

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 597**

51 Int. Cl.:
C08F 226/06 (2006.01)
C08F 226/10 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08759971 .8**
96 Fecha de presentación: **23.05.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2167554**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2010**

54 Título: **MICROGELES BIOCOMPATIBLES Y SUS APLICACIONES.**

30 Prioridad:
25.05.2007 ES 200701450
25.05.2007 US 940109 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2011

73 Titular/es:
UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO
BARRIO SARRIENA, S/N
48940 LEIOA VIZCAYA, ES

72 Inventor/es:
FORCADA GARCÍA, Jacqueline;
IMAZ MAKAZAGA, Ainara y
RAMOS JULIÁN, José

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 369 597 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

Microgeles biocompatibles y sus aplicaciones

5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con unos microgeles biocompatibles y sus aplicaciones, con un procedimiento para su producción y con composiciones farmacéuticas que comprenden dichos microgeles. Dichos microgeles biocompatibles pueden ser utilizados, entre otras aplicaciones, para transportar y dosificar agentes biológicamente

10 Antecedentes de la invención
 Hay un continuo desarrollo e innovación dentro del campo farmacéutico, en el cual los sistemas de liberación para
 15 gentes biológicamente activos constituyen un campo de investigación muy intensa. Es conocido que la administración de ingredientes activos al cuerpo humano y animal requiere de vehículos de transporte adecuados, en los que el ingrediente activo permanezca químicamente inalterado y farmacológicamente estable durante su tránsito desde el lugar de administración hasta la diana donde va a ejercer su efecto. Asimismo, las características del vehículo deben ser tales que no sólo sea compatible con el recorrido que tenga que realizar, sino también con el lugar de dosificación, es decir, que libere el ingrediente activo en el momento preciso cuando haya llegado a la diana.

20 De entre las posibilidades propuestas para la liberación de ingredientes activos o fármacos, se han desarrollado sistemas nanoparticulados a base de polímeros hidrofílicos como sistema de liberación de fármacos. Se han publicado numerosos trabajos que describen diversos métodos de elaboración de nanopartículas hidrofílicas a base de macromoléculas de origen natural tales como las nanopartículas de albúmina y gelatina.

25 Actualmente, los hidrogeles y los microgeles se están proponiendo como nuevos vehículos para la liberación de ingredientes activos o fármacos debido que ambos pueden encapsular dichos ingredientes activos o fármacos en un ambiente acuoso y bajo condiciones relativamente suaves. Además, se ha constatado que las partículas de microgel son capaces de responder a los estímulos de una forma mucho más rápida que sus homólogos geles macroscópicos, los hidrogeles, debido a su pequeño tamaño. Por otro lado, el tamaño de las partículas que forman el microgel es un parámetro muy importante puesto que gobierna la eficacia del sistema de liberación. Las partículas especialmente útiles en este tipo de aplicación son las partículas coloidales con un diámetro inferior a 1 μm [Couvreur P. y col., *Polymeric Nanoparticles and Microspheres*, Guiot, P.; Couvreur, P., ed., CRC Press, Boca Raton, Fla., 27-93, 1986].

30 La familia de polímeros más empleada en la síntesis de microgeles sensibles a las condiciones del medio es la de las poli(alquilacrilamidas) sensibles a la temperatura, más concretamente la poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM). Sin embargo, la toxicidad de las poli(alquilacrilamidas) impide su empleo en aplicaciones biomédicas. A pesar de esto, son muchos los artículos y patentes publicados durante los últimos años sobre este tipo de microgeles: WO 2006/102762 propone una técnica para injertar grupos ácido borónico en microgeles de PNIPAM con grupos carboxilo, los cuales se utilizan para liberar de forma controlada insulina; Nolan, C.M. y col. *Biomacromolecules* 2006, 7 (11), 2918-2922 también investigan la liberación de insulina a partir de microgeles de PNIPAM empleando ^1H RMN de temperatura variable; Bradley, M. y col. *Langmuir* 2005, 21, 1209-1215 sintetizaron microgeles de NIPAM con ácido acrílico para estudiar la captación y liberación de moléculas de polióxido de etileno (POE) de distintos pesos moleculares a distintos pH; Berndt, I. y col. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 1735-1741 preparan microgeles con una corteza de PNIPAM y un núcleo de poli(N-isopropilmetacrilamida) (PNIPMAM) encontrando que a una temperatura comprendida entre 34°C y 44°C la corteza se colapsa, aunque el núcleo sigue hinchado.

35 Dentro de los monómeros biocompatibles y sensibles a la temperatura se encuentra la N-vinilcaprolactama (VCL) [Vihola, H. y col. *Biomaterials* 2005, 26, 3055-3064]. Debido a su biocompatibilidad, en los últimos años se está investigando su utilización para fines terapéuticos. A la hora de sintetizar el correspondiente polímero, se han utilizado diferentes técnicas de polimerización, tales como la polimerización en masa (Lau, A. C. W.; Wu, C. *Macromolecules* 1999, 32, 581-584); en suspensión (US 2003/008993), o en emulsión (Peng, S.; Wu, C. *Macromolecules* 2001, 34, 568-571). Además, se han realizado copolimerizaciones con N-vinilimidazol (Lozinsky, I. A. y col. *Macromolecules* 2003, 36, 7308-7323), acrilato de sodio (Peng, S. y col. *Macromol. Symp.* 2000, 159, 179-186), glicidil metacrilato (Qiu, X. y col. *J. Polym. Sci. Part A, Polym. Chem.* 2006, 44, 183-191), estireno (Pich, A. y col. *Colloid Polym. Sci.* 2003, 281, 916-920), vinilpirrolidona (Boyko, V. y col. *Macromolecules* 2005, 38 (12), 5266-5270), y con ácido metacrílico (Okhapkin, I. M. y col. *Macromolecules* 2003, 36 (21), 8130-8138). También, se ha copolimerizado con moléculas de poli(óxido de etileno) y sus derivados, ya que es un componente que aumenta la biocompatibilidad de los polímeros (Laukkanen, A. y col. *Macromolecules* 2000, 33, 8703-8708; Yanul, N. A. y col. *Macromol. Chem. Phys.* 2001, 202, 1700-1709; Verbrugghe, S. y col. *Macromol. Chem. Phys.* 2003, 204, 1217-1225). El hecho de haber profundizado en el estudio de las propiedades de los microgeles basados en este monómero (Laukkanen, A. y col. *Macromolecules* 2004, 37, 2268-2274. Meeussen, F. y col. *Polymer* 2000, 41, 8597-8602. Shtanko, N. I. y col. *Polym. Int.* 2003, 52, 1605-1610) ha hecho posible la encapsulación de diferentes

compuestos dentro de las partículas del microgel. Por ejemplo, se han introducido nanopartículas de oro (Pich, A. y col. *e-Polymer* 2006, 18, 1-16) y enzimas (Pich, A. y col. *Macromolecules* 2006, 39, 7701-7707). También ha sido posible la encapsulación de varias moléculas de fármaco modelo tales como nadolol, propranolol y colinestearasa (Vihola, H. y col. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002, 16, 69-74).

De entre todas las familias de microgeles biocompatibles que pueden encontrarse en bibliografía destacan todos aquellos basados en polisacáridos por ser, la mayoría de ellos, biodegradables. WO 2003/082316 describe la síntesis de microgeles basados en dextrano empleando un reticulante que contiene un enlace covalente que se rompe fácilmente en medio ácido. De esta forma el material se degrada por hidrólisis, liberando de forma controlada principios activos. También se han sintetizado otras familias de microgeles basados en cadenas de polisacáridos modificados con grupos polimerizables por radicales libres (WO 2006/071110 A1; Franssen, O. y col. *Int. J. Pharm.* 1998, 168, 1-7; Van Tomme, S.R. y col. *Biomaterials* 2005, 2129-2135; Chen, F. y col. *Int. J. Pharm.* 2006, 307, 23-32). Sin embargo, ninguno de ellos manifiesta sensibilidad con la temperatura.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la variación del diámetro hidrodinámico promedio (D_p) de las partículas de microgel poly(VCL-co-BA) de la invención obtenido en la reacción I 0.5CL4 (Tabla 1, Ejemplo 1), como una función de la temperatura del medio.

La Figura 2 muestra la variación del diámetro hidrodinámico promedio (D_p) de las partículas de microgel poly(VCL-co-BA-co-3-MDG) de la invención obtenido en la reacción B (Tabla 2, Ejemplo 1), como función de la temperatura del medio.

La Figura 3 muestra la variación del diámetro hidrodinámico promedio (D_p) de las partículas de microgel poly(VCL-co-PEGDA) de la invención obtenido en la reacción PE8 (Tabla 3, Ejemplo 2), como función de la temperatura del medio.

La Figura 4 muestra la variación de la relación de hinchazón $D_{pT}/D_{p55^\circ C}$ (D_{pT} es el diámetro hidrodinámico medido a cada temperatura y $D_{p55^\circ C}$ es el diámetro dinámico deshinchado medido a $55^\circ C$) de las partículas de geles de poli(VCL-co-3-MDG-co-PEGDA) de la invención obtenidos en las reacciones MPE4 y MPE6 (Tabla 4, Ejemplo 3), como una función de la temperatura del medio.

La Figura 5 muestra la curva de variación del diámetro hidrodinámico promedio (D_p) de las partículas de microgel de poli(VCL-co-3-MDG-co-PEGDA-co-AA) de la invención obtenido en la reacción AA6 (Tabla 5, Ejemplo 4), como una función de la temperatura del medio.

La Figura 6 muestra la curva de variación del diámetro hidrodinámico promedio (D_p) de las partículas de microgel de de poli(VCL-co-3-MDG-co-PEGDA-co-AA) de la invención obtenido en la reacción AA6 (Tabla 5, Ejemplo 4), como una función del pH del medio y a $25^\circ C$.

La Figura 7 muestra la absorción a pH 3 de una molécula modelo (calceína) dentro de microgeles biocompatibles de la invención obtenidos en la reacción I1CL4B1 (Tabla 1, Ejemplo 1), pertenecientes a la familia poly(VCL-co-BA) sintetizado a $70^\circ C$.

La figura 8 muestra la absorción a pH 3 de una molécula modelo (calceína) dentro de microgeles obtenidos en la reacción C (Tabla 2, Ejemplo 1), pertenecientes a la familia (poli(VCL-co-BA-co-3-MDG) sintetizados a $70^\circ C$.

La figura 9 muestra la absorción de una molécula modelo (calceína) dentro de microgeles biocompatibles obtenidos en la reacción PE6 (Tabla 3, Ejemplo 2), pertenecientes a la familia (poli(VCL-co-PEGDA) sintetizados a $70^\circ C$.

La Figura 10 muestra la absorción a pH 3 de una molécula modelo (calceína) dentro de microgeles biocompatibles obtenidos en la reacción MPE4 (Tabla 4, Ejemplo 3), pertenecientes a la familia poli(VCL-co-3-MDG-co-PEGDA) sintetizados a $70^\circ C$.

La Figura 11 muestra la absorción a pH 3 de una molécula modelo (calceína) dentro de microgeles biocompatibles obtenidos en la reacción AA6 (Tabla 5, Ejemplo 4), pertenecientes a la familia poli(VCL-co-3-MDG-co-PEGDA-co-AA) sintetizados a $70^\circ C$.

La Figura 12 muestra la viabilidad celular en cultivos *in vitro* de neuronas corticales de ratas embrionarias de nueve días (9-DIV) tras incubación durante 24 horas con un microgel biocompatible de la invención, específicamente con el microgel identificado como I1CL4B1 [microgel obtenido en el Ejemplo 1 (Tabla 1) perteneciente a la familia poli(VCL-co-BA)]. La dilución 1:100 (primera columna) muestra la más baja viabilidad en estas condiciones; sin embargo a diluciones 1:300 y 1:1000 (segunda y tercera columnas) la viabilidad de las células es del 100%.

La Figura 13 muestra la viabilidad celular en cultivos *in vitro* de neuronas corticales de ratas embrionarias de nueve días (9-DIV) tras incubación durante 72 horas con un microgel biocompatible de la invención, específicamente con el microgel identificado como I1CL4B1 [microgel obtenido en el Ejemplo 1 (Tabla 1) perteneciente a la familia poli(VCL-co-BA)]. La dilución 1:100 (primera columna) muestra la más baja viabilidad en estas condiciones; sin embargo a diluciones 1:300 y 1:1000 (segunda y tercera columnas a) la viabilidad de las células aunque no llega al 100%, es considerablemente más alta.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con un microgel biocompatible, en adelante microgel biocompatible de la invención, que comprende una red polimérica, comprendiendo dicha red polimérica unas unidades poliméricas interconectadas entre sí a través de un agente de entrecruzamiento, en el que dicha red polimérica puede ser

obtenida por polimerización en medio disperso de un monómero vinílico biocompatible y un agente de entrecruzamiento. En una realización particular, dicha red polimérica del microgel biocompatible de la invención comprende, además, un comonómero basado en un carbohidrato. En otra realización particular, dicha red polimérica del microgel de la invención comprende, además, un comonómero basado en un carbohidrato y un comonómero (met)acrílico.

El término "microgel", tal como aquí se utiliza, se refiere a una partícula tridimensional de 10 nm a 1.000 nm (1 μm) de diámetro que se hincha en agua y que está formada a partir de un polímero entrecruzado (e.g., unidades poliméricas interconectadas entre sí mediante un agente de entrecruzamiento).

Del mismo modo, tal como aquí se utiliza, el término "biocompatible", aplicado al material, se refiere a material no tóxico y biológicamente inactivo que durante su uso no libera ninguna sustancia en concentraciones nocivas y no causa reacciones adversas en los seres vivos.

Dicho microgel biocompatible de la invención, si se desea, puede contener, además, al menos, un agente biológicamente activo, dando lugar a un microgel biocompatible cargado con un agente biológicamente activo que puede ser utilizado para transportar, suministrar y/o dosificar agentes biológicamente activos al sitio de interés. Los microgeles biocompatibles, cargados o no con agentes biológicamente activos, proporcionados por esta invención, son sensibles a los cambios de temperatura y pH del medio en el que se encuentran dispersos, y pueden hincharse y deshincharse (es decir, cambiar de tamaño), respondiendo de este modo a estímulos de temperatura y pH.

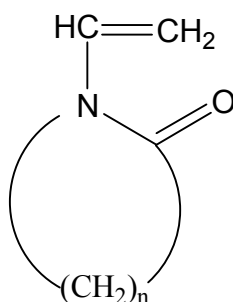
Nanopartículas de microgel biocompatible cargado o no con un agente biológicamente activo proporcionadas por esta invención pueden ser liofilizadas y, posteriormente, resuspendidas en medio acuoso conservando inalteradas sus propiedades y sensibilidades. Por tanto, los microgeles proporcionados por esta invención son materiales biocompatibles, útiles como portadores de agentes biológicamente activos, capaces de absorber (encapsular/captar) tanto agentes biológicamente activos hidrófobos como hidrófilos, y dosificarlos apropiadamente ya que responden a estímulos de temperatura y pH del medio en el que están dispersos.

Los microgeles biocompatibles y sensibles a la temperatura y pH de la presente invención presentan numerosas ventajas con respecto a otros materiales inteligentes que no pueden ser utilizados en la dosificación de fármacos porque no cumplen la condición de biocompatibilidad. En estos nuevos microgeles la fuerza impulsora que controla la absorción y posterior dosificación del agente biológicamente activo tiene un cierto carácter covalente, lo que supone una ventaja adicional tanto en el transporte del agente biológicamente activo como en su dosificación en el lugar elegido.

Monómero vinílico

De acuerdo con la presente invención, el componente "monómero vinílico biocompatible", que constituye el monómero principal, es una lactama (amida cíclica) que comprende un grupo vinilo ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) unido al nitrógeno de la lactama. Es, por tanto, un monómero anfifílico debido a que contiene grupos hidrófilos (amida) e hidrófobos (grupo vinilo y grupos alquilo del anillo de la lactama).

En una realización particular, dicho monómero vinílico es una N-vinil-lactama de 4-7 miembros en el anillo de la lactama, de fórmula general



donde n es un número entero comprendido entre 2 y 5.

En una realización particular, dicho monómero vinílico biocompatible se selecciona entre N-vinilcaprolactama (VCL), N-vinilpirrolidona y sus mezclas, preferentemente, VCL.

La VCL es parcialmente soluble en agua, siendo su solubilidad en agua aproximadamente de 88 g/L a 55°C. La solubilidad en agua del correspondiente homopolímero, poli(N-vinilcaprolactama) (PVCL), varía con la temperatura. La presencia de los grupos hidrófobos e hidrófilos hace que coexistan fuerzas repulsivas y atractivas. El balance de estas fuerzas determina la solubilidad del polímero. Ciertos polímeros son solubles en agua a baja temperatura,

separándose de la disolución y formando fase aparte al aumentar la temperatura por encima de un valor conocido como “temperatura inferior crítica de disolución” (en inglés, LCST). En función de los monómeros empleados en la reacción de polimerización, los microgeles biocompatibles de la invención estarán constituidos por polímeros con distintos valores de LCST. El cambio de volumen experimentado por dichos microgeles biocompatibles de la invención sensibles a la temperatura puede ser mayor o menor según se copolimerice con monómeros más o menos hidrofílicos. En resumen, ciertos polímeros con una composición y densidad de entrecruzamiento apropiadas pueden hincharse enormemente en agua a temperatura ambiente y colapsar a la LCST. Esta transición de fase es reversible.

La poli(N-vinilcaprolactama) (PVCL) es un polímero cuyo comportamiento en disolución es sensible a la temperatura. En fase acuosa, sus cambios de fase ocurren en un intervalo de temperatura comprendido entre 30°C y 40°C, es decir, cercano a la temperatura fisiológica. Además, cuenta con una característica adicional, su biocompatibilidad, que lo hace susceptible de ser utilizado en aplicaciones biomédicas. Durante el desarrollo de esta invención se ha observado que la síntesis de dicho polímero no se lleve a cabo a un pH ácido con el fin de evitar la hidrólisis de la VCL.

La concentración de monómero vinílico respecto al total de la formulación (receta) que comprende los componentes necesarios para la obtención de las unidades poliméricas interconectadas entre sí a través de un agente de entrecruzamiento que constituyen la red polimérica del microgel biocompatible de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; en concreto, entre la concentración de monómero vinílico que al polimerizar no forme un gel macroscópico (concentración máxima) y la concentración de monómero vinílico que al polimerizar permita obtener el diámetro final deseado del microgel biocompatible de la invención (concentración mínima). En una realización particular, la concentración de monómero vinílico está comprendida entre el 1-3% en peso respecto al total de la receta.

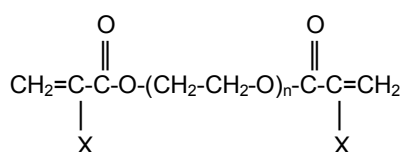
Agente de entrecruzamiento

De acuerdo con la presente invención, el componente “agente de entrecruzamiento” es un monómero difuncional que comprende al menos dos grupos vinilo.

En una realización específica, dicho agente de entrecruzamiento que comprende al menos dos grupos vinilo es un dextrano con dos o más grupos vinilo.

En otra realización específica, dicho agente de entrecruzamiento que comprende al menos dos grupos vinilo es N,N'-metilenbisacrilamida (BA).

En otra realización específica, dicho agente de entrecruzamiento es un monómero difuncional que comprende al menos una unidad etilenglicol en adición a los al menos dos grupos vinilo. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicho agente de entrecruzamiento incluyen un monómero difuncional de fórmula general



donde
X es un hidrógeno o metilo, y
n es un número entero comprendido entre 1 y 90.

En una realización específica, cuando “n” es 1 y “X” es hidrógeno, el agente de entrecruzamiento es diacrilato de etilenglicol (EGDA) y cuando “n” es mayor que 1 y “X” es hidrógeno, el agente de entrecruzamiento es poli(diacrilato de etilenglicol) (PEGDA).

En otra realización específica, cuando “n” es 1 y “X” es metilo, el agente de entrecruzamiento es el dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) y cuando “n” es mayor que 1 y “X” es metilo, el agente de entrecruzamiento es poli(dimetacrilato de etilenglicol) (PEGDMA).

Por tanto, en una realización particular, el agente de entrecruzamiento es un monómero difuncional seleccionado del grupo que consiste de un dextrano con dos o más grupos vinilo, BA, EGDA, PEGDA, EGDMA, PEGDMA y sus mezclas.

Algunos de dichos agentes de entrecruzamiento tienen la característica de que, además de los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo, los átomos de oxígeno presentes en las unidades de etilenglicol pueden formar uniones hidrógeno con grupos carboxilo.

- 5 La concentración de agente de entrecruzamiento, con respecto al monómero vinilo biocompatible, presente en la formulación (receta) que comprende los componentes necesarios para obtener las unidades monoméricas interconectadas entre sí a través de dicho agente de entrecruzamiento formando la red polimérica del microgel biocompatible de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo, dependiendo del diámetro deseado del microgel biocompatible de la invención (a temperaturas más altas o más bajas que el LCST); no obstante, en una realización particular, la concentración de agente de entrecruzamiento presente en dicha receta está comprendida entre 2 y 10% en peso con respecto al monómero de vinilo biocompatible.

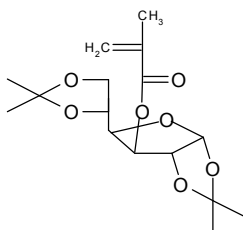
Comonómero basado en un carbohidrato

- 15 Como se ha mencionado previamente, en una realización particular, la red polimérica del microgel biocompatible de la invención comprende, además del monómero de vinilo biocompatible y del agente de entrecruzamiento, un comonómero basado en un carbohidrato como componente opcional.

- 20 De acuerdo con la presente invención, el componente "comonómero basado en un carbohidrato" se refiere a un compuesto que comprende un grupo acrílico o metacrílico [genéricamente ocasionalmente mostrado en esta descripción como (met)acrílico] y un grupo derivado de un glucósido. En una realización particular, dicho grupo derivado de un glucósido comprende, un glucofurano y dos grupos isopropilideno. En general, este componente aumenta la biocompatibilidad del monómero principal (monómero vinílico biocompatible) y colabora en el control del balance hidrófobo/hidrófilo del microgel biocompatible de la invención.

- 25 En una realización particular y preferida, dicho comonómero basado en un carbohidrato se selecciona del grupo formado por 3-O-metacrililoil-1,2:5,6-di-O-isopropilideno-D-glucofuranosa (3-MDG), 1,2-dideoxi-4,5:6,7-di-O-isopropilideno-β-D-arabino-oct-1-en-3,4-diulo-4,8-piranososa, 7,8-dideoxi-1,2:3,4-di-O-isopropilideno-α-D-galacto-oct-7-en-1,5-piranos-6-ulososa, y sus mezclas.

- 30 El compuesto 3-MDG, de fórmula



- 35 es biocompatible, al tratarse de un comonómero basado en un carbohidrato, y, además, debido a que es un comonómero más hidrófobo que la VCL, permite sintetizar microgeles biocompatibles de la invención con temperaturas de transición de fase diferentes.

- 45 Los grupos isopropilideno de dicho comonómero basado en un carbohidrato se pueden descomponer para dar grupos glucósido, conteniendo cada uno de dichos grupos glucósidos cinco grupos hidroxilo en su estructura.

- 50 La concentración de comonómero basado en un carbohidrato, con respecto a la cantidad en peso del monómero vinílico biocompatible, presente en la formulación (receta) que comprende los componentes necesarios para la obtención de las unidades poliméricas interconectadas entre sí a través de un agente de entrecruzamiento que constituye la red polimérica del microgel biocompatible de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la concentración de comonómero basado en un carbohidrato está comprendida entre 5% y 40% en peso respecto al monómero vinílico biocompatible.

Comonómero (met)acrílico

- 55 Como se ha mencionado previamente, en una realización particular, la red polimérica del microgel biocompatible de la invención comprende, además del monómero vinílico biocompatible y del agente de entrecruzamiento, un comonómero basado en un carbohidrato y un comonómero (met)acrílico como componentes opcionales. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicho comonómero (met)acrílico incluyen el ácido acrílico, el ácido metacrílico y sus derivados sensibles al pH, tales como N,N'-dietilaminoetilmetacrilato, hidrocloreuro de aminoetil metacrilato, etc. Un derivado (met)acrílico es sensible al pH si el derivado (met)acrílico intercambia protones cuando el pH varía.

Este componente es sensible a los cambios de pH del medio y, por ello, confiere sensibilidad al pH; es decir, cuando el pH del medio está por debajo del pKa del grupo ionizable, dicho grupo se encuentra protonado, mientras que cuando el pH sobrepasa el pKa de dicho grupo éste se desprotona, aportando una carga al microgel biocompatible de la invención.

La concentración de comonomero (met)acrílico, respecto al monómero principal, cuando está presente en la formulación (receta) que comprende los componentes necesarios para la obtención de las unidades poliméricas interconectadas entre sí a través de dicho agente de entrecruzamiento que constituyen la red polimérica del microgel biocompatible de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la concentración de comonomero (met)acrílico presente en dicha receta está comprendida entre 1% y 10% en peso respecto al monómero vinílico biocompatible.

Obtención del microgel biocompatible de la invención

El microgel biocompatible de la invención se obtiene como resultado del entrecruzamiento de unidades poliméricas interconectadas entre sí a través del agente de entrecruzamiento, generando una red polimérica. Dicha red polimérica puede ser obtenida mediante un procedimiento de polimerización en medio disperso de los monómeros (monómero vinílico biocompatible) y opcionalmente, los comonomeros deseados (por ejemplo, un comonomero basado en un carbohidrato, y, opcionalmente, un comonomero (met)acrílico) en presencia de dicho agente de entrecruzamiento. La polimerización de un monómero, así como la copolimerización de dos o más monómeros diferentes, en un medio disperso (heterogéneo) es conocida por los técnicos en la materia. En una realización particular, dicho procedimiento de polimerización se lleva a cabo en emulsión, es decir, mediante un procedimiento de polimerización en medio disperso vía radicales libres. Para llevar a cabo dicho procedimiento se requiere la participación de emulsificantes (tensioactivos) e iniciadores, así como tampones (disoluciones reguladoras) apropiados.

En una realización particular, el procedimiento de polimerización en emulsión de dichos monómeros y opcionalmente comonomeros comprende el empleo de un emulsificante, tal como un emulsificante aniónico, y un iniciador, apropiados, en un tampón adecuado. En general, en este tipo de procedimiento de polimerización, el agua (por ejemplo, agua destilada) se utiliza como medio continuo de reacción

El emulsificante aniónico confiere estabilidad coloidal a los microgeles biocompatibles de la invención. Aunque prácticamente cualquier emulsificante aniónico apropiado podría ser utilizado, en una realización particular, dicho emulsificante aniónico es el dodecilsulfato sódico (SDS). La concentración de emulsificante aniónico que puede ser utilizada en la puesta en práctica de dicho procedimiento puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la concentración de emulsificante aniónico está comprendida entre 2% y 4 % en peso respecto al monómero vinílico biocompatible, siempre por debajo de la concentración crítica micelar (CMC) del emulsificante [por ejemplo, 8,3 mM, 25°C, en el caso de SDS (Gao, Y.; Au-Yeung, S.C.F.: Wu, C. *Macromolecules* 1999, 32, 3674-3677)], para evitar que se formen micelas.

El iniciador se descompone térmicamente para proporcionar radicales libres capaces de reaccionar con el monómero vinílico biocompatible. Aunque prácticamente cualquier iniciador capaz de descomponerse y generar radicales libres apropiado podría ser utilizado, en una realización particular, dicho iniciador es un peróxido, tal como el persulfato potásico (KPS) [K₂S₂O₈]. La concentración de iniciador que puede ser utilizada en la puesta en práctica de dicho procedimiento puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la concentración de iniciador está comprendida entre 0,5% y 1,5% en peso respecto al monómero vinílico biocompatible.

Como tampón a utilizar en la reacción de polimerización puede emplearse prácticamente cualquier tampón que mantenga el pH del medio entre 6-7. En una realización particular, el tampón empleado en la reacción de polimerización ha sido el bicarbonato sódico que impide la hidrólisis del monómero vinílico biocompatible y que disminuye el pH a 3 en las reacciones de polimerización iniciadas con persulfato potásico. El tampón estará presente en el medio de la reacción de polimerización en la concentración adecuada para mantener el pH deseado.

La reacción de polimerización puede llevarse a cabo a una temperatura comprendida dentro de un amplio intervalo; no obstante, a la hora de elegir la temperatura de reacción es muy importante tener en cuenta la temperatura inferior crítica de disolución (LCST) de las unidades poliméricas que constituyen la red polimérica del microgel biocompatible de la invención. En una realización particular, la reacción de polimerización se lleva a cabo a una temperatura superior a las LCST de las distintas unidades poliméricas que forman parte de los microgeles biocompatibles de la invención. En una realización concreta, la reacción de polimerización se lleva a cabo a una temperatura igual o superior a 60°C.

Asimismo, la velocidad de agitación de la formulación (receta) que contiene los componentes necesarios para generar el microgel biocompatible de la invención mediante polimerización en un medio disperso tal como se ha mencionado previamente puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, la velocidad de agitación debe ser

lo suficientemente alta como para conseguir una mezcla homogénea de la dispersión (mezcla de reacción) a la hora de sintetizar los microgeles biocompatibles de la invención. En una realización particular, la velocidad de agitación es igual o superior a 200 rpm; en otra realización particular, la velocidad de agitación está comprendida entre 200 y 400 rpm.

5 La reacción de polimerización puede llevarse a cabo en un reactor en modo discontinuo o en modo semicontinuo.

10 Las características técnicas de los microgeles biocompatibles de la invención dependerán, entre otros factores, de la naturaleza y concentración utilizadas de monómero vinílico biocompatible, agente de entrecruzamiento, comonómero basado en carbohidrato (cuando sea apropiado), comonómero (met)acrílico (cuando sea apropiado), emulsificante, iniciador, y temperatura de reacción. Sin embargo, a modo ilustrativo, no limitativo, se pueden indicar los valores de algunas características técnicas de dichos microgeles biocompatibles de la invención, en forma de intervalo:

- 15 - Diámetro de partícula deshinchado (55°C): 60 – 180 nm [diámetro hidrodinámico promedio de partícula (Dp) medido por espectroscopía de correlación fotónica (PCS)].
- Diámetro de partícula hinchado (15°C): 200 – 400 nm
- Temperatura inferior crítica de disolución (LCST): 25–39°C
- Carga superficial negativa: 2,9 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ [determinada mediante valoración conductimétrica (Ramos, J.; Forcada, J. Journal Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry 2003, 41 (15), 2322-2334)].

20 Los microgeles de la invención son nanopartículas, que si se desea, pueden ser liofilizadas y, una vez liofilizadas, si se resuspenden en medio acuoso, mantienen sus propiedades y capacidad de hinchamiento/deshinchamiento o respuesta a cambios de temperatura y pH.

25 Para analizar la sensibilidad de nanopartículas a base de microgeles biocompatibles de la invención a los cambios de temperatura, se han medido los tamaños de las nanopartículas finales (Dp) a diferentes temperaturas (desde 10°C hasta 55°C, con un intervalo de 2,5°C), calculándose la LCST de las unidades poliméricas que las constituyen a partir de la representación gráfica Dp vs T, T a la cual se observa el punto de inflexión de la curva.

30 Para analizar la sensibilidad de las nanopartículas basadas en los microgeles biocompatibles de la invención a los cambios de pH, se midieron los tamaños de las nanopartículas finales (Dp) a diferentes pHs (de 2 a 10) y a 25°C.

35 Para que los microgeles biocompatibles de la invención respondan volumétricamente a los cambios de temperatura y pH tienen que ser sometidos a cambios de temperatura del medio en el que están dispersos que varían desde temperaturas por debajo de la LCST hasta temperaturas superiores a la LCST. En cuanto a los cambios de pH, el pH del medio de dispersión tiene que variar desde pHs inferiores al pK_a hasta valores superiores al pK_a .

Microgeles biocompatibles cargados con un agente biológicamente activo

40 Como se ha mencionado previamente, los microgeles biocompatibles de la invención son capaces de captar o encapsular agentes biológicamente activos. Por tanto, en una realización particular, el microgel biocompatible de la invención comprende un agente biológicamente activo. Dicho agente biológicamente activo usualmente puede estar en el interior del microgel biocompatible de la invención o de la nanopartícula de microgel biocompatible de la invención; no obstante, en ocasiones, el agente biológicamente activo puede estar, además, unido o adsorbido a la superficie externa de dicho microgel o nanopartícula.

45 Los microgeles biocompatibles cargados con agentes biológicamente activos proporcionados por esta invención, en forma de nanopartículas, son sensibles a los cambios de temperatura y pH del medio en el que se encuentran dispersos, y pueden hincharse y deshincharse (es decir, cambiar de tamaño), respondiendo de este modo a estímulos de temperatura y pH. Nanopartículas de microgel biocompatible cargado o no con un agente biológicamente activo proporcionadas por esta invención pueden ser liofilizadas y, posteriormente, resuspendidas en medio acuoso conservando inalteradas sus propiedades y sensibilidades.

50 Los microgeles biocompatibles sensibles a la temperatura y, opcionalmente sensibles al pH de la presente invención presentan numerosas ventajas con respecto a otros materiales inteligentes que no pueden ser utilizados en la dosificación de fármacos porque no cumplen la condición de biocompatibilidad. En estos nuevos microgeles la fuerza impulsora que controla la absorción y posterior dosificación del agente biológicamente activo tiene un cierto carácter covalente, lo que supone una ventaja adicional tanto en el transporte del agente biológicamente activo como en su dosificación en el lugar elegido.

60 El término “agente biológicamente activo”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier sustancia que se administra a un sujeto, preferentemente un ser humano, con fines profilácticos o terapéuticos; es decir, cualquier sustancia que puede ser utilizada en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad o para mejorar el bienestar físico y mental de humanos y animales, por ejemplo, fármacos, antígenos, etc.

El microgel biocompatible de la invención puede incorporar uno o más agentes biológicamente activos independientemente de las características de solubilidad de los mismos.

5 La naturaleza química del agente biológicamente activo puede variar dentro de un amplio intervalo, desde moléculas pequeñas hasta compuestos macromoleculares (péptidos, polinucleótidos, etc.). En una realización particular, dicho agente biológicamente activo es un péptido o una proteína. En otra realización particular, dicho agente biológicamente activo es un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polinucleótido o un ácido nucleico (e.g., ARN o ADN). En otra realización particular, dicho agente biológicamente activo es una molécula (orgánica o inorgánica) pequeña; generalmente, estas moléculas se obtienen por métodos de síntesis química o semisintéticos o, alternativamente, se aíslan de sus fuentes. En una realización concreta, dicha molécula (orgánica o inorgánica) pequeña, tiene un peso molecular relativamente bajo, generalmente, igual o inferior a 5.000, típicamente, igual o inferior a 2.500, ventajosamente, igual o inferior a 1.500. Numerosos principios activos terapéuticos (fármacos) contienen estas características y, por tanto, pueden ser utilizados en la puesta en práctica de la presente invención.

10 Los microgeles biocompatibles de la invención pueden ser utilizados como vehículos para la administración tanto de sustancias hidrófilas como de sustancias hidrófobas. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de agentes biológicamente activos (definidos por grupos terapéuticos) que pueden ser utilizados y encapsulados en el interior de dichos microgeles incluyen: sustancias anticancerígenas, antibióticos, agentes inmunosupresores, sustancias antivirales, inhibidores enzimáticos, neurotoxinas, opioides, agentes hipnóticos, antihistamínicos, tranquilizantes, anticonvulsivos, relajantes musculares y sustancias contra la enfermedad de Parkinson, agentes antiespasmódicos y contractores musculares, agentes mióticos y agentes anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparásitos y/o antiprotozoos, antihipertensivos, analgésicos, agentes antipiréticos y antiinflamatorios, anestésicos locales, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, agentes antieméticos, neurotransmisores, proteínas, modificadores de la respuesta celular y vacunas.

15 Ejemplos ilustrativos no limitativos de agentes biológicamente activos incluyen actinimicina D, aldosterona, atorvastatina, carvedilol, cortisona, dexametasona, docetaxel, eritromicina, estradiol, erlotinib, FK-506, gentamicina, hidrocortisona, indinavir, levofloxacina, metilprednisolona, metotrexato, morfina, nelfinavir, paclitaxel, pentazocin, prednisolona, prednisona, rifampicina, ritonavir, saquinavir, tacrolimus, vinblastina, vincristina, vindesina, etc., sus derivados y sus mezclas.

20 Por tanto, los microgeles proporcionados por esta invención son materiales biocompatibles, útiles como portadores de agentes biológicamente activos, capaces de absorber (encapsular/captar) tanto agentes biológicamente activos hidrófobos como hidrófilos, y dosificarlos apropiadamente ya que responden a estímulos de temperatura y pH del medio en el que están dispersos.

25 La capacidad de encapsular y liberar agentes biológicamente activos se ha ensayado con una molécula modelo, concretamente, calceína, un compuesto que contiene 4 grupos carboxilo en su estructura a temperatura ambiente y a pH 3 (por debajo del pK_a del grupo carboxilo). Cuando el microgel colapse, es decir, cuando la temperatura sea mayor que la temperatura de transición de fase de volumen (VPTT) o el pH del medio sea superior al pK_a se liberarán las moléculas captadas.

30 La captación o encapsulación del agente biológicamente activo por los microgeles biocompatibles de la invención puede llevarse a cabo por métodos convencionales. En una realización particular, la reacción de polimerización en medio disperso para producir el microgel biocompatible de la invención puede llevarse a cabo en presencia del agente biológicamente activo con el fin de encapsular dicho agente en su interior. Alternativamente, el procedimiento de obtención del microgel biocompatible cargado con un agente biológicamente activo proporcionado por esta invención comprende poner en contacto una dispersión que comprende un microgel biocompatible de la invención con una disolución que comprende dicho agente (o agentes) biológicamente activo(s) a encapsular.

35 De forma más concreta, en una realización particular, se mezcla una dispersión que comprende los microgeles biocompatibles de la invención con una disolución del agente biológicamente activo a captar, a un pH determinado (por ejemplo, pH 3, para el caso de la calceína); la disolución resultante se agita durante un periodo de tiempo apropiado y se separan los microgeles/nanopartículas de la invención cargadas con el agente biológicamente activo por métodos convencionales, tales como centrifugación (por ejemplo, a 10.000-15.000 rpm y 20°C). Después de separar las nanopartículas cargadas se analiza el sobrenadante por métodos convencionales, por ejemplo, mediante espectrofotometría. Conocida la concentración de agente biológicamente activo que se ha utilizado y la concentración de agente biológicamente activo que ha quedado en el sobrenadante, se puede calcular la cantidad de agente biológicamente activo captado o absorbido.

40 La sensibilidad a la temperatura de los microgeles biocompatibles de la invención puede ser utilizada para encapsular y liberar el agente biológicamente activo. Así, en una realización particular, las nanopartículas de un microgel biocompatible de la invención colapsado se colocan en una disolución que contiene el agente

- biológicamente activo a una temperatura menor que la VPTT mediante lo cual las partículas del microgel se hincharán y/o, debido a interacciones con las moléculas poliméricas, las moléculas del agente biológicamente activo penetrarán a través de los poros de la red polimérica. Si se desea, los microgeles de la invención cargados con el agente biológicamente activo pueden ser separados de la disolución que contiene el agente biológicamente activo por métodos convencionales, por ejemplo, por centrifugación. Cuando la temperatura del medio es mayor que la VPTT, el agente biológicamente activo es liberado. El empleo de VCL como un monómero en la producción de microgeles permite desarrollando familias de microgeles biocompatibles cuyos VPTT pueden ser ajustados a la temperatura del cuerpo a fin de liberar el agente biológicamente activo en el sitio de interés o en el sitio de acción.
- Por tanto, los microgeles biocompatibles de la invención pueden actuar como sistemas de transporte para moléculas biológicamente activas. A modo de ilustración el suministro controlado de fármacos es muy interesante en numerosas ocasiones, por ejemplo, en el tratamiento de dolor/enfermedades que afectan el sistema nervioso, por ejemplo, en el tratamiento de dolor causado por desórdenes del sistema nervioso central (CNS), quimioterapia de tumores intracerebrales y metástasis, daños de la médula espinal y dolor cerebral post-trauma.
- 15 Composiciones farmacéuticas
En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un microgel biocompatible cargado con un agente biológicamente activo proporcionado por esta invención, y un excipiente, vehículo o adyuvante, farmacéuticamente aceptable.
- 20 El agente biológicamente activo presente en el microgel biocompatible de la invención estará generalmente dentro del microgel biocompatible de la invención; no obstante, podría ocurrir que parte de dicho agente biológicamente activo estuviera también unido a la superficie microgel biocompatible de la invención aunque la mayor parte de él estará dentro (por ejemplo, encapsulado) del microgel biocompatible de la invención.
- 25 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición (sólida o semisólida) destinada a su administración oral, bucal, sublingual, parenteral (por ejemplo, subcutánea, inyección específica para el sitio de acción, intramuscular, etc.), tópica, ocular, intranasal, pulmonar, rectal, vaginal, etc.
- 30 En una realización particular, la composición farmacéutica se administra por vía oral debido a su biocompatibilidad. Los microgeles biocompatibles de la invención son unos materiales "inteligentes" que proporcionan una liberación más controlada del agente biológicamente activo y protegen a dichos agentes biológicamente activos durante la liberación pudiendo controlarse de este modo su biodisponibilidad de manera uniforme y constante. La reversibilidad en las propiedades de hinchamiento de estos microgeles convierte a estos materiales en excelentes vehículos de transporte tanto de agentes biológicamente activos de pequeño tamaño como de nuevos fármacos macromoleculares (por ejemplo, péptidos) y otros productos terapéuticos.
- 35 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de composiciones farmacéuticas incluyen suspensiones de los microgeles biocompatibles cargados con agentes biológicamente activos provistos para su administración oral, etc. Por tanto, en una realización particular, la composición farmacéutica provista por esta invención es administrada oralmente.
- 40 Así mismo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden también ser adaptadas para su administración parenteral en la forma de, por ejemplo, suspensiones o productos liofilizados adecuados para su reconstitución antes de su administración, en la forma de dosificación adecuada.
- 45 Las composiciones farmacéuticas descritas aquí incluirán los vehículos y excipientes farmacéuticamente adecuados para cada formulación, que serán elegidos de acuerdo con la forma de dosificación farmacéutica elegida. Una revisión de diferentes formas de dosificación farmacéuticas puede ser hallada en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones.
- 50 La proporción del agente biológicamente activo incorporada en los microgeles biocompatibles de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, puede ser de hasta un 50% en peso respecto al peso total de las nanopartículas. No obstante, la proporción adecuada dependerá en cada caso de la moléculas biológicamente activa incorporada.
- 55 La invención se describe a continuación mediante varios ejemplos que no son limitativos de la invención, sino ilustrativos.

Ejemplo 1

60 Síntesis de microgeles basados en N-vinilcaprolactama
[microgeles de poli(VCL-co-BA) y poli(VCL-co-BA-co-3-MDG)]

1. Materiales

El monómero, N-vinilcaprolactama (VLC, Aldrich); el iniciador: persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$, Fluka); el tampón: bicarbonato de sodio ($NaCO_3H$); el agente de entrecruzamiento: N,N'-metilenbisacrilamida (BA, Aldrich); el emulsificante: dodecil sulfato de sodio (SDS, Aldrich); y el patrón de H^1 -RMN, acetato de sodio, se utilizaron tal y como fueron adquiridos. Hidroquinona (Fluka) fue utilizada como inhibidor de reacción de polimerización. 3-MDG fue sintetizada por los inventores de acuerdo con el procedimiento ya descrito (Imaz, A.; Ayerbe, M.; Ramos, J.; Forcada, J. J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 2006, 44, 443-457)

2. Síntesis de microgeles de poli(VCL-co-BA) y poli(VCL-co-BA-co-3-MDG)

Estas dos familias de partículas de microgeles de la invención se sintetizaron en un reactor discontinuo mediante un procedimiento de copolimerización en emulsión. En la síntesis de la primera familia [microgeles de poli(VCL-co-BA)], VCL se usó como monómero principal y BA como agente de entrecruzamiento, mientras que en la síntesis de la segunda familia [microgeles de poli(VCL-co-Ba-co-3-MDG)], se usó el monómero basado en carbohidrato, 3-O-metaciloil-1,2:5,6-di-O-isopropiliden-D-glucofuranosa (3-MDG) junto con VCL (monómero principal) y BA (agente de entrecruzamiento). SDS se usó como emulsificante y persulfato de potasio como iniciador. La disolución tampón de bicarbonato sódico en agua se añadió en la reacción para controlar el pH de la mezcla de reacción.

Las partículas de microgel poli(VCL-co-BA) se prepararon usando diferentes concentraciones de iniciador a temperaturas de reacción diferentes. La Tabla 1 muestra las recetas y condiciones de reacción usadas en la producción de las partículas de microgel entrecruzadas con BA [poli(VCL-co-BA)].

Tabla 1
Recetas y condiciones de reacción empleados en la producción de la familia de microgeles poli(VCL-co-BA)

I1CL4BX	1	4	1	0,1	4	70
I1CLX	1	0;4;5;7;10	1	1	4	70
IXCL4	1	4	0.3;0.5;1	0.3;0.5; 1	4	70
I1SX	1	4	1	1	1;2;3;4	70
I1TX	1	4	1	1	4	60;70;75;80
I1VCLX	1;3;5	4	1	1	4	70

Condiciones de reacción: rpm= 400; Tiempo de reacción= 5 h

Variables: concentraciones de VCL, BA, $K_2S_2O_8$, $NaCO_3H$ y SDS, y temperatura de reacción.

M=VCL

En la primera columna se muestra la nomenclatura de la reacción [el número y/o la X seguida de I indica la cantidad de iniciador (I, % en peso) añadido respecto al monómero (VCL), y el segundo número y/o X muestra la cantidad de agente de entrecruzamiento (CL) y emulsionante (S). B significa que la reacción es tamponada y el valor que sigue a la B es el % en peso de tampón con respecto VCL.

La figura 1 muestra el diámetro hidrodinámico promedio (Dp) vs. la temperatura del medio, de la partículas del microgel obtenido en la reacción I0.5CL4 [caso particular de reacción IXCL4, en el cual la cantidad de iniciador fue 0,5% en peso con respecto a VCL y la cantidad de iniciador fue 0,5% en peso con respecto a VCL]. Se observó que, a bajas temperaturas (debajo de la temperatura de transición de fase de volumen, VPPT), los microgeles tienen un Dp de aproximadamente 240 nm y que el tamaño de la partícula decrece cuando la temperatura aumenta, mostrando claramente que a temperaturas mayores que la VPPT, los microgeles deshinchon hasta aproximadamente 115 nm.

En la síntesis de los microgeles poli(VCL-co-BA-co-3-MDG) se emplearon diferentes proporciones de 3-MDG frente a VCL (13:87, 21:79, 30:70, 37:63). Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo a 70°C usando un 1% en peso de iniciador y tampón con respecto a la cantidad total de VCL y 3-MDG. La Tabla 2 muestra la receta y las condiciones de reacción utilizadas en la producción de las partículas de microgel poli(VCL-co-BA-co-MDG).

Tabla 2
Recetas y condiciones de reacción empleadas en la producción de la familia de microgeles poli(VCL-co-BA-co-3-MDG)

Reacción	VCL/3-MDG
A	13:87
B	21:79
C	30:70
D	37:63

Condiciones de reacción: rpm= 400; Tiempo de reacción= 5 horas; Temperatura de reacción= 70°C

Las concentraciones de $K_2S_2O_8$ y $NaHCO_3$ son 1% en peso con respecto a M (1 % p M)

Las concentraciones de BA y SDS son 4 % p M

M= suma de comonómeros VCL y 3-MDG (1 % p)

Variables: relaciones entre los comonómeros, VCL y 3-MDG

5 La figura 2 muestra el Dp vs. la temperatura del medio de las partículas de microgel obtenidas en la reacción B. Se observó que, a bajas temperaturas (debajo de la temperatura de transición de fase de volumen, VPTT) los microgeles tienen un Dp de aproximadamente 270 nm y que el tamaño de partícula disminuye cuando la temperatura aumenta, mostrando claramente que a temperaturas mayores de VPTT, los microgeles deshinchan hasta aproximadamente 140 nm. Además se observó que la incorporación de 3-MDG en la receta causa una disminución en el grado de hinchazón y en la VPTT.

Ejemplo 2

Síntesis de microgeles basados en N-vinilcaprolactama y PEGDA
[poli(VCL-co-PEGDA)]

1. Materiales

20 El monómero, N-vinilcaprolactama (VLC, Aldrich); el iniciador: persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$, Fluka); el tampón: bicarbonato de sodio ($NaCO_3H$); el agente de entrecruzamiento: poli(etilenglicol)diacrilato (PEGDA); el emulsificante dodecil sulfato de sodio (SDS, Aldrich); el patrón de H^1 -RMN, acetato de sodio, y óxido de deuterio (D_2O_2 , Aldrich) se utilizaron tal y como fueron adquiridos. A lo largo del proceso se empleó agua desionizada dos veces. Hidroquinona (Fluka) se usó como inhibidor de la reacción de polimerización.

2. Síntesis de microgeles de poli(VCL-co-PEGDA)

25 Las partículas de microgel se sintetizaron con distintas concentraciones de agente de entrecruzamiento mediante un procedimiento de polimerización en emulsión en un reactor discontinuo. VCL se usó como monómero principal y PEGDA como agente de entrecruzamiento. El emulsificante usado fue SDS. La Tabla 3 muestra la receta y las condiciones de reacción usadas en la producción de poli(VCL-co-PEGDA).

Tabla 3

Reacción	PEGDA (% p M)
PE2	2
PE4	4
PE6	6
PE8	8
PE10	10

Condiciones de reacción: rpm= 400; Tiempo de reacción= 5 h; Temperatura de reacción= 70°C

Las concentraciones de $K_2S_2O_8$ y $NaHCO_3$ son 1 % p M

La concentración de SDS es 4 % p M

M=VCL (1 % p)

35 Variable: concentración de PEGDA

40 La figura 3 muestra el Dp vs. la temperatura del medio, de las partículas de microgel obtenidas en la reacción PE8. Se observó que, a bajas temperaturas (debajo de la temperatura de transición de fase de volumen, VPTT), los microgeles tienen un Dp de aproximadamente 235 nm y que el tamaño de partícula disminuye cuando la temperatura aumenta, mostrando claramente que a temperaturas mayores de VPTT, los microgeles deshinchan hasta aproximadamente 95 nm.

Ejemplo 3

Síntesis de microgeles basados en n-vinilcaprolactama y PEGDA
[poli(VCL-co-3-MDG-co-pegda)]

1. Materiales

50 El monomer, n-vinilcaprolactama (VCL, Aldrich); el iniciador: persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$, Fluka); el tampón: bicarbonato de sodio ($NaCO_3H$); el agente de entrecruzamiento: poli(etilenglicol)diacrilato (PEGDA); el emulsificante: dodecil sulfato de sodio (SDS, Aldrich); el patrón de H^1 -RMN, acetato de sodio, y óxido de deuterio (D_2O_2 , Aldrich) se utilizaron tal y como fueron adquiridos. 3-MDG fue sintetizada por los inventores de acuerdo con el procedimiento ya descrito (Imaz, A.; Ayerbe, M.; Ramos, J.; Forcada, J. J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 2006, 44, 443-457). A lo largo del proceso se empleó agua desionizada dos veces. Hidroquinona (Fluka) se usó como inhibidor de la reacción de polimerización.

55

2. Síntesis de microgeles de poli(VCL-co-3-MDG-co-PEGDA)

Las partículas de microgel fueron sintetizadas con diferentes concentraciones de agente de entrecruzamiento por medio de un procedimiento de polimerización en emulsión en un reactor discontinuo. 3-O-metacrililoil-1,2:5,6-di-O-isopropiliden-D-glucofuranosa (3-MDG) fue utilizada como monómero basado en carbohidrato junto con VCL (monómero principal) y PEGDA como agente de entrecruzamiento. El emulsificante empleado fue SDS. La Tabla 4 muestra la receta y las condiciones de reacción empleadas en la producción de poli(VCL-co-3-MDG-co-PEGDA)

Tabla 4

Recetas y condiciones de reacción empleadas en la producción de la familia de microgeles de poli(VCL-co-3-MDG-co-PEGDA)

Reacción	PEGDA % p M
MPE2	2
MPE4	4
MPE6	6

Condiciones de reacción: rpm=300; Tiempo de reacción = 5 horas; Temperatura de reacción= 70°C

Las concentraciones de K₂S₂O₈ y NaHCO₃ son 1 % p M

La concentración de SDS es 4 % p M

M= suma de comonomeros VCL y 3-MDG (1 % p)

VCL/3-MDG= 80/20

Variable: concentración de PEGDA

La figura 4 muestra la relación D_{p7}/D_{p55°C} vs. la temperatura del medio, de las partículas de microgeles obtenidos en las reacciones MPE4 y MPE6, donde se puede observar que cuando la concentración de agente de entrecruzamiento aumenta, el radio de hinchazón disminuye.

Ejemplo 4

Síntesis de microgeles basados en n-vinilcaprolactama y PEGDA
[poli(VCL-co-3-MDG-co-PEGDA-co-AA)]

1. Materiales

El monómero, n-vinilcaprolactama (VCL, Aldrich); el iniciador: persulfato de potasio (K₂S₂O₈, Fluka); el tampón: bicarbonato de sodio (NaCO₃H); el agente de entrecruzamiento: poli(etilenglicol)diacrilato (PEGDA); el emulsificante: dodecil sulfato de sodio (SDS, Aldrich); el patrón de H¹-RMN, acetato de sodio, y óxido de deuterio (D₂O₂, Aldrich) se utilizaron tal y como fueron adquiridos. 3-MDG fue sintetizada por los inventores de acuerdo con el procedimiento ya descrito (Imaz, A.; Ayerbe, M.; Ramos, J.; Forcada, J. J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 2006, 44, 443-457). Ácido acrílico (AA) (99%) fue suministrado por Fluka. A lo largo del proceso se empleó agua desionizada dos veces. Hidroquinona (Fluka) se usó como inhibidor de la reacción de polimerización.

2. Síntesis de microgeles de poli(VCL-co-3-MDG-co-PEGDA-co-AA)

Las partículas de microgel fueron sintetizadas con diferentes concentraciones de comonomero acrílico por medio de un procedimiento de polimerización en emulsión en un reactor discontinuo. 3-MDG fu empleado como monómero basado en un carbohidrato junto con VGL (monómero principal) y PEGDA como agente de entrecruzamiento. Ácido acrílico (AA) fue empleado como el comonomero acrílico. El emulsificante empleado fue SDS. La Tabla 5 muestra la receta y las condiciones de reacción empleadas en la producción de poli(VCL-co-3-MDG-co-PEGDA-co-AA)

Tabla 5

Recetas y condiciones de reacción empleadas en la producción de la familia de microgeles de poli(VCL-co-3-MDG-co-PEGDA-co-AA)

Reacción	AA (% p M)	NaHCO ₃ (% p M)	SDS (% p M)
AA2	2	6	4
AA4	4	9	4
AA6	6	8	1

Condiciones de reacción: rpm=250; Tiempo de reacción = 5 horass; Temperatura de reacción= 70°C

Las concentración de K₂S₂O₈ es 1 % p M; la concentración de PEGDA es 4 % p M

La concentración de SDS es 4 p% M

M= suma de comonomeros VCL y 3-MDG (1 % p)

VCL/3-MDG= 80/20

Variable: concentración de AA

La figura 5 muestra el Dp vs. la temperatura del medio, de partículas de microgel obtenidas en la reacción AA6. Se observa que, a baja temperatura (10°C), los microgeles tienen un Dp de aproximadamente 160 nm y que el tamaño de las partículas disminuye cuando la temperatura aumenta.

La figura 6 muestra el Dp vs. el pH del medio, de las partículas de microgel obtenidas en la reacción AA6. Se observó que cuando el pH del medio aumenta, el Dp de los microgeles aumenta debido a las interacciones repulsivas entre los grupos carboxilo ionizados.

Ejemplo 5

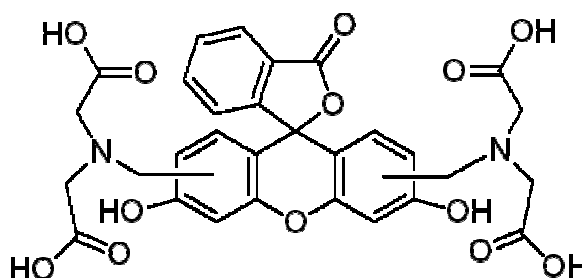
Absorción de calceína por las partículas del microgeles de la invención

Este ejemplo se llevó a cabo para analizar la habilidad de captura de una molécula modelo (calceína) por diferentes microgeles de la invención pertenecientes a diferentes familias

1. Materiales y métodos

Los microgeles de la invención empleados fueron microgeles identificados como I1CL4B1 [microgel obtenido en el Ejemplo 1 (Tabla 1) perteneciente a la familia de poli(VCL-co-BA)], B [microgel obtenido en el Ejemplo 2 (Tabla 2) perteneciente a la familia poli(VCL-co-BA-co-3-MDG)], PE6 [microgel obtenido en el Ejemplo 2 (Tabla 3) perteneciente a la familia poli(VCL-co-PEGDA)], MPE4 [microgel obtenido en el Ejemplo 3 (Tabla 4) perteneciente a la familia poli(VCL-co-3-MDG-co-PEGDA)], y AA6 [microgel obtenido en el ejemplo 4 (Tabla 5) perteneciente a la familia poli(VCL-co-3-MDG-co-PEGDA-co-AA)]

La molécula modelo seleccionada para llevar a cabo este ejemplo fue la calceína (Aldrich) cuya fórmula molecular es la siguiente:



Peso molecular: 622,53 g/mol

También se empleó agua desionizada dos veces.

Método de análisis

Para determinar la absorción de calceína, se preparó por una parte una solución stock de calceína (200 ppm) a pH 3 con el propósito de determinar en el espectrofotómetro la longitud de onda óptima (el máximo en la curva de absorbancia vs. longitud de onda); además se prepararon disoluciones con diferentes concentraciones de calceína para obtener la correspondiente curva de calibración.

Por otra parte, se obtuvieron diferentes preparaciones con diferentes concentraciones de calceína [5-200 ppm (equivalente a aproximadamente 0.008-0.32 mM)] a la misma concentración de microgel (0,05 % p), a pH 3, y se agitaron por 60 horas por medio de un agitador orbital. El microgel se separó a continuación del medio acuoso por centrifugación a 20°C, 10.000 rpm, por 2 horas. Usando una ultracentrífuga Centrikon T-2149 (Kontron Instruments) y la concentración de calceína en equilibrio en el sobrenadante se analizó por medio de espectrofotometría-UV a 478 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesis 5. Los valores resultantes de absorción se compararon con aquellos obtenidos previamente en las curvas de calibración, y se obtuvo la concentración de calceína en equilibrio.

2. Resultados

La calceína se cargó en los microgeles biocompatibles de la invención a pH 3 porque a este pH los grupos carboxilo de la calceína están protonados (-COOH). Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 5-11, donde la cantidad de calceína (mg de calceína/ g de microgel) absorbida por los diferentes geles biocompatibles de la invención ensayados pueden ser observados contra la concentración de calceína. Dichos resultados muestran claramente el potencial de los geles ensayados como sistemas de transporte para agentes biológicamente activos; en particular, dichos microgeles pueden absorber cualquier agente biológicamente activo que contenga grupos -COOH.

Ejemplo 6

Ensayos de biocompatibilidad y toxicidad de microgeles biocompatibles de la invención

5 Este ejemplo se llevó a cabo para analizar la biocompatibilidad y toxicidad *in vitro* de microgeles de la invención. Las células vivas se cuantificaron por medio de fluorometría para averiguar el valor límite de concentración de microgel que no afecta la viabilidad de las neuronas.

1. Materiales y métodos

10 Para llevar a cabo este ejemplo se emplearon calceína-AM (Invitrogen) [un material fluorescente que es incorporado por células viables], el microgel identificado como I1CL4B1 [microgel obtenido en el Ejemplo 1 (Tabla 1) perteneciente a la familia poli(VCL-co-BA)-caso particular de la reacción I1CL4BX, en el cual la cantidad de tampón es 1 % p con respecto a VCL]; cultivos primarios de neuronas de embriones de ratas de 18 días con alto contenido en neuronas y agua desionizada dos veces.

15 1.1 Preparación del cultivo celular

Se cultivaron neuronas del lóbulo cortical de embriones de ratas Sprague-Dawley de 18 días empleando procedimientos previamente descritos [Chengy col., Neuropharmacology, 1998, 37:1419-1429; Larmy col., European Journal of Pharmacology 1996, 35:567-576]. Las neuronas fueron resuspendidas en medio Neurobasal B27 suplementado con 10 % de suero de ternero fetal (FCS) y fueron sembradas sobre un soporte de vidrio de 12 mm cubierto con poli-L-ornitina a una concentración de 5×10^4 células por soporte. Al día siguiente, el medio fue cambiado por otro medio libre de suero (Neurobasal B27 Minus AO). Los cultivos fueron mantenidos en un incubador humidificado (5% CO₂; 37°C) y fueron empleados 8-10 días después de la siembra [Brewer y col., Journal of Neuroscience Research 1993, 35:567-576]

25 1.2 Análisis de viabilidad celular

Los ensayos de toxicidad y viabilidad celular se llevaron a cabo empleando cultivos de neuronas sembradas a 5×10^4 células/soporte, como ya ha sido descrito [Schubert & Piasecki, The Official Journal of the Society for Neuroscience, 2001, 21:7455-7462] con algunas modificaciones. Las neuronas fueron mantenidas en medio Neurobasal a 37°C y 5% CO₂ por 9 o 16 días. Para evaluar el efecto de las partículas del microgel ensayado sobre la viabilidad celular se añadieron diferentes concentraciones de partículas de dicho microgel (1% de contenido en sólidos diluido 1:100, 1:300 y 1:1000) por 24 o 72 horas. La viabilidad celular se ensayó por carga de las células con 1 μM de calceína-AM [células cultivadas viables (en diferentes estados de maduración) incorporan calceína-AM] por 30 minutos y se midió la fluorescencia usando un fluorímetro Synergy-HT (Bio-Tek Instruments). Los datos se muestran como porcentaje de células vivas sobre el número total de células con respecto al control. Todos los experimentos se llevaron a cabo en cuadruplicado y los valores provistos aquí son los valores promedio de por lo menos 3 experimentos independientes. De este modo se pueden establecer las concentraciones a la cuales el microgel ensayado no altera la viabilidad de las células.

40 2. Resultados

Las Figuras 12 y 13 muestran las viabilidades celulares en cultivos *in vitro* de de neuronas corticales de ratas embrionarias de 9 días (9 DIV, "9 días *in vitro*") después de incubación por 24 horas (Figura 12) o por 72 horas (Figura 13) con el microgel biocompatible de la invención ensayado [microgel identificado como I1CL4B1, Tabla 1, perteneciente a la familia poli(VCL-co-BA)]. Las nanopartículas de dicho microgel mostraron baja toxicidad cuando las células inmaduras (9DIV) fueron incubadas por 24 horas. Sin embargo, la toxicidad aumentó cuando el tiempo de incubación con el microgel fue de 72 horas.

50 Cuando se analizó el efecto de la concentración de las nanopartículas del microgel sobre la viabilidad celular, se observó que en ambos casos, la dilución 1:1000 (Figuras 12 y 13, primera columna) mostraron la más baja viabilidad celular. Así mismo, se observó que en células incubadas por 24 horas a diluciones 1:300 y 1:1000 (segunda y tercera columnas a la derecha), la viabilidad celular fue 100%. Dado que las células no murieron, las partículas del microgel ensayado son completamente biocompatibles bajo las condiciones ensayadas (baja concentración de partículas de microgel y un período de incubación de 24 horas). Estos resultados permiten concluir que dicho microgel, en las condiciones ensayas, puede ser empleado como un dispositivo o sistema biocompatible útil para aplicaciones biomédicas.

55 Los experimentos llevados a cabo con células incubadas por 72 horas, a diluciones 1:300 y 1:1000, muestran claramente que la viabilidad celular es más alta que en el caso de la dilución 1:100, aunque en estas condiciones el microgel ensayado no fue completamente biocompatible puesto que la viabilidad fue 77% y 81% a diluciones 1:300 y 1:1000 respectivamente.

60

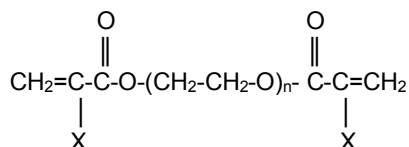
REIVINDICACIONES

1. Un microgel biocompatible que comprende una red polimérica, comprendiendo dicha red polimérica unas unidades poliméricas interconectadas entre sí a través de un agente de entrecruzamiento, en el que dicha red polimérica puede ser obtenida por polimerización en medio disperso de un monómero vinílico biocompatible, un comonómero basado en un carbohidrato y un agente de entrecruzamiento.

2. Microgel según la reivindicación 1, en el que dicho monómero vinílico biocompatible se selecciona entre N-vinilcaprolactama, N-vinilpirrolidona y sus mezclas.

3. Microgel según la reivindicación 1, en la que dicho agente de entrecruzamiento es un monómero difuncional que comprende al menos dos grupos vinilo.

4. Microgel según la reivindicación 3, en el que dicho agente de entrecruzamiento se selecciona entre un dextrano con dos o más grupos vinilo;
N,N'- metilenbisacrilamida (BA)
un compuesto de fórmula general



donde

X es hidrógeno o metilo, y

n es un número entero comprendido entre 1 y 90; y sus mezclas.

5. Microgel según la reivindicación 4, en el que dicho agente de entrecruzamiento se selecciona de diacrilato de etilenglicol (EGDA), poli(etilenglicol diacrilato) (PEGDA), dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), poli(etilenglicol dimetacrilato) (PEGDMA) y sus mezclas.

6. Microgel según la reivindicación 1, en la que dicho comonómero basado en un carbohidrato comprende un grupo acrílico o metacrílico y un grupo derivado de un glucósido, en el que dicho grupo derivado de un glucósido comprende un glucofurano y dos grupos isopropilideno.

7. Microgel según la reivindicación 6, en el que dicho comonómero basado en un carbohidrato es 3-O-metacriloil-1,2:5,6-di-O-isopropiliden-D-glucofuranosa (3-MDG).

8. Microgel según la reivindicación 1, en el que dicha red polimérica comprende, además, un comonómero (met)acrílico.

9. Microgel según la reivindicación 8, en el que dicho comonómero acrílico se selecciona entre ácido acrílico, ácido metacrílico y sus derivados sensibles al pH y sus mezclas.

10. Microgel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende, además, un agente biológicamente activo.

11. Microgel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en forma liofizada.

12. Una composición farmacéutica que comprende un microgel biocompatible según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

13. Un procedimiento para la obtención de un microgel biocompatible según la reivindicación 1, que comprende la polimerización en medio disperso de una composición que comprende un monómero vinílico biocompatible, un comonómero basado en un carbohidrato y un agente de entrecruzamiento.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicha composición comprende, además, un comonómero acrílico.

15. Procedimiento según la reivindicación 13 ó 14, en el que dicha polimerización se lleva a cabo en presencia de un agente biológicamente activo.

5 16. Procedimiento según la reivindicación 13 ó 14, que comprende, además, mezclar dicho microgel biocompatible con una disolución que comprende un agente biológicamente activo.

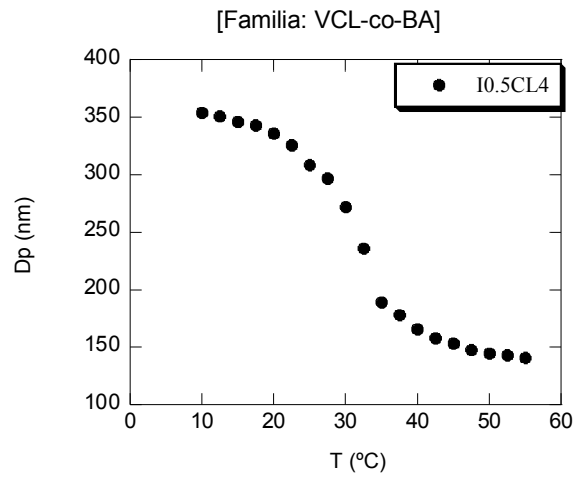


Figura 1

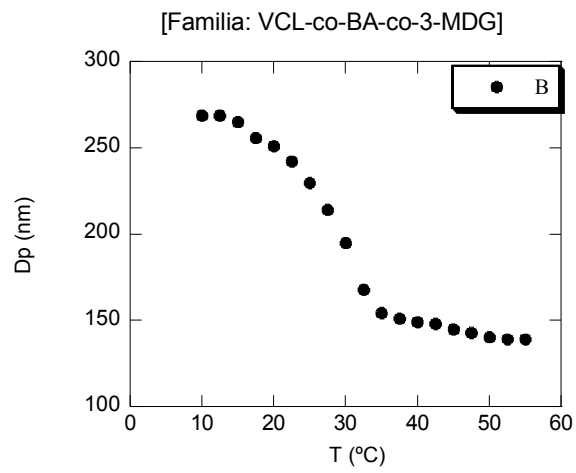


Figura 2

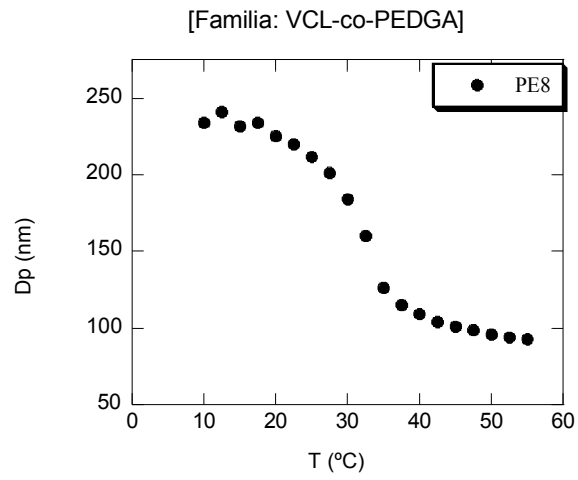


Figura 3

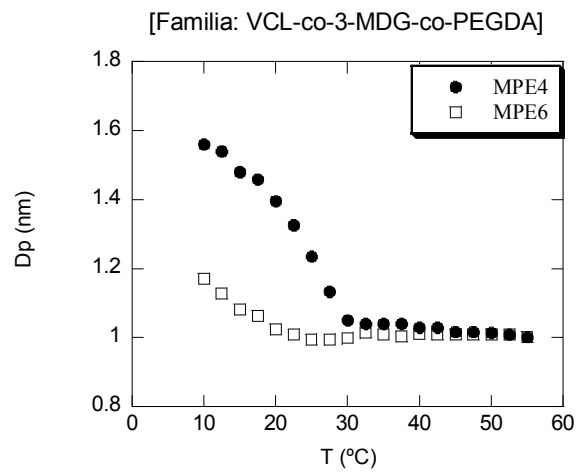


Figura 4

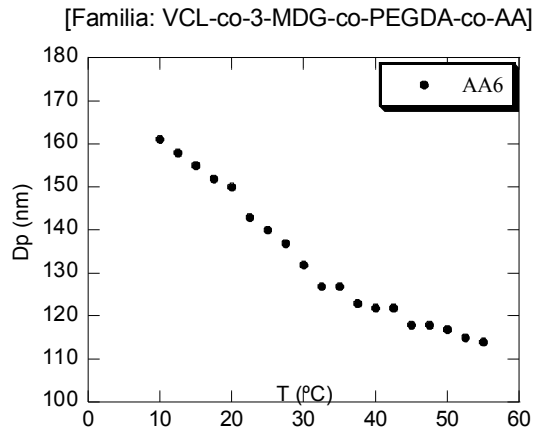


Figura 5

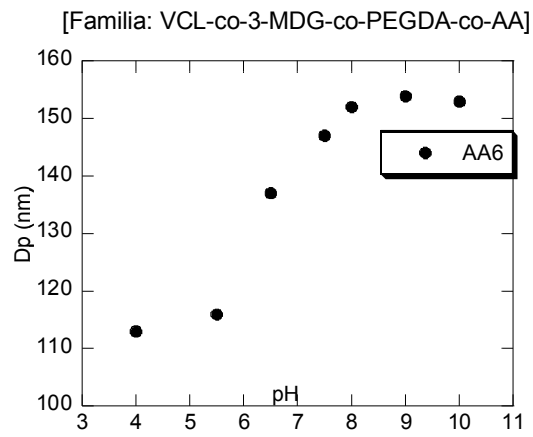


Figura 6

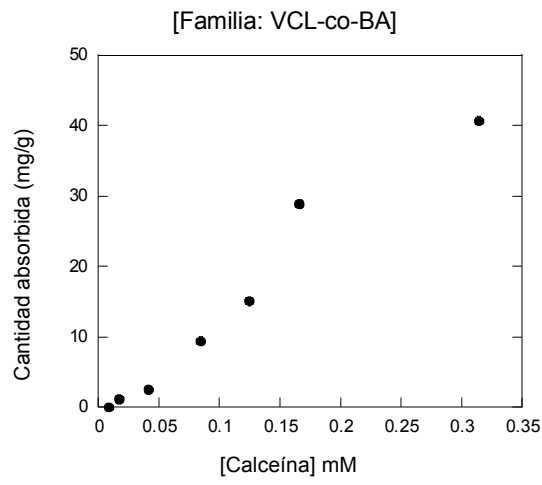


Figura 7

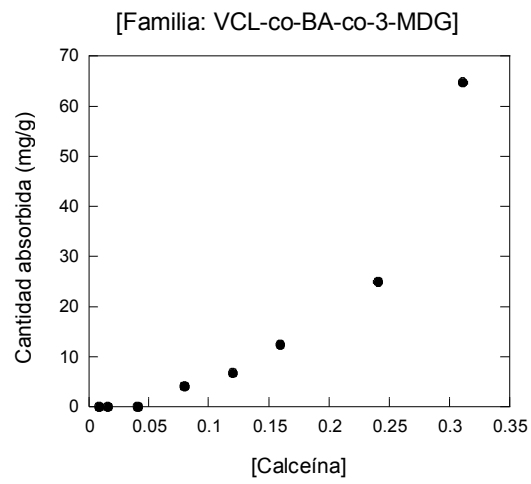


Figura 8

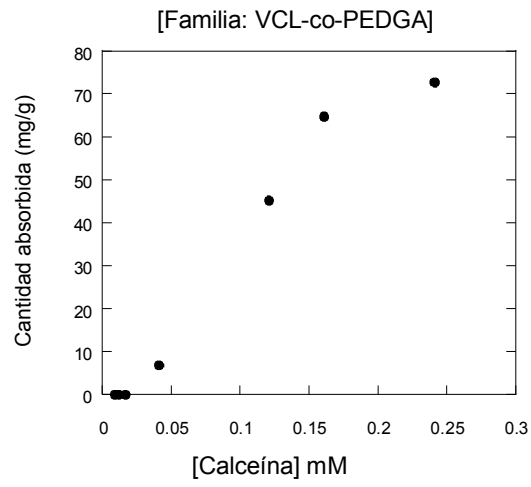


Figura 9

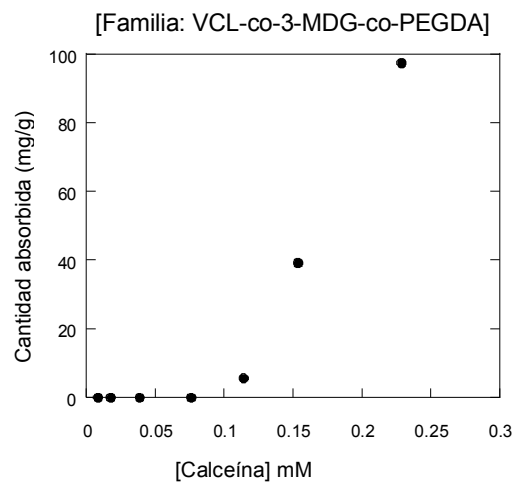


Figura 10

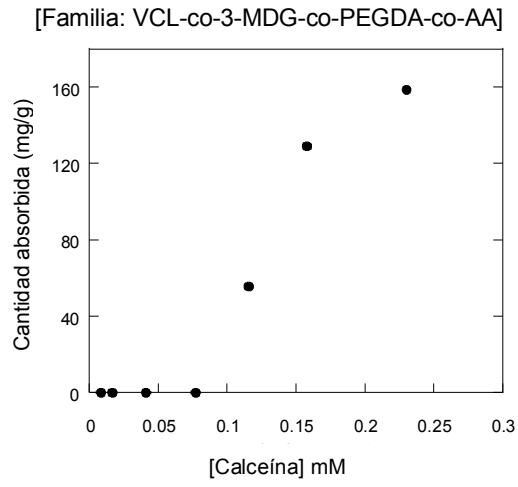


Figura 11

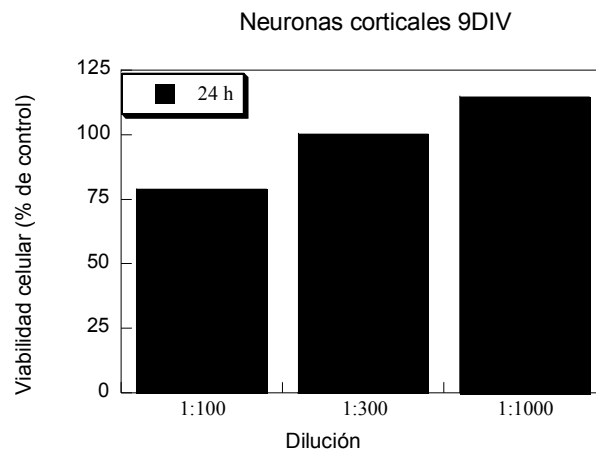


Figura 12

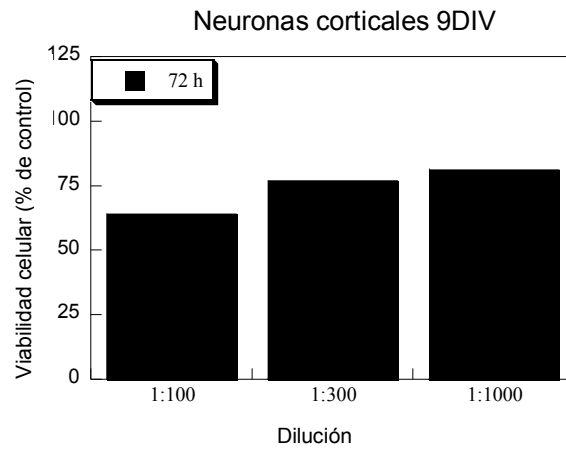


Figura 13