



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 538**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01) **A61K 9/16** (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01) **A61K 9/51** (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01) **A61K 47/26** (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) **A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07837876 .7**

96 Fecha de presentación : **07.09.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2061433**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.05.2009**

54

Título: **Composiciones para aumentar el transporte a través de moco.**

30

Prioridad: **08.09.2006 US 843282 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.06.2011

73

Titular/es: **Johns Hopkins University
Licensing and Technology Development
100 North Charles Street, 5th Floor
Baltimore, Maryland 21201, US**

72

Inventor/es: **Hanes, Justin y
Lai, Samuel, K.**

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 360 538 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

Composiciones para aumentar el transporte a través de moco

5 **Antecedentes**

Los órganos expuesto al ambiente externo, incluyendo las vías respiratorias pulmonares, conducto respiratorio nasal, aparato digestivo y el conducto vaginal cervical están protegidos de la entrada de partículas exógenas (incluyendo algunos patógenos y toxinas) por un gel de moco muy viscoso y elástico. El moco humano ha evolucionado para atrapar partículas exógenas de forma estérica y/o por adhesión, y después limpiarlas del cuerpo antes de que alcancen el epitelio subyacente; las partículas atrapadas en el moco también pueden sufrir degradación bacteriana o enzimática. Aunque las velocidades de depuración están anatómicamente determinadas, las velocidades de recambio del moco en el aparato digestivo se estiman entre 24 y 48 horas. En los pulmones, las velocidades de depuración dependen de la región de deposición de partículas; sin embargo, las velocidades del moco traqueal normal, aunque más rápidas que las velocidades del moco en el pulmón periférico, varían de 1-10 mm/min y los tiempos de recambio son de menos de 1 hora. Como resultado, se ha citado la barrera de moco como un cuello de botella crítico en el tratamiento de una variedad de enfermedades.

El componente principal del moco es glicoproteína mucina de alto peso molecular, que forma numerosos enlaces covalentes y no covalentes con otras moléculas de mucina y varios constituyentes, incluyendo ADN, alginato y ácido hialurónico. (Hanes et al., Gene therapy in the lung, en Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology, 2ª ed.; Marcel Dekker Inc.: Nueva York, 2003; pp. 489-539). La microestructura densa, compleja y la alta densidad de los dominios hidrofóbicos y negativamente cargados da lugar a un gel muy viscoelástico y adhesivo, que dificulta significativamente las velocidades de transporte de grandes macromoléculas y nanopartículas (Saltzman et al., Biophys. J. 1994, 66, 508-515; Sanders et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2002, 162, 1905-1911; Olmsted et al., Biophys. J. 2001 81, 1930-1937). Para salvar la barrera de moco, los soportes de fármacos deben atravesar rápidamente capas de moco que tienen hasta unos cientos de micrómetros de espesor para alcanzar el epitelio subyacente y evitar los mecanismos de depuración. Se piensa que la dificultad del transporte de la partícula fármaco-soporte a través de moco es debida a un tamaño de poro de malla medio muy pequeño (la estimación varía desde 5-10 nm a no más de 200 nm) de moco humano muy elástico, y a su naturaleza fuertemente adhesiva (Olmsted, S.S., J.L. Padgett, A.I. Yudin, K.J. Whaley, T.R. Moench y R.A. Cone, *Diffusion of macromolecules and virus-like particles in human cervical mucus*. Biophysical Journal, 2001. 81(4): p. 1930-1937). Cone y colaboradores han mostrado recientemente que partículas poliméricas de látex estándar (es decir, poliestireno) tan pequeñas como de 59 nm de diámetro son completamente inmóviles en el moco ya que se adhieren fuertemente a las fibras de mucina, lo que produce que se ensamble en cadenas de moco o "haces". Estas observaciones han sugerido que el transporte eficaz de nanopartículas poliméricas sintéticas, en especial las mayores de 59 nm, a través de barreras de moco humano es una tarea desalentadora.

La publicación internacional WO2005072710 divulga partículas poliméricas o liposomales con el agente modificador de superficie polietilenglicol (PEG) para aumentar el transporte a través del moco humano. Las partículas comprenden un núcleo polimérico farmacéuticamente aceptable y un agente bioactivo dispuesto en la superficie. Las partículas pueden estar comprendidas en un inhalador. Para terapia génica, la partícula es un vector o plásmido.

El documento US2006083781 se refiere a una solución acuosa que contiene un polímero funcionalizado, también denominado grupos funcionales de superficie, que forman sobre nanopartículas una capa funcional hidrofílica de superficie. El polímero se puede seleccionar de polietilenglicol (PEG). Las partículas también comprenden agentes bioactivos.

La divulgación en US2005101676 describe ejemplos de vehículos de distribución adecuados para la mucosa gastrointestinal o urogenital que incluye micropartículas biodegradables. La partícula comprende grupos que aumentan el transporte en moco tales como dextrinas (ciclodextrina).

La publicación internacional WO9901498 describe el uso de un conjugado PEG-quitosano para aumentar la captación sistémica de un fármaco a través de una superficie mucosa. Los liposomas, micropartículas, microcápsulas y nanopartículas llevan un conjugado en la superficie del que del 1-50% en base a peso es PEG.

El documento US2004258763 describe partículas nucleares recubiertas por un agente modificador de superficie tal como PEG.

El documento WO9829097 enseña composiciones para biodisponibilidad aumentada a través de distribución mucosa que comprenden partículas en polvo y un agente tensioactivo tal como monoestearato de PEG y lauril sulfato de sodio.

El documento WO02053189 describe un transportador de micropartícula que están recubiertos con un polímero en la superficie.

El documento WO2006 044660 divulga nanopartículas lipídicas sólidas que tienen una capa externa de polímeros funcionalizados tal como PEG y/o agente tensioactivo y/o agente biológicamente activo.

5 Compendio de la invención

La presente invención se refiere en parte al descubrimiento de que se pueden usar agentes modificadores de superficie para disminuir la mucoadhesión de una sustancia y aumentar su movilidad en moco. De esta manera, en un aspecto la invención proporciona una partícula modificada con uno o más grupos modificadores de superficie que facilitan el paso de la partícula a través de moco, en donde (a) la masa del grupo modificador de superficie constituye al menos 1/3400 de la masa de la partícula, y/o (b) el grupo modificador de superficie está presente en la superficie externa a una densidad mayor de 0,01 unidades por nanómetro cuadrado. Tales partículas, por ejemplo nanopartículas o micropartículas, tienen una concentración mayor de grupos de superficie de lo que se ha alcanzado previamente, lo que produce la inesperada propiedad de difusión rápida a través de moco. La presente invención comprende además una composición farmacéutica de tales partículas con soportes, un inhalador que comprende tales partículas.

La invención se refiere además a una preparación farmacéutica adecuada para inhalación, inyección o administración tópica a una membrana mucosa, que comprende un agente bioactivo asociado con un grupo modificador de superficie en donde (a) la masa del grupo modificador de superficie constituye al menos 1/3400 de la masa del agente bioactivo y/o (b) el grupo modificador de superficie está presente en la superficie externa del agente bioactivo a una densidad de más de 0,01 unidades por nanómetro cuadrado.

La invención también se refiere a un virus con envuelta que comprende un grupo modificador de superficie, en donde dicho virus difunde a través de moco cervicovaginal humano a una difusividad en una escala de tiempo de 1 segundo que es más de 20 veces mayor que la difusividad a la que un virus correspondiente que carece del grupo modificador de superficie difunde a través de moco cervicovaginal humano, y en donde (a) la masa del grupo modificador de superficie constituye al menos 1/3400 de la masa del virus y/o (b) el grupo modificador de superficie está presente en la superficie externa del virus a una densidad de más de 0,01 unidades por nanómetro cuadrado.

En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona partículas con la superficie modificada y métodos para hacerlas y usarlas. Las partículas adecuadas incluyen partículas poliméricas, liposomales, metálicas, de óxido metálico, víricas o de punto cuántico, o cualquier combinación de las mismas, que son capaces de atravesar eficazmente capas de moco que recubren superficies mucosas. En ciertas formas de realización, tales partículas pueden comprender uno o más agentes bioactivos, que pueden estar dispuestos en la superficie de la partícula o en el interior de la partícula, por ejemplo, encapsulado en un vehículo, tal como un polímero. En ciertas formas de realización, el uno o más agentes bioactivos están asociados de forma covalente o no covalente con la partícula. Las partículas poliméricas adecuadas pueden comprender un núcleo polimérico farmacéuticamente aceptable y un agente modificador de superficie. Las partículas liposomales en general comprenden un núcleo de liposoma y un agente modificador de superficie. Las partículas pueden comprender uno o más agentes bioactivos y/o agentes de imagen. El agente modificador de superficie puede comprender una o más entidades químicas, o puede, por ejemplo, estar incorporado (por ejemplo, físicamente, como una mezcla, o covalentemente, tal como un copolímero en bloque o un polímero covalentemente modificado) en el vehículo polimérico. Las partículas también pueden comprender uno o más grupos de direccionamiento.

Ciertas formas de realización proporcionan partículas que tienen, de media, más de 1, 2, 5, 10, 20, 50, 55, 59, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 2000 o 5000 nm de diámetro, o que tienen un diámetro intermedio entre cualquiera de estos valores. En ciertas formas de realización, las partículas tienen un diámetro medio de menos de 10.000 nm o 50.000 nm. Ciertas formas de realización proporcionan partículas que son, de media, mayores que el mayor tamaño de poro de moco estimado, que es 100 nm. En ciertas formas de realización, el diámetro es el diámetro físico. En tales formas de realización, el diámetro de una partícula no esférica es la mayor distancia lineal entre dos puntos en la superficie de la partícula. En ciertas formas de realización, el diámetro es el diámetro hidrodinámico. En ciertas formas de realización, el diámetro de una partícula no esférica es el diámetro hidrodinámico.

En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona una partícula que puede difundir a través de una barrera mucosa a una velocidad o difusividad mayor que una partícula correspondiente, por ejemplo, partículas de poliestireno sin modificar. Una partícula de la invención puede pasar a través de una barrera mucosa a una velocidad o difusividad que es al menos 10, 20, 30, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10000 o más veces mayor que una partícula correspondiente. Además, una partícula de la invención puede pasar a través de una barrera mucosa con un desplazamiento cuadrático medio geométrico que es al menos 10, 20, 30, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10000 o más veces mayor que una partícula correspondiente en una escala de tiempo de 1 s. La partícula correspondiente puede comprender una partícula de poliestireno modificado con carboxilo, una partícula de poliestireno modificado con amino o una partícula de poliestireno modificada con sulfato-aldehído. Tal partícula modificada con carboxilo preferiblemente tiene grupos carboxilo presentes a una densidad de 1,77 a 6,69 carboxilos

por nm^2 . Para los fines de tal comparación, la partícula correspondiente puede ser aproximadamente del mismo tamaño, forma y/o densidad que la partícula de la invención.

- 5 En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona partículas que pueden difundir a través de una barrera mucosa a una velocidad que se aproxima a la velocidad o difusividad a la que dichas partículas pueden difundir a través de agua. Una partícula de la invención puede pasar a través de una barrera mucosa a una velocidad o difusividad que es al menos 1/1000, 1/600, 1/500, 1/200, 1/100, 1/50, 1/20, 1/10, 1/5, 1/2 o 1 veces la velocidad de la partícula en agua en idénticas condiciones.
- 10 En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona partículas que comprenden un agente modificador de superficie a una densidad determinada. Una partícula de la invención puede comprender un agente modificador de superficie a una densidad de al menos 0,001, 0,002, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 o 100 unidades por nm^2 .
- 15 En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona partículas que viajan a través de moco, tal como moco cervicovaginal humano, a ciertas difusividades absolutas. Por ejemplo, las partículas de la presente invención pueden viajar a difusividades de al menos 1×10^{-4} , 2×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1×10^{-3} , 2×10^{-3} , 5×10^{-3} , 1×10^{-2} , 2×10^{-2} , 4×10^{-2} , 5×10^{-2} , 6×10^{-2} , 8×10^{-2} , 1×10^{-1} , 2×10^{-1} , 5×10^{-1} , 1 o $2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ en una escala de tiempo de 1 s.
- 20 En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona partículas que comprenden un agente modificador de superficie en donde la masa del grupo modificador de superficie constituye al menos 1/10.000, 1/5000, 1/3400, 1/2000, 1/1000, 1/500, 1/200, 1/100, 1/50, 1/20, 1/5, 1/2 o 9/10 de la masa de la partícula.
- 25 En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona partículas que comprenden un agente modificador de superficie que inhibe la adsorción de avidina marcada con fluorescencia, en donde la partícula adsorbe menos del 99%, del 95%, del 90%, del 70%, del 50%, del 40%, del 30%, del 20%, del 15%, del 10%, del 8%, del 6%, del 5%, del 4%, del 3%, del 2%, del 1%, del 0,5%, del 0,1%, del 0,05% o del 0,01% de la cantidad de avidina marcada con fluorescencia que adsorbe una partícula correspondiente que carece del agente modificador de superficie, calculado mediante intensidad de fluorescencia máxima media.
- 30 En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona partículas que comprenden un agente modificador de superficie que afecta al potencial zeta de la partícula, en donde el potencial zeta de dicha partícula está entre -100 mV y 10 mV, entre -50 mV y 10 mV, entre -25 mV y 10 mV, entre -20 mV y 5 mV, entre -10 mV y 10 mV, entre -10 mV y 5 mV, entre -5 mV y 5 mV o incluso entre -2 mV y 2 mV. La invención comprende además dicha partícula en donde el potencial zeta de dicha partícula es menor de 5 mV. La invención comprende además dicha partícula en donde el potencial zeta de dicha partícula es menor de 10 mV.
- 35 En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona las partículas de cualquier párrafo precedente, en donde el exponente de un ajuste de la ley de potencias del desplazamiento cuadrático medio de la población de partículas como función de escalas de tiempo desde 0,067 s a 3,0 s supera 0,1, 0,2, 0,5, 0,8 o 0,9.
- 40 Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una partícula de la invención, por ejemplo, una o más partículas como se describen aquí y/o que tienen una o más de las cualidades descritas anteriormente. En ciertas formas de realización, la composición farmacéutica se adapta para la administración tópica a un tejido mucoso en un paciente. Dicha composición farmacéutica se puede administrar a una superficie mucosa en un paciente, puede pasar a través de una barrera mucosa en el paciente y/o puede mostrar tiempo de residencia prolongado en un tejido recubierto con moco, por ejemplo, debido a mucoadhesión reducida. En ciertas formas de realización, se pueden administrar partículas poliméricas descritas aquí, con o sin un agente bioactivo, a un paciente, por ejemplo, para tratar, inhibir o prevenir una infección vírica.
- 45 En ciertas formas de realización, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de partículas en donde al menos el 1%, el 2%, el 5%, el 10%, el 15%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 70%, el 90%, el 95% o incluso al menos el 99% de las partículas totales en la composición tienen una o más de las características descritas en los párrafos anteriores. Además, la invención proporciona una composición que comprende una mezcla de dos o más tipos de partículas, por ejemplo, uno de cuyos tipos comprende partículas que tienen una o más de las características descritas en los párrafos anteriores.
- 50 En un aspecto, una partícula comprende un núcleo polimérico farmacéuticamente aceptable y un agente modificador de superficie que está embebido o enmarañado en la superficie de la partícula o que está dispuesto (por ejemplo, mediante, recubrimiento, adsorción, unión covalente u otro proceso) en la superficie de la partícula. El agente modificador de superficie puede ser él mismo un agente bioactivo. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, una partícula puede comprender un polímero farmacéuticamente aceptable y un ácido nucleico que recubre la superficie de la partícula. En tales formas de realización, la molécula de ácido nucleico puede modificar la superficie de la partícula y hacerla mucorresistente. En algunas otras formas de realización, una partícula comprende un polímero
- 55
- 60

farmacéuticamente aceptable y una proteína (por ejemplo, seroalbúmina) dispuesta en la superficie de la partícula. La proteína puede modificar la superficie de la partícula y hacerla mucorresistente.

En cualquiera de las formas de realización anteriores, la partícula puede comprender un agente terapéutico o un agente de imagen, por ejemplo, que puede incluir un agente diagnóstico y/o un marcador detectable. Por ejemplo, un ácido nucleico o proteína incluidos en la partícula puede comprender un agente de imagen él mismo, por ejemplo, un marcador detectable puede estar unido al ADN o la proteína. De forma alternativa, la partícula puede comprender un agente de imagen que está separado del ácido nucleico o la proteína, por ejemplo, encapsulado en el núcleo o dispuesto sobre o acoplado a la superficie. Además, la partícula puede comprender uno o más grupos o moléculas de direccionamiento acopladas a la partícula y/o la proteína o ácido nucleico, y el grupo de direccionamiento puede ayudar a distribuir el ácido nucleico, la proteína y/o el agente terapéutico, de imagen y/o diagnóstico a una localización diana en un paciente.

En ciertas formas de realización, una partícula comprende un núcleo polimérico farmacéuticamente aceptable, un agente bioactivo (por ejemplo, un fármaco o medicamento) encapsulado en el núcleo, y un agente modificador de superficie que está embebido o enmarañado en la superficie de la partícula, o dispuesto (por ejemplo, mediante recubrimiento, adsorción, unión covalente u otro proceso) en la superficie de la partícula y que modifica la superficie de la partícula, por ejemplo, para hacerla capaz de difundir rápidamente a través de moco. La partícula puede comprender un agente de imagen, por ejemplo, un agente diagnóstico y/o un marcador detectable. El agente bioactivo encapsulado puede ser o comprender un agente de imagen él mismo, por ejemplo, un marcador detectable puede estar unido a un agente terapéutico. De forma alternativa, la partícula puede comprender un agente de imagen que está separado del agente bioactivo. Además, la partícula puede comprender un grupo o molécula de direccionamiento acoplado a la partícula y el grupo de direccionamiento puede ayudar a distribuir el agente bioactivo y/o el agente de imagen a una localización deseable en un paciente.

En un aspecto, una partícula comprende un núcleo que tiene uno o más agentes bioactivos (por ejemplo, un fármaco o medicamento) y un agente modificador de superficie que está embebido o enmarañado en la superficie de la partícula o que está dispuesto (por ejemplo, mediante recubrimiento, adsorción, unión covalente u otro proceso) en la superficie de la partícula. El agente modificador de superficie puede ser un agente bioactivo él mismo.

De forma alternativa, una partícula puede comprender un núcleo polimérico farmacéuticamente aceptable, un agente modificador de superficie, por ejemplo, un tensioactivo, que está embebido o enmarañado en la superficie de la partícula, o dispuesto (por ejemplo, mediante recubrimiento, adsorción, unión covalente u otro proceso) en la superficie de la partícula y que modifica la superficie de la partícula, tal como haciéndola mucorresistente, y un agente bioactivo dispuesto sobre la partícula polimérica. El agente bioactivo puede estar recubierto o dispuesto de otra manera en la superficie de la partícula, o estar acoplado a la partícula, por ejemplo, mediante unión covalente, formación de complejos u otro proceso. En ciertas formas de realización, el agente modificador de superficie se selecciona para fomentar adhesión o formación de complejos del agente bioactivo a la superficie de la partícula. En tales formas de realización, el agente modificador de superficie y/o el agente bioactivo pueden contribuir a la rápida difusibilidad a través de moco de las partículas modificadas. Las partículas pueden comprender un agente de imagen, tal como un agente diagnóstico y/o un marcador detectable. El agente bioactivo recubierto o dispuesto en la superficie de la partícula o acoplado a la partícula puede ser o comprender un agente de imagen él mismo, por ejemplo, se puede unir un marcador detectable a un agente terapéutico. De forma alternativa, la partícula puede comprender un agente de imagen que está separado del agente bioactivo, por ejemplo, encapsulado en el núcleo o dispuesto sobre o acoplado a su superficie. Además, la partícula puede comprender un grupo o molécula de direccionamiento acoplado a la partícula, y el grupo de direccionamiento puede ayudar a distribuir el agente bioactivo y/o el agente de imagen en una localización diana en un paciente.

La presente invención también proporciona una partícula, que comprende un polímero que tiene regiones de polietilenglicol o sus derivados que están presentadas en la superficie de la partícula. La partícula puede comprender opcionalmente un agente modificador de superficie adicional. La partícula puede comprender además un agente bioactivo y/o un grupo de direccionamiento.

Los agentes bioactivos según la invención incluyen, pero no están limitados a, un ácido nucleico, ADN (por ejemplo, un vector o plásmido de terapia génica), un ARN (por ejemplo, un ARNm, el transcrito de una construcción de ARNi o un ARNip), una molécula pequeña, un peptidomimético, una proteína, péptido, lípido, tensioactivo y combinaciones de los mismos.

El agente modificador de superficie puede modificar la carga o aumentar la hidrofiliidad de la partícula, o fomentar de otra manera la motilidad a través de moco. El agente modificador de superficie puede aumentar la velocidad media a la que las partículas, o una fracción de las partículas, se mueven en o a través de moco. Los ejemplos de agentes modificadores de superficie adecuados incluyen, pero no están limitados a, proteína aniónica (por ejemplo, seroalbúmina), ácidos nucleicos, tensioactivos tales como tensioactivos catiónicos (por ejemplo, bromuro de dimetildioctadecil-amonio), azúcares o derivados de azúcar (por ejemplo, ciclodextrina), polietilenglicol, agentes mucolíticos u otros agentes no mucoadhesivos. Una forma de realización preferida comprende polietilenglicol

covalentemente unido al núcleo de la partícula. Ciertos agentes, por ejemplo, ciclodextrina, pueden formar complejos de inclusión con otras moléculas y se pueden usar para formar uniones a grupos adicionales y facilitar la funcionalización de la superficie de la partícula y/o las moléculas o grupos unidos. Ejemplos de agentes modificadores de superficie glucídicos adecuados incluyen agar, agarosa, ácido alginico, amilopectina, amilosa, beta-glucano, calosa, carragenano, celodextrinas, celulina, celulosa, quitina, quitosano, crisolamina, curdlano, ciclodextrina, dextrina, ficol, fructano, fucoidano, galactomanano, goma gelana, glucano, glucomanano, glicocáliz, glucógeno, hemicelulosa, hidroxietil almidón, kefiran, laminarina, mucilago, glucosaminoglicano, goma natural, paramilón, pectina, péptido polisacárido, esquizofilano, sialil lewis x, almidón, gelatinización de almidón, sugammadex, goma xantana y xiloglucano, así como fragmentos y derivados de tales hidratos de carbono.

Las partículas de la invención tienen muchas aplicaciones. En particular, son muy adecuadas para hacer composiciones farmacéuticas, en particular esas para las que la vía de administración implica que las partículas pasen a través de una barrera mucosa. Por ejemplo, las partículas son particularmente adecuadas para hacer composiciones farmacéuticas a ser formuladas como aerosol nasal, de modo que las composiciones farmacéuticas se pueden distribuir a través de la capa de mucosa nasal. Además, las partículas son particularmente adecuadas para hacer composiciones farmacéuticas a ser formuladas como un inhalador, de modo que las composiciones farmacéuticas se puedan distribuir a través de la capa mucosa pulmonar. De forma similar, las partículas son particularmente adecuadas para hacer composiciones farmacéuticas para distribución a través de tejidos gastrointestinal, respiratorio, rectal y/o vaginal.

Un polímero farmacéuticamente aceptable puede ser un ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico), polietilenimina, dioleiltrimetilamoniopropano/dioleil-sn-glicerolfosfoetanolamina, anhídrido polisebácico u otros polímeros formados de monómeros clínicamente aceptados o aprobados. Ejemplos de monómeros clínicamente aceptados incluyen, pero no están limitados a, monómeros de ácido sebácico y 3-bis(carboxifenoxi)propano. Otros polímeros o copolímeros descritos aquí también se pueden emplear para hacer las partículas poliméricas de la invención.

En ciertas formas de realización, un agente bioactivo es un agente terapéutico o un agente de imagen (por ejemplo, un agente diagnóstico). Ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero no están limitados a, un ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico, una molécula pequeña, un peptidomimético, una proteína, péptido, lípido o tensioactivo y combinaciones de los mismos. En ciertas formas de realización, el agente de imagen comprende además un marcador detectable.

En ciertas formas de realización, una partícula de la invención puede comprender además un agente o molécula de direccionamiento. Una partícula también puede comprender además o de forma alternativa un adyuvante.

En ciertas formas de realización, una partícula de la invención puede comprender además un agente covalentemente unido a la partícula. El agente puede ser un agente bioactivo, tal como un fármaco. El agente puede ser preferiblemente un agente hidrofílico, de modo que mediante su unión covalente a la partícula, el agente modifica la carga o hidrofiliicidad de la partícula, por ejemplo, para disminuir la mucoadhesión de la partícula. La unión covalente puede ser cortable en condiciones biológicas.

También se proporciona un inhalador o nebulizador que comprende una partícula como se ha descrito aquí.

Un aspecto adicional se refiere a un uso de una partícula como se describe aquí en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o diagnóstico de una afección en un paciente, incluyendo medicamentos adaptados para administración tópica a un tejido mucoso.

Un aspecto adicional se refiere a un método para transfectar una célula que comprende poner en contacto la célula con una partícula de la invención que comprende un ácido nucleico. Una partícula de la invención que comprende un ácido nucleico puede transfectar una célula a una eficiencia mayor, por ejemplo a 2, 5, 10, 20, 50, 100 o más veces de eficiencia mayor que el ácido nucleico desnudo, por ejemplo, en presencia de una barrera mucosa.

Un aspecto adicional se refiere a un método para tratar, prevenir o diagnosticar una afección en un paciente, que comprende administrar al paciente una partícula como se describe aquí o una composición farmacéutica que comprende una o más de tales partículas, por ejemplo, mediante administración tópica a un tejido mucosa. En ciertas formas de realización, la partícula pasa a través de una barrera mucosa en el paciente.

Un método ejemplar para preparar tales partículas puede incluir: proporcionar micropartículas o nanopartículas que comprenden un polímero farmacéuticamente aceptable y acoplar (por ejemplo, mediante recubrimiento, unión covalente o colocación) a la superficie de las micropartículas o nanopartículas un agente modificador de superficie, por ejemplo, un polietilenglicol, un ácido nucleico, una proteína o un hidrato de carbono. Tal método puede incluir además: acoplar (por ejemplo, mediante recubrimiento, unión covalente o colocación) a las partículas un agente de imagen, un marcador detectable o un grupo de direccionamiento. El método puede incluir además uno o más de: formar una suspensión de partículas, pasar la suspensión de partículas a través de un filtro, eliminar impurezas de la suspensión de partículas, centrifugación para precipitar las partículas, dializar la suspensión

de partículas y ajustar el pH de la suspensión de partículas. El método también puede incluir extinguir la reacción de unión covalente.

Un aspecto adicional de la invención comprende un método de reducir la mucoadhesividad de una sustancia modificando la sustancia con un grupo modificador de superficie, tal como PEG o un hidrato de carbono. En la presente memoria, los términos “grupo modificador de superficie” y “agente modificador de superficie” se usan sustancialmente de forma intercambiable, en donde “agente modificador de superficie” se refiere preferentemente a una entidad individual y “grupo modificador de superficie” se refiere a todo o parte de una molécula. El grupo modificador de superficie puede aumentar la hidrofiliidad de la sustancia. Por ejemplo, en ciertas formas de realización adicionales, la invención comprende identificar un agente terapéutico o partícula, por ejemplo, molécula pequeña, ácido nucleico, proteína, liposoma, polímero, liposoma, metal u óxido de metal, cuya mucoadhesividad se desea reducir. La sustancia se puede modificar luego con un agente modificador de superficie. Por ejemplo, el método puede comprender identificar un grupo en la sustancia (por ejemplo, molécula pequeña, proteína, liposoma, polímero, liposoma o virus) al que se puede unir el agente modificador de superficie (por ejemplo, PEG) de forma covalente, por ejemplo, sin perder actividad o través de un enlace susceptible de corte intracelular (por ejemplo, hidrolítico o enzimático), tal como un éster o amida. De forma alternativa, el agente modificador de superficie puede estar asociado de forma no covalente con la sustancia, por ejemplo, recubriendo una forma particulada de la sustancia, por ejemplo, para fomentar su difusividad a través de moco. En ciertas formas de realización adicionales, se puede administrar a un paciente una preparación farmacéutica de la sustancia modificada, por ejemplo, una formulación adaptada para distribución tópica a un tejido mucoso de un paciente.

Un aspecto adicional de la invención comprende un método de aumentar la difusividad en moco de una sustancia en necesidad de la misma, modificando la sustancia con un agente modificador de superficie. Por ejemplo, en ciertas formas de realización la invención comprende seleccionar una sustancia en necesidad de difusividad aumentada a través de moco, un agente modificador de superficie adecuado para fomentar la difusión de de la sustancia a través de moco y un grupo en dicha sustancia al que pueda acoplar el agente modificador de superficie para aumentar la difusividad de la sustancia a través de moco mientras que se evita la pérdida total de actividad de la sustancia. El agente modificador de superficie se puede disponer después sobre dicha sustancia para aumentar su difusividad a través de moco. Además, la sustancia con dicho agente modificador de superficie se puede formular para producir una preparación farmacéutica, que se puede administrar a un paciente con el fin de aumentar la difusividad en moco, por ejemplo en una formulación adaptada para administración tópica a un tejido mucoso de un paciente. Dicha preparación farmacéutica o la sustancia con dicho agente modificador de superficie se puede administrar a una superficie mucosa en un paciente, puede pasar a través de una barrera mucosa en el paciente y/o puede mostrar tiempo de residencia prolongado en un tejido recubierto de moco, por ejemplo, debido a mucoadhesión reducida.

Las sustancias en necesidad de difusividad aumentada pueden, por ejemplo, ser hidrofóbicas, tener muchos donantes o aceptores de puentes de hidrógeno, o estar muy cargadas. Tal sustancia puede ser un agente que viaja a través de moco humano a menos de o igual a una décima (o incluso una centésima o una milésima) de la velocidad a la que viaja en agua. En la técnica se conocen ciertos fármacos que son mucoadhesivos (Khanvilkar K, Donovan MD, Flanagan DR, *Drug transfer through mucus*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 48 (2001) 173-193; Bhat PG, Flanagan DR, Donovan MD. *Drug diffusion through cystic fibrotic mucus: steady-state permeation, rheologic properties, and glycoprotein morphology*, *J Pharm Sci*, Junio 1996; 85(6):624-30.). Como ejemplo, se sugiere que la dexametasona, un corticosteroide para tratar inflamación, no es eficaz debido a la penetración inadecuada de la barrera mucosa (Kennedy, M.J., *Pharmacotherapy*, 2001. 21(5): p. 593-603). Además, el moco reduce la difusión de algunas proteínas; véase, por ejemplo, Saltzman WM, Radomsky ML, Whaley KJ, Cone RA, *Antibody Diffusion in Human Cervical Mucus*, *Biophysical Journal*, 1994. 66:508-515.

En ciertas formas de realización, las sustancias (tales como partículas) modificadas con agentes modificadores de superficie como se describe aquí pueden pasar a través de una barrera mucosa en el paciente, y/o mostrar tiempo de residencia prolongado en un tejido recubierto de moco, por ejemplo, tales sustancias se depuran más lentamente (por ejemplo, al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces o incluso al menos 20 veces más despacio) del cuerpo de un paciente que una partícula de poliestireno modificada con carboxilo comparable típica.

La presente invención también contempla el uso de partículas o polímeros “sacrificiales” para fomentar el transporte de partículas activas a través de moco, en donde las partículas o polímeros sacrificiales aumentan la velocidad a la que las partículas activas se mueven a través de moco. Sin querer estar unido a ninguna teoría, se cree que tales partículas sacrificiales interaccionan con el moco y cambian las propiedades estructurales o adhesivas del moco circundante de modo que las partículas activas experimentan mucoadhesión disminuida. Por ejemplo, la invención contempla el uso de PEG (por ejemplo, no asociado física o químicamente con la(s) partícula(s) activa(s)) como un polímero sacrificial para fomentar la difusión de ciertas partículas a través de moco. Además, la invención contempla el uso de partículas que carecen de agente modificador de superficie (y opcionalmente que carecen de un agente terapéutico), usadas en combinación con partículas modificadoras de superficie de la invención, por ejemplo, que contienen un agente terapéutico. En ciertas formas de realización, las partículas sacrificiales son partículas de poliestireno (PS) modificadas con carboxilo. En ciertas formas de realización, la invención contempla el uso de

partículas sacrificiales que tienen menos de 1.000.000, 500.000, 200.000, 100.000, 50.000, 20.000, 10.000, 5000, 2000, 1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2 o 1 nm de diámetro, o tienen un diámetro intermedio entre cualquiera de estos valores. En ciertas formas de realización, la invención contempla el uso de partículas sacrificiales que pasan a través de una barrera mucosa a una velocidad que es menor de 1/100, 1/200, 1/500, 1/600, 1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/5000 o incluso menor de 1/10.000 de la velocidad de la partícula en agua en condiciones idénticas. Además, la presente invención proporciona partículas sacrificiales que viajan a ciertas velocidades absolutas. Por ejemplo, las partículas sacrificiales pueden viajar a velocidades menores de 2 , 1 , 5×10^{-1} , 2×10^{-1} , 1×10^{-1} , 8×10^{-2} , 6×10^{-2} , 5×10^{-2} , 4×10^{-2} , 2×10^{-2} , 1×10^{-2} , 5×10^{-3} , 2×10^{-3} , 1×10^{-3} , 5×10^{-4} , 2×10^{-4} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 2×10^{-5} o incluso menor de $1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$, a una escala de tiempo de 1s.

La presente invención también contempla una composición de materia que comprende moco humano (por ejemplo, moco cervicovaginal, pulmonar, gastrointestinal, nasal, respiratorio o rectal) y cualquiera de las partículas descritas anteriormente.

La presente invención también contempla una partícula que comprende un polímero que incluye regiones de un agente modificador de superficie que localizan en la superficie de la partícula. Por ejemplo, una partícula puede ser un copolímero de un polímero mucorresistente, tal como PEG. Tal polímero puede formar una partícula en donde regiones que fomentan la difusión a través de moco, se localizan en la superficie de la partícula, reduciendo de esta manera o incluso obviando la necesidad para un recubrimiento separado u otra modificación con un agente modificador de superficie.

En ciertas formas de realización, una partícula puede incluir un agente que fomenta la difusión a través de moco, en donde dicho agente está presente tanto en la superficie como en el interior de la partícula. Dicho agente puede estar unido de forma covalente o no covalente a otro componente de la partícula tal como un agente bioactivo o un vehículo polimérico.

La invención proporciona además una composición que comprende una primera pluralidad de partículas y una segunda pluralidad de partículas. En ciertas formas de realización, la primera pluralidad de partículas y la segunda pluralidad de partículas son tipos distintos de partículas. En ciertas formas de realización, la primera pluralidad de partículas comprende partículas mucorresistentes como se ha descrito anteriormente y la segunda pluralidad comprende partículas sacrificiales. En ciertas formas de realización, la primera pluralidad de partículas constituye al menos el 1%, el 2%, el 5%, el 10%, el 15%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 70%, el 90%, el 95% o el 99% de las partículas totales en la composición. En ciertas formas de realización, la segunda pluralidad de partículas constituye al menos el 1%, el 2%, el 5%, el 10%, el 15%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 70%, el 90%, el 95% o el 99% de las partículas totales en la composición. En ciertas formas de realización, las partículas de la primera pluralidad tienen una o más de las características descritas en los párrafos anteriores.

Las partículas dentro de una pluralidad de partículas se pueden clasificar como que tienen uno de tres modos de transporte: difusivo, inmóvil y entorpecido.

En ciertas formas de realización, la segunda pluralidad de partículas comprende una fracción inmóvil definida como las que muestran un MSD medio menor de la resolución de 10 nm en una escala de tiempo de 1 s. En ciertas formas de realización, la fracción inmóvil puede comprender más del 80%, el 70%, el 60%, el 50%, el 40%, el 30%, el 20%, el 10%, el 5%, el 2% o el 1% de las partículas en la segunda pluralidad.

En ciertas formas de realización, la segunda pluralidad de partículas comprende una fracción entorpecida que se adhiere fuertemente a moco pero no es inmóvil. La suma de las fracciones entorpecida e inmóvil se define aquí en la sección 1.5 de la ejemplificación como partículas que muestran valores de CR por debajo del intervalo del 97,5% tanto para escalas de tiempo cortas como largas. En ciertas formas de realización, la fracción entorpecida puede comprender más del 85%, el 60%, el 50%, el 40%, el 30%, el 20%, el 10%, el 5%, el 2% o el 1% de las partículas en la segunda pluralidad. La segunda pluralidad de partículas puede difundir a través de moco cervicovaginal humano a una difusividad media que menor de 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/5000 o 1/10000 de la difusividad a que las partículas difunden en agua a una escala de tiempo de 1 s.

En ciertas formas de realización, la primera pluralidad de partículas comprende una fracción difusiva que se adhiere poco a moco o no se adhiere en absoluto. La fracción difusiva se define aquí en la sección 1.5 de la ejemplificación como partículas que no son entorpecidas o inmóviles. En ciertas formas de realización, las partículas de la fracción difusiva tienen una o más de las cualidades mucorresistentes descritas anteriormente. En ciertas formas de realización, la fracción difusiva puede comprender más del 85%, el 60%, el 50%, el 40%, el 30%, el 20%, el 10%, el 5%, el 2% o el 1% de las partículas en la primera pluralidad.

Otro aspecto de la invención proporciona un virus con envuelta que tiene un grupo modificador de superficie dispuesto en una superficie del virus (por ejemplo, recubriendo la superficie del virus), en donde dicho virus difunde a través de moco cervicovaginal humano a una difusividad (en una escala de tiempo de 1 s) que es más de 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 o 1000 veces mayor que la difusividad a la que el virus correspondiente que carece del grupo

modificador de superficie difunde a través de moco cervicovaginal humano. El virus puede comprender además un vector u otro ácido nucleico terapéutico como se contempla aquí.

Breve descripción de las figuras

5
Figura 1A, 1B y 1C. Velocidades de transporte de partículas de poliestireno modificado con COOH (COOH-PS) en moco CV. (A) Desplazamientos cuadráticos medios ($\langle \text{MSD} \rangle$) geométricos de media del ensamble y (B) difusividades efectivas ($\langle D_{\text{ef}} \rangle$) como función de la escala de tiempo. (C) D_{ef} media de subfracciones de partículas, de las más rápidas a las más lentas, a una escala de tiempo de 1 s. "A" indica la D_{ef} en agua pura. La línea de puntos negra en $\langle D_{\text{ef}} \rangle = 1 \times 10^{-4}$ significa la resolución microscópica-las partículas más lentas de este valor se consideran inmóviles. Los datos representan la media de 3 experimentos, con $n \geq 120$ partículas para cada experimento.

15
Figura 2A, 2B, 2C, 2D, 2E y 2F. Velocidades de transporte de partículas de poliestireno modificado con PEG de 2 kDa (PEG2kDa-PS) en moco CV. (A) Desplazamientos cuadráticos medios ($\langle \text{MSD} \rangle$) geométricos de media del ensamble y (B) difusividades efectivas ($\langle D_{\text{ef}} \rangle$) como función de la escala de tiempo. (C) D_{ef} media de subfracciones de PEG2kDa-PS, de las más rápidas a las más lentas, a una escala de tiempo de 1 s. La línea de puntos negra en $\langle D_{\text{ef}} \rangle = 1 \times 10^{-4}$ significa la resolución microscópica-las partículas más lentas de este valor se consideran inmóviles. Distribuciones de modo de transporte de COOH-PS y PEG2kDa-PS: (D) partículas inmóviles, (E) partículas inmóviles y entorpecidas y (F) partículas difusivas. Los datos representan la media de ensamble de 3 experimentos, con $n \geq 120$ partículas para cada experimento.

25
Figura 3A y 3B. Velocidades de transporte de partículas de poliestireno modificado con PEG de 10 kDa (PEG10kDa-PS) en moco CV. (A) Desplazamientos cuadráticos medios ($\langle \text{MSD} \rangle$) geométricos de media del ensamble como función de la escala de tiempo. (B) Fracciones de PEG10kDa-PS sometidas a diferentes modos de transporte: partículas inmóviles (Inm), inmóviles y entorpecidas (I + H) y difusivas (Dif). Los datos representan la media de ensamble de 3 experimentos, con $n \geq 110$ partículas para cada experimento.

30
Figura 4A, 4B, 4C, 4D y 4E. Efecto de mucolíticos (rhDNasa, NAC) sobre la reología de moco y transporte de partículas en mucosidad de FQ. MSD de un subconjunto de partículas individuales de 200 nm para (A) sin tratamiento (nótese la gran variación) y (B) tratamiento con pulmozima (rhDNasa) (nótese más uniforme) ($n \geq 120$). (C) La viscosidad de compresión se redujo ~50% por tratamiento con rhDNasa, pero sorprendentemente no se correlacionó con transporte de partículas mejorado en moco de FQ (D) (véase el artículo en JBC para explicación [19]). El transporte de partículas en moco de FQ mejoró drásticamente, sin embargo, con NAC: (E) Las difusividades efectivas de partículas de 10 nm ($n = 100-180$) aumentó significativamente ($p < 0,05$) a 30 minutos (NAC 0,4 mM).

35
Figura 5A y 5B. Velocidades de transporte de media de ensamble de nanopartículas de poliestireno de 500 nm modificadas con PEG (PEG-PS) en expectorado de moco pulmonar sin diluir de pacientes de fibrosis quística (FQ). (A) Los desplazamientos cuadráticos medios geométricos de ensamble muestran que el pretratamiento del moco con N-acetil-L-cisteína neutralizada aumentó las velocidades de transporte 10,7 veces comparadas a control sin tratamiento (PBS). (B) La clasificación de las trayectorias del movimiento de las partículas en diferentes modos de transporte (inmóvil, entorpecido, difusivo) muestra que la fracción difusiva de PEG-PS de 500 nm aumenta 3 veces comparada con el control sin tratamiento. Para ambas condiciones, el número de partículas inmóviles es <3%. Los datos representan $n = 200-250$ partículas por condición.

45
Figura 6A, 6B y 6C. Trayectorias típicas de partículas sometidas a transporte en moco CV: partículas (A) inmóviles, (B) entorpecidas y (C) difusivas. La barra de escala representa 2,3 μm para todas las trayectorias. Los recuadros muestran movimientos de partículas inmóviles aumentados 1000x; la barra de escala en el recuadro representa 2,3 nm.

50
Figura 7A y 7B. (A) Densidad de superficie de polietilenglicol (PEG; M.W. ~3,4 kDa) en dos preparaciones diferentes de partículas. Prep A: PEG adsorbido en partículas de poliestireno de 500 nm como se divulga en el ejemplo 6B en el documento WO 2005/072710 A2. Prep. B: PEG de alta densidad conjugado a partículas de poliestireno de 500 nm como se describe en Lai et al., PNAS v104(5): 1482-1487. (B) Relación en masa del polímero nuclear a PEG de superficie para Prep A y Prep B.

55
Figura 8. Tabla que representa el tamaño de partícula (columna 1), química de superficie de partículas (COOH = sin recubrimiento, PEG = recubierto) (columna 2), diámetro experimentalmente determinado de partículas (columna 3), potencial zeta de partículas (columna 4), adsorbancia de avidina de partículas (columna 5) y difusividad efectiva a una escala de tiempo de 1 s (columna 5).

60
Descripción detallada de la invención

1. Visión global

La presente invención se refiere en parte a una nanopartícula o micropartícula recubierta con un agente de superficie que facilita el paso de la partícula a través de moco. Dichas nanopartículas y micropartículas tienen una concentración mayor de agente de superficie de lo que se alcanzado previamente, lo que produce la propiedad inesperada de difusión extremadamente rápida a través de moco. La presente invención comprende además un método de producir dichas partículas. La presente invención comprende además métodos de usar dichas partículas para tratar un paciente.

El moco cervicovaginal (CV) típicamente muestra viscosidad macroscópica en el intervalo (aunque en el extremo superior) de la secreciones mucosas humanas típicas, que incluyen pulmones, aparato digestivo, nariz, ojos y epidídimo. Esto se atribuye en parte a la similitud en la composición química de los diferentes mocos humanos. Por ejemplo, la glicofoma de mucina MUC5B es la forma principal secretada de mucina en las capas mucosas que protegen el conducto CV, pulmones, nariz y ojo. El contenido de mucina, aproximadamente del 1-3% en peso, también es similar entre moco cervical, nasal y pulmonar. La composición de agua en los tipos de moco anteriormente mencionados está en el intervalo del 90-98%. La composición similar de moco y glicofomas de mucina produce una reología similar, caracterizada aquí por la fluidificación por cizalla logarítmica lineal de viscosidad.

Se ha pensado que las nanopartículas mayores que el tamaño de poro de malla medio descrito de moco humano (aproximadamente 100 nm) son demasiado grandes para sufrir transporte por difusión rápido a través de barreras de moco. Sin embargo, se prefieren nanopartículas grandes para mayor eficacia de encapsulación de fármacos y la capacidad para proporcionar distribución sostenida para un espectro más amplio de fármacos. Aquí se divulga una nueva composición de materia que comprende nanopartículas grandes, de 500 y 200 nm de diámetro, recubiertas con un agente modificador de superficie, tal como polietilenglicol. Tales nanopartículas difunden a través de moco con un coeficiente de difusión efectivo (D_{ef}) casi tan alto como el de las mismas partículas en agua (en escala temporal $\tau=1s$). Por el contrario, para partículas sin recubrir de 100-500 nm de diámetro, D_{ef} fue de 2400 a 40.000 veces menor en moco que en agua. De esta manera, al contrario que la creencia predominante, estos resultados demuestran que las nanopartículas grandes, si están apropiadamente recubiertas, pueden penetrar rápidamente el moco fisiológico humano, y ofrecen la perspectiva de que se pueden usar nanopartículas grandes para distribución mucosa se fármacos.

Los tratamientos para enfermedades del conducto cervicovaginal (CV), con frecuencia basados en administración de fármacos a la circulación sistémica mediante píldoras o inyecciones, típicamente sufren de baja eficacia. Por ejemplo, la quimioterapia sistémica es típicamente la última opción o estrictamente concurrente, después de cirugía y radioterapia, para el tratamiento de cáncer cervical. Además, las medicaciones sistémicas pueden producir efectos secundarios adversos significativos, cuando se requieren altas concentraciones de fármaco en la circulación para provocar una respuesta terapéutica en el conducto CV. Para reducir los efectos secundarios y alcanzar terapia localizada, esfuerzos recientes han enfatizado crecientemente métodos de distribución tópica de fármacos, tales como cremas, hidrogeles y dispositivos insertados, para distribuir agentes terapéuticos a través del lado apical del epitelio del cuello uterino. La distribución apical de fármacos también se puede extender a protección contra la transmisión sexual de infecciones, ya que los anticuerpos neutralizantes y microbicidas deben actuar en las superficies mucosas para bloquear la entrada de patógenos.

Los sistemas de nanopartículas poseen características deseables para el tratamiento, incluyendo: (i) liberación sostenida y controlada de fármacos localmente, (ii) potencial para cruzar la barrera mucosa debido al tamaño nanométrico, (iii) tráfico intracelular rápido a la región perinuclear de células subyacentes, y (iv) protección de agentes terapéuticos cargo de degradación y eliminación en el moco. Sin embargo, las partículas terapéuticas y/o diagnósticas deben superar la barrera mucosa que recubre el conducto cervicovaginal para alcanzar las células subyacentes y evitar la depuración. Las mucinas, proteínas grandes muy glicosiladas (10-40 MDa) secretadas por células epiteliales, representan el componente principal del gel viscoelástico enmarañado que protege el epitelio subyacente de la entrada de patógenos y toxinas. Otros constituyentes del moco, tales como lípidos, sales, macromoléculas, restos celulares y agua, funcionan junto con las mucinas para formar un entorno nanoscópicamente heterogéneo para el transporte de nanopartículas, donde la viscosidad de comprensión dependiente de cizalla es típicamente de 100-10.000 veces más viscosa que el agua. Se ha mostrado que los virus pequeños de hasta 55 nm difunden en el moco CV tan rápidamente como en agua; sin embargo, un virus mayor, el virus del herpes simple de 180 nm, se retrasó de 100 a 1000 veces por el moco CV comparado con agua, lo que sugiere que el espaciamiento de la malla de moco es alrededor de 20-200 nm. También se ha descrito previamente que las partículas de poliestireno (de 59-1000 nm) se adhirieron fuertemente al moco cervical, lo que las hizo completamente inmóviles (Olmsted, SS, Padgett, JL, Yudin, AI, Whaley, KJ, Moench, TR & Cone, RA (2001) *Biophysical Journal* **81**, 1930-1937). Estas observaciones han sugerido que el transporte de nanopartículas poliméricas sintéticas, especialmente las mayores de ~59 nm, era improbable que ocurriera de forma lo suficientemente eficaz para permitir acceso de partículas de liberación sostenida al epitelio subyacente en tejidos humanos recubiertos de moco.

Para investigar y potencialmente mejorar el transporte de nanopartículas a través de la barrera de moco cervicovaginal, se estudiaron las velocidades de transporte cuantitativo de cientos de nanopartículas individuales de

varios tamaños y químicas de superficie en secreciones cervicovaginales humanas. Se obtuvo moco sin diluir en condiciones fisiológicamente relevantes mediante un procedimiento nuevo que usa un dispositivo de recogida menstrual (Boskey, ER, Moench, TR, Hees, PS & Cone, RA (2003) *Sexually Transmitted Diseases* **30**, 107-109). Sorprendentemente, se describe que las nanopartículas, incluyendo las mayores que el espaciado de malla de moco CV previamente descrito, son capaces de transporte rápido en moco CV si están recubiertas con un polímero mucorresistente, tal como polietilenglicol.

Se ha usado poli(etilenglicol) (PEG) de alto peso molecular como un mucoadhesivo añadido a sistemas poliméricos por su capacidad descrita para interpenetrar en la red de moco (Bures et al., J. Controlled Release, (2001) 72:25-33; Huang et al., J. Controlled Release, (2000) 65:63-71; Peppas et al., J. Controlled Release, (1999) 62:81-87) y formar enlaces de hidrógeno con mucinas Willits et al., Biomaterials, (2001) 22:445-452; Sanders et al., J. Controlled Release, (2003) 87:117-129, y solicitud de patente PCT No. US2005/002556). Sin embargo, como se muestra en los ejemplos posteriormente, la modificación de la superficie de los distintos tipos de partículas que tienen un recubrimiento denso de PEG disminuyó la adsorción de componentes del moco a la superficie de la partícula y permitió un transporte más rápido a través de moco con un número reducido de partículas adhesivas. Se puede emplear polietilenglicol de alto peso molecular para reducir la mucoadhesión en ciertas configuraciones, por ejemplo, en donde la longitud de las cadenas de PEG que se extienden desde la superficie se controla (de modo que las cadenas largas sin ramificar que interpenetran en la red de moco se reducen o eliminan). Por ejemplo, se puede emplear PEG lineal de alto peso molecular en la preparación de partículas de modo que solo partes de las hebras lineales se extienden desde la superficie de las partículas (por ejemplo, partes equivalentes en longitud a moléculas de PEG de peso molecular menor). De forma alternativa, se puede emplear PEG de alto peso molecular ramificado. En tales formas de realización, aunque el peso molecular de una molécula de PEG puede ser alto, la longitud lineal de cualquier hebra individual de la molécula que se extiende desde la superficie de una partícula correspondería a una cadena lineal de una molécula de PEG de menor peso molecular.

Se puede producir PEG en un intervalo de pesos moleculares. La presente invención contempla el uso de uno o más pesos moleculares diferentes de PEG en la superficie de nanopartículas, incluyendo, pero no limitado a, 300 Da, 600 Da, 1 kDa, 2 kDa, 3 kDa, 4 kDa, 6 kDa, 8 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 50 kDa, 100 kDa, 200 kDa, 500 kDa y 1 MDa. Además, el PEG de cualquier peso molecular determinado puede variar en otras características tales como longitud, densidad y ramificación. Esta invención contempla el uso de diferentes variantes de PEG, incluyendo PEG de diferentes longitudes, densidades o grado de ramificación.

Sin querer estar unido por ninguna teoría, un posible mecanismo para este efecto es que el PEG cambia el microentorno de la partícula, por ejemplo ordenando agua y otras moléculas en el entorno partícula/moco; un posible mecanismo adicional o alternativo es que el PEG libre protege los dominios adhesivos de las fibras de mucina, reduciendo por tanto la adhesión de la partícula y acelerando el transporte de la partícula.

La modificación de la superficie de la partícula con otros polímeros, proteínas, tensioactivos, azúcares, hidratos de carbono, ácidos nucleicos o materiales no mucoadhesivos también puede producir transporte aumentado en moco y otros fluidos biológicos adhesivos, tal como suero. En ciertas formas de realización, la superficie de la partícula se recubre con uno o más de ADN, ARN, seroalbúmina bovina (BSA), seroalbúmina humana (HSA), poliglicina, ácido poliglicólico, agar, agarosa, ácido algínico, amilopectina, amilosa, beta-glucano, calosa, carragenano, celodextrinas, celulosa, celulosa, quitina, quitosano, crisolaminarina, curdlano, ciclodextrina, dextrina, ficol, fructano, fucoidano, galactomanano, goma gelana, glucano, glucomanano, glicocaliz, glucógeno, hemicelulosa, hidroxietil almidón, kefiran, laminarina, mucilago, glicosaminoglucano, goma natural, paramilón, pectina, péptido polisacárido, esquizofilano, sialil lewis x, almidón, gelatinización de almidón, sugammadex, goma xantana y xiloglucano. Por ejemplo, como se muestra posteriormente, la modificación de la superficie de la partícula mediante la unión covalente de PEG a partículas modificadas con COOH aumenta el transporte en moco. Además, la adición de N-acetil-cisteína aumenta el transporte en moco. Otras moléculas, tales como tensioactivos o polímeros, incluyendo poli(ácido aspártico) y proteínas, tal como heparina, también pueden aumentar las velocidades de transporte en moco.

Según esto, la presente invención se refiere a partículas (por ejemplo, partículas poliméricas o liposomales) o composiciones que las comprenden, tales como composiciones farmacéuticas para la distribución de agentes biológicamente activos y/o terapéuticos, por ejemplo, para la prevención, detección o tratamiento de una enfermedad u otra afección en un paciente, en particular, para la distribución a través de barreras mucosas en el paciente. La presente invención también proporciona una partícula que comprende un polímero que tiene regiones de polietilenglicol que están presentes en la superficie de la partícula. En ciertas formas de realización, se pueden usar polímeros biodegradables y/o biocompatibles para transportar o llevar un agente terapéutico adsorbido o encapsulado a través de una barrera mucosa presente en cualquier superficie mucosa, por ejemplo, tejidos de mucosa gastrointestinal, nasal, respiratoria, rectal o vaginal en un paciente. Los agentes que se pueden adsorber o encapsular en las composiciones objeto incluyen agentes de imagen o diagnóstico (tales como agentes radiopacos, anticuerpos marcados, sondas de ácidos nucleicos marcadas, colorantes, tales como colorantes coloreados o fluorescentes, etc.) y adyuvantes (radiosensibilizadores, agentes de aumento de la transfección, agentes quimiotácticos y quimioatrayentes, péptidos que modulan la adhesión celular y/o movilidad celular, agentes

permeabilizantes de células, potenciadores de vacunas, inhibidores de multiresistencia a fármacos y/o bombas de salida). La presente invención también se refiere a métodos de hacer y/o administrar tales composiciones, por ejemplo, como parte de una pauta de tratamiento, por ejemplo, por inhalación, por vía tópica (por ejemplo, para administración a un tejido mucoso de un paciente) o por inyección, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa.

2. Definiciones

Por conveniencia, antes de la descripción adicional de la presente invención, ciertos términos empleados en la especificación, ejemplos y reivindicaciones adjuntas se recogen aquí. Estas definiciones se deben leer a la luz del resto de la divulgación y entender como el experto en la materia.

El término “dispositivo de acceso” es un término reconocido en la técnica e incluye cualquier dispositivo médico adaptado para ganar o mantener acceso a un área anatómica. Tales dispositivos son familiares para los expertos en campos médicos y quirúrgicos. Un dispositivo de acceso puede ser una aguja, un catéter, una cánula, un trocar, un tubo, una derivación, un drenaje o un endoscopio tal como un otoscopio, nasofaringoscopio, broncoscopio o cualquier otro endoscopio adaptado para su uso en el área de la cabeza y cuello o cualquier otro dispositivo médico adecuado para entrar o permanecer posicionado en el área anatómica preseleccionada.

Los términos “polímero biocompatible” y “biocompatibilidad” cuando se usan en relación a polímeros están reconocidos en la técnica. Por ejemplo, polímeros biocompatibles incluyen polímeros que no son tóxicos ellos mismos para el huésped (por ejemplo, un animal o ser humano), ni se degradan (si el polímero se degrada) a una velocidad que produzca subunidades monoméricas u oligoméricas u otros subproductos a concentraciones tóxicas en el huésped. En ciertas formas de realización de la presente invención, la biodegradación en general implica degradación del polímero en un organismo, por ejemplo, en sus subunidades monoméricas, que se puede saber que sean efectivamente no tóxicas. Los productos oligoméricos intermedios resultantes de tal degradación pueden tener diferentes propiedades toxicológicas, sin embargo, o la biodegradación puede implicar oxidación u otras reacciones bioquímicas que generan moléculas diferentes de las subunidades monoméricas del polímero. Por consiguiente, en ciertas formas de realización, la toxicología de un polímero biodegradable que se pretende para su uso in vivo, tal como implantación o inyección en un paciente, se puede determinar después de uno o más análisis de toxicidad. No es necesario que cualquier composición objeto tenga una pureza del 100% para que se juzgue biocompatible. Por tanto, una composición objeto puede comprender el 99%, el 98%, el 97%, el 96%, el 95%, el 90%, el 85%, el 80%, el 75% o incluso menos de polímeros biocompatibles, por ejemplo, incluyendo polímeros y otros materiales y excipientes descritos aquí, y ser aún biocompatible.

Para determinar si un polímero u otro material es biocompatible, puede ser necesario realizar un análisis de toxicidad. Tales ensayos se conocen bien en la técnica. Un ejemplo de tal ensayo se puede realizar con células vivas de carcinoma, tal como células tumorales GT3TKB, de la siguiente manera: la muestra se degrada en NaOH 1 M a 37°C hasta que se observa degradación completa. La solución se neutraliza después con HCl 1 M. Se colocan alrededor de 200 µL de varias concentraciones de los productos de muestra degradados en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos y se siembran células de carcinoma gástrico humano (GT3TKB) a una densidad de 10⁴/pocillo. Los productos de muestra degradados se incuban con las células GT3TKB durante 48 horas. Los resultados del ensayo se pueden representar como % de crecimiento relativo frente a concentración de muestra degradada en el pocillo de la placa de cultivo. Además, también se pueden evaluar los polímeros y formulaciones de la presente invención mediante pruebas in vivo bien conocidas, tales como implantaciones subcutáneas en ratas para confirmar que no producen niveles significativos de irritación o inflamación en los sitios de implantación subcutánea.

Se pueden emplear polímeros biocompatibles y biodegradables ejemplares divulgados en la patente de EE UU 7.163.697 para hacer las partículas poliméricas de la presente invención.

El término “biodegradable” está reconocido en la técnica, e incluye polímeros, composiciones y formulaciones, tales como las descritas aquí, que se pretende que se degraden durante su uso. Los polímeros biodegradables típicamente se diferencian de los polímeros no biodegradables en que los primeros se pueden degradar durante el uso. En ciertas formas de realización, tal uso implica uso in vivo, tal como terapia in vivo, y en ciertas otras formas de realización, tal uso implica uso in vitro. En general, la degradación atribuible a biodegradabilidad implica la degradación de un polímero biodegradable en sus subunidades componentes, o digestión, por ejemplo, mediante un proceso bioquímico, del polímero en subunidades no poliméricas más pequeñas. En ciertas formas de realización, en general se pueden identificar dos tipos diferentes de biodegradación. Por ejemplo, un tipo de biodegradación puede implicar rotura de enlaces (covalentes o de otro tipo) en el esqueleto del polímero. En tal biodegradación, típicamente se producen monómeros y oligómeros, e incluso más típicamente, tal biodegradación se produce por rotura de un enlace que une una o más subunidades de un polímero. Por el contrario, otro tipo de biodegradación puede implicar rotura de un enlace (covalente o de otro tipo) interno a la cadena lateral o que une una cadena lateral con el esqueleto del polímero. Por ejemplo, se puede liberar un agente terapéutico u otro grupo químico unido como una cadena lateral al esqueleto del polímero por biodegradación. En ciertas formas de realización, puede suceder uno u otro o ambos tipos generales de biodegradación durante el uso de un polímero.

Como se usa aquí el término “biodegradación” abarca ambos tipos generales de biodegradación. La velocidad de degradación de un polímero biodegradable con frecuencia depende en parte en varios factores, incluyendo la identidad química de la unión responsable de cualquier degradación, el peso molecular, cristalinidad, bioestabilidad y grado de entrecruzamiento de tal polímero, las características físicas (por ejemplo, forma y tamaño) del implante, y el modo y localización de la administración. Por ejemplo, cuanto mayor sea el peso molecular, mayor será el grado de cristalinidad, y/o cuando mayor sea la bioestabilidad, la biodegradación de cualquier polímero biodegradable normalmente es más lenta. El término “biodegradable” se pretende que cubra materiales y procesos también denominados “bioerosionables”.

En ciertas formas de realización en donde el polímero biodegradable también tiene un agente terapéutico u otro material asociado con él, la velocidad de biodegradación de tal polímero se puede caracterizar por una velocidad de liberación de tales materiales. En tales circunstancias, la velocidad de biodegradación puede depender no solo en la identidad química y las características físicas del polímero, sino también en la identidad de(l) los material(es) incorporado(s) en el mismo.

En ciertas formas de realización, las formulaciones poliméricas de la presente invención se biodegradan en un periodo que es aceptable en la aplicación deseada. En ciertas formas de realización, tal como en terapia in vivo, tal degradación se produce en un periodo normalmente menor de alrededor de cinco años, un año, seis meses, tres meses, un mes, quince días, cinco días, tres días o incluso un día o menos (por ejemplo, 4-8 horas) en exposición a una solución fisiológica con un pH entre 6 y 8 que tiene una temperatura de entre 25 y 37°C. En otras formas de realización, el polímero se degrada en un periodo de entre alrededor de una hora y varias semanas, dependiendo de la aplicación deseada.

El término “moco cervicovaginal” está reconocido en la técnica y se refiere a moco cervicovaginal no ovulatorio reciente mínimamente diluido recogido de un sujeto humano.

El término “partícula correspondiente” se usa aquí para referirse a una partícula que es sustancialmente idéntica a la partícula con la que se compara, pero típicamente carece de una modificación mucorresistente de superficie. Una partícula correspondiente puede ser de material, densidad y tamaño similares que la partícula con la que se compara. En ciertas formas de realización, una partícula correspondiente es una partícula de poliestireno (PS) modificado con carboxilo, por ejemplo, disponible de Molecular Probes, Eugene, OR. En ciertas formas de realización, una partícula comparable es una partícula de poliestireno que tiene modificaciones de superficie carboxilo, amina o aldehído sulfato. Dichos grupos carboxilo están preferiblemente presentes a una densidad de 1,77 a 6,69 carboxilos por nm². En ciertas formas de realización, una partícula correspondiente es polimérica, liposomal, vírica, metálica, de óxido de metal (por ejemplo, sílice) o un punto cuántico que se diferencia sustancialmente solo en una manera específica, tal como la falta de una modificación mucorresistente de superficie.

El término “ADN” está reconocido en la técnica y se refiere aquí a un polímero de desoxinucleótidos. Los ejemplos de ADN incluyen plásmidos, vector de terapia génica y un vector diseñado para inducir ARNi.

El término “diámetro” está reconocido en la técnica y se usa aquí para referirse a cualquiera del diámetro físico o el diámetro hidrodinámico de la entidad en cuestión. El diámetro de una partícula esencialmente esférica se puede referir al diámetro físico o al diámetro hidrodinámico. El diámetro de una partícula no esférica se puede referir preferentemente al diámetro hidrodinámico. Como se usa aquí, el diámetro de una partícula no esférica se puede referir a la mayor distancia lineal entre dos puntos en la superficie de la partícula. Cuando se refiere a partículas múltiples, el diámetro de las partículas típicamente se refiere al diámetro medio de las partículas a las que se hace referencia.

El término “dispositivo de distribución de fármacos” es un término reconocido en la técnica y se refiere a cualquier dispositivo médico adecuado para la aplicación de un fármaco o agente terapéutico a un órgano o región anatómica diana. El término incluye, sin limitación, esas formulaciones de las composiciones de la presente invención que liberan el agente terapéutico en los tejidos circundantes de un área anatómica. El término incluye además esos dispositivos que transportan o logran la instilación de las composiciones de la presente invención hacia el órgano o área anatómica diana, incluso si el dispositivo mismo no está formulado para incluir la composición. Como ejemplo, una aguja o un catéter a través de los cuales la composición se inserta en un área anatómica o en un vaso sanguíneo u otra estructura relacionada al área anatómica se entiende que es un dispositivo de distribución de fármacos. Como un ejemplo adicional, se entiende que una endoprótesis vascular o una derivación o un catéter que tiene la composición incluida en su sustancia o recubre su superficie es un dispositivo de distribución de fármacos.

Cuando se usa con respecto a un agente terapéutico u otro material, el término “liberación sostenida” está reconocido en la técnica. Por ejemplo, una composición objeto que libera una sustancia durante tiempo puede mostrar características de liberación sostenida, al contrario de una administración por inyección rápida en la que la cantidad entera de la sustancia se hace biológicamente disponible a la vez. Por ejemplo, en formas de realización particulares, tras entrar en contacto con los líquidos corporales incluyendo sangre, líquido cefalorraquídeo,

secreciones mucosas, linfa o similares, las matrices poliméricas (formuladas como se proporciona aquí y de otra manera como las conoce el experto en la materia) pueden experimentar degradación gradual o retrasada (por ejemplo, mediante hidrólisis) con liberación concomitante de cualquier material incorporado en las mismas, por ejemplo, un agente terapéutico y/o biológicamente activo, durante un periodo sostenido o extendido (comparado con la liberación de una inyección rápida). Esta liberación puede producir distribución prolongada de cantidades terapéuticamente eficaces de cualquier agente terapéutico incorporado.

El término "agente de distribución" es un término reconocido en la técnica, e incluye moléculas que facilitan la distribución intracelular de un agente terapéutico u otro material. Ejemplos de agentes de distribución incluyen: esteroides (por ejemplo, colesterol) y lípidos (por ejemplo, un lípido catiónico, virosoma o liposoma).

El término "lípido" está reconocido en la técnica y se usa aquí para referirse a una molécula natural soluble en grasa. También se usa "lípido" aquí para referirse a una molécula con una parte cargada y una cadena de hidrocarburo hidrofóbica. Aquí, el término "lípido" incluye las moléculas que comprenden liposomas.

El término "metal" está reconocido en la técnica y se usa aquí para referirse en general a elementos en los grupos 1-13/grupos I-III A y I-VIII B (incluyendo metales de transición, lantánidos, actínidos, metales alcalinos y metales alcalinotérreos), así como silicio, germanio, estaño, plomo, antimonio, bismuto y polonio. Aquí, hierro, cobre, plata, platino, vanadio, rutenio, manganeso, bario, boro, lantánidos, renio, tecnecio, silicio y otros se consideran metales. El término "óxidos de metal" como se usa aquí se refiere a óxidos de tales metales, incluyendo sílice (dióxido de silicio), alúmina (óxido de aluminio), óxido de bario, etc.

El término "microesferas" está reconocido en la técnica e incluye estructuras coloidales sustancialmente esféricas, por ejemplo, formadas de polímeros biocompatibles tales como las composiciones objeto, que tienen un tamaño que varía desde alrededor de uno o más hasta alrededor de 1000 micrómetros. En general, se pueden distinguir "microcápsulas", también un término reconocido en la técnica, de microesferas, porque las microcápsulas están en general recubiertas por una sustancia de algún tipo, tal como una formulación polimérica. El término "micropartículas" también está reconocido en la técnica e incluye microesferas y microcápsulas, así como estructuras que no se pueden colocar fácilmente en ninguna de las dos categorías anteriores, todas con dimensiones de media de menos de alrededor de 1000 micrómetros. Una micropartícula puede ser esférica o no esférica y puede tener cualquier forma regular o irregular. Si las estructuras tienen menos de alrededor de un micrómetro de diámetro, entonces se pueden utilizar los correspondientes términos reconocidos en la técnica "nanoesfera", "nanocápsula" y "nanopartícula". En ciertas formas de realización, las nanoesferas, nanocápsulas y nanopartículas tienen un diámetro medio de alrededor de 500 nm, 200 nm, 100, 50 nm, 10 nm o 1 nm.

Una composición que comprende micropartículas o nanopartículas puede incluir partículas de un intervalo de tamaños de partícula. En ciertas formas de realización, la distribución de tamaño de partícula puede ser uniforme, por ejemplo, con menos de alrededor de un 20% de desviación estándar del diámetro de volumen mediano, y en otras formas de realización, aún más uniforme, por ejemplo, con alrededor del 10% del diámetro de volumen mediano.

El término "agente mucolítico" está reconocido en la técnica e incluye sustancias que se usan clínicamente para aumentar la velocidad de depuración en moco (Hanes, J., M. Dawson, Y. Har-el, J. Suh y J. Fiegel, *Gene Delivery to the Lung*. Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology, A.J.Hickey, Editor. Marcel Dekker Inc.: Nueva York, 2003: p. 489-539). Tales sustancias incluyen, por ejemplo, N-acetil cisteína (NAC), que corta enlaces disulfuro y sulfhidrilo presentes en mucina. Ejemplos adicionales de mucolíticos incluyen altamisa, bromelina, papaina, clerodendro, acetilcisteína, bromhexina, carbocisteína, eprazinona, mesna, ambroxol, sobrerol, domiodol, letosteína, estepronina, tiopronina, gelsolina, timosina β 4, dornasa alfa, neltenexina, erdoesteína y varias DNAsas incluyendo rhDNasa.

El término "moco" está reconocido en la técnica y se usa aquí para referirse a una sustancia natural que es viscosa y comprende glicoproteínas mucina. Se puede encontrar moco en un ser humano o en un animal no humano, tales como primates, mamíferos y vertebrados. Se puede encontrar moco en un ser humano o animal no humano sano o enfermo. El moco puede ser cervicovaginal, pulmonar, gastrointestinal, nasal, respiratorio o rectal. El término "moco" como se usa aquí se refiere a moco reciente sin diluir a menos que se especifique de otra manera.

El término "mucorresistente" se usa aquí para referirse a la propiedad de tener mucoadhesión reducida o baja, o a la propiedad de tener velocidad alta o aumentada de difusión a través de moco. Se puede usar aquí "mucorresistente" para referirse a una partícula que difunde a través de moco cervicovaginal humano a una velocidad que es mayor de 1/1000, 1/500, 1/20, 1/10, 1/5 o 1/2 la velocidad a la que la partícula difunde a través de agua. Además se puede usar aquí "mucorresistente" para referirse a una partícula que se mueve en moco a una velocidad más de 1×10^{-3} , 2×10^{-3} , 5×10^{-3} , 1×10^{-2} , 2×10^{-2} , 4×10^{-2} , 1×10^{-1} , 2×10^{-1} , 5×10^{-1} , 1 o $2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ en una escala de tiempo de 1 s. Se puede usar aquí adicionalmente "mucorresistente" para referirse a una partícula que difunde a través de una barrera mucosa a una velocidad mayor que una partícula correspondiente no mucorresistente, por ejemplo, una partícula de poliestireno modificado con carboxilo de tamaño y densidad similares en donde las modificaciones carboxilo están presentes a una densidad de 1,77 a 6,69 carboxilos por nm^2 , en donde la partícula mucorresistente

- 5 pasa a través de la barrera mucosa a una velocidad que es al menos 10, 20, 30, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10000 o más veces mayor que dicha partícula correspondiente no mucorresistente, por ejemplo, una partícula de poliestireno modificado con carboxilo de tamaño y densidad similares en donde las modificaciones carboxilo están presentes a una densidad de 1,77 a 6,69 carboxilos por nm². Dicha partícula correspondiente no mucorresistente también puede ser una partícula de poliestireno modificada con amina o una partícula de poliestireno modificada con sulfato-aldehído.
- 10 El término “ácido nucleico” se usa aquí para referirse a AND o ARN incluyendo plásmidos, vectores de terapia génica, construcciones de expresión de ARNip y ARNip.
- 15 El término “análogo de ácido nucleico” se usa aquí para referirse a variantes no naturales de ácidos nucleicos incluyendo morfolinos, ácidos nucleicos 2'O-modificados y ácidos péptido nucleicos (APN).
- 20 El término “partícula” está reconocido en la técnica e incluye, por ejemplo, partículas poliméricas, liposomas, metales y puntos cuánticos. Una partícula puede ser esférica o no esférica. Se puede usar una partícula, por ejemplo, para diagnosticar una enfermedad o afección, tratar una enfermedad o afección, o prevenir una enfermedad o afección.
- 25 Las frases “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral” son términos reconocidos en la técnica e incluyen modos de administración diferentes de administración entérica y tópica, tal como inyecciones, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intrapleural, intravascular, intrapericardiaca, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal e intraesternal.
- 30 El término “peptidomimético” está reconocido en la técnica y se refiere a una cadena pequeña similar a proteína diseñada para mimetizar un péptido. Un peptidomimético puede incorporar modificaciones tales como esqueletos alterados y la incorporación de aminoácidos no naturales.
- 35 El término “péptido” está reconocido en la técnica y se refiere a un polímero de aminoácidos. Un péptido puede ser una proteína, polipéptido y/o oligopéptido.
- 40 El término “ARN” está reconocido en la técnica y se refiere aquí a un ácido ribonucleico. ARN puede incluir, por ejemplo, ARNm, el transcrito de una construcción ARNi o un ARNip.
- 45 El término “agente sacrificial” se usa aquí para referirse a un agente que fomenta el transporte de partículas activas a través de moco, por ejemplo, aumenta la velocidad a la que las partículas activas se mueven a través de moco, sin degradar el moco (por ejemplo, no es un agente mucolítico). Sin querer estar unido por ninguna teoría, se cree que tales partículas sacrificiales interactúan con el moco y cambian las propiedades estructurales o adhesivas del moco de modo que las partículas activas experimentan mucoadhesión disminuida. Un agente sacrificial puede ser una partícula (por ejemplo, una micropartícula o una nanopartícula) o un polímero (incluyendo, por ejemplo, PEG).
- 50 “ARNip” se usa aquí para referirse a un ARN exógeno bicatenario de aproximadamente 20-25 nucleótidos que disminuye la expresión de uno o más genes por apareamiento de bases con el ARNm de dicho(s) gen(es) y produce degradación del ARNm diana.
- 55 El término “tensioactivo” está reconocido en la técnica y aquí se refiere a un agente que disminuye la tensión superficial de un líquido.
- 60 El término “agente terapéutico” está reconocido en la técnica y puede comprender un ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico, una molécula pequeña, un peptidomimético, una proteína, péptido, lípido o tensioactivo y una combinación de los mismos.
- 65 El término “tratar” está reconocido en la técnica e incluye prevenir que se produzca una enfermedad, trastorno o afección en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad, trastorno y/o afección pero que todavía no se ha diagnosticado como que la tiene; inhibir la enfermedad, trastorno o afección, por ejemplo, impedir su progreso; y aliviar la enfermedad, trastorno o afección, por ejemplo, producir regresión de la enfermedad, trastorno y/o afección. Tratar la enfermedad o afección incluye mejorar al menos un síntoma de la enfermedad o afección particular, incluso si la patofisiología subyacente no está afectada, tal como tratar el dolor de un sujeto mediante la administración de un agente analgésico incluso aunque tal agente no trate la causa del dolor.
- El término “grupo de direccionamiento” está reconocido en la técnica y se usa aquí para referirse a un grupo que localiza hacia o fuera de un lugar específico. Dicho grupo puede ser, por ejemplo, una proteína, ácido nucleico, análogo de ácido nucleico, hidrato de carbono o una molécula pequeña. Dicha entidad puede ser, por ejemplo, un compuesto terapéutico tal como una molécula pequeña o una entidad diagnóstica tal como un marcador detectable. Dicho lugar puede ser un tejido, un tipo de célula particular o un compartimento subcelular. En una forma de realización, el grupo de direccionamiento dirige la localización de una entidad activa. Dicha entidad activa puede ser

una molécula pequeña, proteína, polímero o metal. Dicha entidad activa puede ser útil para fines terapéuticos o diagnósticos.

Aquí se entiende que viscosidad, como se reconoce en la técnica, es la fricción interna de un fluido o la resistencia a fluir mostrada por un material fluido cuando se somete a deformación. El grado de viscosidad del polímero se puede ajustar por el peso molecular del polímero, así como variando la proporción de sus varias subunidades monoméricas; otros métodos para alterar las características físicas de un polímero específico serán evidentes para los expertos en la materia sin más que experimentación de rutina. El peso molecular del polímero usado en la composición de la invención puede variar ampliamente, dependiendo de si es deseable un estado sólido rígido (pesos moleculares mayores) o si se desea un estado fluido (pesos moleculares menores).

La frase "farmacéuticamente aceptable" está reconocida en la técnica. En ciertas formas de realización, el término incluye composiciones, polímeros y otros materiales y/o formas farmacéuticas que son, dentro del ámbito del juicio médico, adecuadas para usar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, equivalente a una relación beneficio/riesgo razonable.

La frase "soporte farmacéuticamente aceptable" está reconocida en la técnica e incluye, por ejemplo, materiales, composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como un relleno líquido o sólido, diluyente, solvente o material de encapsulación implicado en llevar o transportar cualquier composición objeto, de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada soporte debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de una composición objeto y no perjudicial para el paciente. En ciertas formas de realización, un soporte farmacéuticamente aceptable es no pirógeno. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como soportes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y fécula de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) manteca de cacao y ceras de supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tal como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua sin pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones de tampón fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" está reconocido en la técnica e incluye sales inorgánicas y orgánicas de adición relativamente no tóxicas de composiciones, incluyendo, sin limitación, agentes analgésicos, agentes terapéuticos, otros materiales y similares. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos minerales, tales como ácido clorhídrico y ácido sulfúrico, y las derivadas de ácidos orgánicos, tales como ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y similares. Ejemplos de bases inorgánicas adecuadas para la formación de sales incluyen los hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de amonio, sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, aluminio, zinc y similares. Las sales también se pueden formar con bases orgánicas adecuadas, incluyendo las que son no tóxicas y lo suficientemente fuertes para formar tales sales. Para propósitos de ilustración, la clase de tales bases orgánicas puede incluir mono-, di- y trialkilaminas, tales como metilamina, dimetilamina y trietilamina; mono-, di- o trihidroxialquilaminas tales como mono-, di- y trietanolamina; aminoácidos, tales como arginina y lisina; guanidina; N-metilglucosamina; N-metilglucamina; L-glutamina; N-metilpiperazina; morfolina; etilendiamina; N-bencilfenetilamina; (trihidroximetil)aminoetano; y similares. Véase, por ejemplo, J. Pharm. Sci: 1-19 (1977), incorporado aquí mediante referencia.

Un "paciente", "sujeto" o "huésped" a ser tratado por el método objeto puede significar un ser humano o animal no humano, tales como primates, mamíferos y vertebrados.

El término tratamiento "profiláctico o terapéutico" está reconocido en la técnica e incluye administración al huésped de una o más de las composiciones objeto. Si se administra antes de la manifestación clínica de la afección no deseada (por ejemplo, enfermedad u otro estado no deseado del animal huésped) entonces el tratamiento es profiláctico, es decir, protege al huésped contra el desarrollo de la afección no deseada, mientras que si se administra después de la manifestación de la afección no deseada, el tratamiento es terapéutico (es decir, se pretende para disminuir, mejorar o estabilizar la afección no deseada existente o efectos secundarios de la misma).

El término "prevenir" está reconocido en la técnica y cuando se usa en relación a una afección, tal como a una recaída local (por ejemplo, dolor), una enfermedad tal como cáncer, un síndrome complejo tal como insuficiencia cardíaca o cualquier otra afección médica, se entiende bien en la técnica, e incluye la administración de una composición que reduce la frecuencia de, o retrasa el inicio de, síntomas de una afección médica en un sujeto relativo a un sujeto que no recibe la composición. Por tanto, prevención de cáncer incluye, por ejemplo, reducir el número de neoplasias cancerosas detectables en una población de pacientes que reciben un tratamiento profiláctico relativa a una población control sin tratar, y/o retrasar la aparición de neoplasias cancerosas detectables en un población tratada frente a una población control sin tratar, por ejemplo, en una cantidad estadística y/o clínicamente

significativa. La prevención de una infección incluye, por ejemplo, reducir el número de diagnósticos de la infección en una población tratada frente a una población control sin tratar, y/o retrasar el inicio de los síntomas de la infección en una población tratada frente a una población control sin tratar. La prevención del dolor incluye, por ejemplo, reducir la magnitud de, o de de forma alternativa retrasar, las sensaciones de dolor experimentadas por sujetos en una población tratada frente a una población control sin tratar.

La frase “tiempo de residencia prolongado” está reconocida en la técnica y se refiere a un aumento en el tiempo requerido para que un agente se depure del cuerpo de un paciente, u órgano o tejido de ese paciente. En ciertas formas de realización, “tiempo de residencia prolongado” se refiere a un agente que se depura con una semivida que es el 10%, el 20%, el 50% o el 75% más larga que un estándar de comparación tal como un agente comparable sin un recubrimiento mucorresistente. En ciertas formas de realización, “tiempo de residencia prolongado” se refiere a un agente que se depura con una semivida 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 o 10000 veces más larga que un estándar de comparación tal como un agente comparable sin un recubrimiento mucorresistente.

El término “proteína” está reconocido en la técnica y se usa aquí para referirse a un polímero de aminoácidos.

Las frases “administración sistémica”, “administrado por vía sistémica”, “administración periférica” y “administrado por vía periférica” están reconocidas en la técnica e incluyen la administración de una composición objeto, agente terapéutico u otro material en un sitio remoto de la enfermedad que se trata. La administración de un agente directamente en, sobre o en la cercanía de una lesión de la enfermedad que se trata, incluso si el agente se distribuye posteriormente de forma sistémica, se puede denominar administración “local” o “tópica” o “regional”, diferente de directamente en el sistema nervioso central, por ejemplo, por administración subcutánea, de modo que entra en el sistema del paciente y, por tanto, se somete a metabolismo y otros procesos similares.

La frase “cantidad terapéuticamente eficaz” es un término reconocido en la técnica. En ciertas formas de realización, el término se refiere a una cantidad del agente terapéutico que, cuando se incorpora en un polímero de la presente invención, produce algún efecto deseado a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. En ciertas formas de realización, el término se refiere a esa cantidad necesaria o suficiente para eliminar o reducir sensaciones de dolor durante un periodo de tiempo. La cantidad eficaz puede variar dependiendo de tales factores como la enfermedad o afección que se trata, las construcciones dirigidas particulares que se administran, el tamaño del sujeto o la gravedad de la enfermedad o afección. El experto en la materia puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un compuesto particular sin necesitar experimentación excesiva.

El término “DE₅₀” está reconocido en la técnica. En ciertas formas de realización, DE₅₀ significa la dosis de un fármaco que produce el 50% de su respuesta o efecto máximo, o, de forma alternativa, la dosis que produce una respuesta predeterminada en el 50% de los sujetos o preparaciones de prueba.

El término “DL₅₀” está reconocido en la técnica. En ciertas formas de realización, DL₅₀ significa la dosis de un fármaco que es letal en el 50% de los sujetos de prueba. El término “índice terapéutico” es un término reconocido en la técnica que se refiere al índice terapéutico de un fármaco, definido como DL₅₀/DE₅₀.

Los términos “incorporado” y “encapsulado” están reconocidos en la técnica cuando se usan en referencia a un agente terapéutico u otro material y una composición polimérica, tal como una composición de la presente invención. En ciertas formas de realización, estos términos incluyen incorporar, formular o incluir de otra manera tal agente en una composición que permite la liberación, tal como liberación sostenida, de tal agente en la aplicación deseada. Los términos contemplan cualquier manera por la cual un agente terapéutico u otro material se incorpora en una matriz polimérica, incluyendo, por ejemplo: unido a un monómero de tal polímero (mediante interacción covalente, iónica u otra unión), mezcla física, envolver el agente en una capa de recubrimiento de polímero y tener tal monómero que sea parte de la polimerización para dar una formulación polimérica, distribuida en toda la matriz polimérica, añadida a la superficie de la matriz polimérica (mediante interacciones covalentes o de otra unión), encapsulada dentro de la matriz polimérica, etc. El término “coincorporación” o “coencapsulación” se refiere a la incorporación de un agente terapéutico u otro material y al menos otro agente terapéutico u otro material en una composición objeto.

Más específicamente, la forma física en la que cualquier agente terapéutico u otro material se encapsula en polímeros puede variar con la forma de realización particular. Por ejemplo, un agente terapéutico u otro material se puede encapsular primero en una microesfera y después combinar con el polímero de tal modo que se mantiene al menos una parte de la estructura de la microesfera. De forma alternativa, un agente terapéutico u otro material puede ser suficientemente inmiscible en el polímero de la invención que se dispersa como gotitas pequeñas, más que ser disuelto, en el polímero. La presente invención contempla cualquier forma de encapsulación o incorporación, en tanto que la liberación, preferiblemente liberación sostenida, de cualquier agente terapéutico u otro material encapsulado determina si la forma de encapsulación es lo suficientemente aceptable para cualquier uso particular.

El término “plastificante biocompatible” está reconocido en la técnica e incluye materiales que son solubles o dispersables en las composiciones de la presente invención, que aumentan la flexibilidad de la matriz polimérica y que, en las cantidades empleadas, son biocompatibles. Los plastificantes adecuados se conocen bien en la técnica

e incluyen los divulgados en las patentes de EE UU No. 2.784.127 y 4.444.933. Los plastificantes específicos incluyen, a modo de ejemplo, citrato de acetil-tri-n-butilo (aprox. 20 por ciento en peso o menos), citrato de acetiltrihexilo (aprox. el 20 por ciento en peso o menos), ftalato de butilbencilo, ftalato de dibutilo, ftalato de dioctilo, citrato de n-butiril-tri-n-hexilo, dibenzoato de dietilenglicol (aprox. 20 por ciento en peso o menos) y similares.

3. Partículas y composiciones relacionadas

La presente invención proporciona partículas, tales como micropartículas o nanopartículas, que tienen uno o más grupos modificadores de superficie dispuestos en la superficie externa, en donde (a) la masa del agente modificador de superficie constituye al menos 1/3400 de la masa de la partícula, y/o (b) el grupo modificador de superficie está presente en la superficie externa a una densidad de más de 0,01 unidades por nanómetro cuadrado. En ciertas formas de realización, una partícula polimérica comprende un polímero farmacéuticamente aceptable, un agente bioactivo y un agente modificador de superficie que hace la superficie de la partícula polimérica mucorresistente. En formas de realización alternativas, una partícula polimérica comprende un polímero farmacéuticamente aceptable y agente modificador de superficie que también es un agente bioactivo. En ciertas de tales formas de realización, la partícula comprende además un agente promotor de adhesión, tal como bromuro de dimetildioctadecil-amonio u otros aditivos con cationes, que fomenta la adhesión del agente modificador de superficie a la superficie de la partícula. El agente modificador de superficie puede aumentar las velocidades de transporte de partículas en moco.

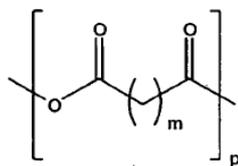
Los ejemplos de agentes modificadores de superficie incluyen, pero no están limitados a, proteína aniónica (por ejemplo, seroalbúmina), tensioactivos (por ejemplo, tensioactivos catiónicos tal como por ejemplo, bromuro de dimetildioctadecil-amonio), azúcares o derivados de azúcar (por ejemplo, ciclodextrina), ácidos nucleicos y polímeros (por ejemplo, heparina, polietilenglicol o poloxómero). Los agentes modificadores de superficie también pueden incluir agentes mucolíticos, por ejemplo, N-acetil cisteína, altamisa, bromelina, papaína, clerodendro, acetilcisteína, bromhexina, carbocisteína, eprazinona, mesna, ambroxol, sobrerol, domiodol, letosteína, estepronina, tiopronina, gelsolina, timosina β_4 , dornasa alfa, neltenexina, erdosteína y varias DNAsas incluyendo rhDNasa. Se puede administrar un agente mucolítico o agente sacrificial por separado o concomitante con una partícula, o como un agente modificador de superficie de la partícula (por ejemplo, recubierto sobre, acoplado de forma covalente a, colocalizado con o encapsulado dentro de una partícula) de la invención para mejorar el transporte a través de una barrera mucosa. Ciertos agentes, por ejemplo, ciclodextrina, pueden formar complejos de inclusión con otras moléculas y se pueden usar para formar uniones a grupos adicionales y facilitar la funcionalización de la superficie de partícula y/o las moléculas o grupos unidos.

Ejemplos de agentes modificadores de superficie adecuados que son hidratos de carbono incluyen agar, agarosa, ácido algínico, amilopectina, amilosa, beta-glucano, calosa, carragenano, celodextrinas, celulina, celulosa, quitina, quitosano, crisolaminarina, curdlano, ciclodextrina, dextrina, ficol, fructano, fucoidano, galactomanano, goma gelana, glucano, glucomanano, glicocáliz, glucógeno, hemicelulosa, hidroxietil almidón, kefiran, laminarina, mucilago, glucosaminoglicano, goma natural, paramilón, pectina, péptido polisacárido, esquizofilano, sialil lewis x, almidón, almidón gelatinización, sugammadex, goma xantana y xiloglucano, así como fragmentos y derivados de tales hidratos de carbono.

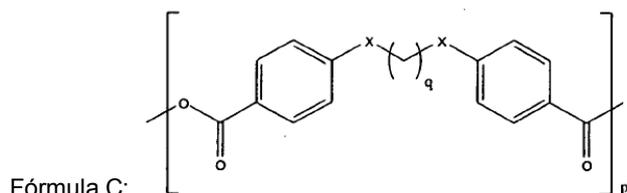
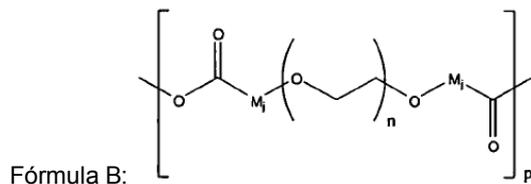
Ejemplos de tensioactivos incluyen, pero no están limitados a, L- α -fosfatidilcolina (PC), 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), ácido oleico, trioleato sorbitano, monooleato sorbitano, monolaurato de sorbitano, monolaurato sorbitano polioxietileno (20), monooleato sorbitano polioxietileno (20), lecitina natural, éter oleico de polioxietileno (2), éter esteárico de polioxietileno (2), éter laurico de polioxietileno (4), copolímeros en bloque de oxietileno y oxipropileno, lecitina sintética, dioleato de dietilenglicol, oleato de tetrahidrofurfurilo, oleato de etilo, miristato de isopropilo, monooleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, monorricinolato de glicerilo, alcohol cetílico, alcohol estearílico, polietilenglicol 400, cloruro de cetil pirimidinio, cloruro de benzalconio, aceite de oliva, monolaurato de glicerilo, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón y aceite de girasol, lecitina, ácido oleico y trioleato sorbitano.

Un polímero farmacéuticamente aceptable puede ser un ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico), polietilenimina, dioleiltrimetilamoniopropano/dioleil-sn-glicerolfosfoetanolamina, anhídridos polisebácicos u otros polímeros formados de monómeros clínicamente aprobados. Ejemplos de monómeros clínicamente aprobados incluyen, pero no están limitados a, monómeros de ácido sebácico y 1,3-bis(carboxifenoxi)propano.

Un polímero farmacéuticamente aceptable puede ser un polímero polianhídrido que comprende subunidades repetidas de fórmula A y fórmula B y, opcionalmente, subunidades de fórmula C, como se representa a continuación:



Fórmula A:



5

en donde, según permitan valencia y estabilidad,

M representa, independientemente para cada caso, un metileno sustituido o sin sustituir, por ejemplo, CH₂, CH(Me), CF₂, CH(OH), C=O, etc., preferiblemente CH₂ o, para un caso de M adyacente a O, C=O;

10 X está ausente o, independientemente para cada caso, representa un heteroátomo seleccionado de NR, O y S, preferiblemente O;

R representa, independientemente para cada caso, H o alquilo inferior;

j representa, independientemente para cada caso, un número entero de 0 a 16, preferiblemente de 1 a 9;

m representa, independientemente para cada caso, un número entero de 4 a 20, preferiblemente de 8 a 14, incluso más preferiblemente 10;

15 n representa, independientemente para cada caso, un número entero de 4 a 500, preferiblemente de 10 a 200;

p representa, independientemente para cada caso, un número entero de 1 a 60, preferiblemente de 4 a 40; y

q representa, independientemente para cada caso, un número entero de 1 a 20, preferiblemente de 2 a 10, incluso más preferiblemente de 2 a 6.

20 En ciertas formas de realización, m, n y q cada uno, independientemente, representan un valor constante en todo el polímero, es decir, m, n y q no varían en una subunidad de fórmula A, B o C, o en diferentes subunidades de las misma fórmula, en una muestra de polímero o una cadena de polímero.

25 En ciertas formas de realización, el polímero puede contener unidades monoméricas diferentes de las subunidades representadas por las fórmulas A, B y C. En formas de realización preferidas, sin embargo, el polímero consiste esencialmente de subunidades de fórmulas A, B y C.

30 En ciertas formas de realización, un polímero de la presente invención tiene la fórmula $-[K]_n-$, en donde cada caso de K representa una subunidad de fórmula A o B o, opcionalmente, C, como se ha explicado anteriormente. Las hebras de polímero pueden estar protegidas (terminadas) con grupos hidroxilo (para formar ácidos carboxílicos), grupos acilo (para formar anhídridos), grupos alcoxi (para formar ésteres) o cualquier otro grupo de protección adecuado.

35 En ciertas formas de realización, las subunidades de fórmula B tienen un peso molecular de entre 200 y 1000 dalton, mientras que en otras formas de realización, las subunidades de fórmula B tienen un peso molecular de entre 4000 y 10.000 dalton. En algunas formas de realización, las subunidades de fórmula B tienen pesos moleculares que varían a lo largo del polímero entre 200 dalton y 10.000 o más dalton, mientras que en otras formas de realización, las subunidades de fórmula B tienen pesos moleculares que varían solo en un intervalo estrecho (por ejemplo, 200-300 dalton o 2.000-3.000 dalton).

40 En ciertas formas de realización, las subunidades de fórmula B constituyen entre el 1 y el 80% del polímero, en peso, preferiblemente entre el 5 y el 60%. En ciertas formas de realización, las subunidades de fórmula C, si están presentes, pueden constituir entre el 1% y el 80% del polímero, en peso, preferiblemente entre el 5 y el 60%. En ciertas formas de realización, las subunidades de fórmula A constituyen entre el 10% y el 99% del polímero, en peso, preferiblemente entre el 15% y el 95%.

45 Cada subunidad se puede repetir cualquier número de veces, y una subunidad se puede producir con sustancialmente la misma frecuencia, con más frecuencia o menos frecuencia que otra subunidad, de modo que ambas subunidades pueden estar presentes en aproximadamente la misma cantidad o en cantidades diferentes, que pueden diferir ligeramente o ser muy dispares, por ejemplo, una subunidad está presente casi hasta la exclusión de la otra.

50

En ciertos casos, los polímeros son copolímeros al azar, en los que las diferentes subunidades y/o otras unidades monoméricas se distribuyen al azar en toda la cadena de polímero. En parte, el término "al azar" se pretende que se refiera a la situación en la que la distribución o incorporación particular de unidades monoméricas en un polímero que tiene más de un tipo de unidad monomérica no esté dirigida o controlada directamente por el protocolo de síntesis, sino que en su lugar se produce de características inherentes al sistema polimérico, tal como la reactividad, cantidades de subunidades y otras características de la reacción de síntesis u otros métodos de fabricación, procesamiento o tratamiento.

En ciertas formas de realización, las cadenas poliméricas de tales composiciones, por ejemplo, que incluyen elementos repetitivos mostrados en cualquiera de las fórmulas anteriores, tienen peso moleculares (M_w) que varían desde alrededor de 2000 o menos hasta alrededor de 300.000, 600.000 o 1.000.000 o más Dalton, o de forma alternativa al menos alrededor de 10.000, 20.000, 30.000, 40.000 o 50.000 dalton, más particularmente al menos alrededor de 100.000 dalton. El peso molecular medio en número (M_n) también puede variar mucho, pero en general está en el intervalo de alrededor de 1.000 hasta alrededor de 200.000 dalton, preferiblemente desde alrededor de 10.000 hasta alrededor de 100.000 dalton e, incluso más preferiblemente, desde alrededor de 8.000 hasta alrededor de 50.000 dalton. Lo más preferiblemente, M_n varía entre alrededor de 12.000 y 45.000 dalton. En una muestra determinada de un polímero, puede estar presente una gran gama de pesos moleculares. Por ejemplo, las moléculas en la muestra pueden tener pesos moleculares que se diferencian en un factor de 2, 5, 10, 20, 50, 100 o más, o que se diferencian del peso molecular medio en un factor de 2, 5, 10, 20, 50, 100 o más.

Un método para determinar el peso molecular es mediante cromatografía de filtración en gel ("GPC"), por ejemplo, columnas de lecho mezclado, solvente CH_2Cl_2 , detector de dispersión de luz y dn/dc fuera de línea. Se conocen otros métodos en la técnica.

Otros polímeros que se pueden emplear para hacer las partículas poliméricas de la invención incluyen, pero no están limitados a, polímeros que contienen ciclodextrina, en particular polímeros catiónicos que contienen ciclodextrina, tales como los descritos en la patente de EE UU No. 6.509.323, poli(caprolactona) (PCL), polímero de acetato de etilenvinilo (EVA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido L-láctico) (PLLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ácido L-láctico-co-ácido glicólico) (PLLGA), poli(D,L-lactida) (PDLA), poli(L-lactida) (PLLA), poli(D,L-lactida-co-caprolactona), poli(D,L-lactida-co-caprolactona-co-glicolida), poli(D,L-lactida-co-PEO-co-D,L-lactida), poli(D,L-lactida-co-PPO-co-D,L-lactida), cianoacralato de polialquilo, poliuretano, poli-L-lisina (PLL), metacrilato de hidroxipropilo (HPMA), polietilenglicol, ácido poli-L-glutámico, poli(hidroxi ácidos), polianhidridos, poliortoésteres, poli(éster amidas), poliamidas, poli(éster éteres), policarbonatos, polialquilenos tales como polietileno y polipropileno, polialquilenglicoles tal como poli(etilenglicol) (PEG), óxidos de polialquileno (PEO), tereftalatos de polialquileno tal como poli(tereftalato de etileno), alcoholes polivinílicos (PVA), éteres polivinílicos, ésteres polivinílicos tal como poli(acetato de vinilo), haluros de polivinilo tal como poli(cloruro de vinilo) (PVC), polivinilpirrolidona, polisiloxanos, poliestireno (PS), poliuretanos, celulosas derivadas tales como alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, polímeros de ácidos acrílicos, tales como poli(met)acrilato de metilo (PMMA), poli(met)acrilato de etilo, poli(met)acrilato de butilo, poli(met)acrilato de isobutilo, poli(met)acrilato de hexilo, poli(met)acrilato de isodecilo, poli(met)acrilato de laurilo, poli(met)acrilato de fenilo, poli(acrilato) de metilo, poli(acrilato) de isopropilo, poli(acrilato) de isobutilo, poli(acrilato) de octadecilo (conjuntamente denominados aquí "ácidos poliacrílicos"), y copolímeros y mezclas de los mismos, polidioxanona y sus copolímeros, polihidroxicanoatos, fumarato de polipropileno), polioximetileno, poloxámeros, poli(orto)ésteres, poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), poli(lactida-co-caprolactona), carbonato de trimetileno, polivinilpirrolidona, y los polímeros descritos en Shieh et al., 1994, J. Biomed. Mater. Res., 28, 1465-1475, y en la patente de EE UU No. 4.757.128, Hubbell et al., patentes de EE UU. Nos. 5.654.381; 5.627.233; 5.628.863; 5.567.440; y 5.567.435. Otros polímeros adecuados incluyen poliortoésteres (por ejemplo, como se divulgan en Heller et al., 2000, Eur. J. Pharm. Biopharm., 50:121-128), polifosfazenos (por ejemplo, como se divulgan en Vandorpe et al., 1997, Biomaterials, 18:1147-1152), y polifosfoésteres (por ejemplo, como se divulgan en Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, pp. 45-60, Ed. E. Mathiowitz, John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, 1999), así como mezclas y/o copolímeros en bloque de dos o más de tales polímeros. Los extremos carboxilo de los polímeros que contienen lactida y glicolida pueden estar opcionalmente protegidos, por ejemplo, mediante esterificación y los extremos hidroxilo pueden estar opcionalmente protegidos, por ejemplo mediante esterificación o esterificación.

Los copolímeros de dos o más copolímeros descritos anteriormente, incluyendo copolímeros en bloque y/o aleatorios, también se pueden emplear para hacer las partículas poliméricas de la invención.

La invención también contempla emplear copolímeros de PEG o derivados del mismo (tal como subunidades de fórmula B, anteriormente) con cualquiera de los polímeros descritos anteriormente para hacer las partículas poliméricas de la invención. En ciertas formas de realización, el PEG o derivados se pueden localizar en las posiciones interiores del copolímero. De forma alternativa, el PEG o derivados se pueden localizar cerca o en las posiciones terminales del copolímero. En ciertas formas de realización, las micropartículas o nanopartículas se forman en condiciones que permiten que las regiones de PEG se separen por fase o se localicen de otra manera en la superficie de las partículas. Mientras en ciertas formas de realización, las regiones de PEG localizadas en la

superficie pueden realizar solas la función de un agente modificador de superficie, en otras formas de realización estas partículas copoliméricas comprenden un agente modificador de la superficie adicional. Tales técnicas se pueden aplicar de forma análoga para formar copolímeros de otros polímeros de agentes modificadores de superficie adecuados, tales como polímeros que contienen ciclodextrina, polímeros polianiónicos, etc.

En ciertas formas de realización, los polímeros son solubles en uno o más solventes orgánicos comunes para facilidad de fabricación y procesamiento. Los solventes orgánicos comunes incluyen tales solventes como 2,2,2-trifluoroetanol, cloroformo, diclorometano, dicloroetano, 2-butanona, acetato de butilo, butirato de etilo, acetona, acetato de etilo, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, dimetilformamida y dimetilsulfóxido.

En ciertas formas de realización, las partículas y composiciones objeto incluyen un agente bioactivo. Un agente bioactivo puede ser un agente terapéutico, un agente diagnóstico o un agente de imagen. Ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero no están limitados a, un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico (por ejemplo, un ADN o un ARN), una molécula pequeña, un peptidomimético, una proteína o una combinación de los mismos. En ciertas formas de realización, el agente diagnóstico o de imagen comprende además un marcador detectable.

Un agente bioactivo puede ser un ácido nucleico o análogo del mismo, por ejemplo, un ADN útil en terapia génica. De forma alternativa o adicional, se puede emplear un ARN como agente bioactivo. El ARN puede ser una molécula o construcción de ARNi. ARNi se refiere a "ARN de interferencia", mediante el cual disminuye la expresión de un gen o un producto génico al introducir en una célula diana uno o más ARN bicatenarios que son homólogos al gen de interés (en particular al ARN mensajero del gen de interés). También se puede alcanzar ARNi mediante introducción de un complejo ADN:ARN en donde la hebra antisentido (relativa a la diana) es ARN. Cualquier hebra puede incluir una o más modificaciones a la base o el esqueleto azúcar-fosfato. Cualquier preparación de ácido nucleico diseñada para alcanzar un efecto de interferencia de ARN se denomina aquí construcción ARNip.

De forma alternativa, se emplea un ácido nucleico antisentido como agente bioactivo. Un ácido nucleico antisentido se puede unir a su diana por complementariedad de pares de bases convencional o, por ejemplo, en el caso de unión a dúplex de ADN, mediante interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. Los oligonucleótidos antisentido pueden ser ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, monocatenarios o bicatenarios. El oligonucleótido se puede modificar en el grupo de la base, grupo azúcar o esqueleto fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos añadidos tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirse a receptores de células huésped) o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556, Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652, publicación de PCT No. WO 88/09810, publicada el 15 de diciembre, 1988) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo la publicación de PCT No. WO 89/10134, publicada el 25 de abril, 1988), agentes de corte desencadenado por hibridación (véase, por ejemplo, Krol et al., 1988, BioTechniques 6:958- 976) o agentes intercalantes (véase, por ejemplo Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549). Para este fin, el oligonucleótido se puede conjugar a otra molécula, por ejemplo, un péptido, agente de entrecruzamiento desencadenado por hibridación, agente de transporte, agente de corte desencadenado por hibridación, etc.

"Molécula pequeña" como se usa aquí se entiende para referirse a una molécula que tiene un peso molecular de menos de alrededor de 3 kDa y lo más preferiblemente de menos de alrededor de 1,5 kDa. Se pueden cribar librerías extensas de mezclas químicas y/o biológicas que comprenden grupos de moléculas pequeñas y/o extractos fúngicos, bacterianos o de algas con cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica para obtener un agente bioactivo deseable para su uso en o con una partícula de la invención.

Los peptidomiméticos son compuestos en los que se modifica al menos una parte de un péptido, tal como un péptido terapéutico, y la estructura tridimensional del peptidomimético permanece sustancialmente igual que la del péptido. Los peptidomiméticos (tanto análogos peptídicos como no peptídicos) pueden tener propiedades mejoradas (por ejemplo, proteólisis disminuida, retención aumentada o biodisponibilidad aumentada). Los peptidomiméticos en general tienen disponibilidad oral mejorada, lo que los hace especialmente adecuados para el tratamiento de trastornos en un ser humano o animal. Se debe advertir que los peptidomiméticos pueden tener o no estructuras químicas bidimensionales similares, pero comparten características estructurales tridimensionales y geometría comunes.

El término "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan aquí de forma intercambiable y en general se refieren a un polímero formado por al menos dos aminoácidos unidos a través de un enlace peptídico.

También se contemplan agentes de imagen (por ejemplo, marcadores detectables o agentes bioactivos unidos a un marcador detectable), agentes terapéuticos y grupos de direccionamiento, tales como los descritos en la publicación de solicitud de patente de EE UU No. 20030049203 y se pueden emplear con las partículas de la presente invención.

- En ciertas formas de realización, una partícula de la invención comprende un agente de imagen que puede estar además unido a un marcador detectable (por ejemplo, el marcador puede ser un radioisótopo, compuesto fluorescente, enzima o cofactor enzimático). El grupo activo puede ser un agente radioactivo, tales como: metales pesados radioactivos tales como quelatos de hierro, quelatos radioactivos de gadolinio o manganeso, emisores de positrones de oxígeno, nitrógeno, hierro, carbono o galio, ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{132}I o ^{99}Tc . Se puede usar partícula que incluya tal grupo como un agente de imagen y ser administrada en una cantidad efectiva para uso diagnóstico en un mamífero tal como un ser humano. De esta manera, se puede detectar la localización y acumulación del agente de imagen. Se puede detectar la localización y acumulación de un agente de imagen mediante radioescintigrafía, imágenes de resonancia magnética nuclear, tomografía computarizada o tomografía de emisión de positrones. Como será evidente para el experto en la materia, la cantidad de radioisótopo a ser administrada depende del radioisótopo. Los expertos en la materia pueden formular fácilmente la cantidad de agente de imagen a ser administrado basado en la actividad específica y energía de un radionúclido determinado usado como el grupo activo. Típicamente se administran 0,1-100 milicurios por dosis de agente de imagen, preferiblemente de 1-10 milicurios, con mayor frecuencia de 2-5 milicurios. De esta manera, las composiciones según la presente invención útiles como agentes de imagen que comprenden un grupo de direccionamiento conjugado a un grupo radioactivo comprenden de 0,1-100 milicurios, en algunas formas de realización preferiblemente de 1-10 milicurios, en algunas formas de realización preferiblemente de 2-5 milicurios, en algunas formas de realización más preferiblemente de 1-5 milicurios.
- Los medios de detección usados para detectar el marcador dependen de la naturaleza del marcador usado y la naturaleza de la muestra biológica usada, y también puede incluir polarización de fluorescencia, cromatografía líquida de alta resolución, captura de anticuerpo, electroforesis en gel, precipitación diferencial, extracción orgánica, cromatografía de exclusión molecular, microscopía de fluorescencia o ensayo de separación celular activado por fluorescencia (FACS).
- En ciertas formas de realización, un agente bioactivo o grupo de direccionamiento se puede acoplar de forma covalente a una partícula de la invención. En tales formas de realización, el agente bioactivo puede ser preferiblemente un agente hidrofílico o cargado, de modo que su presencia en la superficie de la partícula aumenta la carga o hidrofiliidad de la partícula o aumenta de otra manera la resistencia a frotamiento de la partícula. La unión covalente se puede seleccionar para que se corte en condiciones biológicas, por ejemplo, por hidrólisis química o enzimática u otros procesos de corte.
- En ciertas formas de realización, una partícula de la invención puede comprender además un grupo o molécula de direccionamiento. La molécula de direccionamiento puede estar unida de forma covalente a cualquier otro componente de la partícula, tal como el polímero o un agente modificador de superficie. La molécula de direccionamiento también se puede colocalizar con una partícula, usando métodos conocidos en la técnica. La molécula de direccionamiento puede dirigir la partícula, y por tanto el agente bioactivo incluido, a una diana o localización deseable en un paciente.
- En una forma de realización, el grupo de direccionamiento es una molécula pequeña. Las moléculas que pueden ser adecuadas para su uso como grupos de direccionamiento en la presente invención incluyen haptenos, epítopos y fragmentos de ADNbc y análogos y derivados de los mismos. Tales grupos se unen específicamente a anticuerpos, fragmentos o análogos de los mismos, incluyendo miméticos (para haptenos y epítopos) y proteínas de dedo de zinc (para fragmentos de ADNbc). Los nutrientes que se cree que desencadenan endocitosis mediada por receptor y por tanto grupos de direccionamiento útiles incluyen biotina, folato, riboflavina, carnitina, inositol, ácido lipoico, niacina, ácido pantoténico, tiamina, piridoxal, ácido ascórbico y las vitaminas liposolubles A, D, E y K. Otro tipo ejemplar de grupo de direccionamiento de molécula pequeña incluye lípidos esteroideos, tales como colesterol y hormonas esteroideas, tales como estradiol, testosterona, etc.
- En otra forma de realización, el grupo de direccionamiento puede comprender una proteína. Se pueden seleccionar tipos particulares de proteínas basado en características conocidas de sitio diana o células diana. Por ejemplo, la sonda puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, donde se muestra un antígeno correspondiente en el sitio diana. En situaciones en donde las células diana expresan un cierto receptor, el grupo de direccionamiento puede comprender un ligando proteico o peptidomimético capaz de unirse a ese receptor. Los ligandos proteicos de receptores de superficie celular conocidos incluyen lipoproteínas de baja densidad, transferrina, insulina, enzimas fibrinolíticas, anti-HER2, proteínas de unión a plaquetas tales como anexasinas, y modificadores de respuesta biológica (incluyendo interleuquina, interferón, eritropoyetina y factor estimulante de colonias). Se han desarrollado un número de anticuerpos monoclonales que se unen a un tipo específico de célula, incluyendo anticuerpos monoclonales específicos para antígenos asociados a tumores en seres humanos. Entre los muchos de tales anticuerpos monoclonales que se pueden usar están anti-TAC u otros anticuerpos para receptor de interleuquina-2; 9.2.27 y NR-ML-05 contra el proteoglicano de 250 kilodalton asociado a melanoma humano; y NR-LU-10 contra una glicoproteína de pancarcinoma. Un anticuerpo empleado en la presente invención puede ser una molécula intacta (entera), un fragmento de la misma o un equivalente funcional de la misma. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos son fragmentos F(ab')_2 , Fab' , Fab y F_v , que se pueden producir por métodos convencionales o por ingeniería genética o de proteínas.

Otros grupos de direccionamiento preferidos incluyen azúcares (por ejemplo, glucosa, fructosa, galactosa, manosa) que son reconocidos por receptores específicos de diana. Por ejemplo, las construcciones presentes reivindicadas pueden estar glicosiladas con residuos de manosa (por ejemplo, unidos como C-glicósidos a un nitrógeno libre) para dar construcciones dirigidas que tienen mayor afinidad de unión a tumores que expresan receptores de manosa (por ejemplo, glioblastomas y gangliocitomas) y bacterias que también se sabe que expresan receptores de manosa (Bertozzi, C R y M D Bednarski *Carbohydrate Research* 223:243 (1992); *J. Am. Chem. Soc.* 114:2242,5543 (1992)), así como potencialmente otros agentes infecciosos. Ciertas células, tal como células malignas y células sanguíneas (por ejemplo, A, AB, B, etc.) presentan hidratos de carbono particulares, para los que una lectina correspondiente puede servir como grupo de direccionamiento.

La unión covalente se puede realizar por varios métodos conocidos en la técnica. Se pueden acoplar a la superficie grupos, tales como agentes modificadores de superficie, agentes promotores de adhesión, agentes bioactivos, agentes de direccionamiento, y otros grupos funcionales discutidos aquí, a ser covalentemente unidos a la superficie de una partícula (grupos pendientes) después de la formación de la partícula o se pueden acoplar a uno o más componentes antes de la formación de la partícula, de modo que, por azar o autoensamblaje molecular, los grupos se localizan en la superficie de la partícula durante la formación de la partícula, y por tanto se embeben o enmarañan en la superficie de la partícula. En ciertas formas de realización, PEG se une covalentemente a nanopartículas haciendo reaccionar un grupo carboxilo de la partícula con un grupo amina del PEG, por ejemplo, para formar una amida. Se pueden acoplar grupos a la superficie de una partícula formada en cualquier orden o por cualquier unión que mantenga la actividad deseada de cada componente, bien en estado unido o después de corte de una unión biocortable, por ejemplo. Los grupos pendientes se pueden fijar a partículas o componentes mediante unión de grupos funcionales apropiados presentes en cualquier localización o en cualquier componente. De forma alternativa, los varios componentes se pueden unir indirectamente a través una molécula de anclaje como se sabe bien en la técnica.

Se conocen numerosos métodos de entrecruzamiento químico y son potencialmente aplicables para conjugar las varias partes de las presentes construcciones. Muchos métodos de entrecruzamiento químico conocidos son no específicos, es decir, no dirigen el punto de acoplamiento a ningún sitio particular en la molécula. Como resultado, el uso de agentes de entrecruzamiento no específicos puede atacar sitios funcionales o bloquear estéricamente sitios activos, haciendo las moléculas conjugadas inactivas.

Para acoplar moléculas sencillas, con frecuencia es posible controlar la localización del acoplamiento usando grupos protectores, reacciones selectivas de grupo funcional o la accesibilidad estérica diferencial de sitios particulares en las moléculas. Tales estrategias las conocen bien los expertos en la técnica de la síntesis química. Los grupos protectores pueden incluir, pero no están limitados a, grupos protectores N-terminales conocidos en la técnica de síntesis de péptidos, incluyendo *t*-butoxicarbonilo (BOC), benzoilo (Bz), fluoren-9-ilmetoxicarbonilo (Fmoc), trifenilmetil(tritilo) y tricloroetoxicarbonilo (Troc) y similares. El uso de varios grupos N-protectores, por ejemplo, el grupo benciloxicarbonilo o el grupo *t*-butiloxicarbonilo (Boc), varios reactivos de acoplamiento, por ejemplo, dicitclohexilcarbodiimida (DCC), 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxiazabenzotriazol (HATU), carbonildiimidazol o 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (HOBT) y varias condiciones de corte: por ejemplo, ácido tricloroacético (TFA), HCl en dioxano, hidrogenación en Pd-C en solventes orgánicos (tales como metanol o acetato de etilo), tris(trifluoroacetato) de boro y bromuro de cianógeno, y reacción en solución con aislamiento y purificación de intermedios son bien conocidos en la técnica de síntesis de péptidos, e igualmente aplicables a la preparación de los compuestos objeto.

Un planteamiento preferido para aumentar la especificidad de acoplamiento de moléculas complejas es el acoplamiento químico directo a un grupo funcional encontrado solo una vez o unas pocas veces en una o ambas de las moléculas a ser entrecruzadas. Por ejemplo, en muchas proteínas, cisteína, que es el único aminoácido proteico que contiene un grupo tiol, aparece solo unas pocas veces. Además, por ejemplo, si un péptido no contiene residuos de lisina, un reactivo de entrecruzamiento específico para aminas primarias será selectivo el extremo amino de ese péptido. La utilización exitosa de este planteamiento para aumentar la especificidad de acoplamiento requiere que la molécula tenga los residuos reactivos adecuados en áreas de la molécula que se puedan alterar sin pérdida de la actividad biológica de la molécula.

El acoplamiento de dos constituyentes se puede lograr a través de un agente de acoplamiento o conjugación. Hay varios reactivos de entrecruzamiento intermolecular que se pueden utilizar. Véase, por ejemplo, Means, G. E. y Feeney, R. E., *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day, 1974, pp. 3943. Entre estos reactivos están, por ejemplo, 3-(2-piridilditio) propionato de J-sucinimidilo (SPDP) o N,N'-(1,3-fenileno) bismaleimida (ambos de ellos son muy específicos para grupos sulfhidrilo y forman uniones irreversibles); N,N'-etilen-bis-(yodoacetamida) u otros tales reactivos que tienen de 6 a 11 puentes de carbono de metileno (que son relativamente específicos para grupos sulfhidrilos) y 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno (que forma uniones irreversibles con grupos amino y tirosina). Otros reactivos de entrecruzamiento útiles para este fin incluyen: p,p'-difluoro-m,m'-dinitrofenilsulfona (que forma entrecruzamientos irreversibles con grupos amino fenólicos); adipimidato de dimetilo (que es específico para grupos amino); cloruro de fenol-1,4-disulfonilo (que reacciona principalmente con grupos amina); diisocianato o

diisotiocianato de hexametileno, o p-diisocianato de azofenilo (que reacciona principalmente con grupos amino); glutaraldehído (que reacciona con varias cadenas laterales diferentes) y disdiazobenzimida (que reacciona principalmente con tirosina e histidina).

5 Los reactivos de entrecruzamiento pueden ser homobifuncionales, es decir, tienen dos grupos funcionales que experimentan la misma reacción. Un reactivo de entrecruzamiento homobifuncional preferido es bismaleimidohexano ("BMH"). BMH contiene dos grupos funcionales maleimida, que reaccionan específicamente con compuestos que contienen sulfhidrilo en condiciones moderadas (pH 6,5-7,7). Los dos grupos maleimida están unidos por una cadena de hidrocarburo. Por tanto, BMH es útil para el entrecruzamiento irreversible de péptidos que contienen
10 residuos de cisteína.

Los reactivos de entrecruzamiento también pueden ser heterobifuncionales. Los agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales tienen dos grupos funcionales diferentes, por ejemplo, un grupo reactivo con amino y un grupo reactivo con tiol, que entrecruzarán dos proteínas que tengan aminas y tioles libres, respectivamente. Los
15 entrecruzadores heterobifuncionales proporcionan la capacidad de diseñar métodos de acoplamiento más específicos para conjugar dos entidades químicas, reduciendo por tanto la aparición de reacciones secundarias no deseadas tal como polímeros de homoproteínas. En la técnica se conocen una amplia variedad de entrecruzadores heterobifuncionales. Ejemplos de agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales son 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), (4-yodoacetil) aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida clorhidrato (EDC); 4-succinimidiloxycarbonil-a-metil-a-(2-piridilditio)-tolueno (SMPT), 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 6-[3-(2-piridilditio) propionato]hexanoato de succinimidilo (LC-SPDP), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) y 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimida (SMPB), una cadena extendida análoga de MBS. El grupo succinimidilo de estos entrecruzadores reacciona con una amina primaria y la maleimida reactiva con tiol forma un enlace covalente con el tiol de un residuo de cisteína.
25

Los reactivos de entrecruzamiento con frecuencia tienen baja solubilidad en agua. Se puede añadir un grupo hidrofílico, tal como un grupo sulfonato, al reactivo de entrecruzamiento para mejorar su solubilidad en agua. Sulfo-MBS y sulfo-SMCC son ejemplos de reactivos de entrecruzamiento modificados para solubilidad en agua.
30

Otro grupo reactivo útil como parte de un entrecruzador heterobifuncional es un grupo reactivo con tiol. Grupos reactivos con tiol comunes incluyen maleimidas, halógenos y disulfuros de piridilo. Las maleimidas reaccionan específicamente con sulfhidrilos libres (residuos de cisteína) en minutos, en condiciones de ligeramente ácidas a neutras (pH 6,5-7,5). Los grupos haloalquilo (por ejemplo, funciones yodoacetilo) reaccionan con grupos tiol a pH fisiológico. Ambos de estos grupos reactivos producen la formación de enlaces tioéter estables.
35

Además de los entrecruzadores heterobifuncionales, existen un número de otros agentes de entrecruzamiento incluyendo entrecruzadores homobifuncionales y fotorreactivos. Suberato de disuccinimidilo (DSS), bismaleimidohexano (BMH) y dimetilpimelidato-2- HCl (DMP) son ejemplos de agentes de entrecruzamiento homobifuncionales útiles y disulfuro de bis-[β-(4-azidosalicilamido)etilo] (BASED) y N-succinimidil-(6(4'-azido-2'-nitrofenil-amino)hexanoato (SANPAH) son ejemplos de entrecruzadores fotorreactivos útiles para su uso en esta invención. Para una revisión de técnicas de acoplamiento de proteínas, véase Means et al. (1990) Bioconjugate Chemistry 1:2-12.
40

Muchos reactivos de entrecruzamiento producen un conjugado que es esencialmente no cortable en condiciones celulares. Sin embargo, algunos reactivos de entrecruzamiento contienen un enlace covalente, tal como un disulfuro, que es cortable en condiciones celulares. Por ejemplo, ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP), reactivo de Traut y 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) son entrecruzadores cortables bien conocidos. El uso de un reactivo de entrecruzamiento cortable puede permitir que el grupo, tal como un agente terapéutico, se separe de la construcción después de administración a la diana. Los enlaces disulfuro directos también pueden ser útiles. En la técnica se conocen enlaces cortables adicionales y se pueden emplear con ventaja en ciertas formas de realización de la presente invención.
50

En la técnica se conocen muchos métodos para la unión de compuestos, tales como proteínas, marcadores y otras entidades químicas, a nucleótidos. Algunos reactivos de entrecruzamiento nuevos tales como éster de n-maleimidobutiriloxi-succinimida (GMBS) y sulfo-GMBS, tienen inmunogenicidad reducida. Los sustituyentes se han unido al extremo 5' de oligonucleótidos preconstruídos usando química de amidita o H-fosfonato, como describen Oglivie, K. K., et al., Pure and Appl Chem (1987) 59:325, y Froehler, B. C., Nucleic Acids Res (1986) 14:5399. También se han unido sustituyentes al extremo 3' de oligómeros, como describen Asseline, U., et al., Tet Lett (1989) 30:2521. Este último método utiliza 2,2'-ditioetanol unido a un soporte sólido para desplazar diisopropilamina de un fosfonato 3' que lleva el grupo acridina y se delecta posteriormente después de la oxidación del fósforo. Se han unido otros sustituyentes al extremo 3' de oligómeros por métodos alternativos, incluyendo polilisina (Bayard, B., et al., Biochemistry (1986) 25:3730; Lemaitre, M., et al., Nucleosides and Nucleotides (1987) 6:311) y, además, se han usado disulfuros para unir varios grupos al extremo 3', como describen Zuckerman, R., et al., Nucleic Acids Res (1987) 15:5305. Se sabe que los oligonucleótidos que están sustituidos en el extremo 3' muestran estabilidad
65

aumentada y resistencia aumentada a degradación por exonucleasas (Lancelot, G., et al., *Biochemistry* (1985) 24:2521; Asseline, U., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (1984) 81:3297). Se discuten métodos adicionales de unir entidades no nucleotídicas a oligonucleótidos en las patentes de EE UU No. 5.321.131 y 5.414.077.

5 De forma alternativa, un oligonucleótido puede incluir uno o más nucleótidos modificados que tienen un grupo unido a través de un brazo enlazador a la base. Por ejemplo, Langer et al (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78(11):6633-6637, 1981) describe la unión de biotina a la posición C-5 de dUTP mediante un brazo enlazador alilamina. La unión de biotina y otros grupos a la posición 5 de pirimidinas a través de un brazo enlazador también se discute en la patente de EE UU No. 4.711.955. Los nucleótidos marcados a través de un brazo enlazador unido a la posición 5 u otras de las pirimidinas también se sugieren en la patente de EE UU No 4.948.882. La transaminación catalizada por bisulfito de la posición N⁴ de citosina con aminos bifuncionales se describe en Schulman et al. (*Nucleic Acids Research*, 9(5): 1203-1217, 1981) y Draper et al (*Biochemistry*, 19: 1774-1781, 1980). Mediante este método, las entidades químicas se unen a través de brazos enlazadores a citidina o polinucleótidos que contienen citidina. La unión de biotina a la posición N4 de citidina se divulga en la patente de EE UU No. 4.828.979, y la unión de grupo a citidina en la posición N⁴ también se expone en las patentes de EE UU No. 5.013.831 y 5.241.060. La patente de EE UU No. 5.407.801 describe la preparación de un tríplex de oligonucleótido en donde se conjuga un brazo enlazador a desoxicitidina a través de transaminación catalizada por bisulfito. Los brazos enlazadores incluyen un brazo enlazador aminoalquilo o carboxialquilo. La patente de EE UU No. 5.405.950 describe análogos de citidina en los que se une un brazo enlazador a la posición N4 de la base citosina.

20 Numerosos reactivos de entrecruzamiento, incluyendo los discutidos anteriormente, están comercialmente disponibles. Las instrucciones detalladas para su uso están fácilmente disponibles de los suministradores comerciales. Una referencia general sobre entrecruzamiento de proteínas y preparación de conjugados es: S. S. Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press (1991).

25 El entrecruzamiento químico puede incluir el uso de brazos espaciadores, es decir, enlazadores o anclajes. Los brazos espaciadores proporcionan flexibilidad intramolecular o ajustan distancias intramoleculares entre grupos conjugados y por tanto pueden ayudar a conservar la actividad biológica. Un brazo espaciador puede estar en forma de un grupo peptídico que comprende aminoácidos espaciadores. De forma alternativa, un brazo espaciador puede ser parte del reactivo de entrecruzamiento, tal como en "SPDP de cadena larga" (Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., No. de catálogo 21651H).

35 Se pueden usar una variedad de agentes de acoplamiento o entrecruzamiento tales como proteína A, carbodiimida, dimaleimida, ácido ditio-bis-nitrobenzoico (DTNB), N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA) y N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP), 6-hidrazinonicotinamida (HYNIC), N₃S y N₂S₂ en procedimiento bien conocidos para sintetizar construcciones dirigidas. Por ejemplo, se puede conjugar biotina a un oligonucleótido mediante DTPA usando el método del anhídrido bicíclico de Hnatowich et al. *Int. J. Appl. Radiat. Isotop.* 33:327 (1982).

40 Además, 6-(biotinamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo (NHS-LC-biotina, que se puede comprar de Pierce Chemical Co. Rockford, Ill.), "biocitina", un conjugado de lisina de biotina, puede ser útil para hacer compuestos de biotina debido a la disponibilidad de una amina primaria. Además, se pueden acoplar correspondientes biotina ácido clorhídrico o precursores ácidos con un derivado amino del agente terapéutico por métodos conocidos. Al acoplar un grupo biotina a la superficie de una partícula, se puede acoplar otro grupo a avidina y después acoplar a la partícula por la fuerte afinidad avidina-biotina, o viceversa.

45 También se pueden usar métodos análogos para unir un agente modificador de superficie a una molécula pequeña, proteína u otra sustancia en necesidad de tal modificación.

50 En ciertas formas de realización donde una partícula comprende grupos PEG en la superficie de la partícula, el grupo hidroxilo libre de PEG se puede usar para enlace o unión (por ejemplo, unión covalente) de moléculas o grupos adicionales a la partícula.

55 Se pueden acoplar marcadores de imagen a una partícula mediante enlace covalente directa o indirectamente a un átomo del polímero o agente modificador de la superficie, o el marcador puede estar asociado de forma no covalente o covalente con la partícula mediante una estructura quelante o mediante una molécula auxiliar tal como manitol, gluconato, glucoheptonato, tartrato y similares.

60 Se puede usar cualquier estructura quelante adecuada para proporcionar proximidad espacial entre un radionúclido y la partícula mediante asociación covalente o no covalente. Muchas de tales estructuras quelantes se conocen en la técnica. Preferiblemente, la estructura quelante es una estructura N₂S₂, una estructura N₃S, una estructura N₄, una estructura que contiene isonitrilo, una estructura que contiene hidracina, una estructura que contiene HYNIC (ácido hidrazinonicotínico), una estructura que contiene ácido 2-metilitionicotínico, una estructura que contiene carboxilato, o similares. En algunos casos, se puede lograr la quelación sin incluir una estructura quelante separada, porque el radionúclido se quela directamente a átomo(s) en o pendiente(s) de la partícula, por ejemplo a átomos de oxígeno en el polímero o un agente modificador de superficie de polietilenglicol.

65

Los radionúclidos se pueden colocar en proximidad espacial a una partícula usando procedimientos conocidos que realizan u optimizan quelación, asociación o unión del radionúclido específico a un componente de la partícula o un grupo pendiente de la superficie de la partícula. Por ejemplo cuando ^{123}I es el radionúclido, el agente de imagen se puede marcar según procedimientos de radioyodación conocidos tales como radioyodación directa con cloramina T, intercambio de radioyodación por un halógeno o un grupo organometálico, y similares. Cuando el radionúclido es $^{99\text{m}}\text{Tc}$, el agente de imagen se puede marcar usando cualquier método adecuado para unir $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a una molécula ligando. Preferiblemente, cuando el radionúclido es $^{99\text{m}}\text{Tc}$, se incluye una molécula auxiliar tal como manitol, gluconato, glucoheptonato o tartrato en la mezcla de reacción de marcaje, con o sin una estructura quelante. Más preferiblemente, se coloca $^{99\text{m}}\text{Tc}$ en proximidad espacial a la molécula de direccionamiento reduciendo $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ con estaño en presencia de manitol y de la molécula de direccionamiento. Otros agentes reductores, incluyendo tartrato de estaño o reductores sin estaño tal como ditionito de sodio, también se pueden usar para hacer un agente de imagen según la invención.

En general, las metodologías de marcaje varían con la elección del radionúclido, el grupo a ser marcado y la afección clínica que se investiga. Los métodos de marcaje que usan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{111}In se describen por ejemplo en Peters, A. M. et al., *Lancet* 2: 946-949 (1986); Srivastava, S. C. al., *Semin. Nucl. Med.* 14(2):68-82 (1984); Sinn, H. et al., *Nucl. Med. (Stuttgart)* 13:180, 1984; McAfee, J. G. et al., *J. Nucl. Med.* 17:480-487, 1976; McAfee, J. G. et al., *J. Nucl. Med.* 17:480-487, 1976; Welch, M. J. et al., *J. Nucl. Med.* 18:558-562, 1977; McAfee, J. G., et al., *Semin. Nucl. Med.* 14(2):83, 1984; Thakur, M. L., et al., *Semin. Nucl. Med.* 14(2):107, 1984; Danpure, H. J. et al., *Br. J. Radiol.*, 54:597-601, 1981; Danpure, H. J. et al., *Br. J. Radiol.* 55:247-249, 1982; Peters, A. M. et al., *J. Nucl. Med.* 24:39-44, 1982; Gunter, K. P. et al., *Radiology* 149:563-566, 1983; y Thakur, M. L. et al., *J. Nucl. Med.* 26:518-523, 1985.

Las partículas se pueden caracterizar usando métodos estándar de espectros de RMN de campo alto así como IR, MS y rotación óptica. Se pueden usar el análisis de elementos, TLC y/o HPLC como medida de pureza. Se prefiere una pureza de al menos alrededor del 80%, preferiblemente al menos alrededor del 90%; más preferiblemente al menos alrededor del 95% e incluso más preferiblemente al menos alrededor del 98%. También se pueden usar TLC y/o HPLC para caracterizar tales compuestos.

Una vez preparadas, se puede cribar las partículas candidatas por su capacidad de llevar su(s) agente(s) bioactivo(s) a través de la barrera mucosa. También se puede probar la capacidad de las partículas candidatas de transfectar una célula, si el agente bioactivo transportado es un ácido nucleico. Además, se puede probar la estabilidad de una partícula incubando el compuesto en suero, por ejemplo, suero humano y midiendo la potencial degradación del compuesto a lo largo del tiempo. También se puede determinar la estabilidad administrando el compuesto a un sujeto (humano o no humano), obteniendo muestras de sangre a varios periodos de tiempo (por ejemplo, 30 min, 1 hora, 24 horas) y analizando las muestras de sangre para metabolitos derivados o relacionados.

Un "fármaco", "agente terapéutico" o "medicamento", es una sustancia biológica, fisiológica o farmacológicamente activa que actúa de forma local o sistémica en el cuerpo humano o animal. Una composición objeto puede incluir cualquier sustancia activa.

Se pueden usar varias formas de medicamentos o fármacos que son capaces de ser transportados por las partículas a través de barreras mucosas en tejidos o fluidos adyacentes. Pueden ser ácidas, básicas o sales. Pueden ser moléculas neutras, moléculas polares o complejos moleculares capaces de formar puentes de hidrógeno. Pueden estar en forma de éteres, ésteres, amidas y similares, incluyendo profármacos que se activan biológicamente cuando se inyectan en el cuerpo humano o animal, por ejemplo, por corte de un éster o amida. Un analgésico también es un ejemplo de un "medicamento". Cualquier medicamento adicional en una composición objeto puede variar ampliamente con el propósito de la composición. El término "medicamento" incluye sin limitaciones, vitaminas; suplementos minerales; sustancias usadas para el tratamiento, prevención, diagnóstico, cura o mejora de enfermedades; sustancias que afectan la estructura o función del cuerpo; o profármacos, que se hacen biológicamente activos o más activos después de haberlos colocados en un ambiente fisiológico predeterminado.

Se pueden incorporar plastificantes y agentes estabilizantes conocidos en la técnica en las partículas de la presente invención. En ciertas formas de realización, se seleccionan aditivos tales como plastificantes y agentes estabilizantes por su biocompatibilidad. En ciertas formas de realización, los aditivos son surfactantes pulmonares, tales como 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y L- α -fosfatidilcolina (PC).

En otras formas de realización, los potenciadores de esferonización facilitan la producción de partículas objeto que en general son de forma esférica. Sustancias tales como zeína, celulosa microcristalina o celulosa microcristalina coprocesada con carboximetilcelulosa sódica pueden conferir plasticidad a las composiciones objeto así como dar fuerza e integridad. En formas de realización particulares, durante la esferonización, los extrudados que son rígidos, pero no plásticos, producen la formación de partículas en forma de pesa y/o una gran proporción de finos, y los extrudados que son plásticos, pero no rígidos, tienden a aglomerarse y formar partículas excesivamente grandes. En tales formas de realización, es deseable un equilibrio entre rigidez plasticidad. El porcentaje de potenciador de esferonización en una formulación típicamente varía desde el 10 al 90% (peso/peso). En ciertas formas de

realización, una composición objeto incluye un excipiente. Se puede seleccionar un excipiente particular basado en su punto de fusión, solubilidad en un solvente seleccionado (por ejemplo, un solvente que disuelve el polímero y/o el agente terapéutico) y las características resultantes de las partículas.

5 Los excipientes pueden constituir un pequeño porcentaje, alrededor del 5%, el 10%, el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 40%, el 50% o mayor de las composiciones objeto.

Se pueden incorporar tampones, ácidos y bases en las composiciones objeto para ajustar su pH. También se pueden incluir agentes para aumentar la distancia de difusión de agentes liberados de la matriz polimérica.

10

4. Aplicaciones: composiciones terapéuticas y diagnósticas

En parte, una partícula polimérica de la presente invención incluye un polímero biocompatible y preferiblemente biodegradable, tal como cualquier polímero discutido anteriormente, que opcionalmente incluye cualquier otro polímero biocompatible y opcionalmente biodegradable mencionado anteriormente o conocido en la técnica. La invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen una o más partículas. Una composición farmacéutica puede ser una composición terapéutica y/o una composición diagnóstica o de imagen.

15

A. Estructuras físicas de las composiciones objeto

20

Las partículas objeto, por ejemplo, micropartículas o preferiblemente nanopartículas, pueden comprender matrices poliméricas. Las micropartículas típicamente comprenden una matriz polimérica biodegradable y un agente bioactivo, por ejemplo el agente bioactivo se encapsula en o se adsorbe a la matriz polimérica. Las micropartículas se pueden formar mediante una amplia variedad de técnicas que conocen los expertos en la materia. Los ejemplos de técnicas de formación de micropartículas incluyen, pero no están limitadas a, (a) separación en fases mediante emulsificación y posterior evaporación de solvente orgánico (incluyendo métodos de emulsiones complejas tales emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite y emulsiones de agua-aceite-agua); (b) coacervación-separación en fases; (c) dispersión por fusión; (d) deposición interfacial; (e) polimerización in situ; (f) secado por rociado y congelación por rociado; (g) recubrimiento en suspensión de aire; y (h) recubrimiento en bombo o por rociado. Estos métodos, así como las propiedades y características de micropartículas se divulgan en, por ejemplo, patente de EE UU No. 4.652.441; patente de EE UU No. 5.100.669; patente de EE UU No. 4.526.938; WO 93/24150; EPA 0258780 A2; patente de EE UU No. 4.438.253 y patente de EE UU No. 5.330.768.

25

30

Para preparar partículas de la presente invención, se pueden emplear varios métodos dependiendo de la aplicación deseada de los vehículos de distribución. Los métodos adecuados incluyen, pero no están limitados a, secado por rociado, liofilización, secado al aire, secado al vacío, secado en lecho fluido, molido, coprecipitación y extracción crítica de fluido. En el caso de secado por rociado, liofilización, secado al aire, secado al vacío, secado en lecho fluido y extracción crítica de fluido, los componentes (poliol estabilizante, material bioactivo, tampones, etc.) primero se disuelven o resuspenden en condiciones acuosas. En el caso de coprecipitación, los componentes se mezclan en condiciones orgánicas y se procesa como se describe posteriormente. Se puede usar secado por rociado para cargar la partícula con el material bioactivo. Los componentes se mezclan en condiciones acuosas y se secan usando boquillas de precisión para producir gotitas extremadamente uniformes en una cámara de secado. Las máquinas de secado por rociado adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, secadores por rociado Buchi, NIRO, APV y Lab-plant usados según las instrucciones del fabricante.

35

40

La forma de las micropartículas y nanopartículas se puede determinar mediante microscopía electrónica de barrido o de transmisión. Las nanopartículas de forma esférica se usan en ciertas formas de realización, por ejemplo, para circular en el torrente sanguíneo. Si se desea, las partículas se pueden fabricar usando técnicas conocidas en otras formas que sean más útiles para una aplicación específica.

45

50

Además de la distribución intracelular de un agente terapéutico, también es posible que las partículas de las composiciones objeto, tal como micropartículas o nanopartículas, puedan experimentar endocitosis, obteniendo por tanto acceso a la célula. La frecuencia de tal proceso de endocitosis dependerá probablemente del tamaño de cualquier partícula.

55

B. Dosis y formulaciones de las composiciones objeto

En la mayoría de las formas realización, los polímero objeto incorporarán la sustancia a ser distribuida en una cantidad suficiente para administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico u otro material incorporado como parte de un tratamiento diagnóstico, profiláctico o terapéutico. La concentración deseada de compuesto activo en la partícula dependerá de las velocidades de absorción, inactivación y excreción del fármaco así como la velocidad de distribución del compuesto de las composiciones objeto. Se debe advertir que los valores de dosis también pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar. Se debe entender además que para cualquier sujeto particular, se deben ajustar las pautas de dosis específicas durante el tiempo según la

60

necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Típicamente, la dosis se determinará usando técnicas que conoce el experto en la materia.

Además, las cantidades de sustancias bioactivas variarán dependiendo de la potencia relativa de los agentes seleccionados. Además, la concentración y/o cantidades óptimas o cantidades de cualquier agente terapéutico particular se pueden ajustar para acomodar variaciones en los parámetros de tratamiento. Tales parámetros de tratamiento incluyen la composición polimérica de una preparación particular, la identidad del agente terapéutico utilizado y el uso clínico en que se pone la preparación, por ejemplo, el sitio tratado, el tipo de paciente, por ejemplo, humano o no humano, adulto o niño, y la naturaleza de la enfermedad o afección.

La concentración y/o cantidad de cualquier agente terapéutico u otro material adsorbido o encapsulado para una composición objeto determinada se puede identificar fácilmente mediante cribado de rutina en animales, por ejemplo, ratas, cribando un intervalo de concentración y/o cantidades del material en cuestión usando los ensayos apropiados. También están disponibles métodos conocidos para ensayar concentraciones locales en tejido, velocidades de difusión de partículas y flujo sanguíneo local antes y después de la administración de formulaciones terapéuticas según la invención. Uno de tales métodos es microdiálisis, como revisa T. E. Robinson et al., 1991, MICRODIALYSIS IN THE NEUROSCIENCES, Techniques, volumen 7, capítulo 1. Los métodos revisados por Robinson se pueden aplicar, en breve, como sigue. Se coloca un bucle de microdiálisis in situ en un animal de prueba. Se bombea líquido de diálisis a través del bucle. Cuando se inyectan partículas según la invención adyacentes al bucle, los fármacos liberados se recogen en el dializado en proporción a sus concentraciones locales en el tejido. El progreso de la difusión de los agentes activos se puede determinar por tanto con procedimientos de calibración adecuados usando concentraciones conocidas de agentes activos.

En ciertas formas de realización, la dosis de la invención objeto se puede determinar mediante referencia a las concentraciones en plasma del agente terapéutico u otros materiales encapsulados. Por ejemplo, se puede usar la concentración máxima (C_{max}) en plasma y el área bajo la curva concentración en plasma-tiempo desde tiempo 0 hasta infinito.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar por varios medios, dependiendo del uso que se pretenda, como se sabe bien en la técnica. Por ejemplo, si las composiciones objeto se van a administrar por vía oral, se pueden formular como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos o jarabes. De forma alternativa, las formulaciones de la presente invención se pueden administrar por vía parenteral como inyecciones (intravenosa, intramuscular o subcutánea), preparaciones de infusiones en gotas o supositorios. Para aplicación por vía de la membrana mucosa oftálmica, las composiciones objeto se pueden formular como gotas oculares o pomadas oculares. Estas formulaciones se pueden preparar por medios convencionales, y, si se desea, las composiciones objeto se pueden mezclar con cualquier aditivo convencional, tal como un aglutinante, un agente disgregante, un lubricante, un corrector de sabor, un agente solubilizante, un auxiliar de suspensión, un agente emulsionante o un agente de recubrimiento.

Además, en ciertas formas de realización, las composiciones objeto de la presente invención se pueden liofilizar o someter a otra técnica de secado apropiada tal como secado por rociado.

Las composiciones objeto se pueden administrar una vez, o se pueden dividir en un número de dosis más pequeñas a ser administradas a intervalos variables de tiempo, dependiendo en parte de la velocidad de liberación de las composiciones y la dosis deseada.

Las formulaciones útiles en los métodos de la presente invención incluyen las adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo yugal y sublingual), rectal, vaginal, aerosol y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar de forma conveniente en formas farmacéuticas unitarias y se pueden preparar por cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de una composición objeto que se puede combinar con un material soporte para producir una dosis única puede variar dependiendo de sujeto que se trata y el modo particular de administración.

Los métodos de preparar estas formulaciones o composiciones incluyen el paso de asociar las composiciones objeto con el soporte y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente una composición objeto con soportes líquidos, o soportes sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto.

Las partículas, particularmente nanopartículas, que se pueden administrar en formulaciones inhalante o aerosol según la invención comprenden uno o más agentes, tales como adyuvantes, agentes de diagnóstico, agentes de imagen o agentes terapéuticos útiles en terapia de inhalación.

El tamaño de partícula del medicamento particulado debe ser tal que permita la inhalación de sustancialmente todo el medicamento en los pulmones tras la administración de la formulación de aerosol y de esta manera será deseablemente menor de 20 micrómetros, preferiblemente en el intervalo de 1 a 10 micrómetros, por ejemplo, de 1 a

5 micrómetros. El tamaño de partícula del medicamento se puede reducir por medios convencionales, por ejemplo, por molido o micronización.

5 La formulación final de aerosol deseablemente contiene del 0,005-90% peso/peso, preferiblemente del 0,005-50%, más preferiblemente del 0,005-5% peso/peso, en especial del 0,01-1,0% peso/peso, de medicamento relativo al peso total de la formulación.

10 Es deseable, pero en ningún caso requerido, que las formulaciones de la invención no contengan componentes que puedan provocar la degradación del ozono estratosférico. En particular es deseable que las formulaciones estén sustancialmente libres de clorofluorocarbonos tales como CCl_3F , CCl_2F_2 y CF_3CCl_3 . Como se usa aquí "sustancialmente libre" significa menos del 1% peso/peso basado en el sistema de propulsor, en particular menos del 0,5%, por ejemplo el 0,1% o menos.

15 El propulsor puede contener opcionalmente un adyuvante que tenga mayor polaridad y/o un punto de fusión mayor que el propulsor. Los adyuvantes polares que se pueden usar incluyen alcoholes alifáticos y polioles (por ejemplo, C_{2-6}) tales como etanol, isopropanol y propilenglicol, preferiblemente etanol. En general, se pueden requerir solo pequeñas cantidades de adyuvantes polares (por ejemplo del 0,05-3,0% peso/peso) para mejorar la estabilidad de la dispersión —el uso de cantidades por encima del 5% peso/peso puede tender a disolver el medicamento. Las formulaciones según la invención pueden contener preferiblemente menos del 1% peso/peso, por ejemplo alrededor del 0,1% peso/peso de adyuvante polar. Sin embargo, las formulaciones de la invención están preferiblemente libres de adyuvantes polares, especialmente etanol. Los adyuvantes volátiles adecuados incluyen hidrocarburos saturados tales como propano, n-butano, isobutano, pentano e isopentano y éteres alquílicos tales como éter dimetílico. En general, hasta el 50% peso/peso del propulsor puede comprender un adyuvante volátil, por ejemplo del 1 al 30% peso/peso de un hidrocarburo de C1-C6 saturado volátil.

25 Opcionalmente, las formulaciones de aerosol según la invención pueden comprender además uno o más tensioactivos. Los tensioactivos deben ser fisiológicamente aceptables tras administración por inhalación. En esta categoría se incluyen tensioactivos tales como L- α -fosfatidilcolina (PC), 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), ácido oleico, trioleato sorbitano, monooleato sorbitano, monolaurato sorbitano, monolaurato sorbitano polioxietileno (20), monooleato sorbitano polioxietileno (20), lecitina natural, éter oleico de polioxietileno (2), éter esteárico polioxietileno (2), éter laurico polioxietileno (4), copolímeros en bloque de oxietileno y oxipropileno, lecitina sintética, dioleato de dietilenglicol, oleato de tetrahidrofurfurilo, oleato de etilo, miristato de isopropilo, monooleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, monorricinolato de glicerilo, alcohol cetílico, alcohol estearílico, polietilenglicol 400, cloruro de cetil pirimidinio, cloruro de benzalconio, aceite de oliva, monolaurato de glicerilo, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón y aceite de girasol. Los tensioactivos preferidos son lecitina, ácido oleico y trioleato sorbitano.

40 Las formulaciones de la invención se pueden preparar mediante dispersión de las partículas en el propulsor y/o copropulsores seleccionados en un envase apropiado, por ejemplo, con la ayuda de sonicación. Preferiblemente, las partículas se resuspenden en copropulsor y se rellena un envase adecuado. La válvula del envase se sella después en su lugar y se introduce el propulsor por llenado a presión a través de la válvula en la manera convencional. Las partículas se pueden así resuspender o disolver en un propulsor licuado, sellado en un envase con una válvula medidora, y ajustado en actuador. Tales inhaladores de dosis medidas se conocen bien en la técnica. La válvula medidora puede medir de 10 a 500 μL y preferiblemente de 25 a 150 μL . En ciertas formas de realización, se puede alcanzar la dispersión usando inhaladores de polvo seco (por ejemplo, spíhaler) para las partículas (que permanecen como polvos secos). En otras formas de realización, se pueden resuspender la nanoesferas en un líquido acuoso y nebulizar en finas gotitas a ser aerosolizadas en los pulmones.

50 Se pueden usar nebulizadores sónicos porque minimizan la exposición del agente a cizalla, que puede producir degradación de las partículas. Normalmente, se hace un aerosol acuoso formulando una solución o suspensión acuosa de las partículas junto con soportes y estabilizantes farmacéuticamente aceptables convencionales. Los soportes y estabilizantes varían con los requerimientos de la composición particular, pero típicamente incluyen tensioactivos no iónicos (Tweens, Pluronic o polietilenglicol), proteínas inocuas como seroalbúmina, ésteres sorbitanos, ácido oleico, lecitina, aminoácidos como glicina, tampones, sales, azúcares o polioles. Los aerosoles en general se preparan de soluciones isotónicas.

55 También se contempla que formulaciones oftálmicas, pomadas oculares, polvos, soluciones y similares, están dentro del ámbito de esta invención.

60 Ciertas composiciones farmacéuticas de esta invención adecuadas para la administración parenteral comprenden una o más composiciones objeto en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas, estériles, isotónicas farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que se pueden reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre en el receptor deseado o agentes suspensores o espesantes.

65

Ejemplos de soportes acuosos o no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tal como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tal como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Se pueden suspender las composiciones de micropartículas y/o nanopartículas en una solución farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrano, solución de dextrosa, solución de sorbitol, una solución que contiene alcohol polivinílico (desde alrededor del 1% hasta alrededor del 3%, preferiblemente alrededor del 2%) o una solución osmóticamente equilibrada que comprende un tensioactivo (tal como Tween 80 o Tween 20) y un agente potenciador de viscosidad (tal como gelatina, alginato, carboximetilcelulosa sódica, etc.). En ciertas formas de realización, la composición se administra por vía subcutánea. En otras formas de realización, la composición se administra por vía intravenosa. Para la administración intravenosa, la composición se formula preferiblemente como micropartículas o nanopartículas de media menos de alrededor de 15 micrómetros, más particularmente menos de alrededor de 10 micrómetros, más particularmente menos de alrededor de 5 micrómetros, y aún más particularmente menos de alrededor de 5 micrómetros de diámetro medio.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas (usando una base con sabor, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga), que cada una contiene una cantidad predeterminada de una composición objeto como principio activo. Las composiciones objeto de la presente invención también se pueden administrar como una inyección rápida, electuario o pasta.

En formas farmacéuticas sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grajeas, polvos, gránulos y similares), la composición objeto se mezcla con uno o más soportes farmacéuticamente aceptables y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tal como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tal como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, fécula de patata o tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retrasadores de solución, tal como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humidificadores, tal como, por ejemplo, alcohol acético y monoestearato de glicerilo; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como rellenos en cápsulas de gelatina blandas y duras rellenas usando lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Se puede hacer un comprimido mediante compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos por compresión se pueden preparar usando un aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa sódica entrecruzada), agente modificador de superficie o dispersante. Los comprimidos por moldeado se pueden hacer moldeando en una máquina adecuada una mezcla de la composición objeto humedecida con un diluyente líquido inerte. En los comprimidos, y otras formas farmacéuticas sólidas, tales como grajeas, cápsulas, píldoras y gránulos, opcionalmente se pueden hacer incisiones o preparar con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica.

Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de las composiciones objeto, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tal como, por ejemplo, agua y otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, maíz, cacahuete, girasol, soja, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de mismos.

Las suspensiones, además de las composiciones objeto, pueden contener agentes suspensores tales como, por ejemplo, alcoholes isoesteáricos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres sorbitanos, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y goma tragacanto y mezclas de los mismos.

Las formulaciones para administración rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio, que se puede preparar mezclando una composición objeto con uno o más soportes adecuados no irritantes que comprenden, por

ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorio o un salicilato, y que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a la temperatura del cuerpo y, por tanto, se fundirá en la cavidad corporal apropiada y liberará las partículas encapsuladas. Una formulación ejemplar para la administración vaginal puede comprender un agente bioactivo que es un anticonceptivo o un agente antivírico, antifúngico o antibiótico.

Las formulaciones que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de aerosol que contienen tales soportes que se sabe en la técnica que son apropiados.

Las formas farmacéuticas para la administración transdérmica incluyen, polvos, aerosoles, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. Se puede mezclar una composición objeto en condiciones estériles con un soporte farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o propulsor que se pueda requerir. Para la administración transdérmica, los complejos pueden incluir grupos lipofílicos e hidrofílicos para alcanzar la solubilidad en agua y propiedades de transporte deseadas.

Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de composiciones objeto, otros soportes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, goma tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos. Los polvos y aerosoles pueden contener, además de una composición objeto, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de tales sustancias. Los aerosoles pueden contener además propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles sin sustituir, tales como butano y propano.

Ejemplificación

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Recogida y preparación de moco cervicovaginal y de fibrosis quística

El procedimiento de recogida de moco cervicovaginal se llevó a cabo como se ha publicado previamente (Boskey, ER, Moench, TR, Hees, PS & Cone, RA (2003) Sexually Transmitted Diseases 30, 107-109, incorporado aquí mediante referencia). El moco recogido se usó para microscopía a las 4 horas. Se observó la viscosidad de muestras recientes como función de la velocidad de cizalla a 37°C en un viscómetro de cono y placa Brookfield (modelo HADV-III con huso CP-40; Brookfield Engineering Lab, Middleboro, MA).

Se expectoró esputo respiratorio humano de pacientes de fibrosis quística hombres y mujeres (edades 18-35). Las muestras de esputo de FQ de múltiples pacientes se juntaron, liofilizaron y reconstituyeron en tampón de esputo agitando a 4°C para lograr un gran volumen de esputo de FQ homogéneo. El volumen de tampón de esputo añadido para reconstituir las muestras de esputo de FQ se determinó por medidas de masa (el esputo de FQ reconstituido tenía la masa equivalente de las muestras recientes de esputo de FQ).

1.2 preparación y caracterización de nanopartículas

Se modificaron covalentemente partículas de poliestireno (PS) modificadas con carboxilo, fluorescentes amarillo-verde de 100-500 nm (Molecular Probes, Eugene, OR) con diamina PEG (MW ~2 kDa; Nektar Therapeutics, San Carlos, CA) mediante reacción carboxilo-amina en exceso 3:1 según el protocolo sugerido por el fabricante. Se disolvió diamina polietilenglicol (PEG) de peso molecular 3.400 dalton (Nektar Therapeutics, San Carlos, CA) en tampón ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES, Sigma, St. Louis, MO) 50 mM pH 6,0. El uso de diamina PEG puede producir un grupo amino libre en el extremo de las cadenas de PEG unidas a la superficie. Se añadieron nanoesferas de poliestireno fluorescentes amarillo-verde (Molecular Probes, Eugene, OR) a la solución para dar una concentración final de 10 mg de PEG/ml y el 1% de sólidos/ml. Las nanoesferas tenían diámetros de 100 nm y estaban modificadas con carboxilo. Después de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, se añadió EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) (Sigma, St. Louis, MO) a la mezcla a una concentración de 4 mg/ml. El pH de la solución se ajustó a 6,5 con NaOH diluido y se incubó en un agitador orbital durante 2 horas a temperatura ambiente. Para extinguir la reacción, se añadió glicina (JT Baker, Phillipsburg, NJ) para dar una concentración final de 100 mM. La solución se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se dializó extensamente contra solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS) en un Flot-a-lyzer de peso molecular límite de 300.000 kDa (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA). Las microesferas sin modificar se dializaron de forma similar para eliminar todos los restos de azida sódica originalmente añadida por el fabricante.

Se determinaron el tamaño y el potencial ζ mediante dispersión dinámica de luz y anemometría laser Doppler, respectivamente, usando un Zetasizer 3000 (Malvern Instruments, Southborough, MA). Las medidas de tamaño se realizaron a 25°C en un ángulo de dispersión de 90°. Las muestras se diluyeron en agua bidestilada y las medidas se realizaron según las instrucciones de los instrumentos.

1.3 Adsorción de proteínas a partículas – Medida de la eficacia de PEGilación

Para confirmar la unión de PEG y cuantificar la eficacia en resistir la adsorción de proteínas por PEG, se añadieron 10 μL de partículas con COOH y partículas modificadas con PEG (~0,04% en masa) a 200 μL de NeutrAvidina fluorescente con rodamina 0,1 mg/mL (Molecular Probes, Eugene, OR) y se incubaron en un agitador orbital durante 1 hora. Las partículas se lavaron posteriormente dos veces en PBS, se resuspendieron a una concentración del 0,008% en masa, y se observaron en portaobjetos/cubreobjetos de vidrio sellados usando un microscopio confocal (Zeiss LSM 510, Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY) equipado con una lente de inmersión en aceite 100X/1,4 NA. Las muestras se excitaron con láseres de 488 y 543 y la apertura se ajustó para obtener cortes que variaban en menos de 0,7-0,8 μm . Se mantuvieron idénticos ajustes de excitación y detección y se probaron todas las muestras secuencialmente. Las partículas sin incubación con avidina sirvieron como control negativo para asegurar la descoloración insignificante. Se analizó la intensidad máxima de pixel para cada partícula, después de la conversión a la escala de grises, usando SCION Image 4.03b.

1.4 Seguimiento múltiple de partículas (MTP) en moco cervicovaginal y moco de FQ

Se midieron las velocidades de transporte de partículas analizando trayectorias de partículas fluorescentes, registradas una cámara diana intensificada con silicio (VE-1000, Dage-MTI, Michigan, IN) montada en un microscopio de epifluorescencia invertido equipado con un objetivo de inmersión en aceite de 100X (apertura numérica 1,3). Se llevaron a cabo experimentos en cámaras de vidrio de 8 pocillos (LabTek, Campbell, CA) donde se añadieron soluciones de partículas diluidas (0,0082% peso/volumen) a 250-500 μL de moco reciente hasta una concentración final del 3% v/v (concentración final de partículas $8,25 \times 10^7$ peso/volumen) y se incubaron durante 2 horas antes de la microscopía. Se analizaron las trayectorias de $n > 100$ partículas para cada experimento y se realizaron 3 experimentos para cada condición. Se capturaron películas con el software Metamorph (Universal Imaging Corp.) a una resolución temporal de 66,7 ms durante 20 s. La resolución del seguimiento fue 10 nm, determinado por desplazamientos del seguimiento de partículas inmovilizadas con un adhesivo fuerte. Las coordenadas de los centroides de las nanopartículas se transformaron en desplazamientos cuadráticos medios (MSD) de media en el tiempo, $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = [x(t+\tau) - x(t)]^2 + [y(t+\tau) - y(t)]^2$ (τ = escala de tiempo o intervalo de tiempo), de las que se calcularon las distribuciones de los MSD y difusividades efectivas, como se ha demostrado previamente (Dawson, M, Wirtz, D & Hanes, J (2003) *Journal of Biological Chemistry* **278**, 50393-50401., Valentine, MT, Perlman, ZE, Gardel, ML, Shin, JH, Matsudaira, P, Mitchison, TJ & Weitz, DA (2004) *Biophys J* **86**, 4004-14, Mason, TG, Ganesan, K, vanZanten, JH, Wirtz, D & Kuo, SC (1997) *Physical Review Letters* **79**, 3282-3285, todas las cuales se incorporan aquí mediante referencia). Se proporciona información adicional para medir transporte en 3D mediante seguimiento de partículas en 2D en una revisión reciente (Suh, J, Dawson, M & Hanes, J (2005) *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 63-78, incorporada aquí mediante referencia).

Se determinaron los desplazamientos cuadráticos medios (MSD) dependientes del tiempo de cientos de partículas de poliestireno de 500 nm modificadas con PEG (PS-PEG) (el 0,5% en volumen de una dilución 1:20 de una solución de partículas al 2%) en esputo de FQ mediante seguimiento múltiple de partículas (MPT). Se centrifugaron muestras de moco (200 μL) y se reemplazó una parte del sobrenadante (40 μL) con solución mucolítica o PBS para mantener la concentración inicial de sólidos de moco y eliminar cualquier efecto de la dilución. Los desplazamientos de las partículas en el control sin tratamiento (PBS) fueron idénticos a los de partículas embebidas en una muestra de moco sin procesar, que no se centrifugó. La resolución del seguimiento, evaluada por el seguimiento de sondas de poliestireno de 500 nm en glicerol, fue de 5 nm.

1.5 Clasificación de modo de transporte de partículas

Se clasificaron los mecanismos de transporte de partículas en escalas de tiempo cortas y largas basado en el concepto de cambio relativo (CR) de difusividad efectiva (D_{ef}). Brevemente, se calcularon valores de CR de partículas en escalas temporales cortas y largas dividiendo la D_{ef} de una partícula a una escala de tiempo probada por la D_{ef} a una escala temporal de referencia anterior. Calculando los valores de CR para dos pautas temporales (es decir, escalas temporales cortas y largas), se puede obtener el modo de transporte que describe las propiedades de transporte de la partícula durante diferentes longitudes y escalas temporales. Se definió CR_{corta} a $T_{\text{ref}} = 0,2$ s y $T_{\text{sonda}} = 1$ s, mientras que se determinó CR_{larga} a referencia $T_{\text{ref}} = 1$ s y $T_{\text{sonda}} = 2$ s. Se generó una curva patrón de CR, que representa el intervalo de distribución del 95% de D_{ef} para partículas puramente brownianas durante una escala temporal, basada en simulaciones de Monte Carlo y confirmada por seguimiento de nanopartículas de poliestireno en glicerol (datos no mostrados). Los modos de transporte de partículas que muestran valores de CR por debajo del intervalo del 97,5% para escalas temporales cortas o largas se clasificaron como entorpecidos, y el resto se clasificaron como difusivos. Las partículas inmóviles se definen como esas que muestran un MSD medio menor de la resolución de 10 nm a una escala de tiempo de 1 s. El rigor de la clasificación de los modos de transporte se confirmó por las pendientes de los gráficos MSD frente a escala temporal, donde las partículas difusivas poseen una pendiente de aproximadamente 1 y donde la pendiente para partículas entorpecidas disminuye progresivamente desde 1 al aumentar la escala temporal.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1 Moco cervicovaginal humano y su reología

El moco cervicovaginal (CV) muestra viscosidad macroscópica en el intervalo (en el extremo superior) de secreciones mucosas humanas típicas, incluyendo pulmones, aparato digestivo, nariz, ojos y epidídimo. Esto se atribuye en parte a la similitud en su composición química. Por ejemplo, la glicofoma de mucina MUC5B es la principal forma de mucina secretada en las capas mucosas que protegen el conducto CV, pulmones, nariz y ojo. El contenido de mucina, aproximadamente del 1-3% en peso, también es similar entre el moco cervical, nasal y pulmonar. La composición de agua en los tipos de moco anteriormente mencionados está en intervalo del 90-98%.

2.2 Transporte a tiempo real de nanopartículas modificadas con COOH

Se determinó el efecto del tamaño de partícula en las velocidades de transporte en moco cervicovaginal (CV) obtenido de mujeres voluntarias. Los diámetros hidrodinámicos de las partículas resuspendidas en agua, caracterizados por dispersión dinámica de luz, se enumeran en la figura 8. La adición de partículas sin recubrir a una concentración relativamente alta (el 2% de partículas en peso) a moco CV produjo colapso de la fibras de moco en haces que atraparon las partículas y previnieron su transporte (datos no mostrados). Sin embargo, la concentración baja de partículas (el 0,008% de partículas en peso) no produjo formación de haces y permitió el movimiento de partículas. Como se esperaba, el transporte de partículas estaba muy obstaculizado por la malla de moco, evidente de la baja media de sus desplazamientos cuadráticos medios (MSD) (Fig. 1A). La difusividad efectiva (D_{ef}) de media de ensamble de partículas COOH-PS disminuye a escalas temporales cortas (Fig. 2B), como se espera en moco. Ajustando el MSD de partícula frente a la escala temporal (τ) a la ecuación $MSD = 4D_o\tau^\alpha$, donde D_o es el coeficiente de difusión independiente de la escala temporal, se puede obtener un valor medio para α que proporciona percepción del grado de impedimento al movimiento de una partícula. (Nota: $\alpha = 1$ para difusión browniana pura sin obstruir, tal como partículas en agua). Los valores medios de α fueron 0,16, 0,36 y 0,43 para partículas de COOH-PS de 100, 200 y 500 nm, respectivamente. En conjunto, las D_{ef} de media del ensamble de partículas de COOH-PS de 100, 200 y 500 nm en moco (a $\tau = 1s$) se redujeron 44000, 559 y 4600 veces comparadas con las mismas partículas en agua (Fig. 8).

Para empezar a entender las razones mecánicas para la inesperadamente baja movilidad de las partículas de COOH-PS de 100 nm (comparadas con 200 y 500 nm) a lo largo de todas las escalas temporales, se separaron las partículas basado en su D_{ef} calculada (a $\tau = 1s$) en diez grupos (Fig. 1C). Aunque el 10% más rápido de las partículas de COOH-PS de 100 nm tenían aproximadamente D_{ef} similar comparada con partículas de COOH-PS de 200 y 500 nm, los valores medios de D_{ef} para partículas de COOH-PS de 200 y 500 nm eran mayores que para partículas de COOH-PS de 100 nm para los otros subgrupos (es decir, el 90% más lento de partículas), lo que explica la movilidad del ensamble más lenta de la partículas de COOH-PS de 100 nm. La D_{ef} de partículas individuales de todos los tamaños abarcaba un amplio intervalo, con diferencias en las partículas más rápidas y más lentas dentro de cada tamaño de partícula de al menos 4 órdenes de magnitud (Fig. 1C).

2.3 Transporte a tiempo real de nanopartículas modificadas con PEG

Se unió de forma covalente polietilenglicol (PEG), un polímero hidrofílico y sin carga, a la superficie de partículas de 100, 200 y 500 nm en un intento de reducir las interacciones de las partículas con el moco CV. El grado de unión de PEG fue comparable para todas las partículas, como se muestra por sus cargas de superficie casi neutras y eficacias similares en resistir adsorción de avidina marcada con fluorescencia (Fig. 8). La PEGilación aumentó mucho las velocidades de transporte de partículas, como es evidente por los MSD ($\tau = 1s$) de ensamble 20, 400 y 1100 veces mayores de partículas PEGiladas (PEG-PS) de 100, 200 y 500 nm comparadas con las correspondientes partículas de COOH-PS del mismo tamaño (Fig. 2A). Las D_{ef} ($\tau = 1s$) para partículas de PEG-PS de 100 nm, 200 nm y 500 nm solo se redujeron en 2000, 6 y 4 veces comparadas con los valores esperados para su difusión en agua. Las D_{ef} de ensamble de partículas de PEG-PS de los tres tamaños aún disminuyeron con escalas temporales crecientes (Fig. 2B), pero solo las partículas de PEG-PS de 100 nm experimentaron obstrucción extensa al transporte ($\alpha = 0,31, 0,81, 0,89$ para partículas de PEG-PS de 100, 200 y 500 nm, respectivamente). La PEGilación no solo redujo el impedimento para partículas de PEG-PS más grandes (200 y 500 nm), sino que también aumentó la homogeneidad del transporte comparado con partículas de COOH-PS de tamaño similar (Fig. 2C).

Las velocidades de transporte muy mejoradas tras la PEGilación, en especial para las partículas mayores, se debía en gran parte a una marcada reducción en la fracción de partículas mucoadhesivas (inmóviles + entorpecidas) (Fig. 2D & 2E). En efecto, PEG de 2 kDa aumentó la fracción de partículas penetrantes en moco (difusivas) hasta casi el 70% (Fig. 2F). Esto demuestra directamente que nanopartículas no adhesivas mayores que el límite superior anteriormente descrito de tamaño teórico de malla de moco (200 nm) pueden experimentar transporte rápido en moco humano.

2.4 Propiedades de partículas recubiertas con PEG de alto MW (10 kDa)

El PEG de alto peso molecular se usa ampliamente como agente mucoadhesivo (Bures, P., Y. Huang, E. Oral y N.A. Peppas, *Surface modifications and molecular imprinting of polymers in medical and pharmaceutical applications*. J Control Release, 2001. 72(1-3): p. 25-33, Huang, Y., W. Leobandung, A. Foss y N.A. Peppas, *Molecular aspects of muco- and bioadhesion: tethered structures and site-specific surfaces*. J Control Release, 2000. 65(1-2): p. 63-71.,
 5 Lele, B.S. y A.S. Hoffman, *Mucoadhesive drug carriers based on complexes of poly(acrylic acid) and PEGylated drugs having hydrolysable PEG-anhydride-drug linkages*. J Control Release, 2000. 69(2): p. 237-48., Peppas, N.A., K.B. Keys, M. Torres-Lugoy A.M. Lowman, *Polyethylene glycol-containing hydrogels in drug delivery*. J Control Release, 1999. 62(1-2): p. 81-7.). Para probar su efecto como recubrimiento para nanopartículas, se unió de forma covalente PEG de 10 kDa a la superficie de partículas de 200 nm (PEG_{10kDa}-PS). En fuerte contraste con las equivalentes PEG_{2kDa}-PS, las partículas que tenían un recubrimiento denso de PEG de 10 kDa mostraron velocidades de transporte de partículas muy reducidas en moco CV humano reciente, evidente por los MSD ($\tau = 1s$) de ensamble 2300 veces menores comparados con partículas modificadas con PEG de 2 kDa (Fig. 3A). De hecho, la obstrucción extensa al transporte para PEG_{10kDa}-PS produjo un MSD ($\tau = 1s$) de ensamble casi 6 veces menor que ese para partículas de COOH-PS de tamaño similar, debido en gran parte a las altas fracciones de partículas tanto
 10 inmóviles como fuertemente entorpecidas (es decir *mucoadhesivas*) (Fig. 3B). Sin querer estar unido a ninguna teoría, es posible que el PEG de bajo peso molecular elimine la mucoadhesión minimizando tanto los puentes de hidrógeno como la interpenetración de cadenas de PEG en el gel de moco, mientras que el PEG de peso molecular mayor, con cadenas más largas, flexibles que se extienden más lejos de la superficie de la partícula, penetra en el gel de moco de una manera que impide difusión. Planteamientos alternativos para modificar partículas con PEG de alto peso molecular, sin embargo, pueden controlar la longitud y flexibilidad de cadenas pendientes de PEG, proporcionando de esta manera un propiedad de superficie mucorresistente.

2.5 N-acetil-cisteína mejora el transporte de nanopartículas en esputo de FQ humano

Los agentes que degradan moco, tales como rhDNasa (que hidroliza ADN lineal) y N-acetil-cisteína (NAC) (que corta enlaces disulfuro y sulfhidrilo presentes en mucina), se usan clínicamente para aumentar la velocidad de depuración en moco (Hanes, J., M. Dawson, Y. Har-el, J. Suh y J. Fiegel, *Gene Delivery to the Lung*. Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology, A.J.Hickey, Editor. Marcel Dekker Inc.: Nueva York, 2003: p. 489-539.). Estos agentes también pueden ser adyuvantes valiosos en aumentar la velocidad de transporte de nanopartículas en moco (Ferrari, S., C. Kitson, R. Farley, R. Steel, C. Marriott, D.A. Parkins, M. Scarpa, B. Wainwright, M.J. Evans, W.H. Colledge, D.M. Geddes y E.W. Alton, *Mucus altering agents as adjuncts for nonviral gene transfer to airway epithelium*. Gene Ther, 2001. 8(18): p. 1380-6). Previamente, se cuantificó el efecto de rhDNasa en velocidades de transporte de partículas en moco de FQ usando seguimiento múltiple de partículas (Fig. 4). La distribución de velocidades de transporte de partículas individuales fue notablemente más homogénea a los 30 minutos después del tratamiento con rhDNasa que en el control sin tratamiento (compárense las figuras 4A y 4B). Sin embargo, a pesar de la reducción de las propiedades viscoelásticas de compresión en más del 50% (Fig. 4C), el tratamiento con rhDNasa realmente *redujo* las velocidades de transporte de media de ensamble globales de nanopartículas (Fig. 4D). Planteamientos alternativos para tratar moco con rhDNasa, por ejemplo, diferentes tiempos de incubación y diferentes tampones, pueden mejorar su utilidad como agente mucolítico. Por el contrario, el tratamiento con NAC mejoró significativamente las velocidades de transporte de nanopartículas (Fig. 4E).
 25
 30
 35
 40

Los desplazamientos cuadráticos medios geométricos de ensamble muestran que el pretratamiento de moco con N-acetil-L-cisteína neutralizada aumentó las velocidades de transporte 10,7 veces comparado con el control sin tratamiento (Fig. 5A). Clasificar las trayectorias del movimiento de partículas en diferentes modos de transporte (inmóvil, entorpecido, difusivo) muestra que la fracción difusiva de PEG-PS de 500 nm aumenta 3 veces comparada con el control sin tratamiento (Fig. 5B).
 45

2.6 Trayectorias de partículas

Las trayectorias típicas de partículas que experimentan transporte en moco CV se registraron y cuantificaron mediante microscopía. Las partículas están en tres categorías generales: inmóviles (Fig. 6A), entorpecidas (Fig. 6B) y difusivas (Fig. 6C).
 50

2.7 Cuantificación de recubrimiento de superficie de PEG

El transporte rápido por nanopartículas poliméricas en moco humano sin diluir es probablemente una consecuencia directa del recubrimiento de superficie de PEG mejorado. Previamente, se determinó que partículas recubiertas de PEG de 500 nm (como se divulga en el ejemplo 6B en el documento WO 2005/072710 A2), con una baja densidad de PEG (Prep A, figura 7), mejoran el transporte ~10 veces comparado con partículas sin recubrir de tamaño similar. Por el contrario, mayor densidad de PEG de superficie (Prep B, figura 7) fue capaz de mediar mejoras en el transporte de partículas de 500 nm hasta ~1100 veces comparadas con equivalentes sin recubrir de tamaño similar. Esto recalca directamente la importancia de la alta densidad del recubrimiento de PEG de superficie en imponer el transporte de partículas en moco.
 55
 60

65 Equivalentes

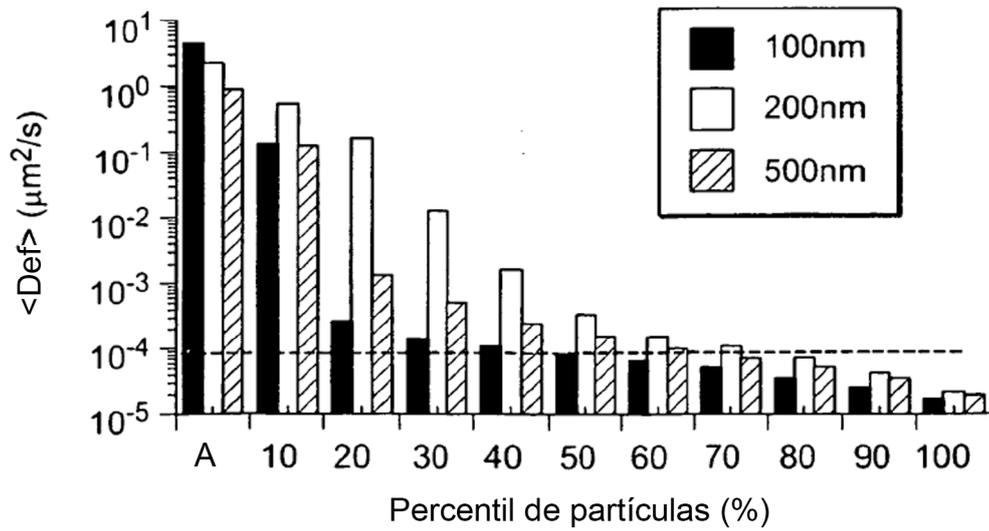
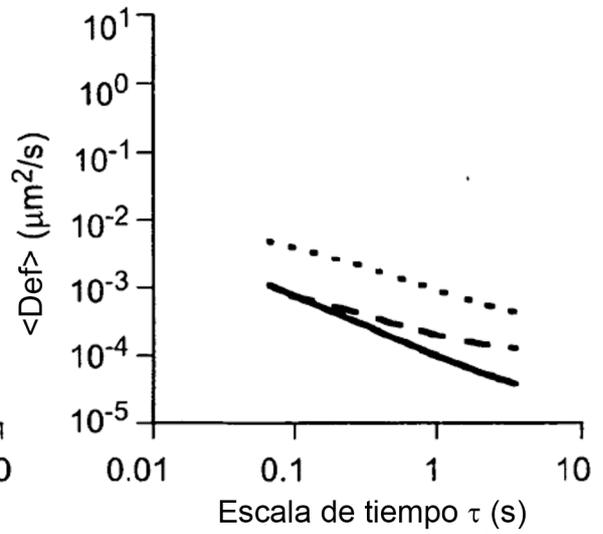
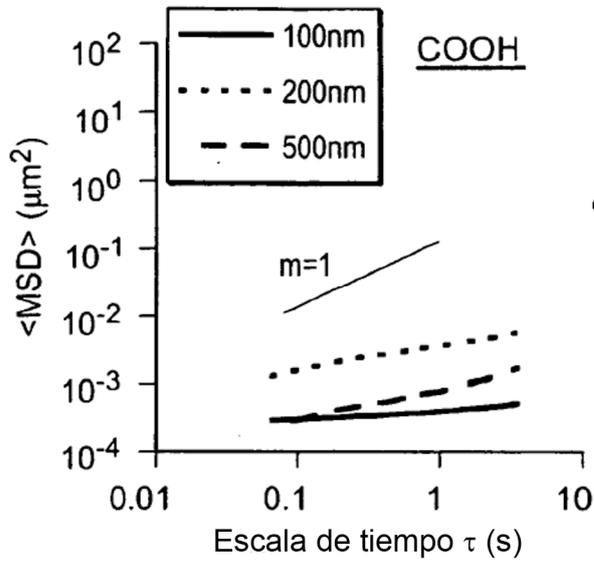
Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar sin usar más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las formas de realización específicas de la invención descrita en esta memoria. Se pretenden que tales equivalentes estén abarcados por las siguientes reivindicaciones.

5

REIVINDICACIONES

1. Una partícula que comprende una superficie externa y uno o más grupos modificadores de superficie dispuestos en la superficie externa que reducen la mucoadhesión de la partícula, en donde
 - (a) la masa del grupo modificador de superficie constituye al menos 1/3400 de la masa de la partícula, y/o
 - (b) el grupo modificador de superficie está presente en la superficie externa a una densidad de más de 0,01 unidades por nanómetro cuadrado.
2. La partícula de la reivindicación 1, en donde la partícula comprende un núcleo, y el agente modificador de superficie está
 - (a) unido de forma covalente al núcleo, o
 - (b) adsorbido de forma no covalente al núcleo.
3. La partícula de cualquier reivindicación anterior, en donde la partícula comprende un núcleo que comprende un polímero, opcionalmente en donde el polímero comprende grupos modificadores de superficie dispuestos en la superficie externa.
4. La partícula de cualquier reivindicación anterior, en donde uno o más agentes bioactivos se asocian con la partícula.
5. La partícula de cualquier reivindicación anterior, en donde dicha partícula tiene un tamaño de partícula de más de 100 nm, 200 nm, 300 nm, 400 nm o 500 nm.
6. La partícula de la reivindicación 4, en donde el agente bioactivo es un agente de imagen o un agente terapéutico.
7. La partícula de cualquier reivindicación anterior, en donde el grupo modificador de superficie es
 - (a) hidrofílico, o
 - (b) es un tensioactivo.
8. La partícula de cualquier reivindicación anterior, en donde la partícula comprende un copolímero que comprende PEG o un derivado de PEG y en donde el PEG o derivados están localizados cerca o en las posiciones terminales del copolímero.
9. La partícula de cualquier reivindicación anterior, en donde el núcleo y/o el agente modificador de superficie comprende PEG.
10. La partícula de la reivindicación 8 o 9, en donde el PEG tiene un peso molecular de 1 kDa, 2 kDa, 3 kDa, 4 kDa, 6 kDa o 8 kDa.
11. La partícula de cualquier reivindicación anterior, en donde el grupo modificador de superficie comprende un copolímero en bloque de oxietileno y oxipropileno.
12. La partícula de cualquier reivindicación anterior, en donde el grupo modificador de superficie tiene una densidad de al menos 0,02, de al menos 0,05, al menos 0,1, de al menos 0,2, de al menos 0,5, de al menos 1, de al menos 2, de al menos 5, de al menos 10 o de al menos 20 unidades por nanómetro cuadrado.
13. La partícula de cualquier reivindicación anterior, en donde la partícula tiene un potencial zeta entre -10 mV y 10 mV, entre -10 mV y 5 mV, entre -5 mV y 5 mV, o entre -2 mV y 2 mV.
14. Una composición farmacéutica que comprende la partícula de cualquier reivindicación anterior y uno o más soportes farmacéuticamente aceptables.
15. Un inhalador que comprende la partícula de cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
16. Una preparación farmacéutica adecuada para
 - (i) inhalación
 - (ii) inyección, o
 - (iii) administración tópica a una membrana mucosa
 que comprende un agente bioactivo asociado con un grupo modificador de superficie, en donde
 - (a) la masa del grupo modificador de superficie constituye al menos 1/3400 de la masa del agente bioactivo; y/o
 - (b) el grupo modificador de superficie está presente en la superficie externa del agente bioactivo a una densidad de más de 0,01 unidades por nanómetro cuadrado.

17. Un virus con envuelta que comprende un grupo modificador de superficie, en donde dicho virus difunde a través de moco cervicovaginal humano a una difusividad en una escala de tiempo de 1 segundo que es más de 20 veces mayor que la difusividad a la que un virus correspondiente que carece de grupo modificador de superficie difunde a través de moco cervicovaginal humano, y en donde
- 5 (a) la masa del grupo modificador de superficie constituye al menos $1/3400$ de la masa del virus; y/o
- (b) el grupo modificador de superficie está presente en la superficie externa del virus a una densidad mayor de 0,01 unidades por nanómetros cuadrados.



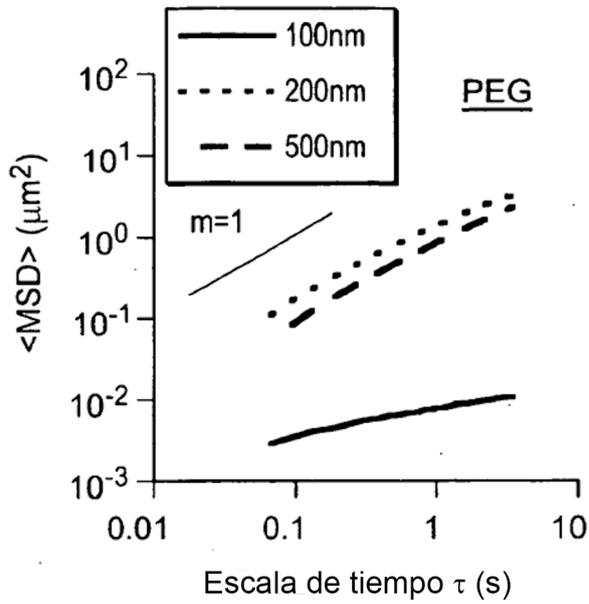


FIG. 2A

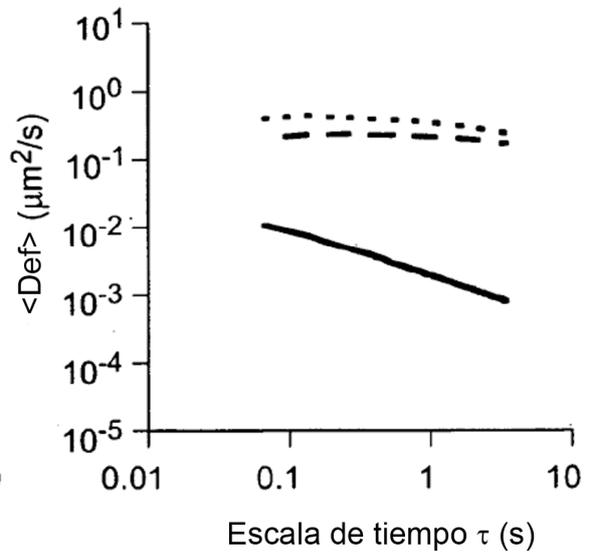


FIG. 2B

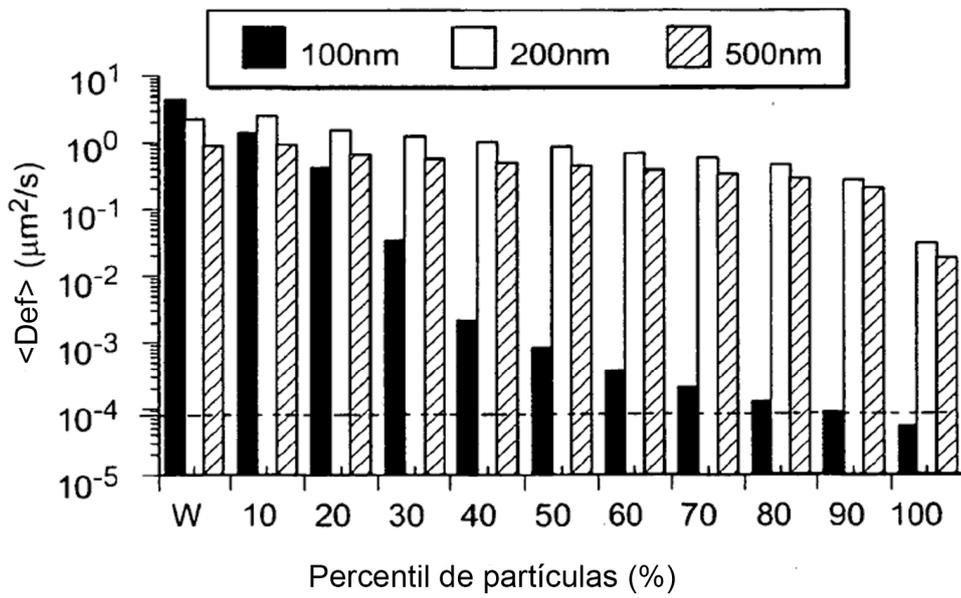


FIG. 2C

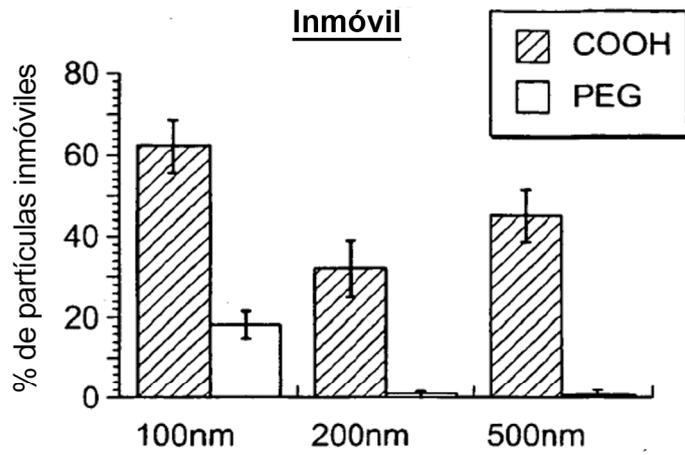


FIG. 2D

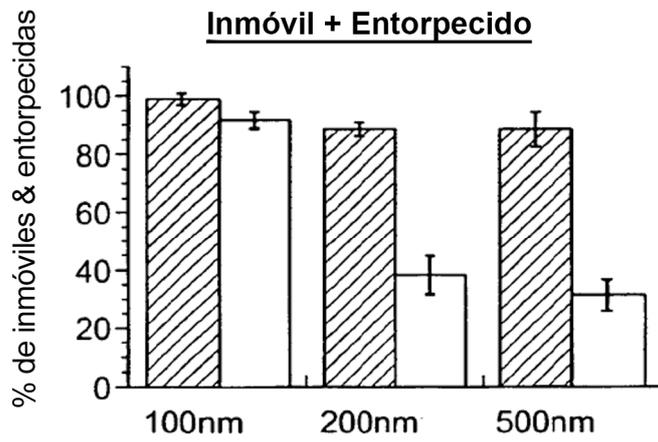


FIG. 2E

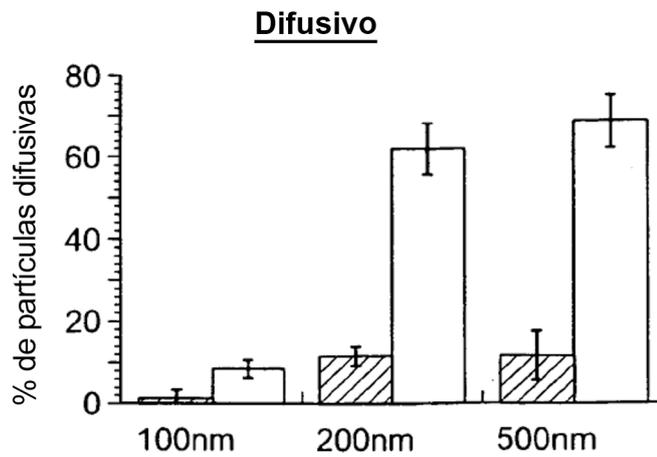


FIG. 2F

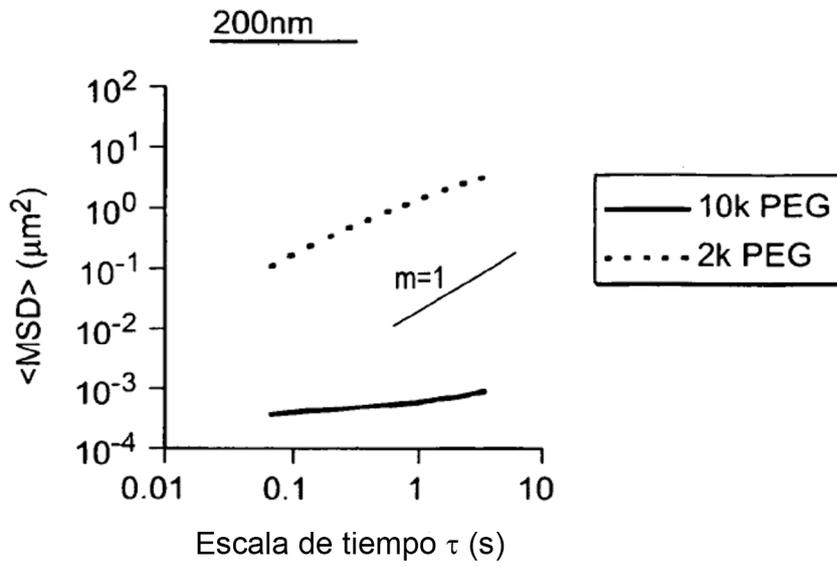


FIG. 3A

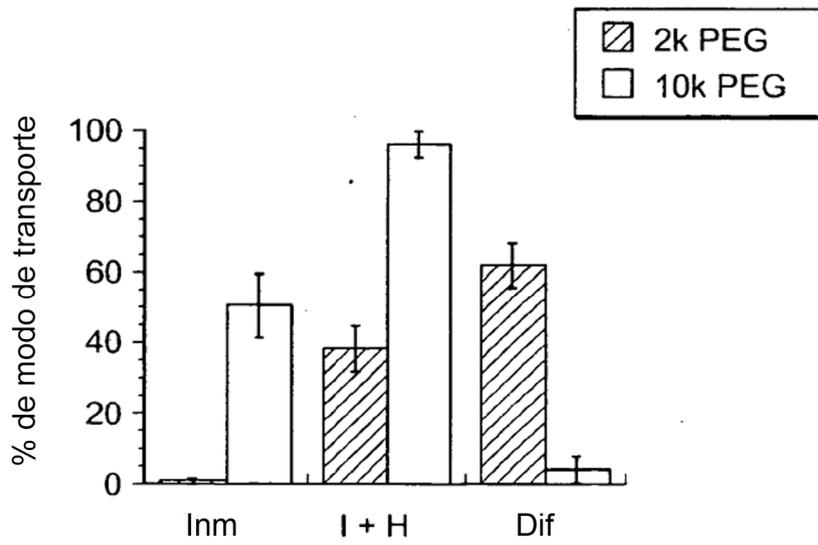


FIG. 3B

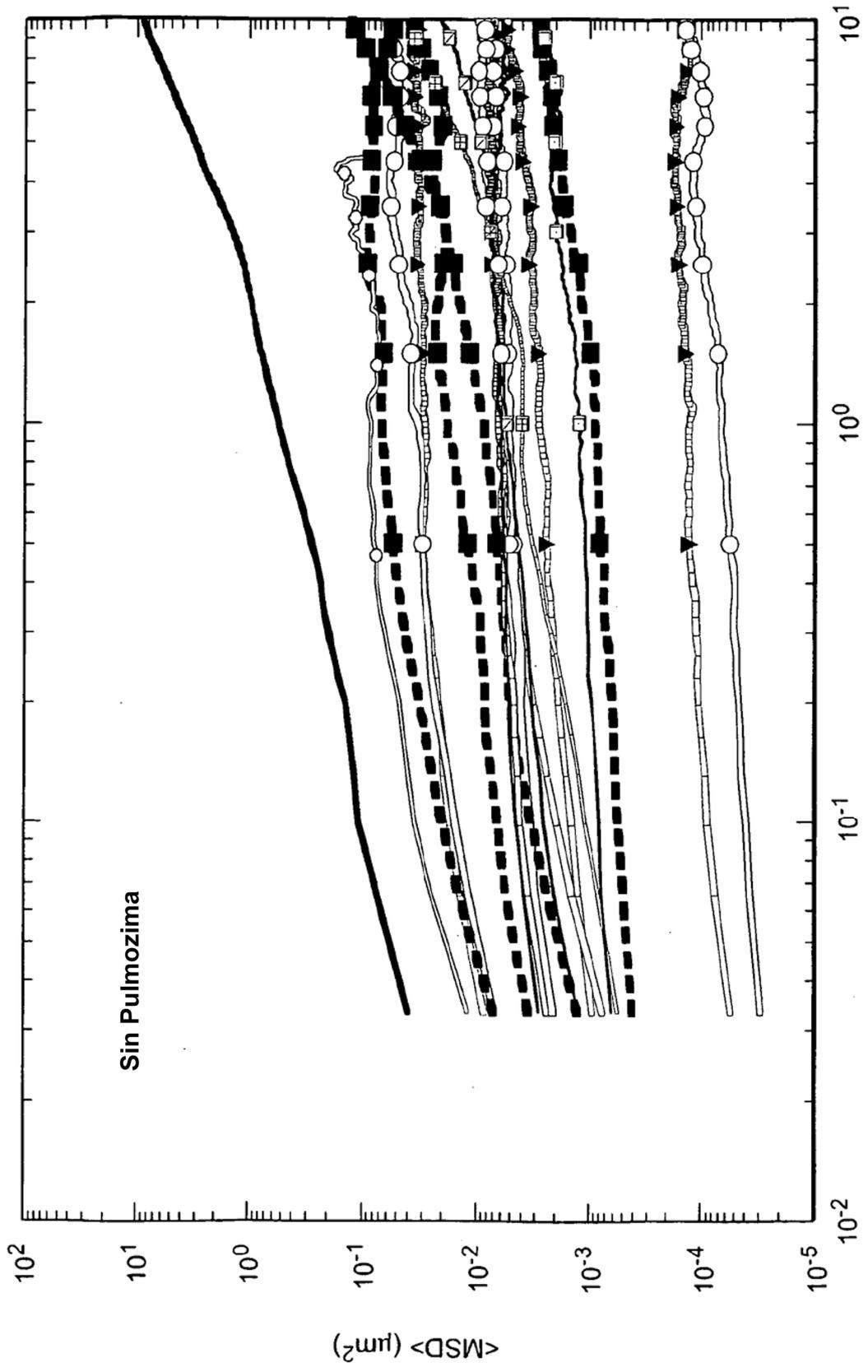


FIG. 4A

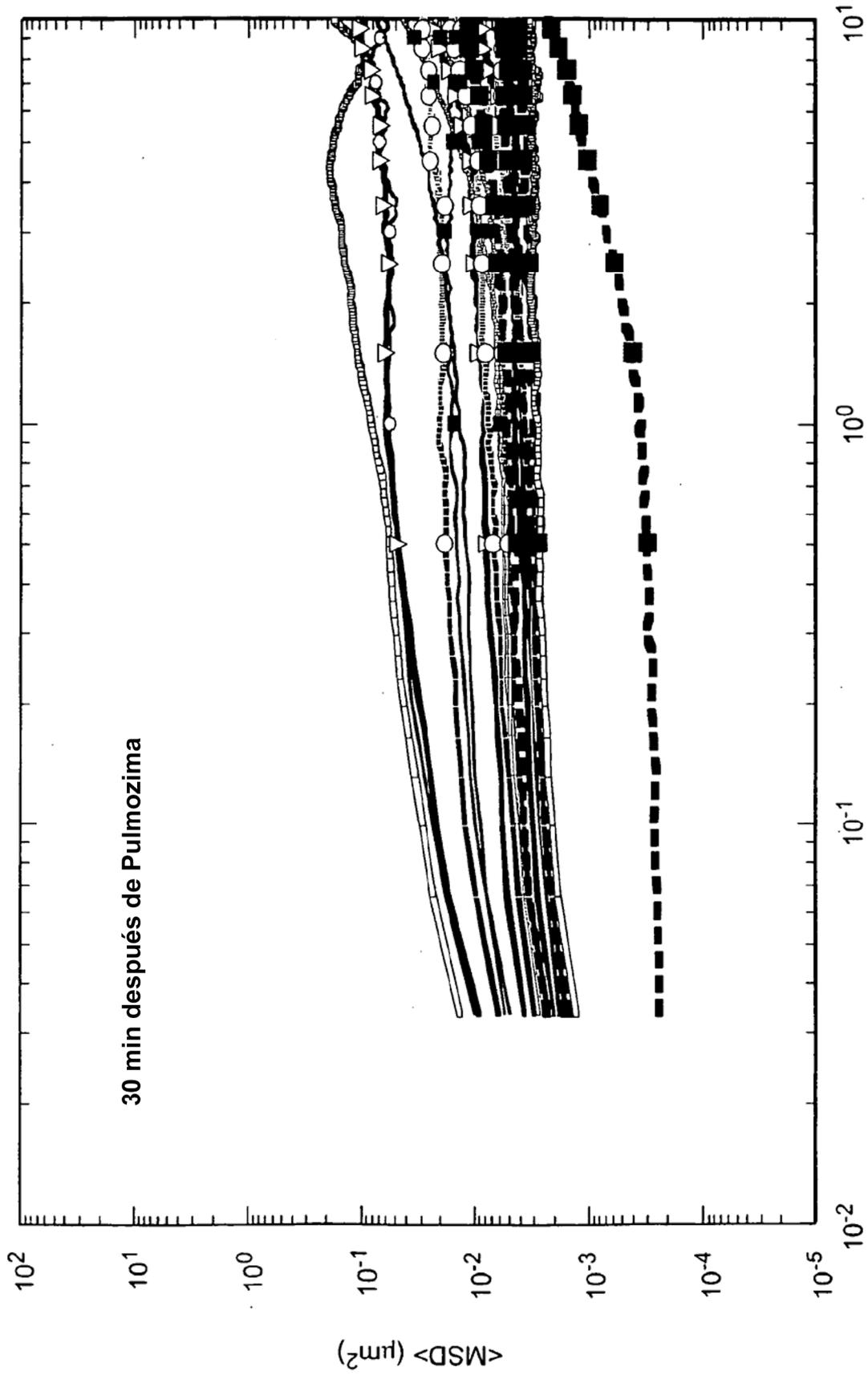
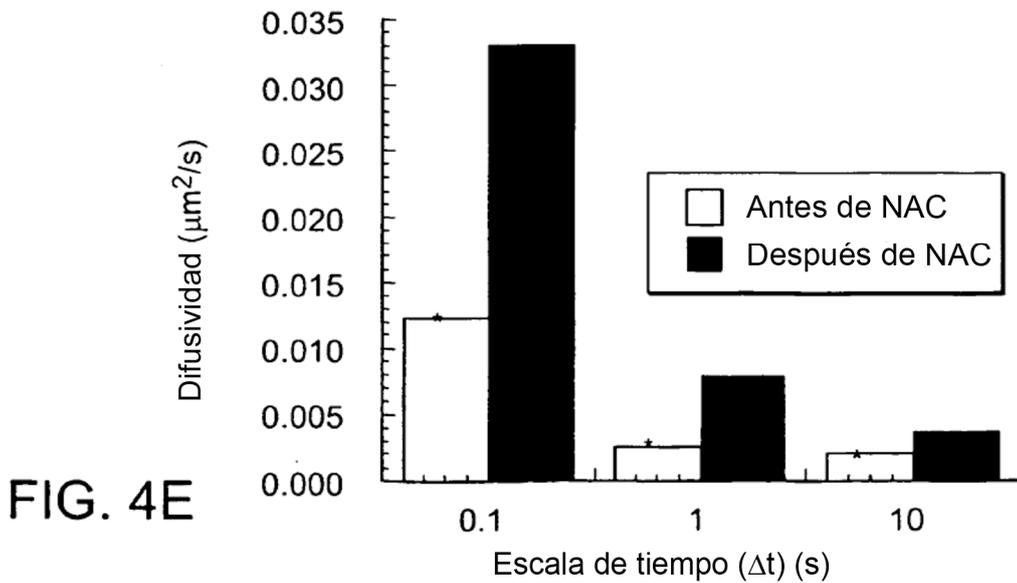
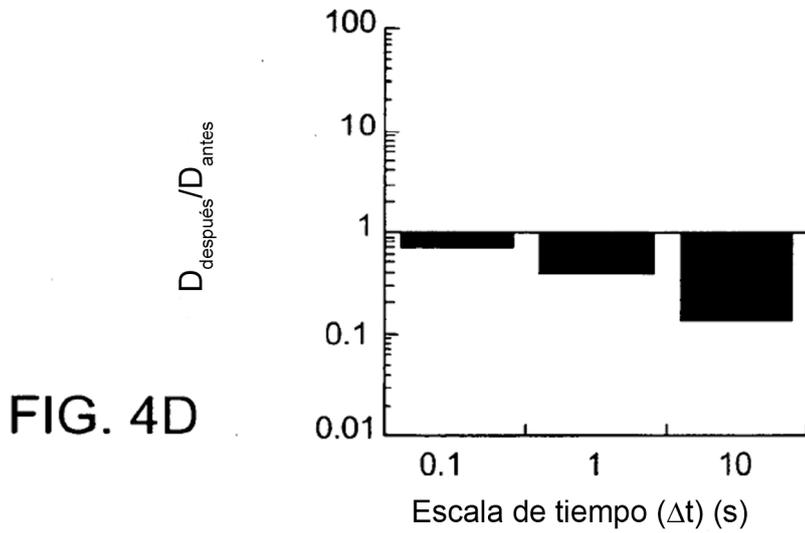
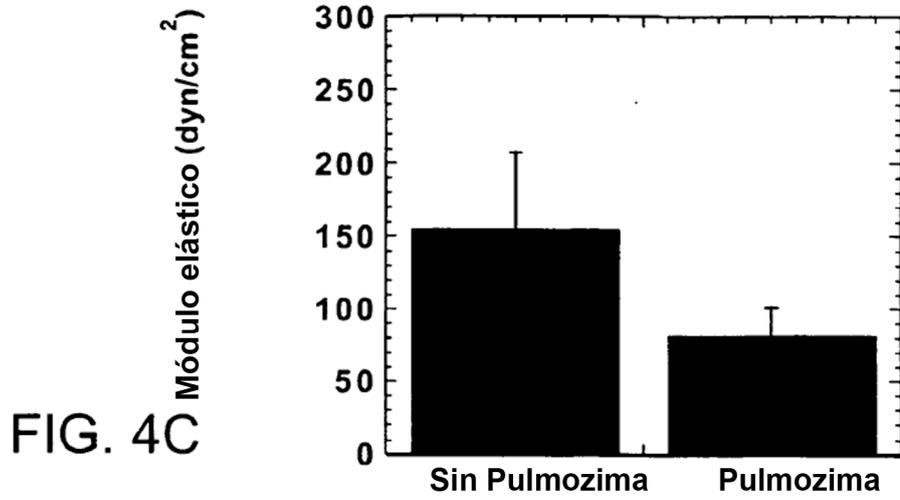


FIG. 4B



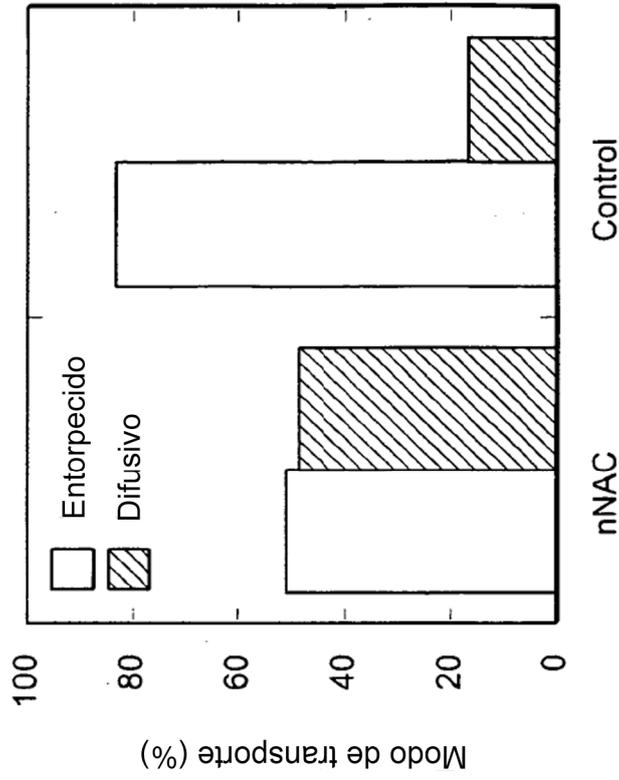


FIG. 5B

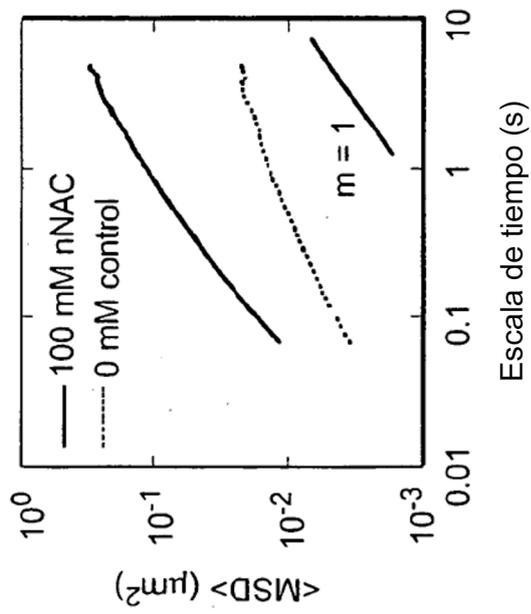


FIG. 5A

FIG. 6A

Inmóvil

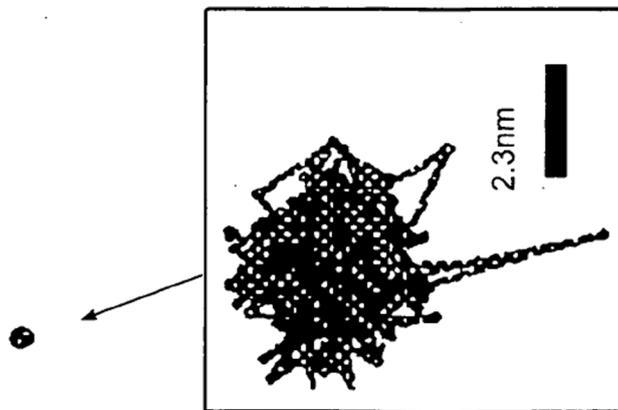


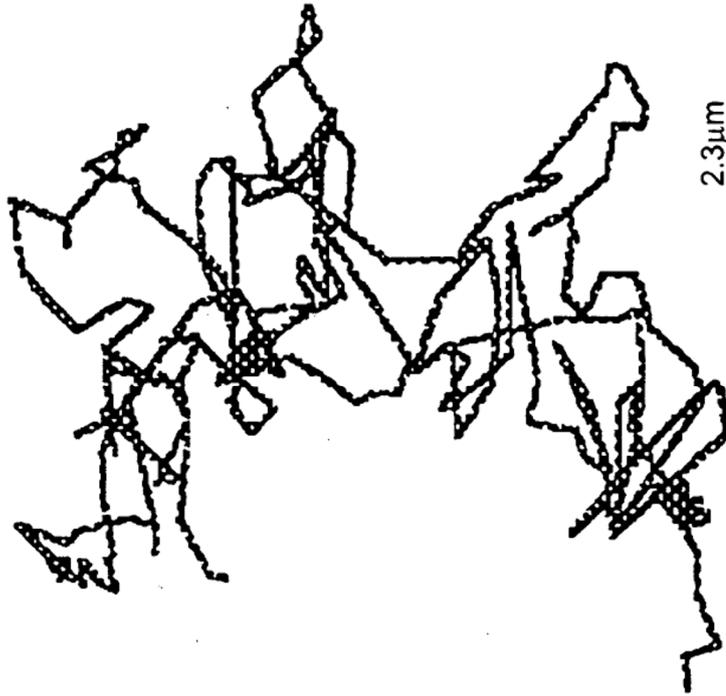
FIG. 6B

Entorpecido



FIG. 6C

Difusivo



Movilidad creciente



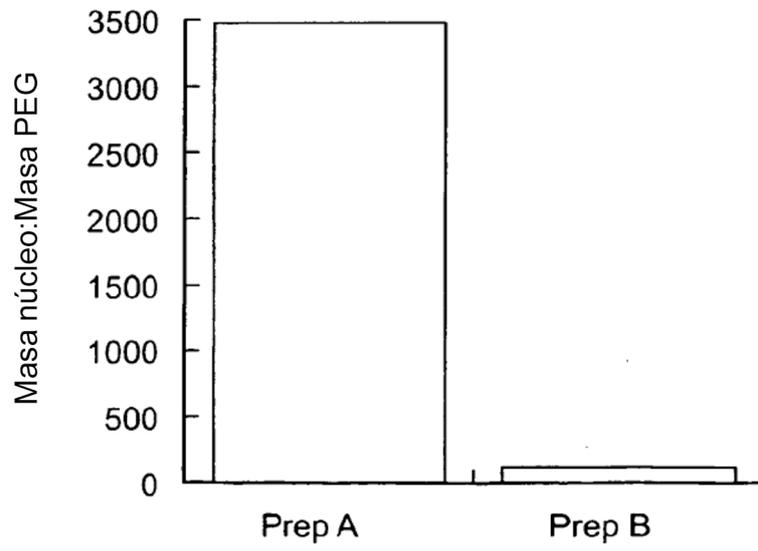
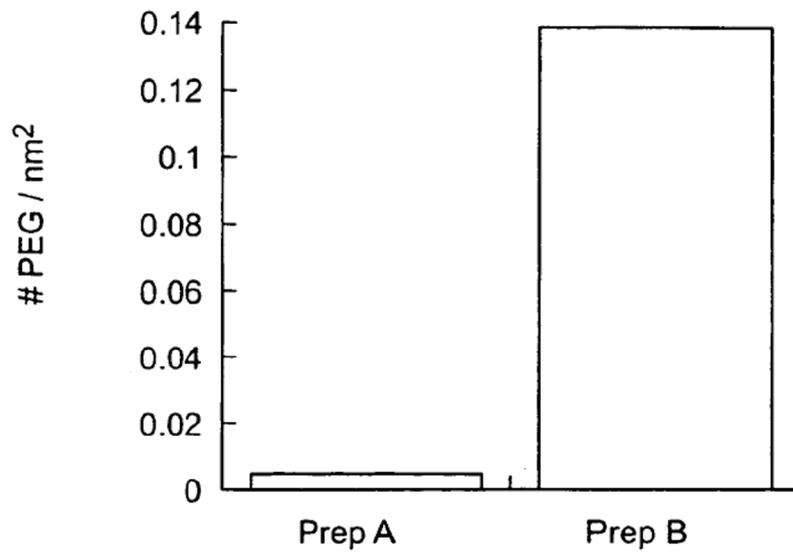


FIG. 7

Tabla 1. Caracterización de nanopartículas modificadas con COOH y PEG y relaciones de coeficientes de difusión de media del ensamble en moco cervical vaginal (D_m) comparado con agua (D_A).

Tamaño (nm) ^a	Química de superficie	Diámetro (nm)	Potencial ζ (mV)	Adsorción de avidina ^b	D_m/D_A ^c
100	COOH	109,2 ± 3,1	-41,0 ± 1,9	97,6%	2,3E-5
100	PEG	122,4 ± 5,2	-4,4 ± 1,1	2,9%	4,6E-4
200	COOH	216,6 ± 4,5	-58,8 ± 4,2	99,1%	1,7E-3
200	PEG	232,3 ± 6,8	-2,1 ± 0,3	2,8%	1,6E-1
500	COOH	515,0 ± 7,2	-61,0 ± 0,5	100,0%	2,2E-4
500	PEG	259,1 ± 8,1	-5,6 ± 0,4	3,1%	2,5E-1

^a Proporcionado por el fabricante^b Adsorción de avidina calculada en base a la intensidad máxima de fluorescencia media,^c Los valores de difusividad efectiva se calculan a una escala de tiempo de 1 s. D_A se calcula de Stokes-Einstein.

FIG. 8