

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 118**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06828863 .8**
96 Fecha de presentación: **25.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1951314**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2008**

54 Título: **SISTEMAS DE SUMINISTRO DE FÁRMACOS.**

30 Prioridad:
25.10.2005 DE 102005051366

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.01.2012

73 Titular/es:
**EVONIK RÖHM GMBH
KIRSCHENALLEE
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:
**SEILER, Matthias;
WINDHAB, Norbert;
STICKLER, Manfred y
PETEREIT, Hans-Ulrich**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 373 118 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

Sistemas de suministro de fármacos

5 El invento se refiere a unos nuevos sistemas de suministro de fármacos (en inglés Drug Delivery Systems) de acuerdo con las reivindicaciones, que se basan en unos soportes poliméricos, en particular unos soportes ramificados, reticulados o dendríticos, que contienen tanto por lo menos una sustancia activa como también por lo menos una sustancia de señal, realizándose que el soporte, la sustancia activa y la sustancia de señal no se unen entre sí específicamente o no son complementario/as fijándose.

10 Uno de los mayores problemas en el caso del tratamiento medicamentoso de enfermedades lo constituye el transporte deliberado de sustancias activas al sitio diana enfermo, es decir en un tejido, un órgano o respectivamente en las correspondientes células. Las membranas son en este caso las barreras más importantes, que blindan al sitio diana (sitio activo) frente a las sustancias activas que se han de transportar. Otro problema adicional lo constituye la descomposición o la derivatización de sustancias activas libres en el organismo. Una tal metabolización disminuye o hace fracasar con frecuencia a un efecto farmacológico deliberado de las sustancias activas junto al sitio diana. Además de ello, las sustancias activas distribuidas o respectivamente modificadas incorrectamente en el cuerpo, en particular cuando ellas son tóxicas local o sistémicamente, pueden conducir a efectos secundarios indeseados.

15 Una vía ya probada para evitar estas desventajas consiste en la producción de formulaciones de sustancias activas en forma de partículas, presentándose la sustancia activa envuelta dentro de una envoltura o matriz polimérica (Nishiyama y colaboradores, Drug Discovery Today: Technologies (2005), 2(1), 21-26. Publicador: Elsevier B.V.). Por lo general, en este caso, los puros soportes con volumen, en los que la sustancia activa está encerrada dentro de una especie de vesícula contenedora polimérica, se pueden diferenciar de los soportes poliméricos funcionalizados químicamente, en los cuales unas sustancias constitutivas individuales, p.ej. sustancias activas o sustancias de señal, están fijadas químicamente al soporte funcionalizado (del tipo de matriz). El documento de patente europea EP 1352657 divulga unas composiciones que contienen lactoferrina, almidón y lactosa.

20 El transporte de las sustancias activas al tejido enfermo se efectúa, en el caso de unas meras formulaciones de soportes y sustancias activas, por liberación y difusión simples (equilibración). Con el fin de mejorar la regulación de las dianas de determinadas sustancias activas, con frecuencia unas sustancias de señal se fijan por enlaces covalentes o respectivamente de coordinación a la sustancia activa o respectivamente al soporte, fijándose la sustancia de señal específicamente a membranas celulares del tejido enfermo e iniciándose la asimilación de la sustancia activa dentro de la célula, descrita como endocitosis (p.ej. documentos de solicitudes de patentes internacionales WO 2005/084158, WO 20041072153, Pitard, B. y colaboradores, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América (1999), 96(6), 2621-2626].

25 Mediante la fijación de unas sustancias de señal, que inician la asimilación por endocitosis de la sustancia activa o del sistema de transporte en forma de partículas, ciertamente la regulación de la diana de la sustancia activa se puede mejorar frente a la asimilación que se realiza puramente por difusión, pero no obstante mediante la funcionalización química del soporte o respectivamente mediante la fijación por enlaces covalentes o de coordinación de la sustancia de señal a la sustancia activa se generan también nuevos problemas.

30 Así, en particular las sustancias activas medicamentosas se pueden mejorar en lo que se refiere a su absorción, distribución, metabolización y segregación (parámetros ADME) así como en lo que se refiere a su efecto y su toxicidad. Mediante la fijación de una sustancia de señal a la sustancia activa, estas propiedades se modifican con frecuencia, la sustancia activa puede ser restringida de esta manera en su posibilidad de utilización farmacéutica o incluso se puede volver inútil. La fijación de una sustancia activa a un soporte funcionalizado plantea de manera enteramente general problemas similares. Además, el soporte, la sustancia de señal o respectivamente la sustancia activa se deben con frecuencia funcionalizar suplementariamente, con el fin de hacer posible una fijación específica correspondiente. Tales soportes y sustancias de señal funcionalizados/as permiten, como consecuencia de ello, solamente unas combinaciones restringidas de un soporte, de una sustancia de señal y de una sustancia activa. Además de ello, estos sistemas de suministro de fármacos son costosos de producir y la sustancia activa, por regla general, si es que ella está fijada por enlaces covalentes o de coordinación a la sustancia de señal o al soporte debe de ser liberada químicamente junto al sitio diana. Además, mediante una fijación por enlaces covalentes o de coordinación de una sustancia de señal o de un soporte resulta una nueva sustancia activa química, que necesita una costosa experimentación clínica.

35 Una meta del presente invento fue, por consiguiente, poner a disposición unos nuevos sistemas de suministro de fármacos, que hagan posible un transporte dirigido hacia una diana de la sustancia activa a través de barreras biológicas y que eliminen por lo menos una parte de los problemas mencionados.

40 En tal contexto se comprobó, de un modo sorprendente, que es suficiente utilizar unos sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas que se basan en unos soportes poliméricos ramificados o respectivamente reticulados que están conglomerados de una manera inespecífica tanto con las sustancias activas respectivamente empleadas

como también con las sustancias de señal utilizadas, sin que sea necesaria una fijación por enlaces covalentes o de coordinación de la sustancia de señal a la sustancia activa o al soporte.

5 También aunque los modelos de endocitosis y de difusión hasta ahora discutidos no pudieron explicar de un modo libre de contradicciones el transporte de las sustancias activas a través de membranas biológicas, hasta ahora se partió
 10 de existir una unión específica entre la sustancia activa y la sustancia de señal que inicia el transporte, o respectivamente entre la sustancia de señal y otras unidades de fusión o entre la sustancia de señal y la sustancia activa, realizándose en el primer caso que directamente la sustancia activa y en el segundo caso el soporte con la sustancia activa se transporta a la célula. De acuerdo con el presente invento, no es necesario, sin embargo, precisamente un acoplamiento químico específico tal. Este transporte de la sustancia activa podría ser atribuido en este caso a un mecanismo hasta ahora no conocido para la asimilación celular de sustancias activas (Fig. 1).

Un objeto del presente invento son unos sistemas de suministro de fármacos de acuerdo con la reivindicación 1.

15 Como soportes entran en consideración unos polímeros lineales tales como p.ej. unas poli(lactidas). No obstante, se prefieren unos soportes poliméricos, que contienen por lo menos un polímero ramificado o reticulado, puesto que los polímeros ramificados o reticulados son especialmente apropiados para una mera conglomeración de una sustancia de señal, de una sustancia activa y de un soporte. La proporción de los polímeros de soporte ramificados o respectivamente reticulados está de manera preferente por encima de 10 % en peso, en particular por encima de 50 % en peso, referida al peso total del soporte.

20 Las sustancias de señal y activa se presentan en este caso de manera preferida dispersadas o respectivamente coacervadas en el soporte polimérico. En particular, son apropiados para esto unos polímeros dendríticos o altamente reticulados así como unos polímeros en forma de peine. En este contexto presentan un interés especial los polímeros idénticos a los naturales o isómeros de los naturales.

25 Unos soportes especialmente preferidos son los polímeros globulares altamente ramificados, que se designan en la bibliografía especializada también como "polímeros dendríticos". Estos polímeros dendríticos sintetizados a partir de monómeros multifuncionales, se pueden clasificar en dos categorías diferentes, los "dendrimeros" así como los "polímeros hiperramificados". Los dendrimeros poseen una estructura muy regular de generaciones radialmente simétricas. Ellos constituyen unos polímeros globulares monodispersos, que en comparación con los polímeros hiperramificados se preparan en síntesis de múltiples etapas. En este caso la estructura está caracterizada por tres áreas diferentes:

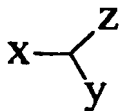
- 30 - el núcleo polifuncional, que constituye el centro de simetría,
 - diferentes capas radialmente simétricas bien definidas de una unidad de repetición (generación) y
 - los grupos terminales.

35 Los polímeros hiperramificados, al contrario que los dendrimeros, son polidispersos e irregulares en lo que se refiere a su ramificación y estructura. Junto a las unidades dendríticas y lineales aparecen – al contrario que en los dendrimeros – también unidades lineales en los polímeros hiperramificados. En cada caso un ejemplo de un dendrimer (Fig. 2a) y de un polímero hiperramificado (Fig. 2b), constituido a base de unas unidades de repetición, que tienen en cada caso tres posibilidades de fijación, se representan esquemáticamente en la Fig. 2. Se realiza que los polímeros dendríticos aquí utilizados contienen por lo menos 3 unidades de repetición por molécula, de manera preferida por lo menos 10 unidades de repetición por molécula y de manera especialmente preferida por lo menos 100 unidades de repetición por molécula o todavía mejor por lo menos 400 unidades de repetición por molécula, las cuales a su vez tienen en cada caso por lo menos tres, de manera preferida por lo menos cuatro posibilidades de fijación, estando unidas por lo menos 3 de estas unidades de repetición, de manera especialmente preferida por lo menos 10 y de manera aún más preferida por lo menos 20 unidades de repetición en cada caso a través de por lo menos tres, de manera preferida a través de por lo menos cuatro posibilidades de fijación con por lo menos tres, de manera preferida por lo menos cuatro otras unidades de repetición adicionales. Usualmente, los polímeros hiperramificados tienen como máximo 10.000, de manera preferida como máximo 5.000 y de manera especialmente preferida como máximo 2.500 unidades de repetición.

45 En una forma preferida de realización, el polímero dendrítico altamente ramificado tiene por lo menos tres unidades de repetición, que en cada caso tienen por lo menos tres posibilidades de fijación posibles, teniendo por lo menos tres de estas unidades de repetición por lo menos dos posibilidades de fijación posibles.

En este caso, por el concepto de "una unidad de repetición" se entiende de manera preferida una estructura que siempre se repite dentro de la molécula hiperramificada, p.ej. unidades lineales, dendríticas o terminales, tal como se definen en las citas de Seiler, Fortschritt-Berichte VDI, serie 3, nº 820 ISBN 3-18-382003-x y de Gao, C. y

colaboradores, Hyperbranched Polymers: from synthesis to application [polímeros hiperramificados: desde la síntesis a la aplicación], Prog. Polym. Sci., 29 (2004) 183-275. Por el concepto de "posibilidad de fijación" se entiende de manera preferida aquella estructura funcional dentro de una unidad de repetición, con la que es posible una unión con otra unidad de repetición distinta. Referido a los ejemplos representados precedentemente de un dendrímero o respectivamente de un polímero hiperramificado, la unidad de repetición es una estructura que tiene en cada caso tres posibilidades de fijación (X, Y, Z):



La unión de las unidades de fijación individuales entre ellas se puede efectuar mediante una polimerización por condensación, mediante una polimerización por radicales, mediante una polimerización aniónica, mediante una polimerización catiónica, mediante una polimerización por transferencia de grupos, mediante una polimerización por coordinación, mediante una polimerización por apertura de anillos o mediante una polimerización catalizada enzimáticamente.

Unos dendrímeros especialmente preferidos son los dendrímeros de poli(amido-aminas) (PAMAM) de Starbust®, dendrímeros de poli(propilen-iminas), dendrímeros basados en poli(óxidos de etileno), dendrímeros de poliéteres, dendrímeros de PAMAM revestidos, p.ej. con un revestimiento de poli(lactida-co-glicolida), dendrímeros de poli(lisina) y entre ellos también dendrímeros de poli(lisina)-bloque-PEG-bloque-poli(lisina) y poli(aril-éteres). Tales dendrímeros preferidos se describen p.ej. en las citas de Frechet, J.M.J. y colaboradores, Dendrimers and Other Dendritic Polymers [dendrímeros y otros polímeros dendríticos], John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, Reino Unido (2001); de Malik, N. y colaboradores, Journal of Controlled Release 65, (2000), 133-148; de Frey, H. y colaboradores Reviews in Molecular Biotechnology 90 (2002) 257-267; y de Jikei, M. y colaboradores Hyperbranched Polymers: a promising new class of materials [polímeros hiperramificados, una prometedora nueva clase de materiales], Prog. Polym. Sci., 26 (2001), 1233-1285.

Unos polímeros de soporte lineales o hiperramificados preferidos en este contexto son poliésteres, poli(éster-amidas), poliéteres, poliamidas, poli(etilen-iminas), poli(gliceroles), poli(glicolidas), poli(lactidas), poli(lactidas-co-glicolidas), poli(tartratos) y polisacáridos. Son especialmente preferidos entre estos polímeros los poliésteres hiperramificados ya obtenibles comercialmente bajo la marca Boltom® de la entidad Perstorp AB, las poli(éster-amidas) hiperramificadas obtenibles bajo la marca Hybrane® de la entidad DSM BV Niederlande, los poli(gliceroles) preparados por la entidad Hyperpolymers GmbH, así como las poli(etilen-iminas) hiperramificadas obtenibles como Polyimin® de la entidad BASF AG.

Unos polímeros de soporte ramificados más aún preferidos son poli(caprolactonas), copolímeros tales como poli(D,L-lactidas-co-glicolidas) así como los compuestos de poliésteres preparados por la entidad Degussa AG a base de las familias de productos Dynapol®S y Dynacol®.

Unos polímeros dendríticos especialmente preferidos son unos polímeros con una masa molecular comprendida entre 1.000 g/mol y 2.000.000 g/mol, de manera especialmente preferida entre 2.000 g/mol y 700.000 g/mol y de manera muy especialmente preferida entre 6.000 g/mol y 100.000 g/mol, con una temperatura de fusión situada preferiblemente entre 0 °C y 150 °C y/o con una viscosidad de la masa fundida de los polímeros de soporte preferidos, que es menor que 3,0 Pas, de manera preferida menor que 2,5 Pas, en particular menor que 2,0 Pas, medida a 80 °C. En particular los soportes poliméricos hiperramificados poseen además de esto un grado de ramificación comprendido entre 20 % y 100 %, de manera preferida entre 30 % y 70 %, y/o un índice de hidroxil comprendido entre 10 mg de KOH/g y 600 mg de KOH/g. El grado de ramificación de los dendrímeros está situado de manera preferida entre 25 % y 75 %.

Se prefieren como polímeros de soporte además unos homo- o heteropolímeros ramificados o reticulados a base de hidratos de carbono (polisacáridos); a base de aminoácidos naturales y artificiales; a base de ácidos nucleicos naturales y artificiales; a base de poliaminas; a base de poliésteres; a base de poliéteres; a base de polioles, en particular poli(alcoholes vinílicos); a base de poliolefinas, en particular a base de poli(isoprenos), polietilenos, polipropilenos, poli(butadienos) o poliestirenos; a base de poli(alquilenglicoles), en particular a base de poli(etilenglicoles); a base de poliamidas; a base de poliacetales; a base de poli(acrilatos); a base de poli(acetatos, en particular a base de poli(acetatos de vinilo); a base de poliuretanos, a base de polímeros orgánicos de silicio, tales como p.ej. siliconas; a base de resinas epoxídicas; a base de polioles; o a base de policarbonatos. Los soportes poliméricos preferidos son además biocompatibles y degradables enzimáticamente de modo retardado. Acerca de ellos hay que mencionar en particular los polímeros de soporte ramificados o reticulados degradables enzimáticamente, tomados del conjunto de las poli(caprolactonas), las poli(glicolidas), las poli(lactidas), las poli(lactidas-co-glicolidas), los poli(tartratos) o los

poliésteres. Se prefieren especialmente unos polisacáridos ramificados o reticulados, a base de celulosa, pectina, amilopectina o dextranos.

5 Unos polímeros de soporte reticulados, especialmente preferidos, son unos hidrogeles, en particular unos hidrogeles dendríticos, tal como se describen p.ej. en las citas de Rueda, J. C., y colaboradores, *Macromol. Chem. Phys.* 2003, 204, 947-953; de Hatice, K.C. y colaboradores, publicada online el 24 de Octubre de 2003 en Wiley InterScience DOI 10.1002/app.13125; Knischka, R. y colaboradores *Polymeric Materials [Materiales poliméricos]: Science & Engineering* 2001, 84, 945.

10 En una forma de realización especialmente preferida, se utilizan unos soportes poliméricos, que en lo posible son tal como están en la naturaleza o cercanos a los naturales, y que en particular no están funcionalizados ni respectivamente derivatizados adicionalmente. Por un lado, se puede asegurar de esta manera que no transcurran reacciones químicas indeseadas de ningún tipo con las sustancias activas o respectivamente con las sustancias de señal, con lo cual se podría modificar el perfil de propiedades farmacológicas de éstas, y por otro lado se reduce al mínimo de esta manera el peligro de una reacción alérgica frente al sistema de suministro de fármacos.

15 Los polímeros ramificados o reticulados poseen, en una forma de realización preferida, una proporción de por lo menos 50 % en peso, de manera preferida situada por encima de 75 % en peso, referida al peso total del soporte. Además de esto, se pueden añadir y mezclar con el soporte otros polímeros adicionales, en particular también polímeros no ramificados y no reticulados de las clases de polímeros que se acaban de mencionar. En una forma de realización especialmente preferida, se emplean como el soporte exclusivamente polímeros ramificados o reticulados.

20 La proporción del soporte en el sistema de suministro de fármacos reivindicado está situada de manera preferida entre 30 % en peso y 99,5 % en peso, de manera más preferida entre 50 % en peso y 98 % en peso, referida al peso total del sistema de suministro de fármacos en forma de partículas. Se realiza que las formulaciones con sustancias activas altamente eficaces poseen de manera preferida una proporción del soporte desde por encima de 80% en peso hasta de 99,5 % en peso, en particular situada entre 90 % en peso y 99 % en peso. Unas formulaciones con sustancias activas usuales poseen, por el contrario, una proporción preferida del soporte de 55 % en peso a 94,5 % en peso, de manera especialmente preferida situada entre 65 % en peso y 94 % en peso.

Como materiales de señal o sustancias de señal en el sentido del presente invento han de entenderse todas las sustancias que pueden iniciar un transporte orientado hacia una diana de una sustancia activa a través de una barrera biológica y que caen dentro del alcance de las reivindicaciones.

30 Unos péptidos de señal conformes al invento son los péptidos con una secuencia de aminoácidos KCFQWQRNMRKVRGPPVSCIQR (SEQ ID No. 3) o CFQWQRNMRKVRGPPVSC (SEQ ID No. 4),

35 Otra forma preferida de realización la constituyen derivados de péptidos con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 3 o 4, siendo intercambiado el radical de metionina por un aminoácido que se escoge entre el conjunto que comprende valina, isoleucina, norvalina, leucina y norleucina. Tales péptidos son p.ej. péptidos con una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

40 KCFQWQRNVRKVRGPPVSCIQR (SEQ ID No. 7),
KCFQWQRNIRKVRGPPVSCIQR (SEQ ID No. 8),
KCFQWQRNXRKVRGPPVSCIQR (SEQ ID No. 9), siendo **X** norvalina,
KCFQWQRNLRKVRGPPVSCIQR (SEQ ID No. 10),
KCFQWQRNXRKVRGPPVSCIQR (SEQ ID No. 28), siendo **X** norleucina,
CFQWQRNVRKVRGPPVSC (SEQ ID No. 11),
CFQWQRNIRKVRGPPVSC (SEQ ID No. 12),
CFQWQRNXRKVRGPPVSC (SEQ ID No. 13), siendo **X** norvalina,
45 CFQWQRNLRKVRGPPVSC (SEQ ID No. 14);
CFQWQRNXRKVRGPPVSC (SEQ ID No. 15), siendo **X** norleucina.

50 Las mencionadas sustancias de señal peptídicas pueden estar marcadas radiactivamente, de manera preferida con un aminoácido marcado radiactivamente, en particular con un aminoácido marcado con tritio. Además de esto, las sustancias de señal pueden estar modificadas también con grupos detectables, estando escogidos tales grupos de manera preferida entre el conjunto de los fluoróforos, los trazadores radiactivos y los haptenos, siendo especialmente apropiado el hapteno biotina.

Mediante el empleo de sustancias de señal humanas, en particular de los péptidos que penetran en células que se derivan de lactoferrina, se pueden reducir al mínimo en particular las reacciones alérgicas dirigidas contra el sistema de suministro de fármacos. Además, los péptidos que se derivan de lactoferrina poseen una alta eficiencia en el caso de la penetración dentro de las células así como en lo que se refiere a la cantidad de péptido o respectivamente de

formulación de péptido que ha sido asimilada en la célula, así como también en lo que se refiere al período de tiempo necesario para la asimilación. Es más aún ventajoso el hecho de que los péptidos, las formulaciones o respectivamente los componentes de las formulaciones que se han asimilado se transportan al citoplasma de la célula.

5 Los péptidos de señal que se derivan de lactoferrina, conformes al invento, presentan interés en particular en lo que se refiere al transporte de la sustancia activa a través del epitelio intestinal, siendo transportada la sustancia activa con una alta eficiencia a las células epiteliales y siendo entregada a continuación al torrente sanguíneo. Para un transporte orientado hacia una diana de sustancias activas, p.ej. a células tumorales, el péptido de señal puede también estar enmascarado. A través de una disociación proteolítica, p.ej. por medio de proteasas que son puestas en libertad por células tumorales, el péptido enmascarado puede ser disociado a su forma funcional que penetra en las células (análogamente a la cita de Jiang, T. y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 17867-17872, 2004).

Por lo demás, los mencionados péptidos de señal se pueden presentar en una forma derivatizada con procedimientos usuales. En particular han de mencionarse en este contexto unos péptidos acetilados o amidificados en el extremo terminal de C, que se distinguen con frecuencia por una buena estabilidad en condiciones fisiológicas. De manera preferida se utilizan no obstante péptidos de señal no modificados.

15 La carga del soporte con una sustancia de señal se efectúa típicamente con una proporción comprendida entre 0,5 % en peso y 20 % en peso, de manera preferida entre 1 % en peso y 10 % en peso, referida al peso total del sistema de suministro de fármacos en forma de partículas.

Por lo demás, es conocido, especialmente a partir de la tecnología de "antisentido", que unos compuestos iónicos, ácidos nucleicos, fragmentos de ácidos nucleicos, compuestos conjugados con ácidos nucleicos y compuestos análogos a ácidos nucleicos pueden reforzar los transportes a través de membranas, es decir que unos fragmentos puros o modificados químicamente se pueden emplear asimismo como estímulo complementario.

25 Puesto que no se efectúa ningún acoplamiento específico, ni de las sustancias activas ni tampoco de las sustancias de señal, la carga del soporte polimérico no está restringida en lo que se refiere a las sustancias activas y de señal utilizables para la producción de los sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas. No obstante, se han de considerar como especialmente ventajosos los sistemas de transporte aquí descritos para sustancias activas o mezclas de sustancias activas, que tienen que ser protegidas contra una descomposición química o enzimática durante el transporte hacia el sitio diana, o respectivamente que para la evitación de efectos secundarios pueden ser puestos en libertad tan sólo junto al sitio diana. Como consecuencia de ello, los descritos sistemas de suministro de fármacos son apropiados en particular para el transporte de péptidos o proteínas eficaces farmacéuticamente. Tales sustancias son p.ej. son proteínas farmacéuticas (farmaproteínas) o sustancias activas proteicas, tales como p.ej. anticuerpos, hormonas peptídicas, receptores o respectivamente sus ligandos peptídicos, o enzimas. A modo de ejemplo se han de señalar acerca de esto el inhibidor de -proteasa, eglina, elastasa, α 1-antitripsina (enfisemas), antitrombina (anticoagulante), angiotensinasa (hipertensión sanguínea), los factores VII, VIII, IX, X, fibrinógeno, trombina, el inhibidor de un activador de plasminógeno (trastornos de la coagulación de la sangre), inmunoglobulinas (inmunización pasiva), ganciclovir, aciclovir, interferones (infecciones causadas por virus, terapia de tumores), un factor de necrosis de tumores, caquectina, la dihidrofolato reductasa, una linfotóxina, interleucinas, proteínas supresoras de tumores, tales como p.ej. la p53 (cáncer), plasmina, urocinasa, hirudina, estreptocinasa, urocinasa, el activador de plasminógeno tisular, la proteína C, la proteína S (trombolisis), la fosfolipasa A₂, uromodulina, la proteína de Tamm-Horsfall (inflamaciones), insulina (diabetes), un inhibidor de tripsina (pancreatitis), lisozima, timopoyetina, antibióticos peptídicos (infecciones bacterianas), eritropoyetina (anemias). No obstante, los sistemas de suministro de fármacos que aquí se describen no permanecen restringidos a tales sustancias activas, sino que se pueden emplear también sustancias activas de bajo peso molecular ("small molecules"), tales como p.ej. muchas sustancias antivirales, sustancias terapéuticas para el hígado, sustancias neuroprotectoras, agentes terapéuticos inmunitarios y supresores de inmunidad, sustancias activas de bajo peso molecular contra enfermedades cardiovasculares o cánceres, agentes analgésicos, sustancias activas antiinflamatorias, antibióticas y antimicrobianas de bajo peso molecular y hormonas de bajo peso molecular, o sustancias activas macromoleculares, tales como p.ej. fragmentos de ácidos nucleicos o los propios ácidos nucleicos (ADN genómicos, ADNc, ARNm, ARNsi, oligonucleótidos antisentido, etc.). Unas sustancias activas de bajo peso molecular son p.ej. compuestos análogos a nucleósidos, β -interferones, ácido α -lipónico, compuestos análogos a péptidos, compuestos inhibidores, agonistas y antagonistas de enzimas o respectivamente de receptores, prostaglandinas, esteroides, agentes citostáticos y antibióticos heterocíclicos. En particular, se pueden emplear también ciertas sustancias activas en forma de sus profármacos.

Una ventaja de las presentes partículas de transporte consiste en que se pueden incorporar también dos o más sustancias activas, en particular también con diferentes propiedades físicas, tales como p.ej. con diferente hidrofilia, juntas dentro de una formulación. Una clasificación farmacológica a este respecto la ofrece el sistema BCS desarrollado por la FDA, que clasifica las sustancias activas medicamentosas en cuatro diferentes clases. Las partículas que aquí se describen son apropiadas en particular para asimilar y recoger precisamente sustancias activas de diferentes clases en un sistema de transporte.

La carga del soporte con una sustancia activa se efectúa típicamente con una proporción comprendida entre 0,001 % en peso y 50 % en peso, referida al peso total del sistema de suministro de fármacos en forma de partículas. Se realiza que unas sustancias activas altamente eficaces están contenidas de manera preferida en una proporción comprendida entre 0,01 % en peso y 1 % en peso, de manera especialmente preferida situada por debajo de 0,1 % en peso. Otras sustancias activas se emplearán en general en una proporción comprendida entre 1 % en peso y 30 % en peso, de manera preferida entre 5 % en peso y 25 % en peso.

La proporción de la sustancia activa en el sistema de suministro de fármacos en forma de partículas es escogida para una formulación farmacéutica de tal manera que se alcanzan de manera preferida entre 0,1 mg y 100 mg de sustancia activa por cada kg de peso corporal de un paciente. En el caso de sustancias activas altamente eficaces, tales como p.ej. hormonas, son suficientes también unas dosificaciones más bajas.

Una característica especialmente preferida de las sustancias de señal y activas aquí utilizadas consiste en que ellas no están modificadas. Por el concepto de "no están modificadas" en el sentido del presente invento se entiende en este contexto que la sustancia de señal o respectivamente la sustancia activa no es derivatizada con ningún grupo funcional o enlazador adicional, con el fin de hacer posible una fijación por enlaces de coordinación o covalentes al soporte o una a otra.

Por el concepto de la "barrera biológica" en el sentido del presente invento, han de entenderse, junto a la membrana celular, en general particularmente también capas de células epiteliales o respectivamente endoteliales. Como consecuencia de ello, también las barreras de órganos o respectivamente tejidos, tales como p.ej. la barrera entre sangre y cerebro (hematoencefálica) o el epitelio intestinal, entran dentro del concepto de la barrera biológica. Se realiza que después del paso a través de las barreras, la vascularización procura un buen transporte ulterior farmacocinético (aspiración por la sustancia activa).

Es decisivo en la estructura de los sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas conformes al invento el hecho de que tanto las sustancias activas como también las sustancias de señal se presentan conglomeradas inespecíficamente con los soportes poliméricos ramificados o reticulados, es decir que no pasan a formar ninguna fijación por enlaces covalentes entre ellas. Dentro del concepto de fijación por enlaces covalentes entran también las fijaciones por enlaces de coordinación, siendo el par de electrones que se ha de fijar puesto a disposición por un partícipe en la fijación para un definido aceptor de pares de electrones. Por el concepto de una fijación por enlaces de coordinación no se abarcan fijaciones inespecíficas algunas, que no son estables y no son selectivas en condiciones fisiológicas. Unas fijaciones específicas por enlaces de coordinación constituyen p.ej. formaciones de complejos, tales como fijaciones de epítomos o fijaciones por enlaces a modo de haptámeros o aptámeros. También las uniones designadas generalmente como fijaciones por enlaces entre huéspedes y anfitriones han de considerarse como un fijación formadora de complejos. Tales fijaciones por enlaces de coordinación se distinguen por su estabilidad y su selectividad de la fijación en condiciones fisiológicas. Unas fijaciones inespecíficas, no selectivas, en el sentido del presente invento son unas interacciones polares o respectivamente unas interacciones lipófilas e interacciones de Van der Waals, que por regla general poseen una entalpía de fijación situada por debajo de 50 kJ/mol o respectivamente por debajo de 20 kJ/mol (por cada radical considerado que está a disposición para una tal fijación). En los sistemas de transporte en forma de partículas que aquí se han descrito, por el contrario, tanto las sustancias de señal como también las correspondientes sustancias activas se presentan preferentemente dispersadas o respectivamente coacervadas simplemente en el material de soporte polimérico.

Los sistemas de suministro de fármacos así estructurados poseen numerosas y variadas ventajas frente a formulaciones habituales de sustancias activas. Así, las sustancias activas y las sustancias de señal se pueden emplear sin modificaciones químicas, con lo cual conservan sus propiedades, en particular tanto en lo que se refiere a su efecto como también en lo que se refiere a los parámetros de ADME. Además, se pueden emplear también unos soportes poliméricos ramificados o reticulados constituidos a base de monómeros naturales o de monómeros presentes en la naturaleza. Así, se pueden obtener unos sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas que sean bien compatibles, que deberían de ser ventajosos en particular también para la evitación de reacciones alérgicas. Por lo demás, los sistemas de suministro de fármacos conformes al invento son más sencillos de producir, puesto que no se debe efectuar ni una funcionalización adicional de componentes individuales ni tampoco una unión específica entre el soporte, la sustancia de señal y/o la sustancia activa. Además, de esta manera se pueden combinar entre sí de modo sencillo diferentes sustancias de señal y sustancias activas, sin que resulte una nueva sustancia activa, tal como ocurre esto p.ej. en el caso de la unión por enlaces covalentes de la proteína Tat (sustancia de señal) con una proteína p53 (sustancia activa) (proteína de fusión Tat-p53). Además de esto no debe efectuarse tampoco ninguna liberación de la sustancia activa, p.ej. a través de una separación proteolítica o enzimática desde el soporte y/o desde la sustancia de señal. Otra ventaja adicional de los sistemas de suministro de fármacos que se han descrito ha de verse en el hecho de que se pueden formular en un sistema de transporte diferentes sustancias de señal y sustancias activas unas junto a otras. También las cantidades de las sustancias de señal y de las sustancias activas, con las que se cargan las partículas de transporte, se pueden escoger libremente y por consiguiente se pueden adaptar a la respectiva indicación sin problemas.

En particular, mediante la utilización de polímeros de soporte dendríticos, a través del tipo y del número de los núcleos funcionales, en particular de grupos polares, se puede ajustar en el soporte la concentración de carga de las partículas con una sustancia activa y con una sustancia de señal; en tal contexto se pueden alcanzar también unas concentraciones de carga desacomodadamente altas, de por encima de 20 % en peso de la sustancia activa y de la sustancia de señal, referidas al peso total de las partículas. Además de esto, a través del número de los grupos funcionales se puede controlar también la cantidad de la sustancia activa puesta en libertad por unidad de tiempo.

En una forma preferida de realización, los péptidos derivados de lactoferrina se pueden incorporar como sustancias de señal en el sistema de suministro de fármacos que se reivindica, usándose para la formulación unos soportes cargados con electricidad negativa o respectivamente bien polarizables. Alternativamente, se pueden emplear también unos soportes con una carga eléctrica neta positiva mediante utilización de una sustancia auxiliar de formulación cargada con electricidad negativa, tal como p.ej. mediante fragmentos de ácidos nucleicos.

Como consecuencia de ello, presentan un interés especial unos sistemas de suministro de fármacos que contienen

- a) un péptido de señal que penetra en células (CPP) que se deriva de lactoferrina
- b) una sustancia activa farmacéutica y
- c) un soporte polimérico a base de homo- o heteropolímeros ramificados o reticulados a base de hidratos de carbono (polisacáridos); a base de poliésteres; a base de poliéteres; a base de polioles; a base de poliolefinas; a base de poli(alquilenglicoles); a base de poliamidas; a base de poliacetales; a base de poliacrilatos; a base de poliacetatos; a base de poliuretanos; a base de polímeros orgánicos de silicio, a base de resinas epoxídicas, a base de polioles, a base de policarbonatos; a base de poli(caprolactonas); a base de poli(glicolidas); a base de poli(lactidas); a base de poli(lactidas-co-glicolidas); o a base de poli(tartratos).

Tales formulaciones son apropiadas en particular para el transporte transcelular de sustancias activas farmacéuticas a través del epitelio intestinal. De modo correspondiente, es especialmente preferida la combinación de CPPs que se derivan de lactoferrina y de agentes terapéuticos para el hígado, tales como p.ej. determinados agentes citostáticos, compuestos análogos a nucleósidos o ácido α -lipónico, un interferón, lamivudina, corticoides, azatioprina, clorambucil, colchicina, metotrexato, ácido ursodesoxicólico, naloxona, amfotericina B, fluconazol y albendazol.

La aplicación de los sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas se puede efectuar p.ej. por vía oral, pulmonar, sublingual, bucal, nasal, ocular o gastrointestinal. En este caso tienen un interés especial en particular las formas de administración por las vías oral e intravenosa. Para esto, las partículas transportadoras pueden ser encapsuladas, sin pérdida de función, adicionalmente con sustancias galénicas usuales en el comercio tales como p.ej. Eudragit®.

La producción de los sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas se puede llevar a cabo mediante diferentes métodos. En este caso, se ha resaltado como un método preferido el procedimiento de coacervación junto a la desecación por atomización, el procedimiento a alta presión con gases comprimidos y la evaporación de disolventes. En principio, la sustancia activa y la sustancia de señal se pueden formular en común o en etapas de trabajo separadas para formar los sistemas de suministro de fármacos conformes al invento.

En el caso de la coacervación se trata de una separación de fases forzada para la precipitación de coloides o respectivamente para la producción de partículas. Esto se puede provocar mediante estímulos externos, tales como la temperatura, el pH, soluciones salinas o agentes no disolventes. Al final, las partículas resultantes se consolidan mediante calor, reticulación, substracción de disolventes o desecación. El procedimiento de coacervación es muy múltiple y variado y se puede llevar a cabo con diferentes polímeros. En este caso se pueden hacer variar libremente el espesor de pared y el tamaño de las partículas así como el grado de carga de una sustancia activa (eficaz). En este caso, también el perfil de liberación de la sustancia activa encapsulada se puede ajustar a los deseos. El procedimiento de coacervación es un procedimiento muy eficiente para la producción de formulaciones en forma de partículas, puesto que permite un alto rendimiento, una alta tasa de carga y una buena reproducibilidad.

Se establece diferencia entre una coacervación simple y una compleja así como entre una separación de fases acuosa y una orgánica (Arshady, R., Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing techniques [microesferas y microcápsulas, una recopilación de técnicas de producción], parte II, Coacervación, Polymer Engineering and Science, 30(15), 905, 1990). En el caso de la coacervación simple pasa a emplearse un componente coloidal, p.ej. una gelatina y en el caso de la coacervación compleja pasan a emplearse dos componentes coloidales cargados eléctricamente con signos opuestos, p.ej. una gelatina y una goma arábica. El principio de la coacervación consiste en que p.ej. una solución acuosa de gelatina se transforma mediante una adición de etanol en un sistema de dos fases, que se compone de una fase rica en gelatina (material coacervado) y una fase pobre en gelatina. Esto es muy similar a un fraccionamiento de polímeros, pero en este caso bajo la acción de fuerzas de cizalladura resultan unas micropartículas con un tamaño medio de 2 – 5.000 μm .

La producción de microcápsulas por coacervación se puede subdividir en tres etapas (1) producción de tres fases no miscibles, (2) deposición del coloide como una envoltura de cápsula y (3) consolidación de la envoltura de cápsula. Las

tres fases no miscibles se componen de un medio externo, de un material de núcleo y del material de envoltura de cápsula. El material de envoltura de cápsula está disuelto en el medio externo y el material de núcleo está dispersado en éste. Por acción de un estímulo externo (temperatura, pH, electrólitos), el material de envoltura de cápsula se vuelve insoluble en el medio externo y se coloca junto a la interfase con el material de núcleo dispersado. Después de una filtración, la envoltura de cápsula es endurecida finalmente mediante acción del calor, reticulación o substracción del disolvente o mediante desecación por atomización o desecación por congelación (liofilización).

La desecación de la formulación de sustancia activa en forma de partículas se efectuaba de una manera especialmente ventajosa mediante lavado de las partículas en un disolvente especialmente volátil (p.ej. etanol, propanol, acetona, diclorometano) con una subsiguiente desecación en un aparato desecador en vacío, de platos o basculante. Alternativamente, ella se podría efectuar también mediante desecación por atomización o por congelación. La fase rica en disolvente, que queda atrás al realizar la separación de las partículas, puede ser reciclada a una mayor escala.

Las micropartículas pueden ser cargadas con una sustancia activa (eficaz), es decir que el material de núcleo corresponde a esta sustancia activa. En este caso, se puede tratar de sustancias hidrófobas o hidrófilas, lo cual conduce a que se tenga que utilizar una separación de fases acuosa y otra orgánica. En el caso de la separación de fases acuosa se pueden encerrar/encapsular sustancias hidrófobas. A la inversa, en el caso de sustancias hidrófilas se necesita una separación de fases orgánica, es decir que el coloide es disuelto en la fase orgánica y después de una acción de un estímulo externo se enriquece sobre la interfase para dar la sustancia hidrófila. Los conceptos de coacervación acuosa y coacervación orgánica representan por consiguiente en cada caso a coloides solubles en agua y solubles en aceite. La carga de las microcápsulas con la sustancia activa y la sustancia de señal está situada en 0,5-70 % en peso y la liberación de la sustancia encerrada se puede iniciar mediante diferentes mecanismos: difusión, disolución del material de envoltura de cápsula, degradación enzimática, etc. Los siguientes materiales de envoltura de cápsulas se utilizan de manera preferida al realizar la coacervación simple: una carboximetilcelulosa, una nitrocelulosa, un poli(alcohol vinílico), poliuretanos, goma laca, carragenano, alginatos, gelatinas, una albúmina, un colágeno, un acetato de celulosa, ftalatos, una etilcelulosa, poli(gliceroles), poliésteres, Eudragits®, etc. En el caso de la coacervación compleja se utilizan de manera preferida las siguientes combinaciones con gelatinas: gelatinas con goma arábiga, carboxipol o pectina.

Otra posibilidad adicional de producir las formulaciones de sustancias activas en forma de partículas conformes al invento, la constituyen unos procedimientos a alta presión con fluidos comprimidos o supercríticos (Gamse y colaboradores, en *Chemie Ingenieur Technik* 77 (2005) 669-680; McHugh y Krukons en "Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practices" [extracción con fluidos supercríticos, principios y prácticas], Stoneham MA 1986, Fages y colaboradores, *Powder Technology* 141 (2004) 219-226 y Bungert y colaboradores, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37, (1997) 3208-3220).

Los procedimientos más conocidos para la producción de partículas con gases comprimidas son el procedimiento GAS (acrónimo de Gas AntiSolvent = gas antidisolvente), el procedimiento PCA (acrónimo de Precipitation with a Compressed fluid Antisolvent = precipitación con un fluido comprimido antidisolvente), el procedimiento PGSS (acrónimo de Particles from Gas Saturated Solutions = partículas procedentes de soluciones saturadas con gas) y el procedimiento RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solutions = expansión rápida de soluciones supercríticas). A continuación, se explican brevemente estos procedimientos.

En el caso del procedimiento GAS se dispone previamente a una temperatura constante dentro de un autoclave una solución que contiene un polímero, una sustancia activa, una sustancia de señal y un disolvente y luego se carga con un gas como agente no disolvente, de manera tal que el polímero y la sustancia activa precipitan en forma de finas partículas. En este caso es conveniente una mezcla a fondo de la solución/suspensión mediante un agitador, con el fin de impedir una aglomeración de las partículas.

Las moléculas de la sustancia de señal y de la sustancia activa se pueden envolver dentro de la matriz polimérica durante la precipitación o se presentan en forma de un núcleo (reservorio), en torno al cual se ha formado un revestimiento polimérico. Se forma entonces una suspensión, que puede ser separada mediante filtración. Mediante lavado de las partículas en un fluido supercrítico se pueden extraer los restos del disolvente. Junto a la posibilidad de llevar a cabo el proceso a temperaturas bajas y por consiguiente protectoras de la sustancia activa, le corresponde un cometido importante sobre todo a la influencia ejercida sobre la cinética de la transformación de fases, es decir la formación de partículas. Puesto que la sobresaturación se puede regular mediante la evolución cronológica y la intensidad de la adición del gas, se puede escoger también la distribución de los tamaños de partículas. En una primera etapa, se inicia la separación de fases y se forman unos núcleos de cristalización en forma de gotitas de la resultante fase rica en polímero, que es la posterior micropartícula. Se trata también de no dejar que estas gotitas se coalezcan y crezcan, sino que se ha de procurar una extracción lo más rápida que sea posible del disolvente a partir de estas gotas. Entonces, las partículas resultan con diámetros pequeños (Gamse y colaboradores, *Chemie Ingenieur Technik* 77 (2005) 669-680 y Bungert y colaboradores, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37, (1997) 3208-3220). Mediante la variación deliberada de estas dos etapas, se pueden ajustar la distribución de partículas y el tamaño de las partículas.

El procedimiento PCA o también el procedimiento SEDS (acrónimo de Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids = dispersión intensificada en solución por fluidos supercríticos) que optimiza los dos tamaños limitativos del procedimiento GAS, a saber la tasa de acumulación de la presión como medio iniciador para la formación de partículas y el transporte de sustancia, con el fin de eliminar el disolvente desde las gotas (Gamse y colaboradores, *Chemie Ingenieur Technik* 77 (2005) 669-680; Fages y colaboradores, *Powder Technology* 141 (2004) 219-226 y Bungert y colaboradores, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37, (1997) 3208-3220). La solución de la sustancia de señal, de la sustancia activa y del polímero que sale del autoclave se consolida en este caso y se pone en contacto en una tobera de inyección con el gas supercrítico y se inyecta conjuntamente dentro de la unidad de precipitación. En un proceso de lavado final, se elimina el disolvente con el fluido supercrítico por extracción a partir de las partículas. Por reunirse la solución y el fluido supercrítico ya poco antes del proceso de atomización dentro de la tobera, mediante el corto período de tiempo de contacto se puede conseguir una alta tasa de acumulación de la presión. Tal como ya se ha expuesto anteriormente, a partir de esto resulta una alta sobresaturación del polímero, de la sustancia activa y de la sustancia de señal. De este modo, se pueden conseguir unas distribuciones homogéneas, así como unos pequeños tamaños de partículas, puesto que después de la separación de fase iniciada se efectúa mediante la inyección un fino dispersamiento, en el que mediante la alta superficie específica de las gotas de la solución de polímero se puede efectuar un mejorado transporte de sustancia desde el disolvente hasta el gas comprimido o supercrítico. Mediante la desecación por atomización supercrítica se pueden combinar una cristalización por desplazamiento y una cristalización por evaporación del disolvente.

El procedimiento PGSS se diferencia fundamentalmente de los procedimientos a alta presión que se han descrito anteriormente, puesto que él se contenta sin ningún disolvente (que con frecuencia es tóxico) para el polímero. Tal como ha sido descrito por Weidner en el documento WO 95/21688, por Gamse y colaboradores, en *Chemie Ingenieur Technik* 77 (2005) 669-680, por Fages y colaboradores en *Powder Technology* 141 (2004) 219-226 y por Bungert y colaboradores en *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37, (1997) 3208-3220, en el caso de este procedimiento se puede aprovechar el efecto de la disminución de la temperatura de transición vítrea de un polímero por medio del fluido supercrítico. El polímero es fundido dentro del fluido supercrítico y la sustancia activa es dispersada en la solución. En tal caso se disminuye también la viscosidad de la masa fundida de polímero. La masa fundida de polímero y gas con la sustancia activa dispersada y la sustancia de señal es descomprimida en la unidad de precipitación a través de una tobera, pudiendo aportarse a la tobera adicionalmente todavía un gas supercrítico. Como consecuencia de la disminución de la temperatura mediante el efecto de Joule-Thomson, la solución se enfría, y el polímero precipita como un polvo fino. Las partículas pueden ser separadas con respecto de la corriente gaseosa a través de un ciclón o de un filtro eléctrico conectado a continuación. De este modo se pueden separar las diferentes fracciones de tamaños. La sustancia activa, a causa de la fusión del polímero, puede ser dispersada en la matriz polimérica. Mediante la descompresión en la tobera resultan unas finas partículas monodispersas.

El procedimiento RESS se asemeja al procedimiento PGSS, puesto que tampoco en este procedimiento se utiliza ningún disolvente orgánico. Tal como ha sido descrito por Gamse y colaboradores en *Chemie Ingenieur Technik* 77 (2005) 669-680, por Fages y colaboradores en *Powder Technology* 141 (2004) 219-226 y por Bungert y colaboradores en *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37, (1997) 3208-3220, primeramente se lleva el polímero a disolución dentro del autoclave a alta presión. La sustancia activa y la sustancia de señal o bien pasan asimismo a disolución o son dispersadas a través de un agitador. En el caso de micropartículas cargadas eléctricamente, corresponde una importancia muy grande a una distribución homogénea de la sustancia activa y de la sustancia de señal en la masa fundida, puesto que a fin de cuentas es el tamaño de las moléculas de la sustancia activa el que constituye la limitación decisiva para el tamaño de las micropartículas (Gamse y colaboradores, *Chemie Ingenieur Technik* 77 (2005) 669-680; Fages y colaboradores, *Powder Technology* 141 (2004) 219-226 y Bungert y colaboradores, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37, (1997) 3208-3220). La solución supercrítica es inyectada en una unidad de precipitación a la presión del medio ambiente. La sobresaturación de la solución o respectivamente de las gotitas al descomprimir se inicia con una velocidad muchísimo más grande en comparación con los procedimientos que arriba se han descrito. Mediante la descompresión, disminuyen en un período de tiempo muy corto la densidad del fluido supercrítico y por consiguiente también la fuerza de disolución hasta valores típicos de los gases. La formación del núcleo y el transporte de sustancia se suceden en este procedimiento inmediatamente una a otro y se optimizan por un valor múltiplo en comparación con los otros procedimientos (Gamse y colaboradores, *Chemie Ingenieur Technik* 77 (2005) 669-680; Fages y colaboradores, *Powder Technology* 141 (2004) 219-226 y Bungert y colaboradores, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37, (1997) 3208-3220).

Con los procedimientos descritos se pueden obtener con facilidad sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas con un diámetro preferido de partículas que es menor que 900 μm , de manera preferida menor que 500 μm . Con los procedimientos descritos se pueden producir también sistemas de suministro de fármacos con un diámetro de las partículas que está comprendido entre 100 nm y 100 μm , pasando a emplearse usualmente unas partículas con un diámetro de partículas comprendido entre 500 nm y 10 μm .

La carga del soporte con la sustancia activa y la sustancia de señal por coacervación o dispersamiento de la sustancia activa y de la sustancia de señal en una masa fundida del polímero de soporte o en una solución rica en el polímero de soporte, se efectúa de manera preferida en un intervalo de temperaturas comprendidas entre -30 $^{\circ}\text{C}$ y +100 $^{\circ}\text{C}$, de manera especialmente preferida entre 0 $^{\circ}\text{C}$ y 60 $^{\circ}\text{C}$. La presión en estos procedimientos está situada de manera preferente entre 0,1 mbar y 20 bares, de manera especialmente preferida entre 1 mbar y 10 bares.

La producción alternativa de la formulación de sustancia activa de acuerdo con el invento mediante desecación por atomización, por el procedimiento GAS (Gas AntiSolvent), por el procedimiento PCA (Precipitation with a Compressed fluid Antisolvent), por el procedimiento PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions) y por el procedimiento RPES (Rapid Expansion of Supercritical Solutions) se efectúa de manera preferida en el intervalo de temperaturas comprendidas entre -30 °C y + 150 °C, de manera preferida entre 0 °C y 100 °C y con unas presiones del sistema situadas entre 0,1 mbar y 250 bares, de manera preferida entre 1 bar y 180 bares.

Como apropiados disolventes para los descritos procedimientos de producción han de mencionarse en particular agua, alcoholes, tales como p.ej. etanol o isopropanol, CO₂ comprimido, propano comprimido, tetrahidrofurano, tolueno, acetona, peróxido de benzoílo, una solución acuosa de HCl, hexano, ácido acético, etanodiol, diclorometano, dicloroetano y líquidos iónicos.

La encapsulación de los sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas, que han sido puestos a disposición de esta manera, en particular para la disponibilidad oral principal, es posible, sin ninguna pérdida de función, con sustancias galénicas usuales en el comercio tales como p.ej. con EUDRAGIT® (Degussa AG, Alemania).

Si se emplean unas variantes de procedimiento especiales de la coacervación o procedimientos de revestimientos especiales (desecación por atomización, el procedimiento de microesferas de Brace, con una tobera coaxial, el revestimiento en capa turbulenta), las sustancias activas y las sustancias de señal se presentan envueltas o respectivamente revestidas en varias capas con uno o varios polímeros de soporte. Así, p.ej. las sustancias de señal pueden estar embebidas en la capa externa, y las sustancias activas pueden estarlo en la capa interna, de manera tal que en primer lugar se libera la sustancia de señal y luego la sustancia activa. Además, se pueden conglomerar también varias diferentes sustancias activas en diferentes capas de partículas.

En el caso de la incorporación de sustancias activas farmacéuticas en formulaciones de medicamentos, p.ej. con los procedimientos que se acaban de describir, se plantean unos requisitos cada vez más especiales en cuanto a la estabilidad de las formulaciones de sustancias activas, el perfil de propiedades del polímero de soporte, el desencadenamiento de la liberación así como la cinética de la liberación. Esto se debe a que las sustancias activas a veces reaccionan de una manera sensible a su entorno (degradación enzimática, temperatura, modificaciones del valor del pH), no son solubles o respectivamente no son lipófilas. Los sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas, producidos con este procedimiento mediante utilización de los soportes poliméricos lineales o ramificados o reticulados más arriba descritos, muestran una estabilidad especialmente alta, con lo cual se pueden liberar de manera controlada o respectivamente se pueden estabilizar en particular sustancias activas farmacéuticas tóxicas, sensibles, reactivas o inestables, en común con las sustancias de señal. Si entonces se utilizan polímeros de soporte ramificados o reticulados, de manera preferida polímeros dendríticos y de manera especialmente preferida polímeros hiperramificados que contienen grupos de poliéster, poli(gliceroles) hiperramificados, polisacáridos o dendrímeros de PAMAM como materiales de soporte, para sustancias activas y sustancias de señal biológicamente activas, se pueden disminuir o suprimir totalmente las desventajas descritas.

Por lo demás, en particular los polímeros de soporte dendríticos, probablemente a causa de sus viscosidades de masa fundida y de solución comparativamente bajas para polímeros, y los procedimientos de encapsulación, se pueden hacer trabajar con cantidades manifiestamente reducidas de disolventes o respectivamente de gases comprimidos. El polímero dendrítico actúa en este caso por sí mismo como disolvente/agente dispersivo. Mediante la disminuida entrada de disolvente, la producción de los sistemas de transporte en forma de partículas se vuelve más segura, en particular se disminuye manifiestamente la liberación de vapores capaces de explosión y perjudiciales para la salud.

Sobre la liberación controlada de la sustancia activa se puede influir en particular mediante el espesor de la capa de polímero de soporte, que rodea a la sustancia activa o respectivamente a la sustancia de señal, mediante el tipo y el número de los grupos funcionales en el polímero de soporte y mediante el tipo del procedimiento de encapsulación. El período de tiempo de liberación es tanto más largo, cuanto más gruesa es la envoltura de polímero de soporte. El espesor del soporte se puede conseguir, junto a la variación de los parámetros del procedimiento (el valor del pH, la temperatura, el disolvente) en particular mediante la modificación de la concentración del polímero en la mezcla de partida. Mediante la utilización de polímeros dendríticos como soportes se puede aumentar la carga del soporte con sustancias activas y de señal hasta un 70 % en peso, de manera tal que se pueden conseguir unos períodos de tiempo de liberación especialmente largos, en el caso de altas cantidades de sustancia activa puestas en libertad. Junto al espesor, la envoltura de polímero de soporte decide sobre el grado de funcionalización o respectivamente el índice de hidroxilo decide sobre el período de tiempo de liberación. Si la liberación de las sustancias activas se debe de efectuar en medios polares, entonces la liberación es tanto más lenta cuantos menos grupos polares libres, p.ej. grupos OH, estén contenidos en el polímero de soporte. Sobre el número de los grupos OH libres se puede influir a su vez mediante una esterificación con ácidos grasos.

La liberación de las sustancias de señal y activas a partir del sistema de suministro de fármacos en forma de partículas se efectúa por medio de diferentes mecanismos, tales como p.ej. por una degradación enzimática del polímero de soporte, mediante procesos de hidrólisis, modificaciones del valor del pH o modificaciones de la temperatura. Para la liberación dirigida hacia una diana de sustancias activas farmacológicas tiene interés sobre todo la degradación

enzimática del soporte. Unos soportes poliméricos especialmente apropiados son a este respecto unos polímeros portadores de grupos de éster, en particular poliésteres ramificados o reticulados, de manera preferida dendríticos.

Los sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas pueden contener además sustancias activas usuales, tales como p.ej. agentes estabilizadores, agentes tensioactivos, aceites, ceras, extractos de plantas, de levaduras y de algas, aminoácidos, derivados de aminoácidos, vitaminas y sus derivados, lípidos bioactivos, tales como colesterol, ceramidas, pseudoceramidas, agentes antioxidantes, agentes de conservación, colorantes y pigmentos.

Descripción de las Figuras:

La Fig. 1a muestra a modo de ejemplo un conglomerado de un soporte, una sustancia activa y una sustancia de señal, que se compone de una sustancia de señal para barreras (1) no modificada incorporada de una manera inespecífica, p.ej. la proteína Tat, de una sustancia activa (2) no modificada incorporada de una manera inespecífica, estando coacervadas la sustancia de señal y la sustancia activa en dos capas con un soporte polimérico ramificado (3). La formulación de sustancia activa está además de ello rodeada por una capa digestiva-oral (4) p.ej. de Eudragit®. En la Fig. 1b se muestra la liberación de la sustancia de señal (8) en la matriz extracelular (5), con lo cual se efectúa la asimilación (9) del sistema de transporte a través de la membrana celular (7) en el plasma celular (6). La Fig. 1c muestra entonces la siguiente liberación (10) de la sustancia activa en la célula.

La Fig. 2 muestra ejemplos esquemáticos de un material de soporte dendrítico, la Fig. 2a muestra a modo de ejemplo un dendrímico, y la Fig. 2b muestra un polímero hiperramificado.

La Fig. 3 muestra una fotografía en un microscopio de fluorescencia de células CHO, que habían sido tratadas con sistemas de suministro de fármacos conformes al invento, habiéndose empleado como sustancia de señal el péptido Tat y como compuesto análogo a la sustancia activa carboxifluoresceína (el agente marcador). Se reconoce la asimilación dirigida hacia una diana del agente marcador en las células CHO, por fuera de las células CHO ya no se puede reconocer después de una incubación durante 30 minutos prácticamente ninguna fluorescencia. Este efecto apoya la tesis de que con el descrito sistema de suministro de fármacos, también mediante estímulos extracelulares no fijados específicamente se pueden transportar sustancias activas a través de una membrana celular (barrera), (lo que se conoce como salto (en inglés hopping).

La Fig. 4 muestra la dependencia con respecto a la concentración, medida mediante una citometría de flujo pasante, de la asimilación de diferentes sustancias de señal peptídicas en células HeLa (péptido Tat, péptido Antp, péptido hLF (con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las posiciones 38 hasta 59 correspondientemente a la SEQ ID No. 1), el péptido bLF (con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las posiciones 33 hasta 50 correspondientemente a la SEQ ID No. 2)).

La Fig. 5 muestra la asimilación, determinada mediante una citometría de flujo pasante, de péptidos hLF marcados con fluoresceína (con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las posiciones 38 hasta 59 correspondientemente a la SEQ ID No. 1) en comparación con los péptidos acortados LF1 y LF2 (con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las posiciones 40 hasta 55 correspondientemente a la SEQ ID No. 1 (LF1) o respectivamente con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las posiciones 40 hasta 50 correspondientemente a la SEQ ID No. 1 (LF2)).

La Fig. 6 muestra el resultado de investigaciones de toxicidad realizadas en células HeLa, en el caso de una incubación durante 0,5 horas o respectivamente durante 6 horas con diferentes concentraciones de péptidos hLF (con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las posiciones 38 hasta 59 correspondientemente a la SEQ ID No. 1).

Las Fig. 7 muestran unos sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas que contienen ácido alfa-lipónico (Fig. 7 A y B) o respectivamente un péptido de señal derivado de lactoferrina humana y de ácido alfa-lipónico.

Ejemplo de realización

En los ejemplos de realización se utilizan las siguientes abreviaturas:

Boc	terc.-butiloxicarbonilo
DIPEA	diisopropiletilamina
DMF	dimetilformamida
EDT	etanoditiol
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
HBTU	hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio
HPLC	cromatografía de líquido a alta presión
Pmc	2,2,5,7,8-pentametil-cromanosulfonilo
tBu	terc.-butilo
TES	triethylsilano

TFA ácido trifluoroacético
 Trt trifenilmetilo.

Ejemplo 1: Producción de un adyuvante de señal peptídico.

- 5 Con una estrategia de Fmoc/tBu se prepara un péptido de señal idéntico a los naturales con la secuencia Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg (secuencia Tat), estando la función amino alfa de los L-aminoácidos empleados protegida con Fmoc y estando protegidas las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales por los siguientes grupos protectores: Boc en el caso de lisina y triptófano; tBu en el caso de ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina y tirosina; Pmc en el caso de arginina; Trt en el caso de cisteína, histidina, asparagina y glutamina.
- 10 El péptido es producido de una manera automática en un aparato sintetizador de péptidos Syroll (de MultiSynTech, Witten, Alemania). Para esto se disponen en caso 70 mg de una Fmoc-Gly-Tritil-resina (carga 0,85 mmol/g; 59,5 μ mol) en jeringas de material sintético con una capacidad de 5 ml, provistas de fritas (cuerpos sinterizados) de material sintético. Los Fmoc-aminoácidos protegidos en las cadenas laterales se disuelven en DMF 0,4 M, como reactivos de activación se emplean HBTU 0,4 M en DMF y DIPEA 0,8 M en DMF, la separación del grupo protector Fmoc provisional se efectúa con piperidina al 40 % en DMF. El acoplamiento de los aminoácidos, la separación del grupo protector Fmoc y las etapas de lavado se efectúan mediando agitación con un agitador magnético.
- 15

Protocolo de síntesis: La resina es en primer lugar hinchada con 2 ml de DMF durante 5 min y filtrada con succión y después de ello lavada todavía tres veces más con 2 ml de DMF. Para la separación del grupo protector Fmoc de la Fmoc-glicina primaria, la resina es reunida con 1,2 ml de piperidina al 40 % en DMF durante 15 minutos, es filtrada con succión y nuevamente reunida con 1,2 ml de piperidina al 40 % en DMF durante 15 min, filtrada con succión y lavada cuatro veces con 2 ml de DMF. Para el acoplamiento se añaden a la resina en primer lugar 600 μ l de la respectiva solución de aminoácidos 0,4 M en DMF (240 μ mol, 4 eq), luego 600 μ l de DIPEA 0,8 M en DMF (480 μ mol, 8 eq) y a continuación 600 μ l de HBTU 0,4 M en DMF (240 μ mol, 4 eq). Después de 1 h, la solución de acoplamiento se filtra con succión y la resina se lava cuatro veces con 2 ml de DMF. Los ulteriores ciclos de acoplamiento se llevan a cabo de una manera análoga a la de la primera partida o posición, efectuándose en primer lugar la separación de Fmoc, tal como se acaba de describir. Con el producto activado y lavado se acopla luego otro aminoácido protegido con Fmoc y el producto de acoplamiento obtenido se lava de nuevo. Después del acoplamiento del último aminoácido, el grupo protector Fmoc se separa tal como arriba se ha indicado, luego la resina es lavada cuatro veces con 2 ml de DMF, 2 ml de metanol y 2 ml de diclorometano y aspirada hasta sequedad. A continuación, el péptido obtenido es tratado durante 3 h con 1,5 ml de una mezcla de TFA/EDT/TES/H₂O (92,5:2,5:2,5:2,5) con el fin de eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales y de separar el péptido constituido desde el soporte sólido. Después de una filtración del péptido resultante, el material filtrado que contiene el péptido es concentrado por evaporación en un evaporador en vacío con IR (infrarrojos) (de TecConsult+Trading, Eggstätt, Alemania) en cada caso hasta 0,5 ml, es reunido con 3,5 ml de dietil-éter enfriado con hielo y es conservado a -20°C durante 2 h. Luego, el péptido precipitado es separado por centrifugación y reunido todavía tres veces con 3,5 ml de enfriado con hielo, suspendido, conservado a -20°C durante 2 h y nuevamente separado por centrifugación. El péptido obtenido es después de esto secado en vacío. El producto obtenido se comprobó mediante una HPLC y una espectrometría de masas.

20

25

30

35

Los compuestos depuradores (scavenger = barredores) necesarios para la síntesis fueron adquiridos de la entidad Fluka (Seelze, Alemania). La resina de síntesis procedía de Rapp Polymere (Tübingen, Alemania), los Fmoc-aminoácidos protegidos en las cadenas laterales así como el HBTU procedían de Novabiochem (Bad Soden, Alemania).

40

Ejemplo 2: Producción de una formulación en forma de partículas

Para esto, se funde en un primer recipiente mezclador a 100 °C un polímero dendrítico (dendrímero de poli(amido-amina) (PAMAM)) con una masa molecular media ponderada M_w de 6.909 g/mol, que tiene una viscosidad de la masa fundida a 80 °C de menos que 3 Pa s, un grado de ramificación de 100 % y un diámetro de la molécula de soporte de PAMAM de aproximadamente 36 Å.

45

Para la estimulación de una sustancia activa se utiliza carboxifluoresceína (agente marcador). La carboxifluoresceína es añadida dosificadamente al primer recipiente mezclador en común con el péptido de señal producido en el Ejemplo 1 hasta que se haya alcanzado una proporción del agente marcador de aproximadamente 1 % en peso y una proporción del péptido de señal de aproximadamente 1 % en peso, referidas a la masa fundida del polímero. La carboxifluoresceína y el péptido de señal se dispersan en tal caso mediante intensa mezclado en la masa fundida de polímero.

50

En un segundo recipiente mezclador se dispone previamente mediando agitación a 50 °C una mezcla de 2 % en peso de pectina (agente estabilizador) y de 1 % en peso de lauril-éter-sulfato (agente emulsionante) en 87 % en peso de agua (agente disolvente), en la que se incorpora dosificadamente la dispersión al 10 % en peso de la mezcla del polímero, del agente marcador y del péptido de señal procedente del primer recipiente mezclador mediando agitación constante (los datos en % peso se refieren aquí al peso total de la emulsión en el segundo recipiente mezclador). Después de un período de tiempo de permanencia de hasta 10 minutos, se sedimentan las resultantes formulaciones en forma de

55

partículas. Las partículas obtenidas, a continuación, se separan por filtración, se lavan con el disolvente fácilmente volátil etanol y luego se secan en un desecador en vacío, de platos o basculante.

La mayor parte de las partículas obtenidas poseen un tamaño de partículas comprendido entre 1 µm y 200 µm.

5 Ejemplo 3: Demostración del transporte a través de una barrera de los sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas:

10 Para esto unas células HeLa o respectivamente CHO se incuban durante 30 min a 37 °C en vasos con tapa de vidrio de 8 cámaras (Nunc) en un medio de Eagle modificado por Dulbecco con y sin agentes indicadores del pH, que contienen 10 µM de los sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas que se han producido en el Ejemplo 2. A continuación, las células se lavan con un medio, se desprenden por tripsinización durante 5 min, se suspenden en una PBS (solución salina tamponada con fosfato) e inmediatamente a continuación se determina la intensidad media de fluorescencia por célula para en total 10.000 células con un citómetro de flujo pasante (BD FACSCalibur System, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). Las células vivas se escogen basando en la dispersión hacia los lados y hacia adelante. Las células escogidas muestran una morfología no perturbada.

15 Todas las mediciones de la asimilación de sustancias activas se llevan a cabo con células vivas mediante un microscopio invertido de barrido de láser LSM510 (de Carl Zeiss, Göttingen, Alemania) mediante utilización de un objetivo Plan-Apochromat 63x 1,4 N.A.. La incubación con un péptido se efectúa tal como ha sido descrito para la citometría de flujo pasante. Para la detección de la carboxifluoresceína, la fluorescencia es excitada con la línea de 488 nm de un láser con iones de argón a través de un divisor de rayos HFT UV/488; la fluorescencia es detectada con un filtro de "paso de banda" BP 505-550.

20 La Fig. 3 muestra a modo de ejemplo el desarrollo de señales de células CHO después de una incubación durante 30 minutos bajo el microscopio de fluorescencia confocal. Esto permite reconocer la buena profundidad de penetración de la señal fluorescente (de la señal de "sustancia activa"). Correspondientemente no se necesita ninguna unión por enlaces covalentes del péptido de señal con la sustancia activa o con el soporte polimérico, con el fin de garantizar el transporte de la sustancia activa a través de la membrana celular.

25 En otro ensayo adicional se produjo, de una manera análoga a la de los Ejemplos 1 y 2, un sistema de suministro de fármacos en forma de partículas con una combinación de los colorantes fluorescentes Cy3 (0,5 % en peso) y Cy5 (0,5 % en peso) y con esto se incubaron células CHO. También en este caso se podía comprobar una asimilación dirigida hacia una diana de ambos colorantes en las células CHO.

Ejemplo 4: Lactoferrina humana y bovina como sustancia de señal

30 Generalidades:

35 Células y reactivos: Las células de carcinoma HeLa humanas utilizadas proceden de la Colección Americana de Cultivos Tipo = American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE.UU). Las células HeLa se cultivaron en el medio RPMI 1640 con glutamina estabilizada y con 2,0 g/l de NaHCO₃ (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania) y con un suero de ternero fetal al 10% (PAN Biotech). La clorobromazina fue adquirida de Calbiochem (Bad Soden, Alemania), la 5-(N-etil-N-isopropil)amilorida (EIPA), la metil-β-ciclodextrina (MβCD) y el MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio] se adquirieron de la entidad Sigma (Deisenhofen, Alemania).

40 Péptidos: Los péptidos utilizados fueron sintetizados por EMC microcollections (Tübingen, Alemania). La pureza de todos los péptidos fue comprobada mediante una HPLC analítica. La identidad de los péptidos fue confirmada mediante una espectrometría de masas MALDI-TOF. La pureza de todos los péptidos era > 95 % (según una HPLC a 214 nm). Los péptidos fueron marcados con carboxifluoresceína en el extremo terminal de N (tal como se describe en la cita de Fischer y colaboradores, Bioconjugate Chem. 14, 653-660, 2003).

45 Solución original de los péptidos: Los péptidos se recogieron en DMSO de manera tal que se obtuvo una solución 10 mM. La solución original obtenida fue reunida además con una PBS o un medio. La concentración de péptidos de la solución original en DMSO se determinó con ayuda de la absorción de carboxifluoresceína. Esto se efectuó mediante una espectrometría de UV/VIS con una dilución a 1:100 de la solución original con un tampón de Tris 0,1 M /HCl (de pH 8,8), la absorción fue medida a 492 nm y se supuso un coeficiente de extinción de la carboxifluoresceína de 75.000 l/(mol·cm).

50 Citometría de flujo pasante: Para la determinación de la eficiencia de la carga con péptidos, unas células HeLa con una densidad de 50.000 por "pocillo" se incorporaron en una placa de 24 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) en un suero que contenía RPMI 1640. Después de un día, las células fueron lavadas con un medio y disueltas con los péptidos en las deseadas concentraciones e incubadas en 300 µl de RPMI 1640 durante 30 min. Cada preparación fue llevada a cabo tres veces. Después de la incubación, las células fueron lavadas con un medio y desprendidas mediante

una tripsinización durante 5 minutos, suspendidas en una PBS enfriada con hielo que contenía 0,1 % (p/v = peso/volumen) de BSA (albúmina de suero bovino y determinadas inmediatamente mediante una citometría de flujo pasante (de BD FACS Calibur Systems, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). En cada muestra se alcanzó la fluorescencia de 7.000 células vitales. Las células vitales fueron determinadas por dispersión hacia los lados y hacia adelante.

Ejemplo 4.1.: Eficiencia de asimilación de péptidos de lactoferrina humana y bovina.

Los péptidos derivados de una lactoferrina humana o bovina se produjeron mediante una síntesis de péptidos en fase sólida. Para la determinación de la asimilación y de la distribución intracelular de los péptidos en células vivas, ambos péptidos fueron modificados con carboxifluoresceína en el extremo terminal de N. Con el fin de determinar si los péptidos de lactoferrina derivados poseen una actividad como péptidos que penetran en las células, la fluorescencia, asociada a células, de las células HeLa incubadas con péptidos bLF o con péptidos hLF se determinó mediante una citometría de flujo pasante. Como comparación, se escogieron los péptidos Antp y Tat como péptidos que penetran en las células, que ya están bien consagrados.

Como se muestra en la Fig. 4, para la totalidad de los cuatro péptidos la fluorescencia celular, medida mediante una citometría de flujo pasante, sube con una concentración creciente de péptidos.

Ejemplo 4.2.: Determinación de conexiones entre la estructura y la actividad.

Con 22 aminoácidos, el péptido hLF es un péptido que penetra en células de longitud mediana. La nonaarginina tiene solamente nueve aminoácidos, y el popular péptido de transporte que penetra en células tiene 27. Cuatro de los siete aminoácidos catiónicos y el aminoácido aromático se presentan en tal caso en la proximidad del radical de citosina. En la proteína completa, el radical de citosina forma un puente de disulfuro, con lo cual el dominio forma una conformación de bucle. Adicionalmente, se ensayó la asimilación celular de unos péptidos acortados (LF1 y LF2, Tabla 1), a los cuales les falta el radical de cisteína situado en un extremo, en comparación con las proteínas completas.

Tabla 1: Estructura primaria de los péptidos ensayados

Nº	Péptido	Secuencia
1	Péptido Tat	Fluo-YGRKKRRQRRR-CONH ₂
2	Péptido Antp	Fluo-RQIKIWFQNRRMKWKK-CONH ₂
3	Péptido hLF	Fluo-KCFQWQRNMRKVRGPPVSCIQR-CONH ₂
4	Péptido bLF	Fluo-PEWFKCRRWQWRMKKLG-CONH ₂
5	Péptido LF1	Fluo-FQWQRNMRKVRGPPVS-CONH ₂
6	Péptido LF2	Fluo-FQWQRNMRKVR-CONH ₂

Todos los péptidos fueron sintetizados como amidas de péptidos. "Fluo" representa la 5(6)-carboxifluoresceína, CONH₂ representa el extremo terminal de C amidificado de los péptidos. Las secuencias de aminoácidos no modificadas corresponden a las SEQ ID No 3 – 6 (Tabla 1, entradas nº 3 -6), la secuencia Tat no modificada corresponde a la SEQ ID No. 27 y la secuencia de Antp no modificada corresponde a la SEQ ID No. 28.

Los resultados de la citometría de flujo pasante se representan en la Fig. 5. La asimilación de los péptidos LF1 y LF2, a los que les faltan las cisteínas, era sólo una décima parte de la cantidad asimilada del péptido hLF, que contiene ambos radicales de cisteína.

Ejemplo 4.3.: Citotoxicidad de los péptidos hLF

En los experimentos que arriba se han descrito se emplearon unas concentraciones de los péptidos hLF situadas en torno a los 40 µM, con lo cual no se observaron efectos citotóxicos algunos. Al realizar la observación de la asimilación de péptidos en células vivas, se utilizaron no obstante unos periodos de tiempo de incubación relativamente cortos, de menos que una hora. Por lo tanto, se ensayó adicionalmente la repercusión de unos periodos de tiempo de incubación más largos y de unas concentraciones más altas de los péptidos sobre la capacidad de supervivencia de las células. Para esto, unas células HeLa fueron incubadas con un péptido hLF con una concentración de 1,25 µM hasta llegar a 160 µM durante 0,5 ó 6 horas. Después de esto se determinó la vitalidad de las células con un ensayo MTT. Los resultados están recopilados en la Fig. 6.

En el caso de unas células, que habían sido incubadas solamente durante 30 min con el péptido, no se pudieron observar efectos citotóxicos algunos hasta llegar a una concentración de 40 µM.

Después de 6 h, con una concentración del péptido de 5 µM, se había reducido ligeramente en la capacidad de supervivencia de las células. En el caso de unas concentraciones superiores a 40 µM, las células fueron aniquiladas.

Ejemplo 5: Carga de partículas de suministro de fármacos con y sin péptidos de señal derivados de lactoferrina humana y ácido α -lipónico

5 Ejemplo 5.1: El poliéster hiperramificado empleado se obtuvo por hidrofugación de un poliéster hiperramificado hidrófilo (obtenible comercialmente de la entidad Perstorp® bajo la denominación Boltorn H30®), que tenía una media ponderada del peso molecular M_w de 3.500 g/mol, una temperatura de transición vítrea de aproximadamente 35 °C y un índice de hidroxilo de aproximadamente 490 mg de KOH/g. La hidrofugación se efectuó mediante esterificación del polímero hidrófilo con una mezcla de ácido esteárico y de ácido palmítico.. (relación referida a la masa del ácido esteárico al ácido palmítico = 2 por 1), siendo convertidos químicamente un 50 % de los grupos hidroxilo del polímero hidrófilo. El peso molecular M_w fue de 7.500 g/mol.

10 Para la producción de la formulación, un 20 % en peso del ácido α -lipónico (CAS: 62-46-4; obtenible comercialmente de la entidad Degussa® AG) se disolvió en el polímero fundido a una temperatura de aproximadamente 65 °C con un aparato agitador de espiral (200 rpm = revoluciones por minuto) en un primer recipiente mezclador en el transcurso de 5 minutos.

15 En otro recipiente mezclador se dispuso previamente mediando agitación a 50 °C una mezcla de agentes tensioactivos que se componía de 1 % en peso de un poli(alcohol vinílico) (peso molecular $M = 6.000$ g/mol, de Polisciencences®, Warrington, EE.UU.) y de 0,1 % en peso de un alcohol graso etoxilado (Tego® Alkanol L4 de la entidad Degussa® AG) en agua.

20 A continuación, la masa fundida de polímero que se había producido en el primer recipiente mezclador, la cual junto al polímero contenía también la sustancia que se había de encapsular, se transfirió desde el primer recipiente mezclador mediando agitación constante (con un ULTRA-TURRAX, a 3.000 rpm) al segundo recipiente mezclador a 50°C. Después de un período de tiempo de permanencia de 2 minutos y de un enfriamiento de la composición contenida en el segundo recipiente mezclador hasta una temperatura, que estaba situada 25 °C por debajo de la temperatura de fusión del polímero, se formaron unas partículas. Con una bomba peristáltica, se aportó la suspensión a una centrifugadora, en la que las partículas de la sustancia activa fueron separadas a 25 °C con respecto de la fase continua. A continuación, las partículas de la sustancia activa fueron secadas en un aparato secador en vacío a 25 °C, y a 10 mbar durante 100 h,

Las partículas estaban exentas de disolventes indeseados y se componían a base del poliéster hiperramificado, modificado con ácidos grasos, y de aproximadamente 4 % en peso de ácido α -lipónico, referido a la masa de las partículas.

30 El contenido de partículas del ácido α -lipónico se determinó mediante una HPLC después de una extracción con metanol o respectivamente con una mezcla de metanol y agua, estaba contenido un 5,4 % en peso de ácido α -lipónico (ácido tióctico).

35 Una muestra de las partículas así obtenidas fue hinchada con el péptido de señal procedente del Ejemplo 4, Tabla 1, nº 3 durante aproximadamente 30 min en una solución de acetonitrilo en agua, se separó por filtración con succión a través de unos filtros y el material polimérico fluorescente seco externamente se fijó a continuación mediante una cinta adhesiva sobre un soporte de tántalo una tira de filtro de papel con el material polimérico cargado y se secó en un alto vacío durante una noche con el fin de eliminar las trazas de acetonitrilo.

40 Una parte de las muestras fue secada, y fijada y puesta en contacto sobre una lámina adhesiva con grafito. En el material de las muestras se representó la morfología mediante fotografía con un microscopio electrónico de barrido. Las correspondientes fotografías se representan en la Fig. 7. En las Figuras 7 A y 7 B se muestran unas fotografías, obtenidas con un microscopio electrónico, de las partículas cargadas con ácido α -lipónico. Las Figuras 7 C y 7 D muestran unas fotografías, obtenidas con un microscopio electrónico, de las partículas cargadas con ácido α -lipónico y con el péptido de señal.

Condiciones de fotografía

45	Microscopio:	Jeol JSM 6400
	Tensión eléctrica de aceleración:	20 KV
	Distancia de trabajo:	15 mm

50 Las partículas obtenidas (con y sin carga con el péptido de señal) fueron caracterizadas mediante una espectroscopía de electrones con fotones de rayos X analítica de superficies (XPS) (aparato de análisis de superficies XPS, de la entidad Leybold, Colonia, con arista de Mg). Los resultados están reproducidos en las Tablas 2 y 3. Las partículas sin el péptido mostraron las señales específicas para átomos del polímero de soporte (C y O), la formulación con el péptido de señal mostró adicionalmente la señal de nitrógeno (N) característica. El resultado muestra que el soporte, el péptido de señal y la sustancia activa están conglomerados/a simplemente es decir no se presentan unidos/a por enlaces covalentes. El péptido de señal es detectable además sobre la superficie de las partículas.

Tabla 2:

Elemento	% en átomos	Órbita	Reg	Intervalo
C	90,30	1s		291.8..279.6
O	9,10	1s	a2	533.6..528.7
S	0,60	2p	a5	167.2..161

Tabla 3:

Elemento	% en átomos	Órbita	Reg	Intervalo
C	91,17	1s		291.6..280.3
N	0,22	1s	a3	402.2..398.3
O	8,34	1s	a2	534..528.3
S	0,27	2p	a5	166..162.2

5

10

Ejemplo 5.2: Para la producción de la formulación se disolvieron en el transcurso de 5 minutos dentro de un primer recipiente mezclador 1 % en peso de ácido α -lipónico (CAS: 62-46-4; obtenible comercialmente de la entidad Degussa® AG) y 4 % en peso de una poli(DL-lactida-co-glicolida) (CAS: 26780-50-7, obtenible comercialmente como RESOMER® RG 502H de la entidad Boehringer Ingelheim) en 95 % en volumen de acetonitrilo a la temperatura ambiente con un agitador de paletas (a 200 rpm).

En otro recipiente mezclador adicional se dispuso previamente mediando agitación a la temperatura ambiente 1 % en peso de un alcohol graso etoxilado (Tego® Alkanol L4 de la entidad Degussa® AG) en aceite de colza (EAN nº 22112682, obtenible de la entidad Associated Oil Packers GmbH).

15

A continuación, la solución de polímero producida en el primer recipiente mezclador, la cual junto al polímero contenía también la sustancia que se había de encapsular, fue transferida a la temperatura ambiente desde el primer recipiente mezclador mediando agitación constante (con un agitador de hélice propulsora, a 500 rpm) a un segundo recipiente mezclador.

20

Después de un período de tiempo de permanencia de 3 horas, el disolvente orgánico se había evaporado y se formaron unas partículas. En el mismo recipiente mezclador el aceite vegetal se mezcló con n-hexano (en la relación en masa 1:1) y a continuación las partículas se separaron por filtración. Las partículas filtradas fueron secadas en un aparato secador en vacío a 50 °C y 10 mbar durante 100 h.

25

El contenido de las partículas en cuanto a ácido α -lipónico fue determinado después de una extracción con metanol o respectivamente con una mezcla de metanol y agua mediante una HPLC, estaba contenido un 0,4 % en peso de ácido α -lipónico (ácido tióctico).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Eberhard Karl universität Tübingen

5 <120> Péptidos útiles como péptidos que penetran en células

<130> 205ut01.wo

<150> EP 05028755.6

10 <151> 2005-12-30

<160> 30

<170> PatentIn version 3.1

15

<210> 1

<211> 711

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(711)

<223> lactoferrina humana

25

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(19)

<223>

30

<400> 1

Met Lys Leu Val Phe Leu Val Leu Leu Phe Leu Gly Ala Leu Gly Leu
1 5 10 15

Cys Leu Ala Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser
20 25 30

Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys
 35 40 45

Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln
 50 55 60

Cys Ile Gln Ala Ile Ala Glu Asn Arg Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp
 65 70 75 80

Gly Gly Phe Ile Tyr Glu Ala Gly Leu Ala Pro Tyr Lys Leu Arg Pro
 85 90 95

Val Ala Ala Glu Val Tyr Gly Thr Glu Arg Gln Pro Arg Thr His Tyr
 100 105 110

Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Gly Ser Phe Gln Leu Asn Glu
 115 120 125

Leu Gln Gly Leu Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Arg Arg Thr Ala Gly
 130 135 140

Trp Asn Val Pro Ile Gly Thr Leu Arg Pro Phe Leu Asn Trp Thr Gly
 145 150 155 160

Pro Pro Glu Pro Ile Glu Ala Ala Val Ala Arg Phe Phe Ser Ala Ser
 165 170 175

Cys Val Pro Gly Ala Asp Lys Gly Gln Phe Pro Asn Leu Cys Arg Leu
 180 185 190

Cys Ala Gly Thr Gly Glu Asn Lys Cys Ala Phe Ser Ser Gln Glu Pro
 195 200 205

Tyr Phe Ser Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Arg Asp Gly Ala Gly
 210 215 220

Asp Val Ala Phe Ile Arg Glu Ser Thr Val Phe Glu Asp Leu Ser Asp
 225 230 235 240

Glu Ala Glu Arg Asp Glu Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asp Asn Thr Arg
 245 250 255

Lys Pro Val Asp Lys Phe Lys Asp Cys His Leu Ala Arg Val Pro Ser
 260 265 270

His Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asn Gly Lys Glu Asp Ala Ile Trp
 275 280 285

Asn Leu Leu Arg Gln Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asp Lys Ser Pro
 290 295 300

Lys Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro Ser Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe
 305 310 315 320
 Lys Asp Ser Ala Ile Gly Phe Ser Arg Val Pro Pro Arg Ile Asp Ser
 325 330 335
 Gly Leu Tyr Leu Gly Ser Gly Tyr Phe Thr Ala Ile Gln Asn Leu Arg
 340 345 350
 Lys Ser Glu Glu Glu Val Ala Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys
 355 360 365
 Ala Val Gly Glu Gln Glu Leu Arg Lys Cys Asn Gln Trp Ser Gly Leu
 370 375 380
 Ser Glu Gly Ser Val Thr Cys Ser Ser Ala Ser Thr Thr Glu Asp Cys
 385 390 395 400
 Ile Ala Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly
 405 410 415
 Gly Tyr Val Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala
 420 425 430
 Glu Asn Tyr Lys Ser Gln Gln Ser Ser Asp Pro Asp Pro Asn Cys Val
 435 440 445
 Asp Arg Pro Val Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Arg Arg Ser
 450 455 460
 Asp Thr Ser Leu Thr Trp Asn Ser Val Lys Gly Lys Lys Ser Cys His
 465 470 475 480
 Thr Ala Val Asp Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Leu
 485 490 495
 Phe Asn Gln Thr Gly Ser Cys Lys Phe Asp Glu Tyr Phe Ser Gln Ser
 500 505 510
 Cys Ala Pro Gly Ser Asp Pro Arg Ser Asn Leu Cys Ala Leu Cys Ile
 515 520 525
 Gly Asp Glu Gln Gly Glu Asn Lys Cys Val Pro Asn Ser Asn Glu Arg
 530 535 540
 Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Asn Ala Gly
 545 550 555 560
 Asp Val Ala Phe Val Lys Asp Val Thr Val Leu Gln Asn Thr Asp Gly
 565 570 575
 Asn Asn Asn Glu Ala Trp Ala Lys Asp eu Ala Asp Phe Ala

Cys Leu Ala Ala Pro Arg Lys Asn Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Gln
 20 25 30

Pro Glu Trp Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu
 35 40 45

Gly Ala Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe Ala Leu Glu Cys
 50 55 60

Ile Arg Ala Ile Ala Glu Lys Lys Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Gly
 65 70 75 80

Gly Met Val Phe Glu Ala Gly Arg Asp Pro Tyr Lys Leu Arg Pro Val
 85 90 95

Ala Ala Glu Ile Tyr Gly Thr Lys Glu Ser Pro Gln Thr His Tyr Tyr
 100 105 110

Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Gln Leu
 115 120 125

Gln Gly Arg Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp
 130 135 140

Ile Ile Pro Met Gly Ile Leu Arg Pro Tyr Leu Ser Trp Thr Glu Ser
 145 150 155 160

Leu Glu Pro Leu Gln Gly Ala Val Ala Lys Phe Phe Ser Ala Ser Cys
 165 170 175

Val Pro Cys Ile Asp Arg Gln Ala Tyr Pro Asn Leu Cys Gln Leu Cys
 180 185 190

Lys Gly Glu Gly Glu Asn Gln Cys Ala Cys Ser Ser Arg Glu Pro Tyr
 195 200 205

Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Gln Asp Gly Ala Gly Asp
 210 215 220

Val Ala Phe Val Lys Glu Thr Thr Val Phe Glu Asn Leu Pro Glu Lys
 225 230 235 240

Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asn Asn Ser Arg Ala
 245 250 255

Pro Val Asp Ala Phe Lys Glu Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His
 260 265 270

Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asp Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Lys
 275 280 285

Leu Leu Ser Lys Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asn Lys Ser Arg Ser
 290 295 300

Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro Pro Gly Gln Arg Asp Leu Leu Phe Lys
 305 310 315 320

Asp Ser Ala Leu Gly Phe Leu Arg Ile Pro Ser Lys Val Asp Ser Ala
 325 330 335

Leu Tyr Leu Gly Ser Arg Tyr Leu Thr Thr Leu Lys Asn Leu Arg Glu
 340 345 350

Thr Ala Glu Glu Val Lys Ala Arg Tyr Thr Arg Val Val Trp Cys Ala
 355 360 365

Val Gly Pro Glu Glu Gln Lys Lys Cys Gln Gln Trp Ser Gln Gln Ser
 370 375 380

Gly Gln Asn Val Thr Cys Ala Thr Ala Ser Thr Thr Asp Asp Cys Ile
 385 390 400

Val Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Leu Asn Leu Asp Gly Gly
 405 410 415

Tyr Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu
 420 425 430

Asn Arg Lys Ser Ser Lys His Ser Ser Leu Asp Cys Val Leu Arg Pro
 435 440 445

Thr Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Lys Lys Ala Asn Glu Gly
 450 455 460

Leu Thr Trp Asn Ser Leu Lys Asp Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val
 465 470 475 480

Asp Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Ile Val Asn Gln
 485 490 495

Thr Gly Ser Cys Ala Phe Asp Glu Phe Phe Ser Gln Ser Cys Ala Pro
 500 505 510

Gly Ala Asp Pro Lys Ser Arg Leu Cys Ala Leu Cys Ala Gly Asp Asp
 515 520 525

Gln Gly Leu Asp Lys Cys Val Pro Asn Ser Lys Glu Lys Tyr Tyr Gly
 530 535 540

Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Asp Val Gly Asp Val Ala
 545 550 555 560

Phe Val Lys Asn Asp Thr Val Trp Glu Asn Thr Asn Gly Glu Ser Thr
 565 570 575

Ala Asp Trp Ala Lys Asn Leu Asn Arg Glu Asp Phe Arg Leu Leu Cys
 580 585 590

Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Thr Glu Ala Gln Ser Cys His Leu
 595 600 605

Ala Val Ala Pro Asn His Ala Val Val Ser Arg Ser Asp Arg Ala Ala
 610 615 620

His Val Lys Gln Val Leu Leu His Gln Gln Ala Leu Phe Gly Lys Asn
 625 630 635 640

Gly Lys Asn Cys Pro Asp Lys Phe Cys Leu Phe Lys Ser Glu Thr Lys
 645 650 655

Asn Leu Leu Phe Asn Asp Asn Thr Glu Cys Leu Ala Lys Leu Gly Gly
 660 665 670

Arg Pro Thr Tyr Glu Glu Tyr Leu Gly Thr Glu Tyr Val Thr Ala Ile
 675 680 685

Ala Asn Leu Lys Lys Cys Ser Thr Ser Pro Leu Leu Glu Ala Cys Ala
 690 695 700

Phe Leu Thr Arg
 705

<210> 3
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

<400> 3

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
 1 5 10 15

Val Ser Cys Ile Lys Arg

<210> 4
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO

<223> sintética

<400> 4

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
1 5 10 15

Ser Cys

5 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

15 <400> 5
Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
1 5 10 15

20 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

<400> 6

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

30 <210> 7
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

<400>7

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Val Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
1 5 10 15

Val ser cys Ile Lys Arg
20

45 <210> 8
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética
 <220>
 5 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

 <400> 8

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Ile Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
1 5 10 15

Val Ser Cys Ile Lys Arg
20
 10 <210> 9
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética
 20
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <222> (9)..(9)
 <223> norvalina
 25
 <400> 9

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
1 5 10 15

Val Ser Cys Ile Lys Arg
20

 <210> 10
 <211> 22
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética
 35 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

 <400> 10

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Leu Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
1 5 10 15

Val Ser Cys Ile Lys Arg
20
 40
 <210> 11
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> sintética
 <220>

<221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

<400> 11

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Val Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
1 5 10 15

Ser Cys

5

<210> 12
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

15

<400> 12

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Ile Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
1 5 10 15

Ser Cys

20

<210> 13
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

30

<220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <222> (8)..(8)
 <223> norvalina

35

<400> 13

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
1 5 10 15

Ser Cys

40

<210> 14
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

<400> 14

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Leu Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
1 5 10 15

Ser Cys

<210> 15
 <211> 18
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética
 <220>
 10 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

<220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 15 <222> (8)..(8)
 <223> norleucina

<400> 15

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val
1 5 10 15

Ser Cys

20 <210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

30 <400> 16

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Val Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
1 5 10 15

35 <210> 17
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

45 <400> 17

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Ile Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
1 5 10 15

<210> 18

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

10

<220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <222> (7)..(7)
 <223> norvalina

15

<400> 18

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
1 5 10 15

<210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> sintética
 <220>

25

<221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

30

<400> 19

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Leu Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
1 5 10 15

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> sintética
 <220>

40

<221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

45

<220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <222> (7)..(7)
 <223> norleucina

<400> 20

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser
1 5 10 15

50

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> sintética
 <220>

<221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

5 <400> 21

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Val Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética
 <220>

15 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

<400> 22

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Ile Arg Lys Val Arg
1 5 10

20 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

30 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <222> (7)..(7)
 <223> norvalina

35 <400> 23

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintética
 <220>

45 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

<400> 24

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Leu Arg Lys Val Arg
1 5 10

50 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 373 118 T3

atgaaacttg	tcttcctcgt	cctgctgttc	ctcggggccc	tggactgtg	tctggctggc	60
cgtaggagaa	ggagtgttca	gtggtgcgcc	gtatcccaac	ccgaggccac	aaaatgcttc	120
caatggcaaa	ggaatatgag	aaaagtgcgt	ggccctcctg	tcagctgcat	aaagagagac	180
tccccatcc	agtgtatcca	ggcatttgcg	gaaaacaggg	ccgatgctgt	gacccttgat	240
ggtggtttca	tatacgaggc	aggcctggcc	ccctacaaac	tgcgacctgt	agcggcggaa	300
gtctacggga	ccgaaagaca	gccacgaact	cactattatg	ccgtggctgt	ggtgaagaag	360
ggcggcagct	ttcagctgaa	cgaactgcaa	ggtctgaagt	cctgccacac	aggccttcgc	420
aggaccgctg	gatggaatgt	ccctacaggg	acacttcgtc	cattcttgaa	ttggacgggt	480
ccacctgagc	ccattgaggc	agctgtggcc	aggttcttct	cagccagctg	tgttcccggc	540
gcagataaag	gacagttccc	caacctgtgt	cgctgtgtg	cggggacagg	ggaaaacaaa	600
tgtgccttct	cctcccagga	accgtacttc	agctactctg	gtgccttcaa	gtgtctgaga	660
gacggggctg	gagacgtggc	ttttatcaga	gagagcacag	tgtttgagga	cctgtcagac	720
gaggctgaaa	gggacgagta	tgagttactc	tgcccagaca	acactcggaa	gccagtggac	780
aagtcaaaag	actgccatct	ggccccgggc	ccttctcatg	ccgttggtgc	acgaagtgtg	840
aatggcaagg	aggatgccat	ctggaatctt	ctccgccagg	cacaggaaaa	gtttggaaag	900
gacaagtcaac	cgaaattcca	gctctttggc	tcccctagtg	ggcagaaaga	tctgctgttc	960
aaggactctg	ccattggggt	ttcgaggggtg	cccccgagga	tagattctgg	gctgtacctt	1020
ggctccggct	acttcaactgc	catccagaac	ttgaggaaaa	gtgaggagga	agtggctgcc	1080
cggcgtgcgc	gggtcgtgtg	gtgtgcgggtg	ggcgagcagg	agctgcgcaa	gtgtaaccag	1140
tggagtggct	tgagcgaagg	cagcgtgacc	tgctcctcgg	cctccaccac	agaggactgc	1200
atcgccctgg	tgctgaaagg	agaagctgat	gccatgagtt	tggatggagg	atatgtgtac	1260
actgcatgca	aatgtggttt	ggtgcctgtc	ctggcagaga	actacaaatc	ccaacaaagc	1320
agtgaccctg	atcctaactg	tgtggataga	cctgtggaag	gatatcttgc	tgtggcgggtg	1380
gttaggagat	cagacactag	ccttacctgg	aactctgtga	aaggcaagaa	gtcctgccac	1440
accgccgtgg	acaggactgc	aggctggaat	atccccatgg	gcctgctctt	caaccagacg	1500
ggctcctgca	aatttgatga	atatttcagt	caaagctgtg	cccctgggtc	tgacctgaga	1560

tctaattctct gtgctctgtg tattggcgac gagcaggggtg agaataagtg cgtgccaac 1620
 agcaacgaga gatactacgg ctacactggg gctttccggt gcctggctga gaatgctgga 1680
 gacgttgcat ttgtgaaaga tgtcactgtc ttgcagaaca ctgatggaaa taacaatgag 1740
 gcatgggcta aggatttgaa gctggcagac tttgcgctgc tgtgcctcga tggcaaacgg 1800
 aagcctgtga ctgaggctag aagctgccat cttgccatgg ccccgaatca tgccgtggtg 1860
 tctcggatgg ataaggtgga acgcctgaaa caggtgctgc tccaccaaca ggctaaattt 1920
 gggagaaatg gatctgactg cccggacaag ttttgcttat tccagtctga aaccaaaaac 1980
 cttctgttca atgacaacac tgagtgtctg gccagactcc atggcaaaaac aacatatgaa 2040
 aaatatttgg gaccacagta tgtcgcaggc attactaatc tgaaaaagtg ctcaacctcc 2100
 cccctcctgg aagcctgtga attcctcagg aagtaa 2136

5 <210> 28
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

15 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <222> (9)..(9)
 <223> norleucina

<400> 28

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Xaa Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
 1 5 10 15

Val Ser Cys Ile Lys Arg
 20

20 <210> 29
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> ASPECTO_DIVERSO
 <223> sintética

<400> 29

Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser
 1 5 10 15

Ile Thr Cys Val Arg Arg
 20

35 <210> 30
 <211> 18
 <212> PRT

ES 2 373 118 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

5 <220>

<221> ASPECTO_DIVERSO

<223> sintética

10 <400> 30

Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser Ile
1 5 10 15

Thr Cys

REIVINDICACIONES

1. Sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas, que se basan en un soporte polimérico, por lo menos una sustancia de señal para el transporte a través de una barrera biológica y por lo menos una sustancia activa, no teniendo el soporte, la sustancia de señal y la sustancia activa uniones algunas por enlaces covalentes entre sí,
5 **caracterizados porque** la sustancia de señal es un péptido derivado de lactoferrina, y las sustancias activas y las sustancias de señal se presentan envueltas o revestidas en varias capas con el polímero de soporte, presentándose embebidas las sustancias de señal en la capa externa y las sustancias activas en la capa interna, teniendo el péptido derivado de lactoferrina una secuencia según la SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 4, o teniendo una secuencia según la SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 4,
10 siendo intercambiado el radical de metionina por un aminoácido, que se escoge entre el conjunto formado por valina, isoleucina, norvalina, leucina y norleucina.
2. Sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizados porque** tanto la sustancia de señal como también la sustancia activa se presentan dispersadas o coacervadas en el soporte polimérico.
- 15 3. Sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizados porque** el soporte polimérico contiene por lo menos un polímero ramificado o reticulado con una proporción de por encima de 50 % en peso, referida al peso total del soporte.
4. Sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 hasta 3, **caracterizados porque** como soporte polimérico se emplea un polímero dendrítico.
- 20 5. Sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 hasta 4, **caracterizados porque** el soporte polimérico está ramificado y es un hidrogel o un polímero en forma de peine.
6. Sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 hasta 5, **caracterizados porque** como soporte polimérico se emplea un polímero dendrítico con una masa molecular mayor que 1.000 g/mol y/o con una viscosidad de la masa fundida menor que 3,0 Pas a 80 °C.
- 25 7. Sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 6, **caracterizados porque** el polímero de soporte es un polímero de soporte dendrítico escogido entre el conjunto formado por los dendrímeros de poli(amido-aminas), los dendrímeros de poli(propilen-iminas), los dendrímeros basados en poli(óxidos de etileno), los dendrímeros de poliéteres, los dendrímeros de poliamidas, los dendrímeros de poli(lisinas), los dendrímeros de poli(aril-éteres) y/o un polímero dendrítico escogido entre el conjunto de los poliésteres, las poli(éster-amidas, los poliésteres, las poliamidas, las poli(etilen-iminas); las poli(caprolactonas) los poli(gliceroles) las poli(glicolidas), las poli(lactidas), las poli(lactidas-co-glicolidas), los poli(tartratos) y los polisacáridos;
30 y/o un polímero de soporte ramificado o reticulado escogido entre el conjunto formado por los homo- o copolímeros de hidratos de carbono naturales y artificiales, los polímeros de aminoácidos naturales y artificiales, los ácidos nucleicos naturales y artificiales, las poliaminas, las poliiminas, los poliésteres, los poliéteres, los polioles, los poliolefinas, los poli(alquilenglicoles), las poliamidas, los poliacetales, los poliacrilatos, los poliacetatos, los poliuretanos, los polímeros orgánicos de silicio, las resinas epoxídicas, los polioles, los policarbonatos, las poli(caprolactonas), las poli(glicolidas), las poli(lactidas), las poli(lactidas-co-glicolidas) y los poli(tartratos).
- 35 8. Sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 7, **caracterizados porque** la sustancia de señal es una sustancia de señal no modificada que contiene un dominio de transducción (PTD).
- 40 9. Sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 hasta 8, **caracterizados porque** la sustancia activa es una sustancia activa farmacéutica no modificada.
- 45 10. Procedimiento para la producción de sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 hasta 9, **caracterizado porque** las partículas de los sistemas de suministro de fármacos se producen mediante coacervación o mediante un procedimiento a alta presión mediante utilización de un gas comprimido o supercrítico en un intervalo de temperaturas comprendidas entre -30 °C y +150 °C y a una presión situada entre 0,1 mbar y 250 bares.
- 50 11. Utilización de soportes poliméricos ramificados o reticulados para la producción de sistemas de suministro de fármacos en forma de partículas de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 hasta 9.

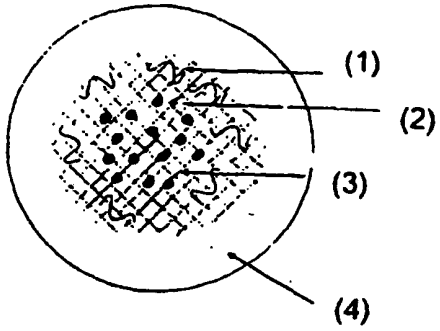


Fig. 1a

Fig. 1b

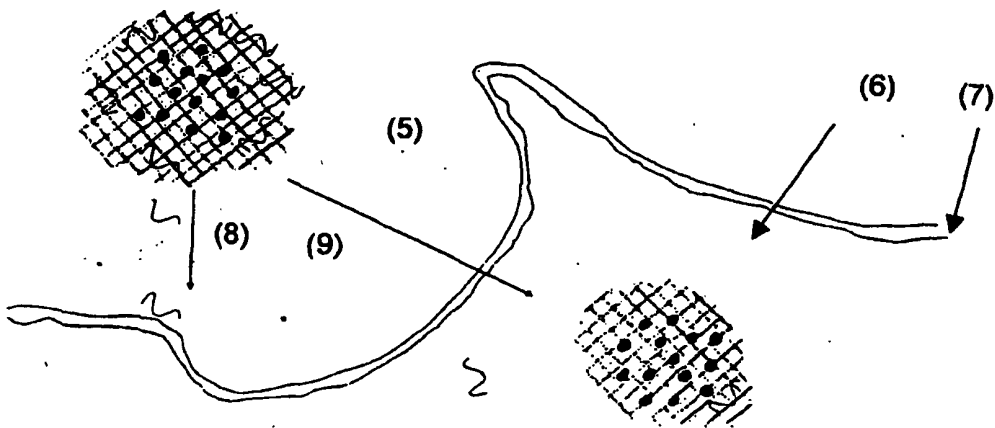


Fig. 1c

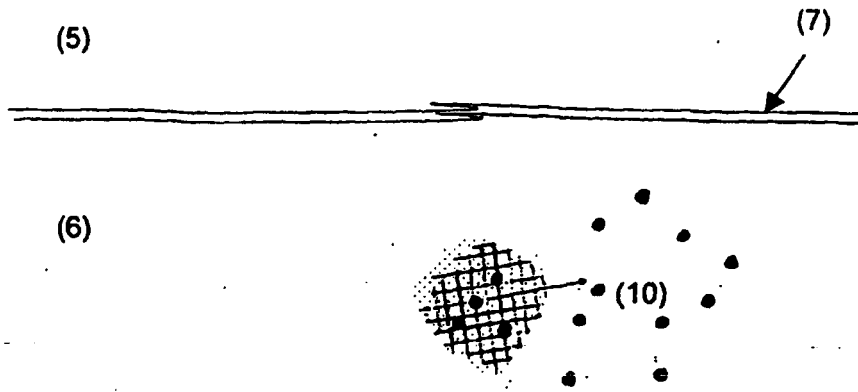


Fig. 2a

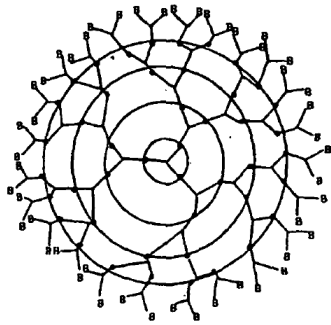


Fig. 2b

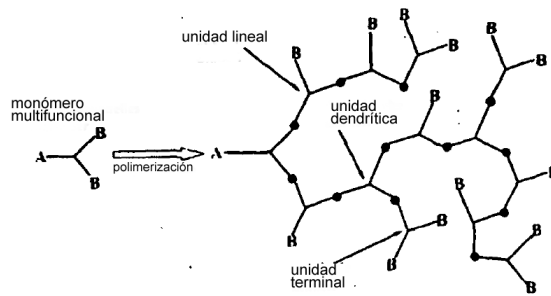
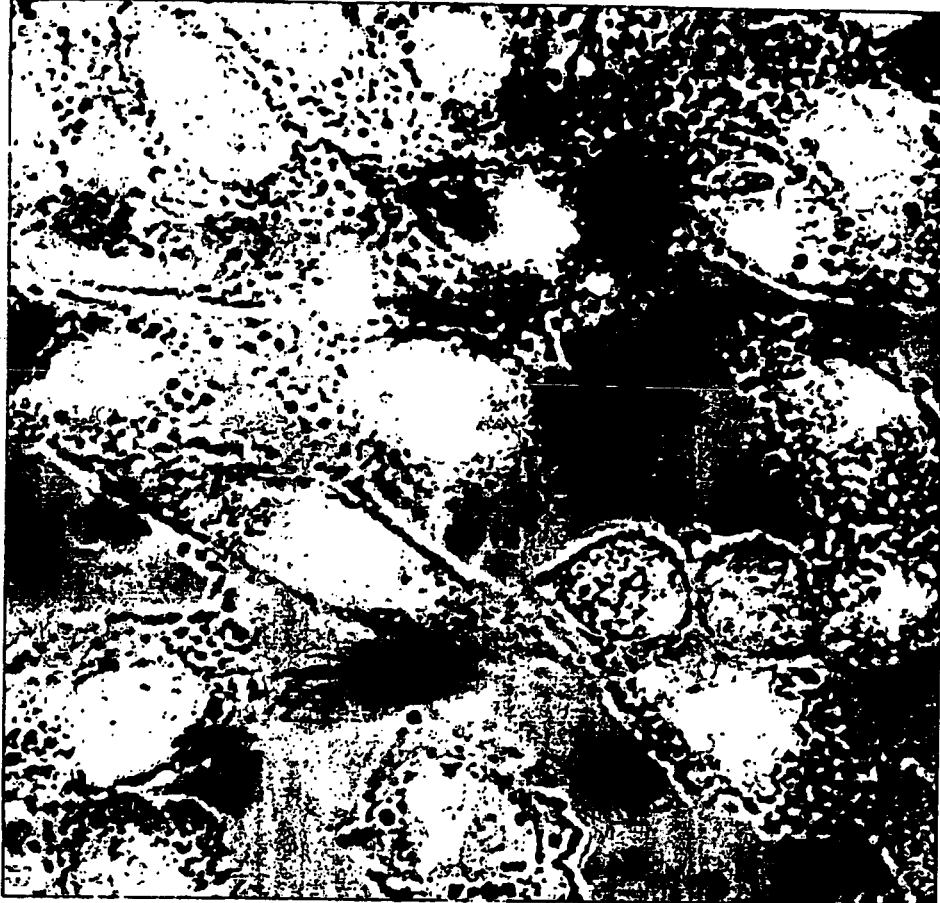


Fig. 3



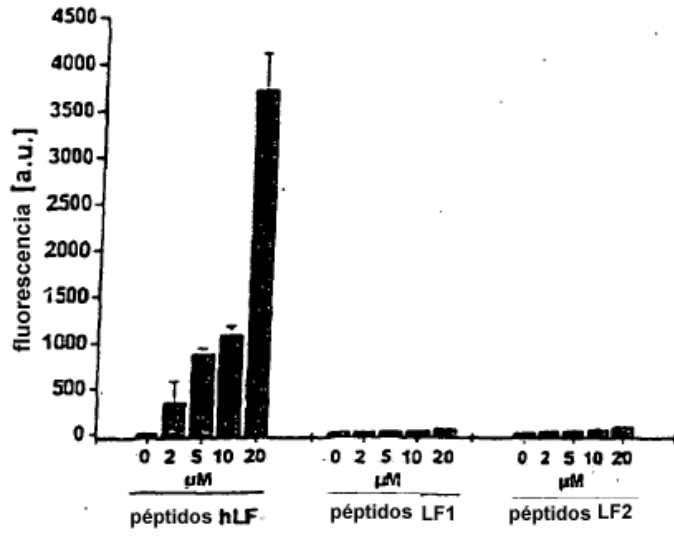


Fig. 4

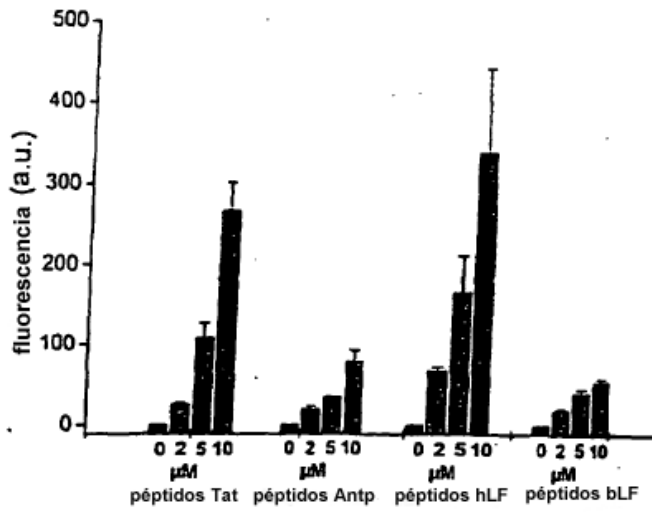


Fig. 5

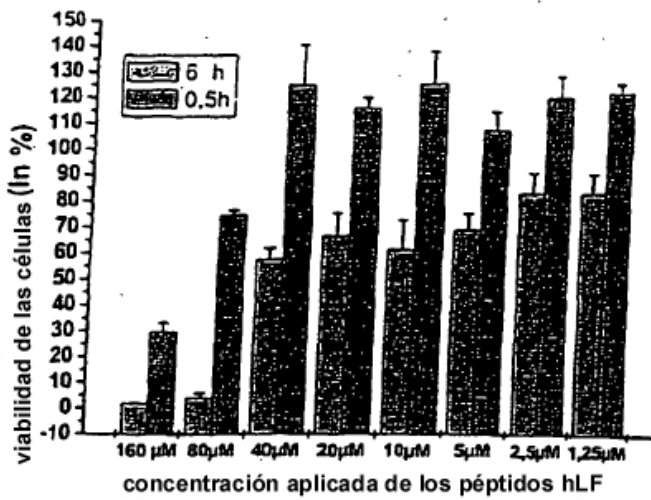


Fig. 6



A



B



C



D

Fig. 7