub. de Sol. de Pat. de EE. UU. 20020041861), Hass et al. (Pub. de Sol. de Pat. de EE. UU. 20050232984), Kisek et al. (Pub. de Sol. de Pat. de EE. UU. 20050260260) y Smyth-Templeton et al. (Pub. de Sol. de Pat. de EE. UU. 20060204566), la descripción de tales liposomas y métodos para su producción se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

El material de soporte hidrófobo como se proporciona aquí comprende uno o más polímeros hidrófobos o unidades de los mismos. Sin embargo, en algunas realizaciones, aunque el material de soporte hidrófobo es hidrófobo en general, el material de soporte hidrófobo también puede comprender polímeros o unidades de los mismos que no son hidrófobos.

Por consiguiente, el material de soporte hidrófobo como se proporciona aquí puede comprender poliésteres, tales como poliésteres hidrófobos. Los poliésteres incluyen copolímeros que comprenden unidades de ácido láctico y ácido glicólico, tales como poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) y poli(lactida-co-glicolida), denominados colectivamente aquí "PLGA"; y homopolímeros que comprenden unidades de ácido glicólico, denominados aquí "PGA", y unidades de ácido láctico, tales como poli-ácido L-láctico, poli-ácido D-láctico, poli-ácido D,L-láctico, poli-L-lactida, poli-D-lactida, y poli-D,L-lactida, denominados colectivamente aquí como "PLA". En algunas realizaciones, los poliésteres ejemplares incluyen, por ejemplo, polihidroxiácidos; copolímeros de PEG y copolímeros de lactida y glicolida (por ejemplo, copolímeros de PLA-PEG, copolímeros de PGA-PEG, copolímeros de PLGA-PEG, y derivados de los mismos. En algunas realizaciones, los poliésteres incluyen, por ejemplo, poli(caprolactona), copolímeros de poli(caprolactona)-PEG, poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster de serina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina), poli[ácido α -(4-aminobutil)-L-glicólico], y derivados de los mismos.

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

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

no tiene extremos que terminen con metoxi. "Polímero plurónico no terminado en metoxi" significa un polímero distinto de un polímero plurónico lineal con metoxi en ambos extremos.

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

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

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

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

En algunas realizaciones, los polímeros del material de soporte hidrófobo se pueden asociar para formar una matriz polimérica. Se conocen convencionalmente una amplia variedad de polímeros y métodos para formar matrices poliméricas a partir de ellos. En algunas realizaciones, un nanosoporte sintético que comprende una matriz polimérica hidrófoba genera un entorno hidrófobo dentro del nanosoporte sintético.

En algunas realizaciones, los polímeros se pueden modificar con uno o más restos y/o grupos funcionales. Se puede usar una variedad de restos o grupos funcionales según la presente invención. En algunas realizaciones, los polímeros se pueden modificar con polietilenglicol (PEG), con un hidrato de carbono, y/o con poliacetales acíclicos derivados de polisacáridos (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). Se pueden hacer ciertas realizaciones usando las enseñanzas generales de la patente de EE. UU. núm. 5543158 de Gref et al., o la publicación WO WO2009/051837 de Von Andrian et al.

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

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

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

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser polímeros lineales o ramificados. En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser dendrímeros. En algunas realizaciones, los polímeros se pueden reticular sustancialmente entre sí. En algunas realizaciones, los polímeros pueden estar sustancialmente exentos de reticulaciones. En algunas realizaciones, se pueden usar polímeros según la presente invención sin someterse a una etapa de reticulación. Además, debe entenderse que los nanosportes sintéticos pueden comprender copolímeros de bloques, copolímeros de injerto, combinaciones, mezclas y/o aductos de cualquiera de los polímeros anteriores y otros. Los expertos en la

técnica reconocerán que los polímeros enumerados aquí representan una lista ilustrativa, no completa, de polímeros que pueden ser útiles según la presente invención siempre que cumplan los criterios deseados.

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

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

En algunas realizaciones, es deseable usar una población de nanosportes sintéticos que sea relativamente uniforme en términos de tamaño o forma, de modo que cada nanosporte sintético tenga propiedades similares. Por ejemplo, al menos 80 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de los nanosportes sintéticos, en base al número total de nanosportes sintéticos, pueden tener una dimensión mínima o dimensión máxima que se encuentra dentro del 5 %, 10 % o 20 % del diámetro promedio o dimensión promedio de los nanosportes sintéticos.

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

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

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

Los nanosportes sintéticos se pueden preparar usando una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los nanosportes sintéticos se pueden formar por métodos tales como nanoprecipitación, enfoque de flujo usando canales fluídicos, secado por pulverización, evaporación de disolvente de emulsión simple y doble, extracción de disolvente, separación de fases, molienda (incluyendo criomolienda), procesamiento de fluido supercrítico (tal como dióxido de carbono supercrítico), procedimientos de microemulsión, microfabricación, nanofabricación, capas de sacrificio, coacervación simple y compleja, y otros métodos bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Alternativa o adicionalmente, se han descrito síntesis en disolventes acuosos y orgánicos para nanomateriales monodispersos semiconductores, conductores, magnéticos, orgánicos y otros (Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Sci., 30:545; y Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843). Se han descrito métodos adicionales en la bibliografía (véase, por ejemplo, Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; y Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755; patentes de EE. UU. 5578325 y 6007845; P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)).

Diversos materiales se pueden encapsular en nanosportes sintéticos según sea conveniente usando una variedad de métodos que incluyen, pero no se limitan a, C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, No. 3, págs. 247-289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery" Current Drug Delivery 1:321-333 (2004); C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" Nanomedicine 2:8- 21 (2006); P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can

Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010). Se pueden usar otros métodos adecuados para encapsular materiales en nanosopores sintéticos, incluyendo sin limitación métodos descritos en la patente de Estados Unidos 6.632.671 de Unger expedida el 14 de octubre, 2003.

En ciertas realizaciones, los nanosopores sintéticos se preparan por un procedimiento de nanoprecipitación o secado por pulverización. Las condiciones usadas en la preparación de nanosopores sintéticos se pueden alterar para producir partículas de un tamaño o propiedad deseado (por ejemplo, hidrofobia, hidrofilia, morfología externa, "pegajosidad", forma, etc.). El método de preparación de los nanosopores sintéticos y las condiciones (por ejemplo, disolvente, temperatura, concentración, caudal de aire, etc.) usadas pueden depender de los materiales que se van a incluir en los nanosopores sintéticos y/o la composición de la matriz del soporte.

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

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

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

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

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

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

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

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

Otro aspecto de la descripción se refiere a kits. En algunas realizaciones, el kit comprende una cualquiera de las composiciones proporcionadas aquí. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, el kit comprende un rapalogo, material de soporte hidrófobo y tensioactivo no iónico con un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) menor o igual a 10. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, las cantidades del rapalogo, del material de soporte hidrófobo, y del tensioactivo no iónico con un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) menor o igual a 10 están en una cualquiera de las cantidades proporcionadas aquí para ese componente, respectivamente. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, el kit comprende además un antígeno. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, las composiciones o elementos de las mismas pueden estar contenidos en recipientes distintos o en el mismo recipiente en el kit. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, el recipiente es un vial o una ampolla. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, las composiciones o elementos de las mismas están contenidas en una disolución separada del recipiente, de modo que las composiciones o elementos se pueden añadir al recipiente en un momento posterior. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, las composiciones o elementos de las mismas están en forma liofilizada, cada una en un recipiente distinto o en el mismo recipiente, de modo que se puedan reconstituir en un momento posterior. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, el kit comprende además instrucciones para la reconstitución, mezclamiento, administración, etc. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados, las instrucciones incluyen una descripción de los métodos descritos aquí. Las instrucciones pueden estar en cualquier forma adecuada, por ejemplo como un inserto impreso o una etiqueta. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los kits proporcionados aquí, el kit comprende además una o más jeringas u otro dispositivo o dispositivos que pueden suministrar nanosopores sintéticos *in vivo* a un sujeto.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - El tensioactivo de HLB bajo, SM, aumenta la carga de RAPA y la filtrabilidad de nanosopores sintéticos

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

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

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

Por el contrario, las composiciones que contenían el tensioactivo SM incorporaban fácilmente mayores cantidades de RAPA. El tamaño del nanosopore no se veía afectado por la filtración, y el aumento de la cantidad de RAPA añadida a la composición dio como resultado mayor carga de RAPA de los nanosopores. Se observó cierta reducción de la producción del filtro en el nivel de carga más alto (muestra 6), pero esto puede deberse al tamaño del nanosopore

inherentemente mayor. En resumen, la incorporación de SM ayudó a aumentar la carga de RAPA y la filtrabilidad de las composiciones de nanosopores sintéticos.

Ejemplo 2 - SM y colesterol aumentaron la carga de RAPA y la filtrabilidad

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

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

Las muestras de nanosopores producidas en ausencia de excipientes (muestras 7 y 8) demostraron que el aumento de carga de RAPA más allá de un punto de saturación aparente de nanosopores tiende a conducir a una reducción de la producción del filtro. La adición de SM o colesterol dio como resultado una mayor carga de RAPA al mismo tiempo que se mantiene la estabilidad (muestras 9 y 10).

Para evaluar la capacidad de las composiciones para inducir inmunotolerancia, se inyectaron por vía intravenosa a ratones tres veces por semana nanosopores y KLH (hemocianina de lapa californiana) coadministrados con la misma dosis de RAPA, y después se expusieron semanalmente sólo a KLH. Después, los sueros de los ratones se analizaron para determinar los anticuerpos contra KLH después de cada exposición a KLH (Fig. 1).

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

Ejemplo 3 - Efectos del tensioactivo de HLB bajo sobre la carga de RAPA y la filtrabilidad

Materiales y métodos

El PLA con una viscosidad inherente de 0,41 dl/g se adquirió de Lakeshore Biomaterials (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211), código de producto 100 DL 4A. El copolímero de bloques de PLA-PEG-OMe con un bloque de PEG terminado en éter metílico de aproximadamente 5.000 Da y una viscosidad inherente total de 0,50 dl/g se adquirió de Lakeshore Biomaterials (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211), código de producto 100 DL mPEG 5000 5CE. La rapamicina se adquirió de Concord Biotech Limited (1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India), código de producto SIROLIMUS. El poli(alcohol vinílico) EMPROVE® 4-88, USP (85-89 % hidrolizado, viscosidad de 3,4-4,6 mPa·s) se adquirió de EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027), código de producto 1.41350. La disolución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (DPBS) 1X se adquirió de Lonza (Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basilea, Suiza), código de producto 17-512Q. El monopalmitato de sorbitán se adquirió de Croda International (300-A Columbus Circle, Edison, NJ 08837), código de producto SPAN 40. El polisorbato 80 se adquirió de NOF America Corporation (One North Broadway, Suite 912 White Plains, NY 10601), código de producto Polysorbate80 (HX2). El monolaurato de sorbitán (SPAN 20) se adquirió de Alfa Aesar (26 Parkridge Rd Ward Hill, MA 01835), código de producto L12099. El estearato de sorbitán (SPAN 60) se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto S7010. El monooleato de

sorbitán (SPAN 80) se adquirió de Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (9211 North Harborgate Street Portland, OR 97203), código de producto S0060. El octil- β -D-glucopiranosido se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto 08001. El alcohol oleílico se adquirió de Alfa Aesar (26 Parkridge Rd Ward Hill, MA 01835), código de producto A18018. El palmitato de isopropilo se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto W515604. El polietilenglicol-hexadecil-éter (BRIJ 52) se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto 388831. El polietilenglicol-oleil-éter (BRIJ 93) se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto 388866. El poli(etilenglicol)-*bloque*-poli(propilenglicol)-*bloque*-poli(etilenglicol) (Pluronic L-31) se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto 435406. El poli(etilenglicol)-*bloque*-poli(propilenglicol)-*bloque*-poli(etilenglicol) (Pluronic P-123) se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto 435465. El ácido palmítico se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto P0500. La DL- α -palmitina se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto M1640. El tripalmitato de glicerilo se adquirió de Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), código de producto T5888.

Para la muestra 11, las disoluciones se prepararon como sigue:

Disolución 1: Se preparó una mezcla de polímero y rapamicina disolviendo en diclorometano PLA a 75 mg/ml, PLA-PEG-Ome a 25 mg/ml, y rapamicina a 16 mg/ml. **Disolución 2:** Se preparó una mezcla de Polisorbato80 disolviendo Polisorbato80 a 80 mg/ml en diclorometano. **Disolución 3:** Se preparó poli(alcohol vinílico) a 50 mg/ml en amortiguador de fosfato 100 mM a pH 8.

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

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

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

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

Muestra	Tensioactivo de la fase orgánica	HLB del tensioactivo	Tamaño (nm)	Filtración	Número de filtros	Calculado g de NP/m ²	Rendimiento (%)	Carga de rapamicina (%)
11	Polisorbato 80	15	184	Millex 0,22 µm	>1	22	91	9,7
12	SPAN 20	8,6	148	Millex 0,22 µm	1	>144	71	11,2
13	SPAN 40	6,7	149	Millex 0,22 µm	1	>154	77	11,2
14	SPAN 60	4,7	151	Millex 0,22 µm	1	>154	77	11,0
15	SPAN 80	4,3	144	Millex 0,22 µm	1	>169	85	11,1
16	octil β-D-glucopiranosido	12	127	Millex 0,22 µm	3	47	64	6,7
17	alcohol oleílico	1,3	165	Millex 0,22 µm	1	>157	78	12,5
18	palmitato de isopropilo	2,9	171	Millex 0,22 µm	1	>144	71	10,9
19	Brij 52	5	182	Millex 0,22 µm	1	>138	77	11,2
20	Brij 93	4	174	Millex 0,22 µm	1	>158	79	11,9
21	Pluronic L-31	1-7	169	Millex 0,22 µm	4	31	70	8,5
22	Pluronic P-123	7-9	162	Millex 0,22 µm	1	>145	72	10,7
23	Ácido palmítico	3,2	132	Millex 0,22 µm	1	>141	71	1,0
24	DL-α-palmitina	7,2	153	Millex 0,22 µm	3	51	68	7,4
25	Tripalmitato de glicerilo	4,3	168	Millex 0,22 µm	1	>146	73	10,0

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

Antes de la inyección en animales, la suspensión de nanosopores a granel se descongeló en un baño de agua a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los nanosopores se diluyeron con DPBS para alcanzar una concentración deseada de rapamicina de 278 µg/ml . Se trataron ratones hembra C57BL/6 de 6 semanas por vía intravenosa los días 0, 7 y 14 con nanosopores ($1,17 \text{ ml}$) mezclados con 130 µl de KLH (hemocianina de lapa californiana) $10\times$. Se dio a los ratones un refuerzo de 200 µg de KLH los días 21, 28, 35 y 42. Los títulos de IgG anti-KLH (medidos por ELISA) se leyeron los días 40, 47 y 61. Los resultados demuestran que el tensioactivo de HLB bajo puede dar como resultado cargas de rapamicina y filtrabilidad de nanosopores sintéticos sustanciales. Además, todos los nanosopores con tensioactivos de HLB bajo como se muestra en la Fig. 2 dieron como resultado menores títulos de anticuerpos durante al menos 40 y 47 días.

Ejemplo 4 - Efecto del tensioactivo de HLB bajo sobre la filtrabilidad de nanosopores sintéticos

Materiales y métodos

El copolímero de bloques de PLA-PEG-OMe con un bloque de PEG terminado en éter metílico de aproximadamente 5.000 Da y una viscosidad inherente total de 0,50 dl/g se adquirió de Evonik Industries (Rellinghauser Straße 1-11 45128 Essen, Alemania), código de producto 100 DL mPEG 5000 5CE. El PLA con una viscosidad inherente de 0,41 dl/g se adquirió de Evonik Industries (Rellinghauser Straße 1-11 45128 Essen, Alemania), código de producto 100 DL 4A. La rapamicina se adquirió de Concord Biotech Limited, 1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India. Código de producto SIROLIMUS. Everolimus se adquirió de LC Laboratories (165 New Boston Street Woburn, MA 01801). Número de lote E-4040. El temsirolimus se adquirió de LC Laboratories (165 New Boston Street Woburn, MA 01801). Número de lote T-8040. El monopalmitato de sorbitán se adquirió de Croda (315 Cherry Lane New Castle Delaware 19720), código de producto SPAN 40. El diclorometano se adquirió de Spectrum (14422 S San Pedro Gardena CA, 90248-2027). Número de lote M1266. El poli(alcohol vinílico) EMPROVE® 4-88, USP (85-89 % hidrolizado, viscosidad de 3,4-4,6 mPa·s) se adquirió de EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027), código de producto 1.41350. La disolución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (DPBS), 1X, 0,0095 M (PO₄), sin calcio ni magnesio, se adquirió de BioWhittaker (8316 West Route 24 Mapleton, IL 61547), número de lote 12001, código de producto Lonza DPBS. La emulsión se llevó a cabo usando un Branson Digital Sonifier 250 con una sonda de titanio de punta cónica de 3,17 mm (1/8 pulgadas).

Las disoluciones se prepararon como sigue:

Disolución 1: Se preparó una mezcla de polímero disolviendo PLA-PEG-OMe (100 DL mPEG 5000 5CE) a 50 mg por 1 ml y PLA (100 DL 4A) a 150 mg por ml en diclorometano. **Disolución 2:** Se disolvió rapamicina a 160 mg por 1 ml en diclorometano. **Disolución 3:** Se disolvió everolimus a 150 mg por ml en diclorometano. **Disolución 4:** Se disolvió temsirolimus a 150 mg por ml en diclorometano. **Disolución 5:** Se disolvió monopalmitato de sorbitán (SPAN 40) a 50 mg por 1 ml en diclorometano. **Disolución 6:** El diclorometano (CH₂Cl₂) se filtró de forma estéril usando un filtro de jeringa de membrana de PTFE de 0,2 µm (número de pieza VWR 28145-491). **Disolución 7:** Se preparó una disolución de poli(alcohol vinílico) disolviendo poli(alcohol vinílico) (poli(alcohol vinílico) EMPROVE® 4-88) a 75 mg por 1 ml en amortiguador de fosfato 100 mM a pH 8. **Disolución 8:** Se preparó una mezcla de poli(alcohol vinílico) y disolución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco, 1X, 0,0095 M (PO₄), disolviendo poli(alcohol vinílico) (poli(alcohol vinílico) EMPROVE® 4-88) a 2,5 mg por 1 ml en disolución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco, 1X, 0,0095 M (PO₄) (Lonza DPBS).

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

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

Para la muestra 28, se preparó una emulsión de Ac/Ag combinando la Disolución 1 (0,5 ml), la Disolución 3 (0,2 ml), la Disolución 5 (0,1 ml) y la Disolución 6 (0,20 ml) en un tubo de presión de vidrio pequeño. La disolución se mezcló pipeteando repetidamente. A continuación, se añadió la Disolución 7 (3,0 ml), y la formulación se mezcló con vórtice durante diez segundos. La formulación se sometió entonces a ultrasonidos con el tubo de presión sumergido en un baño de hielo durante 1 minuto, a 30 % de amplitud. La emulsión se añadió entonces a un vaso de precipitados abierto

de 50 ml que contenía Lonza DPBS (30 ml). Después se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, para permitir que se evaporara el diclorometano y se formaran los nanosopores. Una porción de los nanosopores se lavó transfiriendo la suspensión de nanosopores a un tubo de centrifuga y centrifugando a 75.600xg y 4°C durante 50 minutos, eliminando el líquido sobrenadante, y resuspendiendo el pelete en Disolución 8. Se repitió el procedimiento de lavado, y después el pelete se resuspendió en Disolución 8 para lograr una suspensión de nanosopores que tiene una concentración nominal de 10 mg por ml en base al polímero. La formulación de nanosopores se filtró usando un filtro de jeringa de membrana de PES de 0,22 µm (número de pieza Millex SLGP033RS). Se midió la masa de la producción del filtro de la disolución de nanosopores. La disolución de nanosopores filtrada se almacenó después a -20°C.

Para la muestra 29, se preparó una emulsión de Ac/Ag combinando la Disolución 1 (0,5 ml), la Disolución 3 (0,2 ml) y la Disolución 6 (0,30 ml) en un tubo de presión de vidrio pequeño. La disolución se mezcló pipeteando repetidamente. A continuación, se añadió la Disolución 7 (3,0 ml), y la formulación se mezcló con vórtice durante diez segundos. La formulación se sometió entonces a ultrasonidos con el tubo de presión sumergido en un baño de hielo durante 1 minuto, a 30 % de amplitud. La emulsión se añadió entonces a un vaso de precipitados abierto de 50 ml que contenía Lonza DPBS (30 ml). Después se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, para permitir que se evaporara el diclorometano y se formaran los nanosopores. Una porción de los nanosopores se lavó transfiriendo la suspensión de nanosopores a un tubo de centrifuga y centrifugando a 75.600xg y 4°C durante 50 minutos, eliminando el líquido sobrenadante, y resuspendiendo el pelete en Disolución 8. Se repitió el procedimiento de lavado, y después el pelete se resuspendió en Disolución 8 para lograr una suspensión de nanosopores que tiene una concentración nominal de 10 mg por ml en base al polímero. La formulación de nanosopores se filtró usando un filtro de jeringa de membrana de PES de 0,22 µm (número de pieza Millex SLGP033RS). Se midió la masa de la producción del filtro de la disolución de nanosopores. La disolución de nanosopores filtrada se almacenó después a -20°C.

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

Para la muestra 31, se preparó una emulsión de Ac/Ag combinando la Disolución 1 (0,5 ml), la Disolución 4 (0,2 ml), la Disolución 6 (0,30 ml) en un tubo de presión de vidrio pequeño. La disolución se mezcló pipeteando repetidamente. A continuación, se añadió la Disolución 7 (3,0 ml), y la formulación se mezcló con vórtice durante diez segundos. La formulación se sometió entonces a ultrasonidos con el tubo de presión sumergido en un baño de hielo durante 1 minuto, a 30 % de amplitud. La emulsión se añadió entonces a un vaso de precipitados abierto de 50 ml que contenía Lonza DPBS (30 ml). Después se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, para permitir que se evaporara el diclorometano y se formaran los nanosopores. Una porción de los nanosopores se lavó transfiriendo la suspensión de nanosopores a un tubo de centrifuga y centrifugando a 75.600xg y 4°C durante 50 minutos, eliminando el líquido sobrenadante, y resuspendiendo el pelete en Disolución 8. Se repitió el procedimiento de lavado, y después el pelete se resuspendió en Disolución 8 para lograr una suspensión de nanosopores que tiene una concentración nominal de 10 mg por ml en base al polímero. La formulación de nanosopores se filtró usando un filtro de jeringa de membrana de PES de 0,22 µm (número de pieza Millex SLGP033RS). Se midió la masa de la producción del filtro de la disolución de nanosopores. La disolución de nanosopores filtrada se almacenó después a -20°C.

El tamaño de los nanosopores se determinó por dispersión dinámica de la luz. La cantidad de rapalogo en el nanosopore se determinó por análisis de HPLC. La masa total de nanosopores secos por ml de suspensión se determinó por un método gravimétrico. La filtrabilidad se evaluó por la cantidad de filtrado que pasaba a través del primer filtro.

Los datos muestran que para varios rapalogos, la incorporación de SPAN 40 en los nanosopores sintéticos dio como resultado un aumento de la filtrabilidad de las composiciones de nanosopores sintéticos.

ID del nanosoporte	Rapalogo	Tensioactivo de HLB bajo	Diámetro efectivo (nm)	Contenido de rapalogo (% p/p)	Rendimiento de nanosoportes (%)	Producción del filtro de 0,22 µm (g/m ²)
26	Rapamicina	SPAN 40	179	17,19	80	98
27	Rapamicina	Ninguno	226	17,56	75	10
28	Everolimus	SPAN 40	188	20,11	80	76
29	Everolimus	Ninguno	248	36,81	98	7
30	Temsirolimus	SPAN 40	213	26,94	89	18
31	Temsirolimus	Ninguno	225	28,79	78	5

Ejemplo 5 - Efectos de SPAN 40 en la filtrabilidad de nanosoportes sintéticos que comprenden polímeros no de poliésteres

5

Materiales y métodos

La rapamicina se adquirió de Concord Biotech Limited (1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India). Código de producto SIROLIMUS. El poli(estireno)-*bloque*-poli(etilenglicol) (PS-PEG) con un bloque de PEG terminado en éter metílico de aproximadamente 700-1.100 Da se adquirió de Sigma Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103). Número de lote 686476. El poli(estireno)-*bloque*-poli(metacrilato de metilo) (PS-PMMA) (Mw=30.000 Da) con una relación de metacrilato:estireno 1:1 se adquirió de Sigma Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103). Número de lote 749184. La 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC) se adquirió de Avanti Polar Lipids, Inc (Avanti Polar Lipids, Inc. 700 Industrial Park Drive Alabaster, Alabama 35007-9105). Número de lote 850345P. El poli(etilenglicol)-*bloque*-poli(propilenglicol)-*bloque*-poli(etilenglicol) (P-123) con una relación PEG:PPG:PEG de 20:70:20 se adquirió de Sigma Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103). Código de producto Pluronic® P-123, número de lote 435465. El diclorometano se adquirió de Spectrum (14422 S San Pedro Gardena CA, 90248-2027). Número de lote M1266. El monopalmitato de sorbitán se adquirió de Croda (315 Cherry Lane New Castle Delaware 19720). Código de producto SPAN 40. El poli(alcohol vinílico) EMPROVE® 4-88 (PVA), USP (85-89 % hidrolizado, viscosidad de 3,4-4,6 mPa·s) se adquirió de EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027). Código de producto 1.41350. La disolución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (DPBS), 1X, 0,0095 M (PO₄), sin calcio ni magnesio, se adquirió de BioWhittaker (8316 West Route 24 Mapleton, IL 61547). Número de lote 17-512Q. La emulsión se llevó a cabo usando un Branson Digital Sonifier 250 con una sonda de titanio de punta cónica de 3,17 mm (1/8 pulgadas).

Las disoluciones se prepararon como sigue:

Disolución 1: Se preparó una disolución de polímero y rapamicina disolviendo PS-PEG a 50 mg por ml y rapamicina a 8 mg por ml en diclorometano. **Disolución 2:** Se preparó una disolución de polímero y rapamicina disolviendo PS-PMMA (Mw = 30.000 Da) a 50 mg por ml y rapamicina a 8 mg por ml en diclorometano. **Disolución 3:** Se preparó una disolución de lípido y rapamicina disolviendo DMPC a 50 mg por ml y rapamicina a 8 mg por ml en diclorometano. **Disolución 4:** Se preparó una disolución de polímero y rapamicina disolviendo (P-123) a 50 mg por ml y rapamicina a 8 mg por ml en diclorometano. **Disolución 5:** El diclorometano (CH₂Cl₂) se filtró de forma estéril usando un filtro de jeringa de membrana de PTFE de 0,2 µm (número de pieza VWR 28145-491). **Disolución 6:** Se disolvió SPAN 40 a 50 mg por ml en diclorometano. **Disolución 7:** Se disolvió PVA a 62,5 mg por ml en amortiguador de fosfato 100 mM a pH 8.

Para la muestra 28, se preparó una emulsión de Ac/Ag combinando la Disolución 1 (1,0 ml) y la Disolución 5 (0,05 ml) en un tubo de presión de vidrio pequeño preenfriado >4 minutos en un baño de agua helada. A continuación, se añadió la Disolución 7 (3,0 ml), y el tubo de presión se mezcló con vórtice durante diez segundos. Después, la emulsión se sometió a ultrasonidos con el tubo de presión sumergido en un baño de hielo durante 1 minuto, a 30 % de amplitud. La nanoemulsión resultante se añadió entonces a un vaso de precipitados abierto de 50 ml que contenía DPBS (15 ml), y se colocó un trozo de papel de aluminio sobre el vaso de precipitados abierto. Se preparó una segunda emulsión usando el mismo procedimiento, y se añadió a la primera emulsión en el mismo vaso de precipitados de 50 ml con una parte alícuota nueva de DPBS (15 ml). El vaso de precipitados se dejó sin tapar, y se desechó el papel de aluminio. Después se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, para permitir que se evaporara el diclorometano y se formaran los nanosoportes. Una porción de los nanosoportes se lavó transfiriendo la suspensión de nanosoportes a un tubo de centrifuga y centrifugando a 75.600xg y 4°C durante 50 minutos, eliminando el líquido sobrenadante, y resuspendiendo el pelete en DPBS. Se repitió el procedimiento de lavado, y después el pelete se resuspendió en DPBS para lograr una suspensión de nanosoportes que tiene una concentración nominal de 10 mg por ml en base al polímero. La formulación de nanosoportes se filtró usando un filtro de jeringa de membrana de PES de 0,22 µm (número de pieza Millex SLGP033RS). Se midió la masa de la producción del filtro de la disolución de nanosoportes. La disolución de nanosoportes filtrada se almacenó después a -20°C.

La muestra 29 se preparó igual que la muestra 28, usando la Disolución 6 en lugar de la Disolución 5. La muestra 30 se preparó igual que la muestra 28, usando la Disolución 2 en lugar de la Disolución 1. La muestra 31 se preparó igual que la muestra 30, usando la Disolución 6 en lugar de la Disolución 5. La muestra 32 se preparó igual que la muestra 28, usando la Disolución 3 en lugar de la Disolución 1. La muestra 33 se preparó igual que la muestra 32, usando la Disolución 6 en lugar de la Disolución 5. La muestra 34 se preparó igual que la muestra 28, usando la Disolución 4 en lugar de la Disolución 1. La muestra 35 se preparó igual que la muestra 34, usando la Disolución 6 en lugar de la Disolución 5.

El tamaño de los nanosopores se determinó por dispersión dinámica de la luz. La cantidad de rapamicina en el nanosopore se determinó por análisis de HPLC. La masa total de nanosopores secos por ml de suspensión se determinó por un método gravimétrico. La filtrabilidad se evaluó por la masa del filtrado de nanosopores a través del primer filtro de jeringa de 0,22 µm de membrana de PES de 33 mm.

A continuación, los resultados muestran que, aunque no está optimizado, la inclusión de SPAN 40 en nanosopores sintéticos con polímeros no de poliésteres puede aumentar la filtrabilidad de los nanosopores sintéticos en algunas realizaciones.

ID del nanosopore	Material de matriz	Tensioactivo de HLB bajo	Diámetro efectivo (nm)	Contenido de rapamicina (% p/p)	Rendimiento de nanosopores (%)	Producción del filtro de 0,22 µm (g/m ²)
28	PS-PEG	Ninguno	152	11,41	67	40
29	PS-PEG	SPAN 40	152	10,42	83	77
30	PS-PMMA	Ninguno	156	10,24	102	199
31	PS-PMMA	SPAN 40	159	10,02	107	197
32	DMPC	Ninguno	236	11,24	53	22
33	DMPC	SPAN 40	211	10,26	62	35
34	P-123	Ninguno	785	85,84	7	49
35	P-123	SPAN 40	991	90,24	4	73

Ejemplo 6 - SPAN 40 aumenta enormemente la filtrabilidad de nanosopores sintéticos que comprenden polímeros de poliésteres

Materiales y métodos

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

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

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

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

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

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

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

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

El tamaño de los nanosopores se evaluó igual que antes.

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

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

Ejemplo 7 - Nanosopores sintéticos con tensioactivo de HLB bajo y carga de RAPA significativa dan como resultado tolerancia específica de antígeno duradera

Materiales y métodos

El PLA con una viscosidad inherente de 0,41 dl/g se adquirió de Lakeshore Biomaterials (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211), código de producto 100 DL 4A. El copolímero de bloques de PLA-PEG-OME con un bloque

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

Las disoluciones se prepararon como sigue:

Disolución 1: Se preparó una mezcla de polímero, rapamicina y monopalmitato de sorbitán disolviendo PLA a 37,5 mg/ml, PLA-PEG-Ome a 12,5 mg/ml, rapamicina a 8 mg/ml, y monopalmitato de sorbitán a 2,5 en diclorometano.

Disolución 2: Se preparó poli(alcohol vinílico) a 50 mg/ml en amortiguador de fosfato 100 mM a pH 8.

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

El tamaño de los nanosopores se determinó por dispersión dinámica de la luz. La cantidad de rapamicina en el nanosopore se determinó por análisis de HPLC. La masa total de nanosopores secos por ml de suspensión se determinó por un método gravimétrico.

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

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

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

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

Para evaluar la especificidad antigénica de la tolerancia a la KLH, todos los animales se expusieron a OVA+CpG s.c. (35 µg+20 µg) en la extremidad trasera los días 49 y 56. La Fig. 5 muestra que todos los animales desarrollaron niveles similares de títulos contra la OVA, lo que demuestra que la administración concomitante del antígeno con nanosoporte sintético puede producir tolerancia inmunológica, y que el tratamiento con nanosoposites sintéticos no induce inmunosupresión crónica. Estos resultados demuestran que la rapamicina encapsulada en nanosoposites, en lugar de rapamicina libre, (cuando está presente en una cantidad significativa, induce inmunotolerancia duradera y específica del antígeno cuando se administra de forma concomitante con un antígeno diana.

Ejemplo 8 - SPAN 40 aumenta la filtrabilidad de rapalogos, rapamicina y everolimus

Materiales y métodos

El PLA con una viscosidad inherente de 0,41 dl/g se adquirió de Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen Alemania), código de producto 100 DL 4A. El copolímero de bloques PLA-PEG-OMe con un bloque de PEG terminado en éter metílico, de aproximadamente 5.000 Da y una viscosidad inherente total de 0,50 dl/g, se adquirió de Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen Alemania), código de producto 100 DL mPEG 5000 5CE. La rapamicina se adquirió de Concord Biotech Limited (1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India), código de producto SIROLIMUS. Everolimus se adquirió de LC Laboratories (165 New Boston St # T, Woburn, MA 01801). Código de producto E-4040. El temsirolimus se adquirió de LC Laboratories (165 New Boston Street Woburn, MA 01801). Número de lote T-8040. El deforolimus se adquirió en MedChem Express (11 Deer Park Drive, Suite 102D Monmouth Junction, NJ 08852). Código de producto HY-50908. El poli(alcohol vinílico) EMPROVE® 4-88, USP (85-89 % hidrolizado, viscosidad de 3,4-4,6 mPa·s) se adquirió de EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027), código de producto 1.41350. La disolución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (DPBS) 1X se adquirió de Lonza (Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basilea, Suiza), código de producto 17-512Q. El monopalmitato de sorbitán se adquirió de Croda International (300-A Columbus Circle, Edison, NJ 08837), código de producto SPAN 40.

Las disoluciones se prepararon como sigue. **Disolución 1:** Se preparó una mezcla de polímero y rapamicina disolviendo PLA a 150 mg/ml y PLA-PEG-Ome a 50 mg/ml. **Disolución 2:** Se preparó una disolución de rapamicina a 100 mg/ml en diclorometano. **Disolución 3:** Se preparó una disolución de everolimus a 100 mg/ml en diclorometano. **Disolución 4:** Se preparó una disolución de temsirolimus a 100 mg/ml en diclorometano. **Disolución 5:** Se preparó una disolución de deforolimus a 100 mg/ml en diclorometano. **Disolución 6:** Se preparó una disolución de monopalmitato de sorbitán disolviendo SPAN 40 a 50 mg/ml en diclorometano. **Disolución 7:** Se preparó poli(alcohol vinílico) a 75 mg/ml en amortiguador de fosfato 100 mM a pH 8.

Se prepararon emulsiones de Ac/Ag añadiendo la Disolución 1 (0,5 ml) a un tubo de presión de pared gruesa. Para los lotes 1, 3, 5 y 7, esta se combinó con la Disolución 6 (0,1 ml) y diclorometano (0,28 ml). Después, el Lote 1 combinó esta con la Disolución 2 (0,12 ml), el Lote 3 con la Disolución 3 (0,12 ml), el Lote 5 con la Disolución 4 (0,12 ml), y el Lote 7 con la Disolución 4 (0,12 ml). De manera similar, los Lotes 2, 4, 6 y 8 se combinaron con diclorometano (0,38 ml), y después el Lote 2 se combinó con la Disolución 2 (0,12 ml), el Lote 4 con la Disolución 3 (0,12 ml), el Lote 6 con la Disolución 4 (0,12 ml), y el Lote 8 con la Disolución 5 (0,12 ml). Por lo tanto, para cada lote individual, el volumen total de la fase orgánica fue 1 ml. Las disoluciones de la fase orgánica combinadas se mezclaron pipeteando repetidamente. A continuación, se añadió la Disolución 7 (3,0 ml), el tubo de presión se mezcló con vórtice durante 10 segundos, y después se sometió a ultrasonidos a una amplitud de 30 % durante 1 minuto, con el tubo de presión sumergido en un baño de agua helada usando un Branson Digital Sonifier 250. La emulsión se añadió entonces a un vaso de precipitados de 50 ml que contenía DPBS (30 ml). Después, se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el diclorometano se evaporara rápidamente para que se formaran los nanosoposites. Una porción de los nanosoposites se lavó transfiriendo la suspensión de nanosoposites a un tubo de centrifuga y centrifugando a 75.600xg y 4°C durante 50 minutos, eliminando el sobrenadante, y resuspendiendo el pelete en DPBS que contenía PVA al 0,25 % p/v. Se repitió el procedimiento de lavado, y entonces el pelete se resuspendió en DPBS que contenía PVA al 0,25 % p/v, para lograr una suspensión de nanosoposites que tenía una concentración nominal de 10 mg/ml en base al polímero. La suspensión de nanosoposites se filtró entonces usando un filtro de jeringa de membrana de PES de 0,22 µm (número de pieza de Millipore SLGP033RB). La suspensión de nanosoposites filtrada se almacenó entonces a -20°C.

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

Número de lote	Rapalogo	Tensioactivo	Producción calculada del filtro (g de NP/m ²)	Tamaño (nm)	Rendimiento (%)	Carga de rapalogo (%)
1	Rapamicina	SPAN 40	>117	163	60	10,41
2	Rapamicina	Ninguno	21	189	58	11,38
3	Everolimus	SPAN 40	>130	165	66	13,60
4	Everolimus	Ninguno	23	190	57	12,03
5	Temsirolimus	SPAN 40	31	163	73	8,73
6	Temsirolimus	Ninguno	46	178	62	9,57
7	Deforolimus	SPAN 40	>119	135	61	7,51
8	Deforolimus	Ninguno	>120	139	60	7,53

Ejemplo 9 - Muestra los efectos de las cantidades de los componentes sobre la carga de rapamicina y la filtrabilidad de los nanosportes sintéticos

5

Materiales y métodos

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

Las disoluciones se prepararon como sigue:

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

Se preparó una emulsión de Ac/Ag combinando la disolución de polímero, disolución de rapamicina, disolución de SPAN 40 y/o disolución de CH₂Cl₂ (volumen total 1-2 ml) en un tubo de presión de vidrio de pared gruesa. La disolución se mezcló pipeteando repetidamente. A continuación, se añadió disolución de PVA (3 a 6 ml) (éter como una única emulsión con 1 ml de fase orgánica y 3 ml de disolución acuosa de PVA, o como dos emulsiones individuales preparadas una tras otra). La formulación se mezcló con vórtice durante diez segundos, y después se sometió a ultrasonidos con el tubo de presión sumergido en un baño de hielo durante 1 minuto a 30 % de amplitud. La emulsión se añadió entonces a un vaso de precipitados abierto de 50 ml que contenía Lonza DPBS (30 ml). Después se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, para permitir que se evaporara el diclorometano y se formaran los nanosportes. Una porción de los nanosportes se lavó transfiriendo la suspensión de nanosportes a un tubo de centrífuga y centrifugando a 75.600xg y 4°C durante 50 minutos, eliminando el sobrenadante, y resuspendiendo el pelete en disolución de DPBS PVA. Se repitió el procedimiento de lavado, y después el pelete se resuspendió en disolución de DPBS PVA para lograr una suspensión de nanosportes que tiene una concentración nominal de 10 mg por ml en base al polímero. La formulación de nanosportes se filtró usando un filtro de jeringa de membrana de PES

de 0,22 μm (número de pieza Millex SLGP033RS). Se midió la masa de la producción del filtro de la disolución de nanosportes. La disolución de nanosportes filtrada se almacenó después a -20°C .

5 La filtrabilidad se da como g/m^2 de área superficial de la membrana de filtración, del nanosporte medido que pasa a través de un filtro de jeringa de 0,22 μm de membrana de PES de 33 mm de Millipore, número de pieza SLGP033RB.

Los resultados muestran la cantidad de diversos componentes en una serie de nanosportes sintéticos que pueden dar como resultado nanosportes sintéticos filtrables de forma estéril iniciales con una cantidad de rapamicina que se espera que sea eficaz *in vivo*.

10

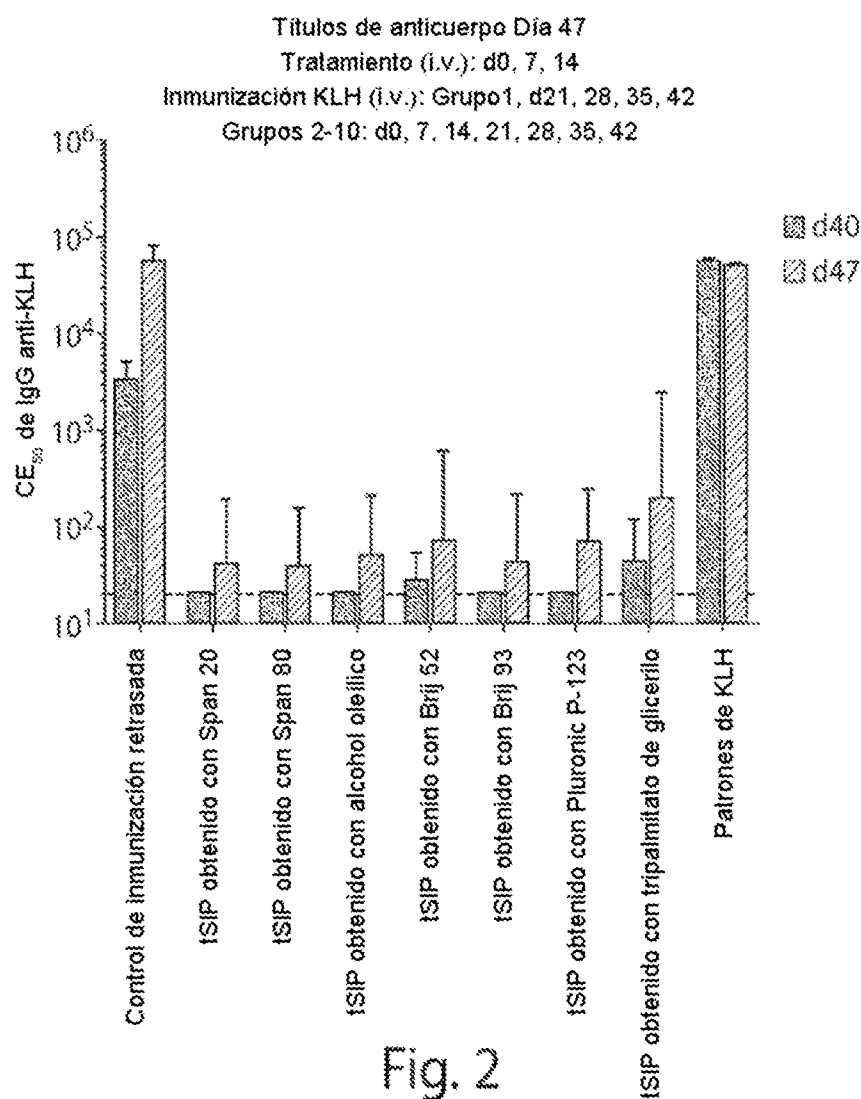
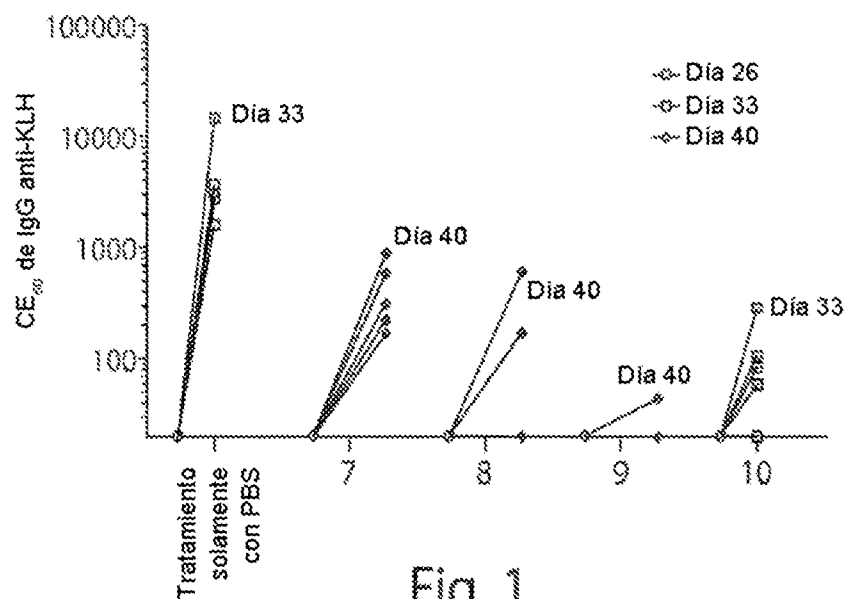
Lote nº	Polímero (mg por ml)	SPAN 40 (mg por ml)	Rapamicina (mg por ml)	PVA (mg por ml)	Tamaño (nm)	Filtrabilidad (g NP/m ²)	Rendimiento	HLB/Rapa % en peso	HLB/Polímero % en peso
1 ^a	50	0	8	62,5	135	52	70,7	0,00	0,00
2 ^a	50	0,1	8	62,5	135	26	68,6	1,23	0,20
3 ^a	50	0,25	8	62,5	148	27	70,9	3,03	0,50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

^aEstas formulaciones se prepararon con 2 ml de fase orgánica, 6 ml de disolución de PVA

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende nanosopores sintéticos que comprenden:
 un material de soporte hidrófobo,
 un rapalogo, y
 un tensioactivo no iónico con un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) menor o igual a 10;
 opcionalmente en la que la composición es inicialmente filtrable de manera estéril a través de un filtro de 0,22 μm .
2. Un método para producir nanosopores sintéticos que comprenden un tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10 y un rapalogo, que comprende:
 obtener o proporcionar un material de soporte hidrófobo,
 obtener o proporcionar un tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10,
 obtener o proporcionar un rapalogo, y
 combinar el material de soporte hidrófobo, el tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10 y el rapalogo para formar nanosopores sintéticos.
3. El método de la reivindicación 2, que además comprende:
 disolver el material de soporte hidrófobo, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 y el rapalogo en un disolvente;
 obtener o proporcionar otro tensioactivo;
 formar una primera y después una segunda emulsión de Ac/Ag con el material de soporte hidrófobo, el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 y el rapalogo disueltos, y otro tensioactivo;
 mezclar la primera y segunda emulsiones de Ac/Ag; y
 dejar que el disolvente se evapore, preferiblemente en el que el disolvente es diclorometano, acetato de etilo, cloroformo, o carbonato de propileno.
4. La composición de la reivindicación 1 o el método de las reivindicaciones 2 o 3, en los que:
 (i) el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es un tensioactivo no iónico con valor de HLB menor que 10;
 (ii) el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es un tensioactivo no iónico con valor de HLB menor que 9;
 (iii) el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es un tensioactivo no iónico con valor de HLB menor que 8;
 (iv) el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es un tensioactivo no iónico con valor de HLB menor que 7;
 (v) el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es un tensioactivo no iónico con valor de HLB menor que 6; o
 (vi) el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es un tensioactivo no iónico con valor de HLB menor que 5.
5. La composición de las reivindicaciones 1 o 4, o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en los que:
 (i) el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 comprende un éster de sorbitán, alcohol graso, éster de ácido graso, alcohol graso etoxilado, poloxámero, o un ácido graso, y
 (ii) el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 comprende un éster de sorbitán, alcohol graso, éster de ácido graso, alcohol graso etoxilado, poloxámero, o un ácido graso, y
 en los que el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 comprende SPAN 40, SPAN 20, alcohol oleílico, alcohol estearílico, palmitato de isopropilo, monoestearato de glicerilo, BRIJ 52, BRIJ 93, Pluronic P-123, Pluronic L-31, ácido palmítico, ácido dodecanoico, tripalmitato de glicerilo, o trilinoleato de glicerilo; o
 (iii) el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es SPAN 40.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 o 5, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en los que el tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 está encapsulado en los nanosopores sintéticos, está presente en la superficie de los nanosopores sintéticos, o ambos.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 6, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en los que:
 (i) la cantidad de tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es $\geq 0,01$ pero ≤ 20 % en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/peso de material de soporte hidrófobo;
 (ii) la cantidad de tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es $\geq 0,1$ pero ≤ 15 % en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/peso de material de soporte hidrófobo;
 (iii) la cantidad de tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es ≥ 1 pero ≤ 13 % en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/peso de material de soporte hidrófobo; o
 (iv) la cantidad de tensioactivo no iónico con valor de HLB menor o igual a 10 es ≥ 1 pero ≤ 9 % en peso de tensioactivo no iónico con un valor de HLB menor o igual a 10/peso de material de soporte hidrófobo.

8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 7, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en los que:
- (i) el material de soporte hidrófobo comprende uno o más polímeros hidrófobos o lípidos, y
 - (ii) el material de soporte hidrófobo comprende uno o más polímeros hidrófobos, y en los que el uno o más polímeros hidrófobos comprenden un poliéster, preferiblemente en los que el poliéster comprende PLA, PLG, PLGA, o policaprolactona;
 - (iii) el material de soporte hidrófobo comprende uno o más polímeros hidrófobos, y en los que el uno o más polímeros hidrófobos comprenden un poliéster, preferiblemente en los que el poliéster comprende PLA, PLG, PLGA, o policaprolactona, y en los que el material de soporte hidrófobo comprende, o comprende además, PLA-PEG, PLGA-PEG, o PCL-PEG.
9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 8, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en los que:
- (i) la cantidad de material de soporte hidrófobo en los nanosoportes sintéticos es 5-95 % en peso de material de soporte hidrófobo/sólidos totales; o
 - (ii) la cantidad de material de soporte hidrófobo en los nanosoportes sintéticos es 60-95 % en peso de material de soporte hidrófobo/sólidos totales.
10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 9, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en los que:
- (i) la cantidad de rapalogo es ≥ 6 pero ≤ 50 % en peso de rapalogo/peso de material de soporte hidrófobo;
 - (ii) la cantidad de rapalogo es ≥ 7 pero ≤ 30 % en peso de rapalogo/peso de material de soporte hidrófobo; o
 - (iii) la cantidad de rapalogo es ≥ 8 pero ≤ 24 % en peso de rapalogo/peso de material de soporte hidrófobo.
11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 10, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en los que el rapalogo está encapsulado en los nanosoportes sintéticos, y/o en los que el rapalogo es rapamicina.
12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 11, en la que:
- (i) la composición comprende además un antígeno; o
 - (ii) la composición comprende además un antígeno, en la que el antígeno se mezcla con los nanosoportes sintéticos en la composición.
13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 12, en la que la media de una distribución de tamaños de partículas obtenida usando la dispersión dinámica de luz de los nanosoportes sintéticos es un diámetro mayor que 120 nm, preferiblemente en la que el diámetro es mayor que 150 nm.
14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 13, en la que la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. Un kit que comprende: la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 14.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, en el que:
- (i) el método comprende además filtrar la composición resultante; o
 - (ii) el método comprende además filtrar la composición resultante, en el que la filtración comprende filtrar a través de un filtro de 0,22 μm .
17. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 14, para uso en la modulación de una respuesta inmunitaria.



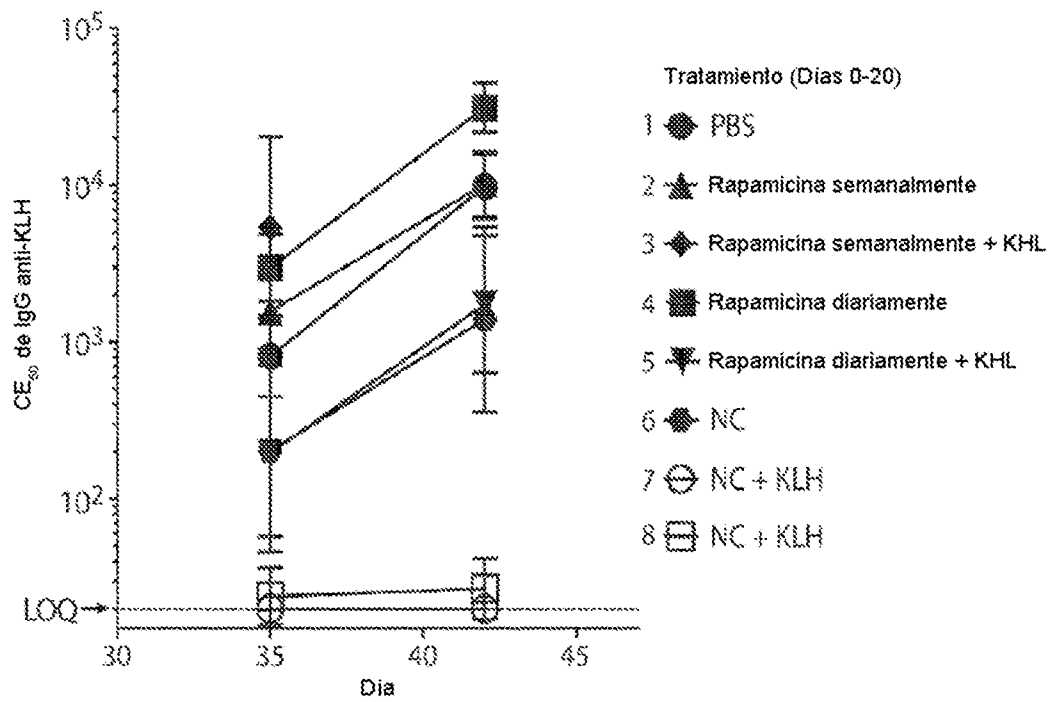


Fig. 3

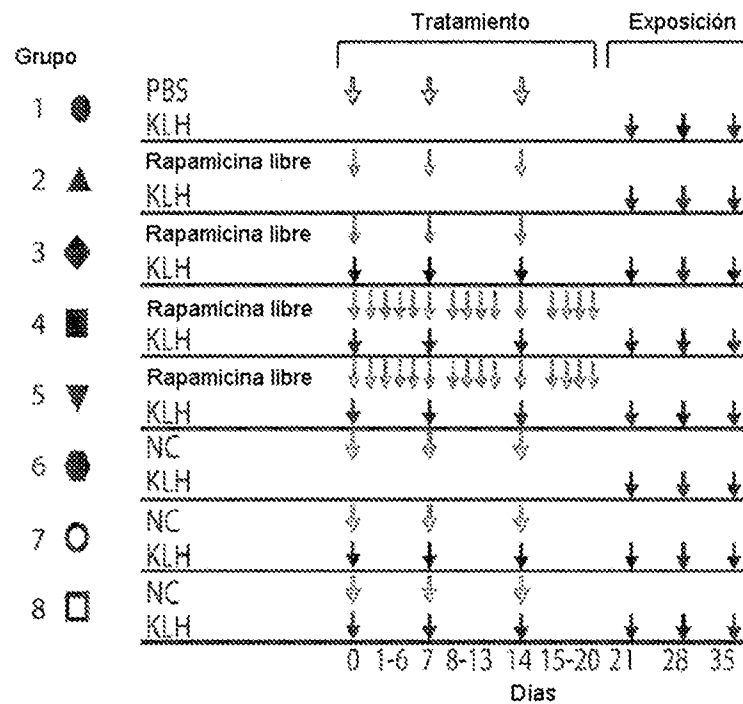


Fig. 4

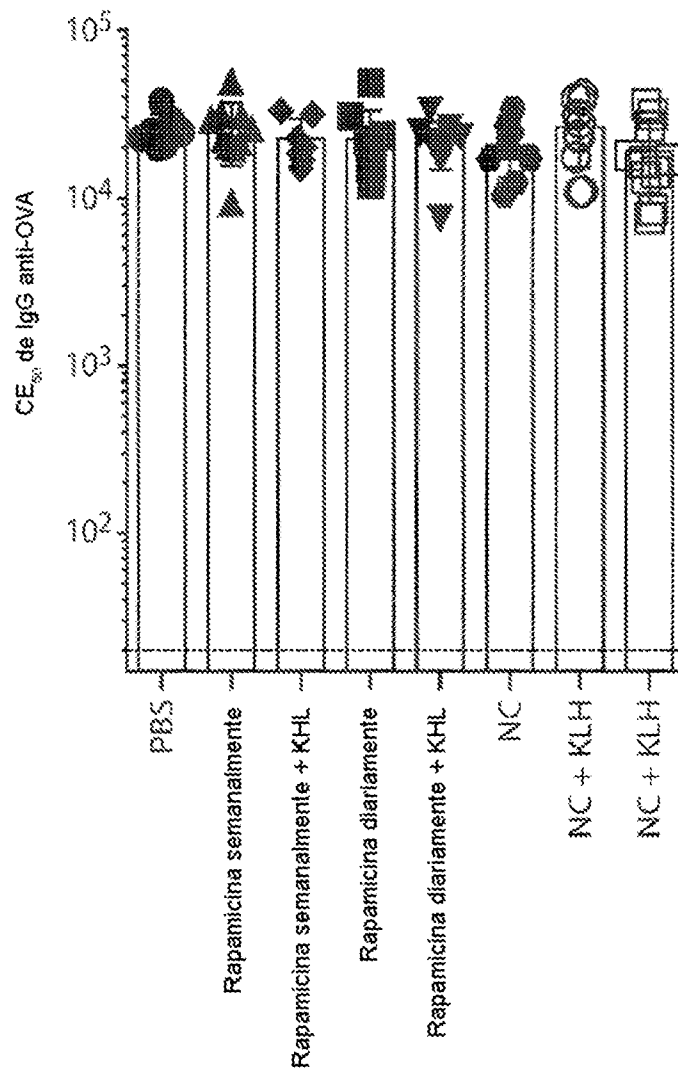


Fig. 5