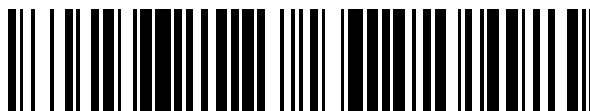


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 715**

51 Int. Cl.:

A61K 47/34

(2006.01)

C08G 63/91

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05739818 .2**

96 Fecha de presentación: **06.05.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1742665**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2007**

54 Título: **SISTEMA DE LIBERACIÓN PARA AGENTES BIOACTIVOS SOBRE LA BASE DE UN PORTADOR POLIMÉRICO DE FÁRMACOS QUE COMPRENDE UN POLÍMERO DE BLOQUES ANFÍFILO Y UN DERIVADO DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO).**

30 Prioridad:
06.05.2004 US 568945 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPÍ:
05.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.03.2012

73 Titular/es:
**SAMYANG CORPORATION
263, YEONJI-DONG
JONGRO-GU, SEOUL 110-470, KR**

72 Inventor/es:
**YI, Yil-Woong;
LEE, Sa-Won;
YU, Jeong-Il;
CHANG, Dong-Hoon;
SEO, Min-Hyo;
KANG, Hye-Won y
KIM, Jae-Hong**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

ES 2 375 715 T3

DESCRIPCIÓN

Sistema de liberación para agentes bioactivos sobre la base de un portador polimérico de fármacos que comprende un polímero de bloques anfífilo y un derivado de poli(ácido láctico)

REFERENCIA CRUZADA A UNA SOLICITUD RELACIONADA

- 5 Esta solicitud reclama prioridad sobre y los beneficios de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 60/568.945 en la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos el 6 de Mayo de 2004, cuyo contenido completo se incorpora a la presente como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

- 10 La presente invención se refiere a un sistema de liberación y a un método para la liberación intracelular de agentes bioactivos utilizando portadores poliméricos de fármacos. Más concretamente, se refiere a un método para la liberación intracelular de agentes bioactivos utilizando portadores poliméricos de fármacos formados a partir de (a) un copolímero de bloques anfífilo que comprende un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo, donde dicho bloque hidrófobo tiene un grupo hidroxilo terminal que está sustituido con un grupo tocoferol o colesterol, y (b) un derivado de poli(ácido láctico) que tiene al menos un grupo carboxilo terminal en el extremo del polímero.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 Con el fin de lograr el efecto terapéutico deseado de un agente bioactivo, una cantidad apropiada del fármaco administrado se debe introducir en las células diana en un organismo. Con el fin de aumentar la internalización celular de un fármaco, se debe mantener una concentración apropiada del fármaco durante un período de tiempo deseado en el tejido diana; además, el fármaco se debe introducir en las células diana en el tejido. Una alta concentración de fármaco en un tejido se puede lograr por medio de una formulación que exhiba un tiempo de circulación en sangre prolongado. Por lo tanto, se han realizado grandes esfuerzos para desarrollar sistemas de liberación de fármacos por medio del uso de portadores para fármacos nanoparticulados, incluyendo liposomas y micelas poliméricas, que tienen tiempos de circulación prolongados.

- 20 Se han sugerido muchos enfoques para potenciar la absorción intracelular de los agentes bioactivos. También se han descrito vehículos de liberación tales como los liposomas para su uso en la liberación intracelular de agentes bioactivos tales como oligonucleótidos (Felgner, et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.264.618 (1993); Eppstein, et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.897.355 (1990); y Wang, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 7851-7855 (1987); Patente de los Estados Unidos Núm. 5.759.519 (1998), documento WO 2005035606, documento WO 03033592. El uso de liposomas como portadores de fármacos, sin embargo, está limitado debido a problemas tales como la baja eficacia de atrapamiento, la inestabilidad del fármaco, la rápida filtración del fármaco, y la escasa estabilidad de almacenamiento. Las pequeñas micelas de tensioactivo molecular se disocian fácilmente cuando se diluyen con fluidos corporales después de ser administrados al organismo; de manera que es difícil para ellos realizar su papel como portadores de fármacos.

- 25 En los últimos años, se han realizado esfuerzos para la preparación, caracterización y aplicación farmacéutica de micelas poliméricas. Estas fueron bien caracterizadas por V. Torchilin en Journal of Controlled Release 73(2001) págs.137-172. Las micelas poliméricas están caracterizadas por una estructura de núcleo-envoltura en medios acuosos que resulta de los copolímeros de bloques anfífilos que tienen segmentos hidrófobos (núcleo) e hidrófilos (envoltura). Un fármaco escasamente soluble en agua es atrapado en el interior del núcleo hidrófobo de la micela. Ha habido una investigación considerable en el desarrollo de copolímeros de bloques A-B, A-B-A, o B-A-B que tienen un bloque A hidrófilo y un bloque B hidrófobo. Para su uso como portador de fármaco, se prefiere que el hidrófobo B (bloque del núcleo interno de la micela) comprenda un polímero biodegradable tal como poli-DL-lactida, poli-ε-caprolactona o poli(γ-bencil-L-aspartato) y que el hidrófilo A (bloque de la envoltura externa de la micela) sea un polímero que sea capaz de interactuar con proteínas plasmáticas y membranas celulares, tales como polietilenglicol (PEG).

- 30 Las micelas poliméricas proporcionan características atractivas ya que pueden evitar la absorción del fármaco por el sistema reticuloendotelial (SRE) o el sistema fagocítico mononuclear (SFM) in vivo, y por tanto, pueden circular en la sangre durante un período de tiempo prolongado. Esta ventaja proviene de la estructura de la micela. Las porciones hidrófilas de un copolímero de bloques anfífilo forman la envoltura externa y están expuestas al fluido corporal, y por tanto, protegen eficazmente las micelas de las interacciones con las membranas celulares y las proteínas plasmáticas en la sangre [V. Torchilin et al., Advanced Drug Delivery Reviews 16(1995) págs.141-155].

- 35 R. Savic et al. mostraron la evidencia experimental de que las micelas formadas a partir de copolímeros de bloques de poli(caprolactona)-b-poli(óxido de etileno) pueden liberar un agente bioactivo a las células vivas utilizando micelas con tetrametilrodamina-5-carbonilazida (TMRCA) unida covalentemente al extremo de PCL del polímero [R. Savic et al., Science 300(2003) págs.615-618]. Sin embargo, las micelas fluorescentes únicamente fueron detectadas en el compartimento citoplásmico pero no en el nuclear y de este modo no son apropiados agentes bioactivos tales como los fármacos anticancerosos de unión al ADN para su uso con las micelas.

En vista de lo anterior, se desea el desarrollo de una micela polimérica o nanopartícula que pueda liberar agentes bioactivos en las células elegidas como diana. De este modo, la presente invención proporciona un método para la liberación intracelular dirigida de agentes bioactivos utilizando un portador para fármaco de micela polimérica o nanopartícula.

5 COMPENDIO DE LA INVENCION

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para la liberación intracelular de agentes bioactivos utilizando portadores poliméricos de fármacos formados a partir de composiciones que comprenden (a) un copolímero de bloques anfífilo que comprende un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo, donde dicho bloque hidrófobo tiene un grupo hidroxilo terminal que está sustituido con un grupo tocoferol o colesterol, y (b) un derivado de poli(ácido láctico) que tiene al menos un grupo carboxilo terminal en el extremo del polímero. Opcionalmente, de 0,01 a 10 equivalentes de un ión metálico di- o trivalente se unen a 1 equivalente del grupo carboxilo terminal de dicho derivado de poli(ácido láctico).

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un sistema de liberación para la liberación intracelular de agentes bioactivos que comprende agentes bioactivos y un portador polimérico de fármacos con dichos agentes bioactivos atrapados en su interior en la solución acuosa, donde el portador polimérico de fármacos se prepara por medio de una composición polimérica que comprende (a) un copolímero de bloques anfífilo que consiste en un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo en el que dicho bloque hidrófobo tiene un grupo hidroxilo terminal que está sustituido con un grupo tocoferol o colesterol y (b) un derivado de poli(ácido láctico) que tiene al menos un grupo carboxilo en el extremo del polímero; y donde se permite que dichos agentes bioactivos atrapados en el portador polimérico de fármacos sean liberados en una célula en una mayor cantidad cuando el portador de fármaco entra en contacto con dicha célula. Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición para la liberación intracelular de agentes bioactivos que comprende agentes bioactivos y un portador polimérico de fármacos con dichos agentes bioactivos atrapados en su interior en la solución acuosa, donde el portador polimérico de fármacos se prepara por medio de una composición polimérica que comprende (a) un copolímero de bloques anfífilo que consiste en un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo en el que dicho bloque hidrófobo tiene un grupo hidroxilo terminal que está sustituido con un grupo tocoferol o colesterol y (b) un derivado de poli(ácido láctico) que tiene al menos un grupo carboxilo en el extremo del polímero; y donde se permite que dichos agentes bioactivos atrapados en el portador polimérico de fármacos sean liberados en una célula en una mayor cantidad cuando el portador de fármaco entra en contacto con dicha célula.

La presente invención se refiere a portadores poliméricos de fármacos que pueden liberar un agente bioactivo en una célula elegida como diana.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es un diagrama esquemático de la internalización celular de un agente bioactivo desde el fluido corporal después de la administración de la composición de la presente invención.

La Fig. 2A muestra el número de células en las que se internaliza el fármaco después del tratamiento de células sensibles a la doxorubicina (MES-SA) con las composiciones de fármaco.

La Fig. 2B muestra el número de células en las que se internaliza el fármaco después del tratamiento de células resistentes a la doxorubicina (MES-SA/Dx-5) con las composiciones de fármaco.

La Fig. 3A muestra la intensidad de fluorescencia detectada mediante FACS después del tratamiento de células sensibles a la doxorubicina (MES-SA) con las composiciones de fármaco.

La Fig. 3B muestra la intensidad de fluorescencia detectada mediante FACS después del tratamiento de células resistentes a la doxorubicina (MES-SA/Dx-5) con las composiciones de fármaco.

La Fig. 4A muestra imágenes de microscopia confocal obtenidas 2 horas después del tratamiento de células sensibles a la doxorubicina (MES-SA) con la composición que contiene doxorubicina (composición 1, lado derecho) y una formulación en solución convencional (lado izquierdo).

La Fig. 4B muestra imágenes de microscopia confocal obtenidas 8 horas después del tratamiento de células sensibles a la doxorubicina (MES-SA) con la composición que contiene doxorubicina (composición 1) y una formulación en solución convencional.

La Fig. 4C muestra imágenes de microscopia confocal obtenidas 2 horas después del tratamiento de células resistentes a la doxorubicina (MES-SA/Dx-5) con la composición que contiene doxorubicina (composición 1) y una formulación en solución convencional.

La Fig. 4D muestra imágenes de microscopia confocal obtenidas 8 horas después del tratamiento de células resistentes a la doxorubicina (MES-SA/Dx-5) con la composición que contiene doxorubicina (composición 1) y una formulación en solución convencional.

La Fig. 4E muestra imágenes de microscopia confocal obtenidas 2 horas después del tratamiento de células sensibles a la epirrubicina (MCF-7) con la composición que contiene epirrubicina (composición 6) y la formulación en solución convencional.

5 La Fig. 4F muestra imágenes de microscopia confocal obtenidas 8 horas después del tratamiento de células sensibles a la epirrubicina (MCF-7) con la composición que contiene epirrubicina (composición 6) y una formulación en solución convencional.

La Fig. 4G muestra imágenes de microscopia confocal obtenidas 2 horas después del tratamiento de células resistentes a la epirrubicina (MCF-7/ADR) con la composición que contiene epirrubicina (composición 6) y una formulación en solución convencional.

10 La Fig. 4H muestra imágenes de microscopia confocal obtenidas 8 horas después del tratamiento de células resistentes a la epirrubicina (MCF-7/ADR) con la composición que contiene epirrubicina (composición 6) y una formulación en solución convencional.

La Fig. 5A muestra la viabilidad celular después del tratamiento de células sensibles a la doxorubicina (MES-SA) con las composiciones de fármaco (0,1 µg/ml).

15 La Fig. 5B muestra la viabilidad celular después del tratamiento de células resistentes a la doxorubicina (MES-SA/Dx-5) con las composiciones de fármaco (1,0 µg/ml).

La Fig. 6 muestra la concentración de fármaco en plasma sanguíneo con el tiempo después de la administración intravenosa de las composiciones de fármaco en ratas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 Antes de revelar y describir la presente invención, se debe entender que esta invención no está limitada a las configuraciones, las etapas procedimentales, y los materiales concretos descritos en la presente memoria, y tales configuraciones, etapas procedimentales, y materiales pueden variarse. También se deberá entender que la terminología empleada en la presente memoria se utiliza con el fin de describir realizaciones concretas únicamente y no se pretende que limite el alcance de la presente invención que solo será limitada por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

Se debe observar que, según se utiliza en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen sus referentes en plural a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a un polímero que contiene "un grupo terminal" incluye la referencia a dos o más de tales grupos.

30 Al describir y reivindicar la presente invención, se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones presentadas más abajo.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "agentes bioactivos" significa un compuesto orgánico o fármaco que tiene una actividad o función biológica deseable, es decir un efecto biológico o un efecto farmacológico, in vivo. Por ejemplo, los agentes bioactivos que consisten en agentes terapéuticos pueden alterar funciones celulares, tales como la función génica. Alternativamente, los agentes bioactivos que consisten en agentes diagnósticos, tales como los agentes para la obtención de imágenes mediante resonancia magnética (MRI por sus siglas en Inglés de "Magnetic Resonance Imaging") o tomografía computarizada ("TC"), tienen la función biológica de potenciar las imágenes diagnósticas de tejidos y/u órganos.

40 Según se utiliza en la presente memoria, el término "biodegradable" o "biodegradación" se define como la conversión de materiales en intermedios o productos finales menos complejos por medio solubilización-hidrólisis, o por medio de la acción de entidades formadas biológicamente que pueden ser enzimas u otros productos del organismo.

45 Según se utiliza en la presente memoria, el término "biocompatible" significa los materiales o los intermedios o productos finales de los materiales formados por medio de solubilización-hidrólisis, o por medio de la acción de entidades formadas biológicamente que pueden ser enzimas u otros productos del organismo y que no causan efectos adversos sobre los organismos.

"Poli(lactida)" o "PLA" significará un polímero derivado de la condensación de ácido láctico o de la polimerización por apertura del anillo de la lactida. Los términos "lactida" y "lactato" se utilizan indistintamente.

50 Ahora se hará referencia a las realizaciones ilustrativas y se utilizará lenguaje específico en la presente memoria para describir las mismas. Sin embargo se deberá entender de ese modo que no se pretende limitar el alcance de la invención. Las alteraciones y modificaciones adicionales de las características de la invención ilustradas en la presente memoria, y las aplicaciones adicionales de los principios de la invención según se ilustran en la presente memoria, que se le ocurrirían a un experto en la técnica relevante y que se encuentre en posesión de esta descripción, se deben considerar dentro del alcance de la invención.

La presente invención proporciona un método para la liberación intracelular de agentes bioactivos utilizando portadores poliméricos de fármacos formados a partir de composiciones poliméricas que comprenden un copolímero de bloques anfífilo que comprende un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo, donde dicho bloque hidrófobo tiene un grupo hidroxilo terminal que está sustituido con un grupo tocoferol o colesterol, y un derivado de poli(ácido láctico) que tiene al menos un grupo carboxilo terminal en el extremo del polímero.

La presente invención también proporciona un método para la liberación intracelular de agentes bioactivos utilizando portadores de fármacos formados a partir de composiciones poliméricas que comprenden un copolímero de bloques anfífilo que comprende un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo, donde dicho bloque hidrófobo tiene un grupo hidroxilo terminal que está sustituido con un grupo ácido tocoferolsuccínico o ácido colesterolsuccínico, un derivado de poli(ácido láctico) que tiene al menos un grupo carboxilo terminal en el extremo del polímero y de 0,01 a 10 equivalentes de un ión metálico di- o trivalente con respecto a 1 equivalente del grupo carboxilo terminal del derivado de poli(ácido láctico).

La presente invención proporciona adicionalmente un sistema de liberación para la liberación intracelular de agentes bioactivos que comprende agentes bioactivos y un portador polimérico de fármacos con dichos agentes bioactivos atrapados en su interior en la solución acuosa, donde el portador polimérico de fármacos se prepara por medio de una composición polimérica que comprende (a) un copolímero de bloques anfífilo que consiste en un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo en el que dicho bloque hidrófobo tiene un grupo hidroxilo terminal que está sustituido con un grupo tocoferol o colesterol y (b) un derivado de poli(ácido láctico) que tiene al menos un grupo carboxilo en el extremo del polímero; y donde se permite que dichos agentes bioactivos atrapados en el portador polimérico de fármacos sean liberados en una célula en una mayor cantidad cuando el portador de fármaco entra en contacto con dicha célula.

En una realización de la presente invención, se permite que los agentes bioactivos sean liberados en una célula en una mayor cantidad, y preferiblemente, de una manera mas eficiente que aquellos en ausencia del portador polimérico de fármacos.

La presente invención proporciona adicionalmente portadores poliméricos de fármacos que pueden liberar un agente bioactivo en la célula elegida como diana.

Específicamente la presente invención proporciona un método para la liberación intracelular de agentes bioactivos que comprende las etapas de:

a) seleccionar al menos un agente bioactivo;

b) preparar una composición polimérica que comprende un copolímero de bloques anfífilo que comprende un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo donde dicho bloque hidrófobo tiene un grupo hidroxilo terminal que está sustituido con un grupo tocoferol o colesterol, un derivado de poli(ácido láctico) que tiene al menos un grupo carboxilo en el extremo del polímero;

c) mezclar y disolver dicha composición polimérica y dichos agentes bioactivos en un disolvente y evaporar el disolvente;

d) añadir una solución acuosa para formar un portador polimérico de fármacos con dichos agentes bioactivos atrapados en su interior en la solución; y

e) poner en contacto dicho portador de fármaco con una célula para facilitar la liberación de dichos agentes bioactivos en el interior de dicha célula.

Selección de al menos un agente bioactivo

Los agentes bioactivos de la presente invención pueden ser cualquier compuesto orgánico o cualquier fármaco que ejerza una actividad biológica deseable. Esto incluye, pero no está limitado a, proteínas, hormonas tales como testosterona, estradiol, estrógeno, progesterona, acetato de triamcinolona, dexametasona, etc., genes, polipéptidos, oligonucleótidos, nucleótidos, anticuerpos, fármacos tales como agentes anticancerosos, agentes antiinflamatorios, agentes antifúngicos, antibióticos, anestésicos, agentes antihipertensores, y agentes para el tratamiento de la diabetes, agentes antihiperlipidémicos, agentes antivirales, agentes para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, agentes antidemencia, antieméticos, inmunosupresores, agentes antiulcerativos, laxantes, agentes antimaláricos, y agentes para la obtención de imágenes diagnósticas. Los ejemplos de los fármacos anticancerosos incluyen paclitaxel, epirrubicina, dactinomicina, bleomicina, mitomicina, docetaxel, 5-fluorouracilo, metotrexato, camptotecina, etoposido, doxorubicina, daunorubicina, idarrubicina, ara-C, ciclosporina A, etc., y sus derivados.

Los agente bioactivos anteriores se pueden añadir a la composición polimérica a una razón en peso por peso de 0,1~20:80,0~99,9 para que sean contenidos apropiadamente en el núcleo de las micelas formadas a partir del copolímero de bloques anfífilo y el derivado de poli(ácido láctico).

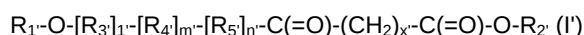
Preparación de una composición polimérica

El copolímero de bloques anfífilo de la presente invención es preferiblemente un copolímero de dibloques de tipo A-B o un copolímero de tribloques de tipo B-A-B que comprende un bloque hidrófilo A y un bloque hidrófobo B. El copolímero de bloques anfífilo, cuando se coloca en una fase acuosa, forma micelas poliméricas de tipo núcleo-envoltura donde el bloque hidrófobo B forma el núcleo y el bloque hidrófilo A forma la envoltura. Preferiblemente, el bloque hidrófilo A es un miembro seleccionado del grupo que consiste en polialquilenglicol, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poliacrilamida y sus derivados. Más preferiblemente, el bloque hidrófilo A es un miembro seleccionado del grupo que consiste en monometoxipolietilenglicol, monoacetoxipolietilenglicol, polietilenglicol, polietilen-co-propilenglicol, y polivinilpirrolidona. Preferiblemente, el bloque hidrófilo A tiene un peso molecular medio numérico de 500 a 50.000 Daltons. Más preferiblemente, el bloque hidrófilo A tiene un peso molecular medio numérico de 1.000 a 20.000 Daltons.

El bloque hidrófobo B del copolímero de bloques anfífilo de la presente invención es un polímero altamente biocompatible y biodegradable seleccionado del grupo que consiste en poliésteres, polianhídridos, poliaminoácidos, poliortoésteres y polifosfazina. Más preferiblemente, el bloque hidrófobo B es uno o más seleccionado del grupo que consiste en polilactidas, poliglicólidos, policaprolactona, polidioxan-2-onas, poliláctico-co-glicólido, poliláctico-co-dioxan-2-ona, poliláctico-co-caprolactona, y poliglicólico-co-caprolactona. El grupo terminal del bloque hidrófobo tiene un grupo hidroxilo, y el grupo hidroxilo terminal del bloque hidrófobo B está sustituido con un grupo tocoferol o colesterol hidrófobo, teniendo ambos excelente carácter hidrófobo, con el propósito de aumentar el carácter hidrófobo del bloque hidrófobo B a la vez que se mantiene su peso molecular. El grupo tocoferol o colesterol está unido químicamente al grupo hidroxilo terminal del bloque hidrófobo B utilizando un agente de unión, p. ej. un ácido dicarboxílico tal como ácido succínico, ácido malónico, ácido glutárico, ácido adípico. El tocoferol y el colesterol son compuestos biocompatibles e hidrófobos que tienen una estructura anular, que pueden aumentar el carácter hidrófobo interior de las micelas poliméricas aumentando de ese modo la estabilidad física de la micelas poliméricas. Preferiblemente, el bloque hidrófobo B del copolímero de bloques anfífilo tiene un peso molecular medio numérico de 500 a 50.000 Daltons. Más preferiblemente, el bloque hidrófobo B del copolímero de bloques anfífilo tiene un peso molecular medio numérico de 1.000 a 20.000 Daltons.

La razón del bloque hidrófilo A con respecto al bloque hidrófobo B del copolímero de bloques anfífilo de la presente invención se encuentra preferiblemente dentro del intervalo de 3:7 a 8:2 en peso, y más preferiblemente dentro del intervalo de 4:6 a 7:3. Si el contenido del bloque hidrófilo A es demasiado bajo, el polímero puede no formar micelas poliméricas en una solución acuosa, y si el contenido es demasiado alto, la micelas poliméricas formadas no son estables.

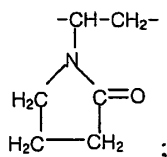
En una realización, el copolímero de bloques anfífilo de la presente invención puede estar representado por la siguiente Fórmula:



donde R_1 , es CH_3- , $H-[R_5]_{n'}-[R_4]_{m'}-$, o $R_2-O-C(=O)-(CH_2)_{X'}-C(=O)-[R_5]_{n'}-[R_4]_{m'}-$;

R_2 es tocoferol o colesterol;

R_3 , es $-CH_2CH_2-O-$, $-CH(OH)-CH_2-$, $-CH(C(=O)-NH_2)-CH_2-$, o



R_4 es $-C(=O)-CHZ'-O-$, donde Z' es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo;

R_5 es $-C(=O)-CHY''-O-$, donde Y'' es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, $-C(=O)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-O-$, o $-C(=O)-CH_2OCH_2CH_2-O-$;

$1'$ es un número entero de 4-1150;

m' es un número entero de 1-300;

n' es un número entero de 0-300; y

X' es un número entero de 0-4.

El copolímero de bloques que tiene el bloque hidrófobo cuyo grupo hidroxilo terminal está sustituido con tocoferol o colesterol se puede preparar de acuerdo con los siguientes métodos. En una realización, se introduce un conector adecuado, p. ej. un ácido dicarboxílico tal como ácido succínico, ácido malónico, ácido glutárico o ácido adípico en el

grupo hidroxilo del tocoferol o colesterol, y el tocoferol o colesterol carboxilado está unido químicamente al grupo hidroxilo terminal del bloque hidrófobo B.

En una realización, de acuerdo con el método de la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.322.805, el copolímero de bloques anfífilo (mPEG-PLA) que comprende monometoxipolietilenglicol (mPEG; $M_n=2.000$) y polilactida (PLA; $M_n=1.750$) se pesa, y se deshidrata utilizando una bomba de vacío a 120°C , y a continuación se disuelve en acetonitrilo o cloruro de metileno. A esto se le añade succinato de tocoferol o succinato de colesterol, y la dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y la 4-dimetilaminopiridina (DMAP) se pesan y se añaden a esto como un iniciador y un catalizador, respectivamente, y la reacción se realiza a temperatura ambiente. El reaccionante se vuelve opaco debido a la dicitclohexilurea (DCU) formada en la reacción entre el -OH terminal del mPEG-PLA y el -COOH del compuesto hidrófobo. Al cabo de 24 horas, la DCU se elimina por medio de la utilización de un filtro de vidrio, y la DMAP se extrae y se elimina con una solución acuosa de ácido clorhídrico. A esta solución de producto purificado se le añade MgSO_4 para eliminar cualquier humedad residual, y a continuación, se forman precipitados en un disolvente de hexano/éter dietílico con el fin de obtener el copolímero de bloques anfífilo al que se unen el tocoferol-succinilo o el colesterol-succinilo, el mPEG-PLA-tocoferol o el mPEG-PLA-colesterol (en el que el tocoferol o el colesterol están unidos al PLA a través del diéster de ácido succínico). El producto polimérico precipitado se filtra, y a continuación se seca a vacío para obtener el polímero en forma de partículas de color blanco.

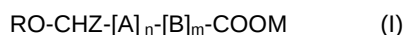
En otra realización, un compuesto hidrófobo carboxilado es activado con cloruro de oxalilo sin ningún catalizador, y se une al extremo del mPEG-PLA. Esto es, el succinato de tocoferol (o colesterol) se hace reaccionar con cloruro de oxalilo, y a continuación, el cloruro de oxalilo en exceso se elimina a vacío a temperatura ambiente. El mPEG-PLA se pesa y se añade a esto, y la reacción se realiza a 100°C durante 12 horas para obtener mPEG-PLA-tocoferol (o colesterol). El polímero sintetizado se disuelve en acetonitrilo o cloruro de metileno, se precipita en hexano/éter dietílico, y se filtra.

En los dos procedimientos de preparación anteriores, se pueden utilizar malonato de tocoferol (o colesterol), glutarato de tocoferol (o colesterol), o adipato de tocoferol (o colesterol), etc. en lugar de succinato de tocoferol (o colesterol).

En otra realización, el tocoferol o el colesterol se unen al extremo del mPEG-PLA utilizando un compuesto dicloruro como agente de unión. Específicamente, el tocoferol o el colesterol se pesan y deshidratan utilizando una bomba de vacío a 50°C . A esto se le añade el agente de unión en exceso, y la reacción se realiza durante 12 horas. Después de completar la reacción, el agente de unión añadido en exceso se elimina a vacío a 100°C . A esto se le añade el xnPEG-PLA pesado, y la reacción se realiza a 100°C durante 12 horas. El polímero sintetizado se disuelve en cloruro de metileno, y se precipita en hexano/éter dietílico con el fin de obtener el copolímero de bloques anfífilo en el que se une el tocoferol o el colesterol al PLA a través del diéster de ácido succínico, es decir mPEG-PLA-tocoferol o mPEG-PLA-colesterol. El producto polimérico precipitado se filtra, y se seca a vacío para obtener el polímero en forma de partículas de color blanco. El agente de unión que se puede utilizar en la reacción se puede seleccionar entre compuestos dicloruro tales como cloruro de succinilo, cloruro de oxalilo, cloruro de malonilo, cloruro de glutarilo, cloruro de adipilo, etc.

Uno o más extremos del derivado de poli(ácido láctico) de la presente invención se unen covalentemente a al menos un ácido carboxílico o sal carboxilato. El otro extremo del derivado de poli(ácido láctico) de la presente invención se puede unir covalentemente a un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en grupos hidroxilo, acetoxi, benzoilo, decanoilo y palmitoilo. El ácido carboxílico o las sales carboxilato funcionan como un grupo hidrófilo en una solución acuosa de pH 4 o mayor que posibilita que el derivado de poli(ácido láctico) forme micelas poliméricas en su interior. Cuando los derivados de poli(ácido láctico) de la presente invención se disuelven en una solución acuosa, los componentes hidrófilos e hidrófobos presentes en el derivado de poli(ácido láctico) se deben equilibrar con el fin de formar micelas poliméricas. Por lo tanto, el peso molecular medio numérico del derivado de poli(ácido láctico) de la presente invención se encuentra preferiblemente dentro del intervalo de 500 a 2.500 Daltons. El peso molecular del derivado de poli(ácido láctico) se puede ajustar controlando la temperatura de reacción, el tiempo, y similares, durante el procedimiento de preparación.

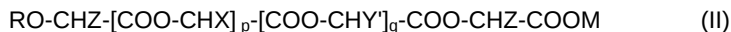
El derivado de poli(ácido láctico) está representado preferiblemente por la siguiente fórmula:



donde A es -COO-CHZ-; B es -COO-CHY, -COO-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- o -COO-CH₂CH₂OCH₂; R es un átomo de hidrógeno, un grupo acetilo, benzoilo, decanoilo, palmitoilo, metilo o etilo; cada uno de Z e Y es un átomo de hidrógeno, un grupo metilo, o fenilo; M es H, Na, K, o Li; n es un número entero de 1 a 30, y m es un número entero de 0 a 20.

Un extremo del derivado de poli(ácido láctico) de la presente invención se une covalentemente a un grupo carboxilo o una sal de metal alcalino del mismo, preferiblemente, una sal de metal alcalino del mismo. El ión metálico en la sal de metal alcalino que forma el derivado de poli(ácido láctico) es monovalente, p. ej. sodio, potasio o litio. El derivado de poli(ácido láctico) en la forma de sal de ión metálico es un sólido a temperatura ambiente, y es muy estable a causa de su pH relativamente neutro.

Más preferiblemente, el derivado de poli(ácido láctico) está representado por la siguiente fórmula:

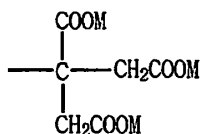


donde X es un grupo metilo; Y' es un átomo de hidrógeno o un grupo fenilo; p es un número entero de 0 a 25; q es un número entero de 0 a 25, siempre que p+q sea un número entero de 5 a 25; R, Z y M son los mismos que se han definido en la Fórmula (I).

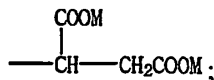
Por añadidura, los derivados de poli(ácido láctico) de las siguientes fórmulas (III), (IV) y (V) son también adecuados para la siguiente fórmula :



donde W-M' es



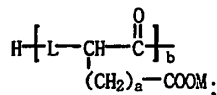
o



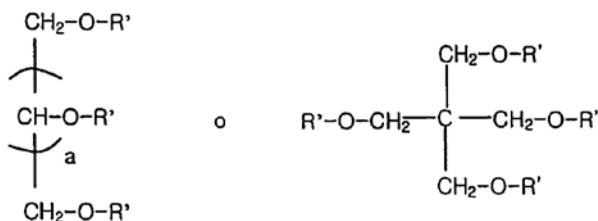
PAD es un miembro seleccionado del grupo que consiste en ácido D,L-poliláctico, ácido D-poliláctico, ácido polimandélico, un copolímero de ácido D,L-láctico y ácido glicólico, un copolímero de ácido D,L-láctico y ácido mandélico, un copolímero de ácido D,L-Láctico y caprolactona, y un copolímero de ácido D,L-láctico y 1,4-dioxan-2-ona; R y M son los mismos que se han definido en la Fórmula (I).



donde S es



L es -NR₁- o -O-; R₁ es un átomo de hidrógeno o alquilo C₁-C₁₀; Q es CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₂CH₃, o CH₂C₆H₅; a es un número entero de 0 a 4; b es un número entero de 1 a 10; R y M son los mismos que se han definido en la Fórmula (I); y PAD es el mismo que se ha definido en la Fórmula (III).



(V)

donde R' es -PAD-O-C(O)-CH₂CH₂-C(O)-OM y M es el mismo que se ha definido en la fórmula (I); PAD es el mismo que se ha definido en la Fórmula (III); a es un número entero de 1 a 4 (cuando a=1, es un PLA-COONa de 3 brazos; si a=2, es un PLA-COONa de 4 brazos; cuando a=3, es un PLA-COONa de 5 brazos, y si a=4, es un PLA-COONa de 6 brazos).

El iniciador para la síntesis de los polímeros (Fórmula V) incluye glicerol, eritritol, treitol, pentaeritritol, xilitol, adonitol, sorbitol y manitol.

La composición polimérica de la presente invención puede contener de 0,1 a 99,9% en peso del copolímero de bloques anfífilo y de 0,1 a 99,9% en peso del derivado de poli(ácido láctico) basándose en el peso total del copolímero de bloques anfífilo y el derivado de poli(ácido láctico). Preferiblemente, la composición polimérica de la presente invención contiene de 20 a 95% en peso del copolímero de bloques anfífilo y de 5 a 80% en peso del

derivado de poli(ácido láctico). Más preferiblemente, la composición polimérica de la presente invención contiene de 50 a 90% en peso del copolímero de bloques anfífilo y de 10 a 50% en peso del derivado de poli(ácido láctico).

Si bien los derivados de poli(ácido láctico) de la presente invención solos pueden formar micelas en una solución acuosa con un pH 4 o superior, las composiciones poliméricas que comprenden copolímeros de bloques anfífilos y derivados de poli(ácido láctico) pueden formar micelas en una solución acuosa independientemente del pH de la solución, y las composiciones poliméricas de la presente invención se pueden utilizar a un pH dentro del intervalo de 1 a 10, preferiblemente a un pH dentro del intervalo de 4 a 8. El tamaño de partícula de las micelas o nanopartículas preparadas a partir de las composiciones poliméricas de la presente invención se puede ajustar para que esté dentro del intervalo de 1 a 400 nm, y preferiblemente de 5 a 200 nm, dependiendo del peso molecular de los polímeros y la razón del derivado de poli(ácido láctico) con respecto al copolímero de bloques anfífilo.

En una realización de la presente invención, el grupo carboxilo terminal del derivado de poli(ácido láctico) se une o se fija a un ión metálico di- o trivalente. La composición polimérica con el ión metálico fijado se puede preparar añadiendo un ión metálico di- o tri-valente a la composición polimérica del copolímero de bloques anfífilo y el derivado de poli(ácido láctico). Las micelas poliméricas o nanopartículas se pueden formar combinando la cantidad del ión metálico di- o tri-valente añadido para unir o fijar el grupo carboxilo terminal del derivado de poli(ácido láctico).

El ión metálico di- o tri-valente es preferiblemente un miembro seleccionado del grupo que consiste en Ca^{2+} , Mg^{2+} , B^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , y Al^{3+} . El ión metálico di- o tri-valente se pueden añadir a la composición polimérica del copolímero de bloques anfífilo y el derivado de poli(ácido láctico) en forma de un sulfato, cloruro, carbonato, fosfato o hidroxilato, y preferiblemente, en forma de CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , AlCl_3 , FeCl_3 , CaCO_3 , MgCO_3 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , MgSO_4 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{Mg}(\text{OH})_2$, $\text{Al}(\text{OH})_3$, o $\text{Zn}(\text{OH})_2$.

Se pueden preparar micelas poliméricas o nanopartículas cambiando el número de equivalentes del ión metálico añadido. Específicamente, si se añade un ión metálico divalente a 0,5 equivalentes o menos con respecto a los grupos carboxilo terminales, el ión metálico que puede formar enlaces con el grupo carboxilo terminal del derivado de poli(ácido láctico) es insuficiente; y de este modo, se forman micelas poliméricas. Si se añade un ión metálico divalente a 0,5 equivalentes o más, el ión metálico que forma enlaces con el grupo carboxilo terminal del derivado de poli(ácido láctico) es suficiente para fijar firmemente las micelas; y de este modo, se forman nanopartículas.

Por añadidura, la tasa de liberación de fármaco desde las micelas poliméricas o nanopartículas se puede ajustar cambiando el número de equivalentes del ión metálico añadido. Si el ión metálico está presente a 1 equivalente o menos con respecto al del grupo carboxilo del derivado de poli(ácido láctico), el número disponible para unirse al grupo carboxilo terminal del derivado de poli(ácido láctico) disminuye, y de este modo la tasa de liberación de fármaco aumenta. Si el ión metálico está presente a 1 equivalente o más, el número disponible para unirse al grupo carboxilo terminal del derivado de poli(ácido láctico) aumenta, y de este modo la tasa de liberación de fármaco disminuye. Por lo tanto, para aumentar la tasa de liberación de fármaco en sangre, el ión metálico se utiliza a pequeña cantidad equivalente, y para disminuir la tasa de liberación de fármaco, el ión metálico se utiliza en una gran cantidad equivalente.

Las composiciones poliméricas con el ión metálico fijado de la presente invención pueden contener de 5 a 95 % en peso del copolímero de bloques anfífilo, de 5 a 95% en peso del derivado de poli(ácido láctico) y de 0,01 a 10 equivalentes del ión metálico di- o tri-valente con respecto al número de equivalentes de los grupos carboxilo terminales de los derivados de poli(ácido láctico). Preferiblemente, contienen de 20 a 80% en peso del copolímero de bloques anfífilo, de 20 a 80% en peso del derivado de poli(ácido láctico) y 0,1 a 5 equivalentes del ión metálico di- o tri-valente, y más preferiblemente, de 20 a 60 % en peso del copolímero de bloques anfífilo, de 40 a 80 % en peso del derivado de poli(ácido láctico) y de 0,2 a 2 equivalentes del ión metálico di- o tri-valente.

Mezcla y disolución de la composición polimérica y los agentes bioactivos en un disolvente y evaporación del disolvente; y formulación de una solución de un portador de fármaco con un agente bioactivo atrapado en su interior

El portador de fármaco de la presente invención puede ser una micela polimérica o una nanopartícula formada a partir de composiciones poliméricas que comprenden un copolímero de bloques anfífilo que comprende un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo donde dicho bloque hidrófobo tiene un grupo hidroxilo terminal que está sustituido con un grupo tocoferol o colesterol, y un derivado de poli(ácido láctico) que tiene al menos un grupo carboxilo terminal en el extremo del polímero.

Las nanopartículas o micelas de la presente invención se pueden formar a partir de composiciones poliméricas de un copolímero de bloques anfífilo que comprende un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo, donde el bloque hidrófobo tiene un grupo hidroxilo terminal que está sustituido con un grupo tocoferol o colesterol, un derivado de poli(ácido láctico) que tiene al menos un grupo carboxilo terminal en el extremo que está unido o fijado a un ión metálico di- o trivalente.

Los agentes bioactivos pueden estar atrapados en las micelas o nanopartículas o se pueden incorporar en el interior de las micelas o nanopartículas de la presente invención por medio de la formación de un complejo iónico estable con el grupo carboxilo del derivado de poli(ácido láctico) biodegradable de acuerdo con los agentes bioactivos.

El copolímero de bloques anfífilo, el derivado de poli(ácido láctico), y el fármaco escasamente soluble en agua a ciertas proporciones se pueden disolver en una o más mezclas de disolventes orgánicos seleccionados del grupo que consiste en acetona, etanol, metanol, acetato de etilo, acetonitrilo, cloruro de metileno, cloroformo, ácido acético y dioxano. El disolvente orgánico se puede eliminar de allí para preparar una mezcla homogénea del fármaco escasamente soluble en agua y el polímero. La mezcla homogénea del fármaco escasamente soluble en agua y la composición polimérica de la presente invención se puede añadir a una solución acuosa con un pH de 4 a 8, de 0 a 80°C, dando como resultado una solución acuosa mixta de micelas poliméricas que contienen el fármaco escasamente soluble en agua. La solución acuosa de micelas poliméricas que contienen fármaco anterior se puede liofilizar a continuación para preparar la composición de micelas poliméricas en forma de un sólido.

Se añade una solución acuosa que contiene 0,001 a 2 M del ión metálico di- o tri-valente a la solución acuosa mixta de micelas poliméricas que contienen el fármaco escasamente soluble en agua. La mezcla se agita lentamente a temperatura ambiente durante 0,1 a 1 hora y a continuación se liofiliza para preparar la composición de micelas poliméricas o nanopartículas con el ión metálico fijado en forma de un sólido.

Contacto el portador de fármaco con una célula

Para la administración oral o parenteral de un agente bioactivo, el agente bioactivo está atrapado en el portador de fármaco y de ese modo se solubiliza. Particularmente, las micelas poliméricas o nanopartículas con el ión metálico fijado son retenidas en la corriente sanguínea durante un largo período de tiempo y se acumulan en las lesiones diana. El agente bioactivo se libera desde el núcleo hidrófobo de las micelas para ejercer un efecto farmacológico mientras las micelas se degradan.

Para la liberación parenteral, la composición polimérica se pueden administrar intravenosamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, transnasalmente, intrarrectalmente, intraocularmente, o intrapulmonarmente. Para su liberación oral, el agente bioactivo se mezcla con el portador de fármaco de la presente invención, y a continuación se administra en forma de un comprimido, una cápsula, o una solución acuosa. La composición polimérica de la invención se puede administrar con diversos intervalos de acuerdo con los requerimientos del fármaco concreto. Como es bien conocido en las artes médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el peso del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto concreto que se vaya a administrar, el sexo, el tiempo y la ruta de administración, la salud general, y otros fármacos que estén siendo administrados simultáneamente.

Internalización celular de un agente bioactivo

La internalización celular de un agente bioactivo se puede estudiar con citometría de flujo y microscopia confocal utilizando las composiciones que contienen fármaco. Como ejemplo de la presente invención, líneas celulares de cáncer uterino humano (MES-SA; MES-SA/Dx-5) y líneas celulares de cáncer de mama humano (MCF-7; MCF-7/ADR) se trataron con las composiciones de fármaco de la presente invención. Las líneas celulares MES-SA y MCF-7 son sensibles a la doxorrubicina y las líneas celulares MES-SA/Dx-5; MCF-7/ADR son resistentes a la doxorrubicina.

Como se muestra en las Figs. 2A a 3B y las Tablas 2A y 2B, el fármaco se introduce más eficazmente en las células desde la composición de fármaco de la presente invención (Composición 1) que desde la formulación en solución convencional (Sin Dox). Muy notablemente, el número de células que absorbió el fármaco fue cinco veces mayor desde la composición de fármaco de la presente invención que desde la formulación en solución convencional. Particularmente la absorción de doxorrubicina en las células es notable en la línea celular resistente a fármaco. De este modo, existe una buena posibilidad de que la composición de fármaco de la presente invención se pueda utilizar para superar la multi-resistencia a fármacos en quimioterapia.

Las imágenes confocales en las Figs. 4A a 4H visualizan los resultados de la citometría de flujo: las células absorbieron cantidades mucho mayores de fármaco cuando se trataron con la composición de fármaco de la presente invención. En las Figs. 4A a 4H, las ilustraciones del lado izquierdo son las imágenes confocales después del tratamiento con la formulación en solución convencional y las imágenes del lado derecho son después del tratamiento con las composiciones de la presente invención. Y como se muestra en las Figs. 4B, 4D, 4F, y 4H, las micelas o nanopartículas se detectaron en los compartimentos citoplásmico y nuclear.

Además, los resultados del análisis MTT mostrados en las Figs. 5A a 5B y en Tabla 3 apoyan los resultados de los estudios de citometría de flujo y de microscopia confocal. Para el análisis MTT, se sometieron a ensayo una composición que contenía doxorrubicina de la presente invención (Composición 1) y una formulación de doxorrubicina convencional (Sin Dox) sobre las líneas celulares de cáncer uterino humano MES-SA (línea celular sensible a la doxorrubicina) y MES-SA/Dx-5 (línea celular resistente a la doxorrubicina). La actividad citotóxica sobre las células sensibles a la doxorrubicina fue similar en ambas composiciones como se muestra en la Fig. 5A, pero la composición de fármaco de la presente invención mostró una actividad 6,7 veces mayor tres días después del

tratamiento que la formulación en solución convencional cuando se trataron las células resistentes a la doxorrubicina como se muestra en la Fig. 5B. Esta diferencia de actividad es debida a las características de las líneas celulares resistentes a fármacos en las que se expresan en exceso las P-glicoproteínas (P-gp) y extruden continuamente los fármacos citotóxicos de la célula. Puesto que el fármaco libre no se puede concentrar en el interior de las células resistentes a fármacos, este resultado implica que el portador de fármaco de la presente invención se introduce en la célula junto con el fármaco incorporado en el portador de fármaco.

De la estabilidad física del portador de fármaco de la presente invención y los resultados del estudio de internalización celular, se puede concluir que la mayoría de las composiciones que contienen agentes bioactivos de la presente invención se introducen en el citoplasma celular en forma de una micela o nanopartícula por medio de endocitosis sin el desmoronamiento de su estructura. Este proceso de internalización celular se muestra esquemáticamente en la Fig 1: 1 representa un fármaco; 2 representa el núcleo interno de una micela o nanopartícula; 3 representa la envoltura externa de una micela o nanopartícula; 4 representa el fluido extracelular; 5 representa la membrana celular; y representa el citoplasma.

Se realizó un experimento farmacocinético con ratas Sprague-Dawley (200–250 g) utilizando las composiciones que contienen doxorrubicina de la presente invención (Composiciones 1 a 5) y la formulación de doxorrubicina convencional (Sin Dox). Como se muestra en la Fig. 6 y la Tabla 4, las composiciones de la presente invención exhibieron un tiempo de circulación en sangre prolongado en comparación con la formulación de doxorrubicina convencional. La biodisponibilidad calculada a partir del área bajo la curva (AUC) de la concentración en sangre-tiempo para la composición 1 de la presente invención fue 63 veces mayor que la de la formulación de doxorrubicina convencional.

Los portadores de fármacos de la presente invención pueden proporcionar un tiempo prolongado en la circulación sistémica debido a su pequeño tamaño (<100 nm), su envoltura hidrófila que minimiza la absorción por los MPS, y su alto peso molecular que evita la excreción renal. Los portadores de fármaco de la presente invención se pueden utilizar como portadores para fármacos, péptidos y proteínas solubles en agua así como para fármacos escasamente solubles en agua. Según se ha ilustrado por medio del estudio de internalización celular, las composiciones que contienen agentes bioactivos de la presente invención forman micelas o nanopartículas estables en medios acuosos que se introducen en el citoplasma en forma de micelas o nanopartículas mediante endocitosis sin el desmoronamiento de su estructura. Además, la mayor acumulación de un agente bioactivo en un tejido tumoral se puede lograr con la composición de la presente invención.

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Ejemplo de Preparación 1

Copolímero de bloques anfífilo de PEG y PLA (mPEG-PLA)

Una mezcla de 20 g de monometoxipoli(etilenglicol) (mPEG con un peso molecular de 2.000), 20 g de D,L-lactida que se había recrystalizado en acetato de etilo, y 0,2 g de octoato estannoso que se había disuelto en 5 ml de tolueno se añadió a un reactor equipado con un agitador mecánico y un aparato de destilación. El tolueno residual se evaporó a 120°C. La reacción se llevó a cabo a vacío (25 mmHg). Al cabo de 6 horas de producirse la polimerización, el polímero resultante se disolvió en diclorometano y se vertió en éter dietílico frío (4°C) para precipitar el polímero. El polímero precipitado se lavó dos veces con éter dietílico y se secó a vacío (0,1 mmHg) durante 24 horas. El peso molecular del copolímero de bloques determinado por medio de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) fue de 2.000-1.800 (2.000 para el bloque de PEG y 1.800 para el bloque de PLA).

Ejemplo de Preparación 2

Copolímero de bloques anfífilo de PEG y PLGA (mPEG-PLGA)

Se preparó un copolímero de dibloques (mPEG-PLGA, LA:GA=70:30 en peso) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo de Preparación 1, utilizando 14 g de D,L-lactida y 6 g de glicólido en lugar de 20 g de D,L-lactida. El peso molecular del copolímero de bloques determinado por medio de RMN fue de 2.000-1.750 (2.000 para el bloque de PEG y 1.750 para el bloque de PLGA).

Ejemplo de Preparación 3

Copolímero de bloques anfífilo de PEG y PCL (mPEG-PCL)

Se preparó un copolímero de dibloques (mPEG-PCL) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo de Preparación 1, utilizando 20 g de ϵ -caprolactona en lugar de D,L-lactida. El peso molecular del copolímero de bloques determinado por medio de RMN fue de 2.000-1.800 (2.000 para el bloque de PEG y 1.800 para el bloque de PCL).

Ejemplo de Preparación 4**Copolímero de bloques anfífilo de PEO y PLA (PLA-PEO-PLA)**

Se preparó un copolímero de tribloques (PLA-PEO-PLA) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo de Preparación 1, utilizando 20 g de polietilenglicol (PEG con un peso molecular de 2.000) en lugar de monometoxipolietilenglicol (mPEG con un peso molecular de 2.000). El peso molecular del copolímero de bloques determinado por medio de RMN fue de 850-2.000-850 (2.000 para el bloque de PEO y 900 para cada bloque de PLA).

Ejemplo de Preparación 5**Succinato de tocoferol**

Una mezcla de 8,6 g de tocoferol, 2,4 g de anhídrido succínico y 2,9 g de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) se disolvió en 100 ml de 1,4-dioxano en un reactor equipado con un agitador mecánico. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente. Después de 24 horas de agitación, la mezcla de reacción se introdujo en una solución de HCl para precipitar el succinato de tocoferol (10,2 g; rendimiento = 96%).

Ejemplo de Preparación 6**Succinato de colesterilo**

El succinato de colesterilo (9,1 g; rendimiento = 94%) se preparó mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo de Preparación 5, utilizando 7,7 g de colesterol en lugar de tocoferol.

Ejemplo de Preparación 7**Copolímero de bloques anfífilo que tiene un grupo tocoferol en el extremo del bloque hidrófobo (mPEGPLA-Toco)**

Una mezcla de 10,0 g (2,6 mmoles) de mPEG-PLA preparado a partir del Ejemplo de Preparación 1 y 1,7 g (3,2 mmoles) de succinato de tocoferol preparado a partir del Ejemplo de Preparación 5 se disolvió en 50 ml de acetonitrilo en un reactor equipado con un agitador mecánico. Se utilizaron 0,78 g (3,8 mmoles) de diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 0,046 g (0,38 mmoles) de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) como catalizadores. Después de agitar durante 24 horas a temperatura ambiente, la mezcla se filtró utilizando un filtro de vidrio para eliminar la diciclohexilcarburea. Los catalizadores restantes se extrajeron con una solución acuosa de HCl, y a la solución polimérica se le añadió sulfato de magnesio para eliminar el agua. El producto resultante (mPEG-PLA-Toco) se recrystalizó en un co-disolvente de n-hexano/éter dietílico (6/4, v/v). El producto recrystalizado se filtró y se secó a vacío para proporcionar un producto en polvo de color blanco (9,9 g; rendimiento = 87%).

Ejemplo de Preparación 8**Copolímero de bloques anfífilo que tiene un grupo tocoferol en el extremo del bloque hidrófobo (mPEGPLGA-Toco)**

Se preparó un copolímero de bloques anfífilo (mPEG-PLGA-Toco) (9,5 g; rendimiento = 83%) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo de Preparación 7, utilizando 9,8 g (2,6 mmoles) de mPEG-PLGA preparado a partir del ejemplo de preparación 2 en lugar de mPEG-PLA preparado a partir del Ejemplo de Preparación 1.

Ejemplo de Preparación 9**Copolímero de bloques anfífilo que tiene un grupo tocoferol en el extremo del bloque hidrófobo (mPEG-PCL-Toco)**

Se preparó un copolímero de bloques anfífilo (mPEG-PCL-Toco) (10,1 g; rendimiento = 89%) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo de Preparación 7, utilizando 10,0 g (2,6 mmoles) de mPEG-PCL preparado a partir del ejemplo de preparación 3 en lugar de mPEG-PLA preparado a partir del Ejemplo de Preparación 1.

Ejemplo de Preparación 10**Copolímero de bloques anfífilo que tiene un grupo tocoferol en el extremo del bloque hidrófobo (Toco-PLA-PEO-PLA-Toco)**

Se preparó un copolímero de bloques anfífilo (Toco-PLA-PEO-PLA-Toco) (9,2 g; rendimiento = 84%) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo de Preparación 7, utilizando 9,6 g (2,6 mmoles) de PLA-PEO-PLA preparado a partir del Ejemplo de Preparación 4 en lugar de mPEG-PLA preparado a partir del Ejemplo de Preparación 1.

Ejemplo de Preparación 11**Copolímero de bloques anfífilo que tiene a colesterol grupo en el extremo del bloque hidrófobo (mPEG-PLA-Col)**

Se preparó un copolímero de bloques anfífilo (mPEG-PLA-Col) (9,7 g; rendimiento = 86%) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo de Preparación 7, utilizando 1,6 g (3,2 mmoles) de succinato de colesterol preparado a partir del Ejemplo de Preparación 6 en lugar de succinato de tocoferol preparado a partir del Ejemplo de Preparación 5.

Ejemplo de Preparación 12**Poliéster biodegradable (PLMA-COONa)****(1) Preparación de PLMA-COOH**

Una mezcla de 7,5 g de ácido D,L-láctico (0,083 moles) y 2,5 g de ácido D,L-mandélico (0,016 moles) se añadió a un reactor equipado con un agitador mecánico y un aparato de destilación. La humedad se evaporó a 80°C durante 1 hora a presión reducida (25 mmHg) con un aspirador. La reacción se llevó a cabo a una temperatura elevada de 180°C durante 5 horas a vacío (10 mmHg). El producto resultante se añadió a agua destilada, el polímero precipitado se lavó adicionalmente con agua destilada. El producto polimérico se añadió a continuación a 0,1 litros de agua destilada, y el pH de la solución acuosa se ajustó entre 6 y 8 por medio de la adición de hidrogenocarbonato de sodio en porciones disolviendo el polímero. El polímero insoluble en agua se separó y se eliminó mediante centrifugación o filtración. A esto se le añadió gota a gota una solución de ácido clorhídrico 1 N y el polímero se precipitó en la solución acuosa. El polímero precipitado se lavó dos veces con agua destilada, se aisló y se secó a presión reducida para obtener un polímero que tiene un grupo terminal carboxilo (6,7 g de PLMA-COOH, rendimiento = 67%). El peso molecular medio numérico del polímero determinado por medio de RMN fue de 1.100.

(2) Preparación de PLMA-COONa

Una solución de 5 g de polímero de PLMA-COOH se disolvió en acetona en un reactor equipado con un agitador mecánico y un aparato de destilación. La solución se agitó lentamente a temperatura ambiente, y a esto se le añadió lentamente una solución de hidrogenocarbonato de sodio (1 N) para alcanzar un pH de 7. Se añadió sulfato de magnesio anhidro a esto para eliminar cualquier humedad residual. La mezcla se filtró, la acetona restante se evaporó con un evaporador rotativo, y de allí se obtuvo un producto sólido de color blanco. El producto sólido se disolvió de nuevo en acetona anhidra, la solución se filtró para eliminar las partículas insolubles, la acetona se separó mediante evaporación para proporcionar el producto final, PLMA-COONa, en forma de un sólido de color blanco (rendimiento: 95%).

Ejemplo de Preparación 13**Poliéster biodegradable (PLA-COOK de 3 brazos)****(1) Preparación de PLA-OH de 3 brazos**

Se añadieron 1,0 g (0,011 moles) de glicerol a un reactor equipado con un agitador mecánico y un aparato de destilación. La humedad se evaporó a 80°C durante 30 minutos. A esto se le añadieron 0,036 g (0,089 mmoles) de octoato estannoso en tolueno, el tolueno residual se evaporó a 120°C, y se introdujeron 36 g (0,25 moles) de D,L-lactida que se recrystalizó en acetato de etilo en el reactor. La reacción se llevó a cabo a 130°C a vacío (20 mmHg). Después de 6 horas de polimerización, el polímero resultante se disolvió en acetona y a esto se le añadió gota a gota una solución acuosa de NaHCO_3 (0,2 N) para precipitar el polímero. El polímero precipitado se lavó tres veces con agua destilada y se secó a presión reducida para producir una forma del polímero en polvo de color blanco (PLA-OH de tres brazos). El peso molecular del polímero determinado mediante espectroscopia de RMN fue de 3,050.

(2) Preparación de PLA-COOH de 3 brazos

Se añadieron 10 g (3,28 mmoles) de polímero PLA-OH de tres brazos preparado anteriormente a un reactor equipado con un agitador mecánico y un aparato de destilación. La humedad se evaporó a 120°C durante 1 hora. A esto se le añadieron 1,96 g (19,6 mmoles) de anhídrido succínico, y la reacción se llevó a cabo a 125°C durante 6 horas. El polímero resultante se disolvió en acetona y a esto se le añadió gota a gota agua destilada para precipitar el polímero. El polímero precipitado se disolvió en una solución acuosa de NaHCO_3 (0,2 N) a 60°C, y a esto se le añadió gota a gota una solución acuosa de HCl (1N) para precipitar el polímero. El polímero precipitado se lavó tres veces con agua destilada y se secó a vacío para producir una forma del polímero en polvo de color blanco (PLA-COOH de 3 brazos). El peso molecular del polímero determinado mediante espectroscopia de RMN fue de 3.200.

(3) Preparación de PLA-COOK de 3 brazos

Finalmente, se preparó un poliéster biodegradable (PLA-COOK de 3 brazos) (rendimiento = 90%) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo de Preparación 12, utilizando 5 g del polímero de PLA-COOH de 3 brazos preparado anteriormente y una solución de hidrogenocarbonato de potasio (1 N) en lugar del polímero de PLMA-COOH y la solución de hidrogenocarbonato sodio (1 N).

Ejemplo de Preparación 14**Poliéster biodegradable (PLA-COONa de cuatro brazos)****(1) Preparación de PLA-OH de cuatro brazos**

Se preparó un polímero de PLA-OH de cuatro brazos mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo de Preparación 13, utilizando 1,5 g (0,011 moles) de pentaeritritol en lugar de glicerol. El peso molecular del polímero (PLA-OH de cuatro brazos) determinado mediante espectroscopia de RMN fue de 3.100.

(2) Preparación de PLA-COOH de cuatro brazos

Se preparó un polímero de PLA-COOH de cuatro brazos se preparó mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo de Preparación 13, utilizando 10 g (3,23 mmoles) del polímero de PLA-OH de cuatro brazos preparado anteriormente y 2,58 g (25,8 mmoles) de anhídrido succínico en lugar de 10 g (3,28 mmoles) del polímero de PLA-OH de 3 brazos y 1,96 g (19,6 mmoles) de anhídrido succínico. El peso molecular del polímero (PLA-COOH de cuatro brazos) determinado mediante espectroscopia de RMN fue de 3.300.

(3) Preparación de PLA-COONa de cuatro brazos

Finalmente, se preparó un poliéster biodegradable (PLA-COONa de cuatro brazos) (rendimiento = 92%) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo de Preparación 12, utilizando 5 g del polímero de PLA-COOH de cuatro brazos preparado anteriormente en lugar del polímero de PLMA-COOH.

Ejemplo de Preparación 15**Poliéster biodegradable (PLA-COONa)****(1) Preparación de PLA-COOH**

Se preparó un PLA-COOH (rendimiento = 78%) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo de Preparación 12, utilizando 10 g de ácido D,L-láctico (0,11 mmoles). El peso molecular medio numérico del polímero determinado por medio de RMN fue de 1.100.

(2) Preparación de PLA-COONa

Se preparó un poliéster biodegradable (PLA-COONa) (rendimiento = 92%) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo de Preparación 12, utilizando 5 g del polímero de PLA-COOH preparado anteriormente en lugar del polímero de PLMA-COOH.

Ejemplo 1**Composición que contiene fármaco****(Composición 1: Doxorrubicina/mPEGPLA-Toco/PLMA-COONa)**

Se disolvieron 10 mg de hidrocloreto de doxorrubicina en 5 ml de etanol-agua (9:1 v/v) en un matraz de fondo redondo. A esto se le añadieron 810 mg del copolímero de bloques anfífilo preparado a partir del ejemplo de preparación 7 (mPEG-PLA-Toco) y 180 mg del poliéster biodegradable preparado a partir del Ejemplo de Preparación 12 (PLMA-COONa) y se disolvieron completamente proporcionando una solución clara. El disolvente se evaporó a una temperatura elevada (60°C) a vacío con un evaporador rotativo. Se añadió una solución acuosa de 3 ml de lactosa (20% en peso) y el matraz se hizo girar a 100 rpm a 60°C con un evaporador rotativo para formar micelas o nanopartículas en el medio acuoso. La solución se filtró utilizando un filtro de membrana de PVDF de 0,22 µm. La solución filtrada se liofilizó y se almacenó en un refrigerador hasta su uso. El tamaño de partícula de las micelas o las nanopartículas en la solución filtrada se midió por medio de un método de dispersión de luz dinámico (DLS, ZetaPlus, Brookhaven Instruments Ltd.). La eficacia de carga (% en peso de fármaco incorporado a las micelas o nanopartículas con respecto al fármaco inicial utilizado) se calculó a partir del contenido de doxorrubicina analizado por medio de HPLC utilizando daunorrubicina como patrón interno. Las condiciones para el análisis de HPLC fueron las siguientes:

Volumen de inyección: 75 µl

Velocidad de flujo: 1,0 ml/min

Fase móvil: incremento de gradiente de Disolvente B de 15% a 85% durante 40 minutos (Disolvente A: ácido acético al 1%; Disolvente B: acetonitrilo)

Temperatura: Temperatura Ambiente

Columna: C-18 (Vydac, multi-anillo, tamaño de poro: 5 µm)

5 Longitud de onda; 485 nm

Y el tamaño de partícula se midió de acuerdo con un Método de Dispersión de Luz Dinámico (DLD).

Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Ejemplo 2

Composición que contiene fármaco

10 **(Composición 2: Doxorrubicina/mPEG-PLGA-Toco/PLMA-COONa)**

Se preparó una composición que contenía fármaco (composición 2) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1, utilizando mPEG-PLGA-Toco preparado a partir del Ejemplo de Preparación 8 en lugar de mPEG-PLA-Toco.

Los resultados se resumen en la Tabla 1.

15 **Ejemplo 3**

Composición que contiene fármaco

(Composición 3: Doxorrubicina/mPEGPCL-Toco/PLA-COOK de 3 brazos)

20 Se preparó una composición que contenía fármaco (composición 3) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1, utilizando mPEG-PCL-Toco preparado a partir del Ejemplo de Preparación 9 y de PLA-COOK de 3 brazos preparado a partir del Ejemplo de Preparación 13 en lugar de mPEG-PLA-Toco y PLMA-COONa.

Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Ejemplo 4

Composición que contiene fármaco

(Composición 4: Doxorrubicina/Toco-PLA-PEO-PLA-Toco/PLA-COONa de cuatro brazos)

25 Se preparó una composición que contenía fármaco (composición 4) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1, utilizando Toco-PLA-PEO-PLA-Toco preparado a partir del ejemplo de preparación 10 y PLA-COONa de cuatro brazos preparado a partir del Ejemplo de Preparación 14 en lugar de mPEG-PLA-Toco y PLMA-COONa.

Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Ejemplo 5

30 **Composición que contiene fármaco**

(Composición 5: Doxorrubicina/mPEGPLA-Col/PLMA-COONa)

Se preparó una composición que contenía fármaco (composición 5) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1, utilizando mPEG-PLA-Col preparado a partir del Ejemplo de Preparación 11 en lugar de mPEG-PLA-Toco.

35 **Ejemplo 6**

Composición que contiene fármaco

(Composición 6: Epirubicina/mPEG-PLA-Toco/PLMA-COONa)

Se preparó una composición que contenía fármaco (composición 6) mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1, utilizando epirubicina en lugar de doxorrubicina.

40 Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Ejemplo 7**Composición que contiene fármaco****(Composición 7: Paclitaxel/mPEGPLA-Toco/PLA-COONa con Ca^{2+} fijado)****(1) Preparación de la solución acuosa que contiene paclitaxel**

- 5 Una mezcla de 248,1 mg de PLA-COONa preparado a partir del Ejemplo de Preparación 15, 7,5 mg de paclitaxel, y 744,3 mg de mPEG-PLA-Toco preparado a partir del Ejemplo de Preparación 7 se disolvieron completamente en 5 ml de etanol para obtener una solución clara. El etanol se eliminó de allí para preparar una composición polimérica que contenía paclitaxel. A esto se le añadió agua destilada (6,2 ml) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a 60°C para preparar la solución acuosa que contenía paclitaxel.

10 **(2) Fijación con el ión metálico divalente**

Se añadieron 0,121 ml (0,109 mmoles) de una solución acuosa 0,9 M de cloruro de calcio anhidro a la solución acuosa que contenía paclitaxel preparada anteriormente, y la mezcla se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se filtró utilizando un filtro de membrana de PVDF de 0,22 μm . La solución filtrada se liofilizó y se almacenó en un refrigerador hasta su uso.

- 15 Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Ejemplo 8**Composición que contiene fármaco****(Composición 8: Paclitaxel/mPEGPLGA-Toco/PLMA-COONa con Mg^{2+} fijado)**

- 20 Se preparó una composición que contenía paclitaxel con Mg^{2+} fijado mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 7 excepto que se utilizaron 248,1 mg de PLMA-COONa (Mn: 1,096) del Ejemplo de Preparación 12, 7,5 mg de paclitaxel, 744,3 mg de mPEG-PLGA-Toco del Ejemplo de Preparación 8 y 0,230 ml (0,113 mmoles) de una solución acuosa 0,5 M de cloruro de magnesio hexahidratado (Pm: 203,31).

Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Ejemplo 9

- 25 **Composición que contiene fármaco**

(Composición 9: Paclitaxel/mPEGPLA-Toco/PLMA-COONa con Ca^{2+} fijado)

- 30 Se preparó una composición que contenía paclitaxel con Ca^{2+} fijado mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 7 excepto que se utilizaron 248,1 mg de PLMA-COONa del Ejemplo de Preparación 12, 7,5 mg de paclitaxel, 744,4 mg de mPEG-PLA-Toco del Ejemplo de Preparación 7 y 0,230 ml (0,113 mmoles) de una solución acuosa 0,9 M de cloruro de calcio anhidro.

Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Ejemplo 10**Composición que contiene fármaco****(Composición 10: Paclitaxel/mPEGPLA-Col/PLMA-COONa con Ca^{2+} fijado)**

- 35 Se preparó una composición que contenía paclitaxel con Ca^{2+} fijado se preparó mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 7 excepto que se utilizaron 248,1 mg de PLMA-COONa del Ejemplo de Preparación 12, 7,5 mg de paclitaxel, 744,4 mg de mPEG-PLA-Col de Ejemplo de Preparación 11 y 0,230 ml (0,113 mmoles) de una solución 0,9 M acuosa de cloruro de calcio anhidro.

Los resultados se resumen en la Tabla 1.

40

Tabla 1.

	Fármaco	Copolímero de bloques anfífilo	Poliéster biodegradable	Eficacia de Atrapamiento (%)	Tamaño de partícula (mn)
Peso inicial	10 mg	810 mg	180 mg	-	-
Comp. 1	Doxorrubicina	mPEG-PLA-Toco	PLMA-COONa	98	32
Comp. 2	Doxorrubicina	mPEG-PLGA-Toco	PLMA-COONa	97	28
Comp. 3	Doxorrubicina	mPEG-PCL-Toco	PLA-COOK de 3 brazos	95	41
Comp. 4	Doxorrubicina	Toco-PLA-PEO-PLA-Toco	PLA-COONa de cuatro brazos	95	57
Comp. 5	Doxorrubicina	mPEG-PLA-Col	PLMA-COONa	96	35
Comp. 6	Epirubicina	mPEG-PLA-Toco	PLMA-COONa	97	38
Comp. 7	Paclitaxel	mPEG-PLA-Toco	PLA-COONa	99	29
Comp. 8	Paclitaxel	mPEG-PLGA-Toco	PLMA-COONa	101	30
Comp. 9	Paclitaxel	mPEG-PLA-Toco	PLMA-COONa	100	34
Comp. 10	Paclitaxel	mPEG-PLA-Col	PLMA-COONa	99	34

Ejemplo 11**Evaluación de la absorción intracelular de un fármaco: Citometría de flujo**

Para evaluar la absorción intracelular de un agente bioactivo, se sometieron a ensayo la composición que contenía doxorubicina de la presente invención (Composición 1 en el ejemplo 1) y la formulación de doxorubicina convencional (solución acuosa de hidrocloreto de doxorubicina, Sin Dox) en líneas celulares de cáncer uterino humano, MES-SA (línea celular sensible a la doxorubicina) y MES-SA/Dx-5 (línea celular resistente a la doxorubicina).

Se realizó el estudio de citometría de flujo con FACStarPlus (Becton Dickinson) de acuerdo con el método de Walker et al. (Experimental Cell Research 207: 142(1993)). En resumen, se incubaron células ($1,0 \times 10^6$) en medio de McCoy 5A (Invitrogen Corp.) con un suplemento de suero bovino fetal al 10% y penicilina-estreptomicina al 1%. Después de un período de incubación de 24 horas, las células se trataron con la composición de fármaco a una dosis de 1,0 µg/ml. Las células en 12 x 75 tubos Falcon se colocaron en el FACStarPlus y se observó la fluorescencia a una Longitud de onda de 488 nm (excitación) y 519 nm (emisión). Los datos se analizaron mediante soporte lógico CellQuest y los resultados se muestran en las Figs. 3A a 4B y se resumen en las Tablas 2A y 2B.

Tabla 2A: Número de células (%) que absorbieron el fármaco

Tiempo (hr)	MES-SA			MES-SA/Dx-5		
	Sin Dox	Comp.1	Proporción*	Sin Dox	Comp.1	Proporción*
0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
1	4,0	16,3	4,0	1,8	10,4	5,8
4	11,3	68,9	6,1	3,2	22,7	7,1
8	35,1	92,3	2,6	5,3	29,3	5,5
*Proporción = Composición 1 / Sin Dox						

Tabla 2B: Cambio de (Δ) Intensidad de Fluorescencia

Tiempo (hr)	MES-SA			MES-SA/Dx-5		
	Sin Dox	Comp.1	Proporción*	Sin Dox	Comp.1	Proporción*
0	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-
1	7,6	25,6	3,4	2,6	23,4	9,0
4	20,6	68,6	3,3	7,1	37,6	5,3
8	40,6	108,3	2,7	9,2	46,2	5,0
*Proporción = Composición 1 / Sin Dox						

Como se muestra en las Figs. 2A a 3B y las Tablas 2A y 2B, el fármaco se introduce más eficazmente en las células a partir de la composición de fármaco de la presente invención (Composición 1) que a partir de la formulación en solución convencional (Sin Dox). Particularmente la absorción de doxorrubicina en las células es notable en la línea celular resistente a fármaco.

Ejemplo 12A

Microscopía confocal: composición que contiene doxorrubicina en células MES-SA

Para visualizar la absorción intracelular de un agente bioactivo, se sometieron a ensayo la composición que contenía doxorrubicina de la presente invención (Composición 1 en el Ejemplo 1) y la formulación de doxorrubicina convencional (solución acuosa de hidrocloreto de doxorrubicina, Sin Dox) en las líneas celulares de cáncer uterino humano, MES-SA (línea celular sensible a la doxorrubicina) y MES-SA/Dx-5 (línea celular resistente a la doxorrubicina).

Se obtuvieron imágenes de las células en un sistema de obtención de imágenes confocal Zeiss (Thornwood, NY) LSM 510 con un microscopio de fluorescencia invertida y un analizador de imágenes. En resumen, se incubaron células (3×10^5) en 3 ml de medio de McCoy 5A (Invitrogen Corp.) con un suplemento de suero bovino fetal al 10% y penicilina-estreptomicina al 1% durante la noche en un cubre de vidrio a 37°C. Después de la incubación, las células se trataron con la composición de fármaco a una dosis de 1,0 $\mu\text{g/ml}$, y el cubre se montó en el microscopio. A intervalos de tiempo dados, se observó la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 484 nm, y los resultados se muestran en las Figs. 4A a 4D.

Las imágenes confocales en las Figs. 4A a 4D visualizan los resultados de la citometría de flujo: las células absorbieron cantidades mucho mayores de doxorrubicina cuando se trataron con la composición que contenía doxorrubicina de la presente invención. En Figs. 4A a 4D, las imágenes del lado izquierdo son las imágenes confocales después del tratamiento con la formulación en solución convencional y las imágenes del lado derecho son después del tratamiento con las composiciones de la presente invención. Y según se muestra en las Figs. 4B y 4D, las micelas o nanopartículas se detectaron en los compartimentos citoplásmico y nuclear.

Ejemplo 12B

Microscopía confocal: composición que contiene epirrubicina en células MCF-7

Para visualizar la absorción intracelular de un fármaco, se sometieron a ensayo una composición que contenía epirrubicina de la presente invención (Composición 6 en el Ejemplo 6) y la formulación de epirrubicina convencional (solución acuosa de hidrocloreto de epirrubicina) en líneas celulares de cáncer de mama humano, MCF-7 (línea celular sensible a la epirrubicina) y MCF-7/ADR (línea celular resistente a la epirrubicina).

Las imágenes confocales se obtuvieron mediante el mismo procedimiento descrito en ejemplo 12A, utilizando medio RPMI (Invitrogen Corp.) en lugar de medio de McCoy 5A, y los resultados se muestran en las Figs. 4E a 4H.

Las imágenes confocales en las Figs. 4E a 4H visualizan los resultados de la citometría de flujo: las células absorbieron cantidades mucho mayores de epirrubicina cuando se trataron con la composición que contenía epirrubicina de la presente invención. En las Figs. 4E a 4H, las imágenes del lado izquierdo son las imágenes confocales después del tratamiento con la formulación en solución convencional y las imágenes del lado derecho son después del tratamiento con las composiciones de la presente invención. Y como se muestra en las Figs. 4F y 4H, las micelas o nanopartículas se detectaron en los compartimentos citoplásmico y nuclear.

Ejemplo 13

Citotoxicidad in vitro

Para en ensayo de citotoxicidad in vitro de la composición de la presente invención, se sometieron a ensayo la composición que contenía doxorubicina de la presente invención (Composición 1 en el Ejemplo 1, Doxo-PNP) y la formulación de doxorubicina convencional (solución acuosa de hidrocloreuro de doxorubicina, Sin Dox) en las líneas celulares de cáncer uterino humano, MES-SA (línea celular sensible a la doxorubicina) y MES-SA/Dx-5 (línea celular resistente a la doxorubicina). El análisis MTT es un método bien establecido para el ensayo de citotoxicidad. Cuando las células se tratan con MTT (metiltiazoltetrazolio), se produce MTT-formazano a partir de la reducción del MTT-tetrazolio por las enzimas presentes en las células vivas solo (las células muertas no pueden reducir el MTT-tetrazolio a MTT-formazano). La fluorescencia del MTT-formazano se detecta por medio de un lector de fluorescencia y la densidad óptica se correlaciona con el número de células. Este procedimiento se automatiza, y se calculan la viabilidad celular y los valores de CI_{50} (concentración inhibidora del 50% del crecimiento celular) por medio del soporte lógico instalado en el lector de microplacas.

La actividad citotóxica de cada composición se evaluó en ambas líneas celulares tumorales humanas a diluciones 1:5 a 1:10 que oscilaban de 0,01 a 100 $\mu\text{g/ml}$. Después de su exposición continuada durante 3 días, las células se trataron con MTT (metiltiazoltetrazolio). El MTT-formazano producido a partir de la reducción del MTT-tetrazolio por enzimas presentes en las células vivas se detectó por medio de un lector de fluorescencia. La densidad óptica se correlaciona con el número de células. Los resultados de dos experimentos independientes se expresaron en forma de los valores de CI_{50} (concentración inhibidora del 50%) de cada línea celular. El análisis MTT se realizó esencialmente de acuerdo con el método de Carmichael et al. (Cancer Research 47: 936(1987)). En resumen, las células se cosecharon a partir de un cultivo en fase exponencial desarrollado en medio de McCoy 5A (Invitrogen Corp.) con un suplemento de suero bovino fetal al 10% y penicilina-estreptomycin al 1%, se contaron y se cultivaron en placa en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (suspensión de 100 células, 5×10^4 células/ml para cada línea celular). Después de una recuperación de 24h para permitir que las células reanudaran el crecimiento exponencial, se añadió a los pocillos un medio de cultivo (24 pocillos de control por placa) o medio de cultivo que contenía fármaco. Cada concentración de fármaco se cultivó en placa por triplicado. Al cabo de 3 días de exposición continua al fármaco, las células se trataron con 25 μl de una solución de MTT en agua estéril (2 mg/ml). La fluorescencia se midió utilizando un lector de microplacas automático (SpectraMax 190, Molecular Devices) a una Longitud de onda de 549 nm, y el número de viable células se calculó a partir de la densidad óptica.

Los resultados del estudio de viabilidad celular se muestran en las Figs. 5A y 5B y los valores de CI_{50} (concentración inhibidora del 50%) de cada línea celular se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Análisis MTT (CI_{50} , $\mu\text{g/ml}$)

Tiempo (hr)	MES-SA			MES-SA/Dx-5		
	Sin Dox	Comp.1	Proporción*	Sin Dox	Comp.1	Proporción*
24	0,30	0,14	2,1	54,0	0,95	56,8
48	0,087	0,068	1,3	0,92	0,28	3,3
72	0,031	0,018	1,7	0,75	0,14	5,4
* Proporción = Sin Dox / Composición 1						

La actividad citotóxica de las células sensibles a la doxorubicina fue similar en ambas composiciones como se muestra en la Fig. 5A, pero la composición de fármaco de la presente invención mostró una actividad 6,7 veces mayor tres días después del tratamiento que la formulación en solución convencional cuando se trataron las células resistentes a la doxorubicina como se muestra en la Fig. 5B. Esta diferencia de actividad es debida a las características de las líneas celulares resistentes a fármacos en las que las glicoproteínas P (P-gp) son expresadas en exceso y extruden continuamente los fármacos citotóxicos de la célula. Puesto que el fármaco libre no se puede concentrar en el interior de las células resistentes a fármacos, este resultado implica que el portador de fármaco de la presente invención se introduce en la célula junto con el fármaco incorporado en el portador de fármaco.

Ejemplo 14

Farmacocinética en ratas

Las concentraciones de fármaco en plasma sanguíneo se midieron después de la administración intravenosa de las composiciones que contenían doxorubicina de la presente invención (Composiciones 1 a 5 en los ejemplos 1 a 5) y la formulación de doxorubicina convencional (solución acuosa de hidrocloreuro de doxorubicina, Sin Dox) en ratas Sprague-Dawley de 7-8 semanas de edad (200~250 g).

Las ratas (5 ratas para cada formulación) recibieron una inyección intravenosa a través de la vena de la cola a una dosis de 5 mg/kg. Las muestras de sangre se recogieron de la vena de la cola a los 1, 5, 15, 30 minutos y 1, 2, 4, 8, y 24 horas después de la inyección de fármaco. Las muestras de sangre se centrifugaron inmediatamente, y se separó el plasma. Las muestras de plasma se almacenaron a -50°C hasta su análisis. La doxorubicina se sometió a ensayo por medio del análisis HPLC descrito en el ejemplo 1. La curva de concentración en sangre-tiempo (curva C-t) se muestra en la Fig. 6, y el área bajo la curva de concentración en sangre-tiempo ("AUC" en sus siglas en Inglés) se calculó utilizando la regla trapezoidal lineal. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Farmacocinética en Ratas

	Concentración (µg·hr/mL)				AUC (µg·hr/mL)
	1hr	4hr	8hr	24hr	
Sin Dox	0,23	0,07	0,04	0,03	1,3
Composición 1	7,41	4,69	3,85	1,99	85,6
Composición 2	5,23	2,59	1,57	0,85	42,0
Composición 3	1,47	0,85	0,63	0,31	14,7
Composición 4	2,10	1,35	0,95	0,60	23,2
Composición 5	3,54	2,35	1,96	1,16	44,2

REIVINDICACIONES

1. El uso de un sistema de liberación intracelular en la fabricación de un medicamento para su uso en la liberación de al menos un agente bioactivo en el interior de una célula,

donde el sistema de liberación intracelular comprende al menos un agente bioactivo y un portador polimérico de fármacos con dicho agente bioactivo atrapado en su interior en la solución acuosa, y donde el portador polimérico de fármaco se prepara por medio de una composición polimérica que comprende:

(a) un copolímero de bloques anfífilo que consiste en un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo en el que dicho bloque hidrófobo tiene un grupo hidroxilo terminal que está sustituido con un grupo tocoferol o colesterol, y

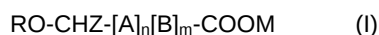
(b) un derivado de poli(ácido láctico) que tiene al menos un grupo carboxilo en el extremo del polímero;

y donde dicho agente bioactivo atrapado en el portador polimérico de fármacos es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácidos nucleicos, proteínas y polipéptidos, con la condición de que el polipéptido no sea ciclosporina, y se permite que sea liberado en una célula en una mayor cantidad cuando el portador de fármaco entra en contacto con dicha célula.

2. El uso de la reivindicación 1, donde dicho grupo tocoferol o colesterol comprende un grupo ácido tocoferolsuccínico o ácido colesterolsuccínico, y dicho derivado de poli(ácido láctico) tiene al menos un grupo carboxilo en el extremo del polímero y de 0,01 a 10 equivalentes de un ión metálico di- o trivalente con respecto a 1 equivalente del grupo carboxilo terminal del derivado de poli(ácido láctico).

3. El uso de la Reivindicación 2, donde dicho ión metálico di- o tri-valente es uno seleccionado del grupo que consiste en Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Al^{3+} .

4. El uso de la Reivindicación 1, 2 o 3, donde dicho derivado de poli(ácido láctico) está representado por la siguiente fórmula:



donde A es -COO-CHZ-; B es -COO-CHY-, -COO-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- o -COO-CH₂CH₂OCH₂; R es un átomo de hidrógeno, un grupo acetilo, benzoilo, decanoilo, palmitoilo, metilo o etilo; cada uno de Z e Y es un átomo de hidrógeno, grupos metilo, o fenilo; M es H, Na, K, o Li; n es un número entero de 1 a 30, y m es un número entero de 0 a 20.

5. El uso de la Reivindicación 1, 2 o 3, donde dicho derivado de poli(ácido láctico) está representado por la siguiente fórmula:

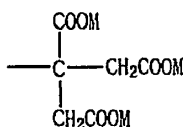


donde X es un grupo metilo; Y' es un átomo de hidrógeno o un grupo fenilo; p es un número entero de 0 a 25; q es un número entero de 0 a 25, siempre que p+q sea un número entero de 5 a 25; R es un átomo de hidrógeno, un grupo acetilo, benzoilo, decanoilo, palmitoilo, metilo o etilo; Z es un átomo de hidrógeno, un grupo metilo, o fenilo; y M es H, Na, K, o Li.

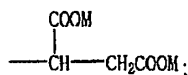
6. El uso de la Reivindicación 1, 2 o 3, donde dicho derivado de poli(ácido láctico) está representado por la siguiente fórmula:



donde W-M' es



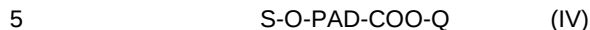
o



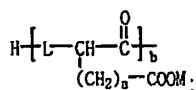
PAD es un miembro seleccionado del grupo que consiste en poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido D-láctico), poli(ácido mandélico), un copolímero de ácido D,L-láctico y ácido glicólico, un copolímero de ácido D,L-láctico y ácido mandélico, un copolímero de ácido D,L-láctico y caprolactona, y un copolímero de ácido D,L-láctico y 1,4-dioxan-2-

ona; R es un átomo de hidrógeno, un grupo acetilo, benzoilo, decanoilo, palmitoilo, metilo o etilo; y M es H, Na, K, o Li.

7. El uso de la Reivindicación 1, 2 o 3, donde dicho derivado de poli(ácido láctico) está representado por la siguiente fórmula:

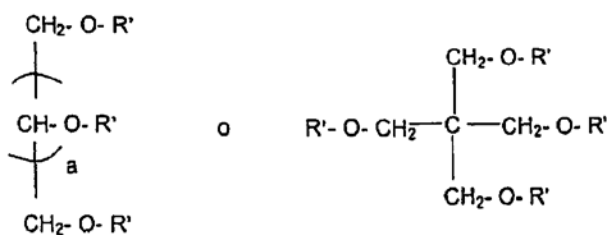


donde S es



10 L es -NR₁- o -O-; R₁ es un átomo de hidrógeno o alquilo C₁-C₁₀; Q es CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₂CH₃, o CH₂C₆H₅; a es un número entero de 0 a 4; b es un número entero de 1 a 10; R es un átomo de hidrógeno, un grupo acetilo, benzoilo, decanoilo, palmitoilo, metilo o etilo; M es H, Na, K, o Li y PAD es un miembro seleccionado del grupo que consiste en poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido D-láctico), poli(ácido mandélico), un copolímero de ácido D,L-láctico y ácido glicólico, un copolímero de ácido D,L-láctico y ácido mandélico, un copolímero de ácido D,L-láctico y caprolactona, y un copolímero de ácido D,L-láctico y 1,4-dioxan-2-ona.

15 8. El uso de la Reivindicación 1, 2 o 3, donde dicho derivado de poli(ácido láctico) está representado por la siguiente fórmula:



(V)

20 donde R' es -PAD-O-C(O)-CH₂CH₂-C(O)-OM y PAD es un miembro seleccionado del grupo que consiste en poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido D-láctico), poli(ácido mandélico), un copolímero de ácido D,L-láctico y ácido glicólico, un copolímero de ácido D,L-láctico y ácido mandélico, un copolímero de ácido D,L-láctico y caprolactona, y un copolímero de ácido D,L-láctico y 1,4-dioxan-2-ona.; M es el mismo que se ha definido en la fórmula (I); a es un número entero de 1 a 4.

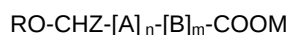
9. El uso de un sistema de liberación intracelular en la fabricación de un medicamento para su uso en la liberación de al menos un agente bioactivo en el interior de una célula,

25 donde el sistema de liberación intracelular comprende al menos un agente bioactivo y un portador polimérico de fármacos con dichos agentes bioactivos atrapados en su interior en la solución acuosa, y donde el portador polimérico de fármacos se prepara por medio de una composición polimérica que comprende

(a) un copolímero de bloques anfífilo que consiste en un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo en el que dicho bloque hidrófobo tiene un grupo hidroxilo terminal que está sustituido con un grupo tocoferol o colesterol, y

(b) un derivado de poli(ácido láctico) que tiene al menos un grupo carboxilo en el extremo del polímero;

30 y donde dicho agente bioactivo atrapado en el portador polimérico de fármacos es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en epirubicina y doxorubicina, y se permite que sea liberado en una célula en una mayor cantidad cuando el portador de fármaco entra en contacto con dicha célula, y donde dicho derivado de poli(ácido láctico) está representado por una cualquiera seleccionada entre las siguientes fórmulas:



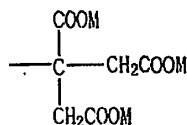
35 donde A es -COO-CHZ-; B es -COO-CHY-, -COO-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- o -COO-CH₂CH₂OCH₂-; R es un átomo de hidrógeno, un grupo acetilo, benzoilo, decanoilo, palmitoilo, metilo o etilo; Z e Y son cada uno átomos de hidrógeno, o grupos metilo; M es H, Na, K, o Li; n es un número entero de 1 a 30, y m es un número entero de 0 a 20;



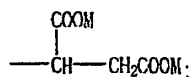
donde X es un grupo metilo; Y' es un átomo de hidrógeno; p es un número entero de 0 a 25; q es un número entero de 0 a 25, siempre que p + q sea un número entero de 5 a 25; R es un átomo de hidrógeno, un grupo acetilo, benzoilo, decanoilo, palmitoilo, metilo o etilo; Z es un átomo de hidrógeno, o un grupo metilo; y M es H, Na, K, o Li;

RO-PAD-COO-W-M

5 donde W-M' es



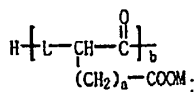
o



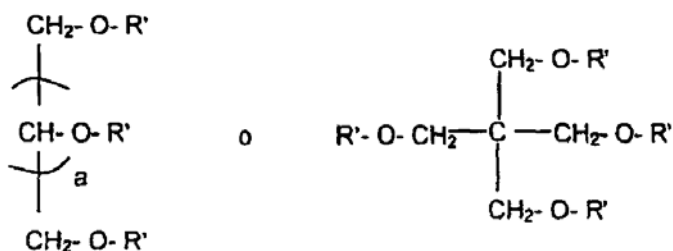
10 PAD es un miembro seleccionado del grupo que consiste en poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido D-láctico), poli(ácido mandélico), un copolímero de ácido D,L-láctico y ácido glicólico, un copolímero de ácido D,L-láctico y ácido mandélico, un copolímero de ácido D,L-láctico y caprolactona, y un copolímero de ácido D,L-láctico y 1,4-dioxan-2-ona; R es un átomo de hidrógeno, un grupo acetilo, benzoilo, decanoilo, palmitoilo, metilo o etilo grupo; y M es H, Na, K, o Li;

S-O-PAD-COO-Q

15 donde S es



20 L es -NR¹- o -O-; R¹ es un átomo de hidrógeno o alquilo C₁-C₁₀; Q es CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₂CH₃, o CH₂C₆H₅; a es un número entero de 0 a 4; b es un número entero de 1 a 10; R es un átomo de hidrógeno, un grupo acetilo, benzoilo, decanoilo, palmitoilo, metilo o etilo; M es H, Na, K, o Li y PAD es un miembro seleccionado del grupo que consiste en poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido D-láctico), poli(ácido mandélico), un copolímero de ácido D,L-láctico y ácido glicólico, un copolímero de ácido D,L-láctico y ácido mandélico, un copolímero de ácido D,L-láctico y caprolactona, y un copolímero de ácido D,L-láctico y 1,4-dioxan-2-ona; y



25 donde R' es -PAD-O-C(O)-CH₂CH₂-C(O)-OM y PAD es un miembro seleccionado del grupo que consiste en poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido D-láctico), poli(ácido mandélico), un copolímero de ácido D,L-láctico y ácido glicólico, un copolímero de ácido D,L-láctico y ácido mandélico, un copolímero de ácido D,L-láctico y caprolactona, y un copolímero de ácido D,L-láctico y 1,4-dioxan-2-ona.; M es el mismo que se ha definido en la fórmula (I); a es un número entero de 1 a 4.

30 10. El uso de la Reivindicación 9, donde dicho grupo tocoferol o colesterol comprende un grupo ácido tocoferolsuccínico o ácido colesterolsuccínico, y dicho derivado de poli(ácido láctico) tiene al menos un grupo carboxilo en el extremo del polímero y 0,01 a 10 equivalentes del ión metálico di- o tri-valente con respecto a 1 equivalente del grupo carboxilo terminal del derivado de poli(ácido láctico).

11. El uso de la Reivindicación 10, donde dicho ión metálico di- o tri-valente es uno seleccionado del grupo que consiste en Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Cr³⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ y Al³⁺.

35 12. El uso de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 11, donde dicho bloque hidrófilo es uno seleccionado del grupo que consiste en polialquilenglicoles, polivinilpirrolidona, poli(alcoholes vinílicos) y poli(acrilamidas), y el bloque hidrófobo es uno seleccionado del grupo que consiste en polilactidas, poliglicólidos, polidioxan-2-ona,

policaprolactona, poliláctico-co-glicólido, poliláctico-co-caprolactona, poliláctico-co-dioxan-2-ona, y sus derivados donde el grupo carboxilo terminal está sustituido con un grupo ácido tocoferolsuccínico o ácido colesterolesuccínico.

13. El uso de cualquier Reivindicación anterior, donde dichos bloques hidrófilos e hidrófobos tienen un peso molecular medio numérico dentro del intervalo de 500 a 50.000 g/mol, respectivamente.
- 5 14. El uso de cualquier Reivindicación anterior, donde la razón del bloque hidrófilo con respecto al bloque hidrófobo en el copolímero de bloques anfífilo es de 3:7 a 8:2.
- 15 15. El uso de cualquier Reivindicación anterior, donde dicho derivado de poli(ácido láctico) tiene un peso molecular medio numérico de 500 a 2.500 g/mol.
- 10 16. El uso de cualquier Reivindicación anterior, donde dicho derivado de poli(ácido láctico) está en forma de una sal de sodio o potasio obtenida mediante una reacción de condensación en ausencia de un catalizador seguido de neutralización con carbonato de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, hidrogenocarbonato de potasio, o carbonato de potasio.
- 15 17. El uso de cualquier Reivindicación anterior, donde dicha composición polimérica comprende de 0,1 a 99,9% en peso del copolímero de bloques anfífilo y de 0,1 a 99,9% en peso de los derivados de poli(ácido láctico) basándose en el peso total del copolímero de bloques anfífilo y el derivado de poli(ácido láctico).
18. El uso de cualquier Reivindicación anterior, donde la razón del agente bioactivo con respecto a la composición polimérica es una razón en peso de 0,1-20,0:80,0-99,9.
19. El uso de cualquier Reivindicación anterior, donde el tamaño de partícula del portador de fármaco está dentro del intervalo de 1 a 400 nm.
- 20 20. El uso de cualquier Reivindicación anterior, donde dicho portador de fármaco es una micela polimérica o una nanopartícula.

Fig. 1

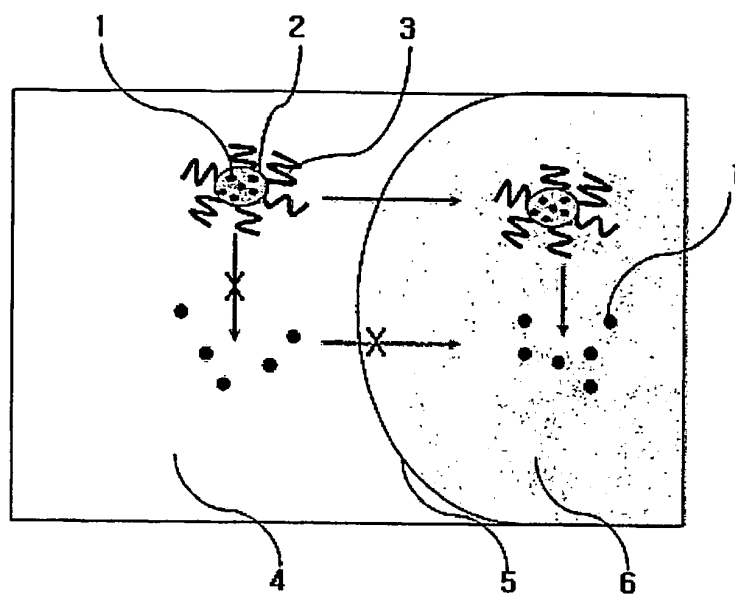


Fig. 2A

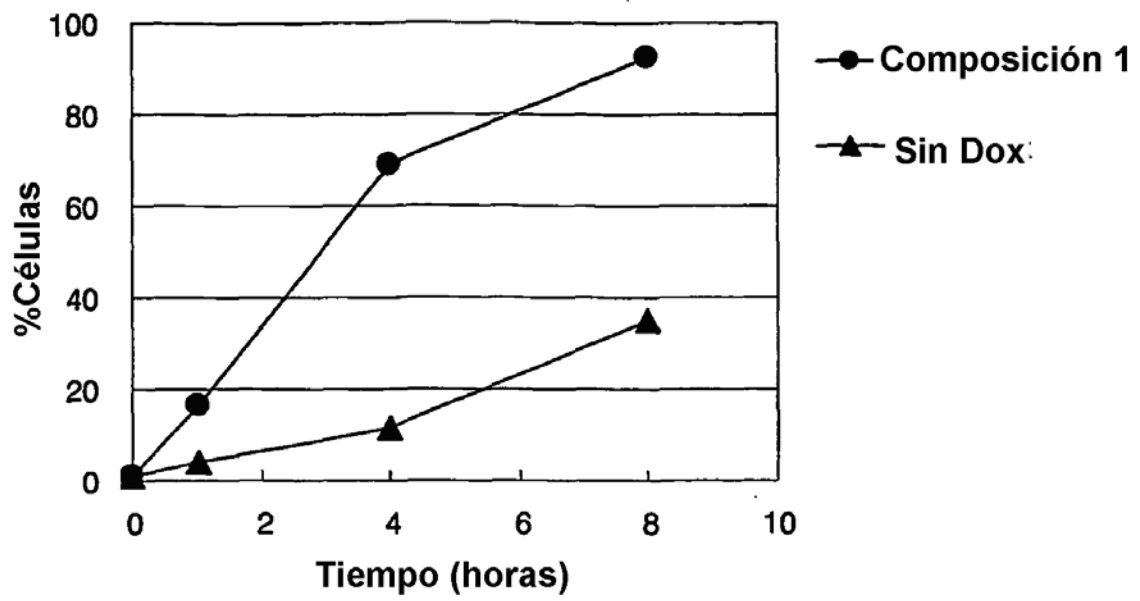


Fig. 2B

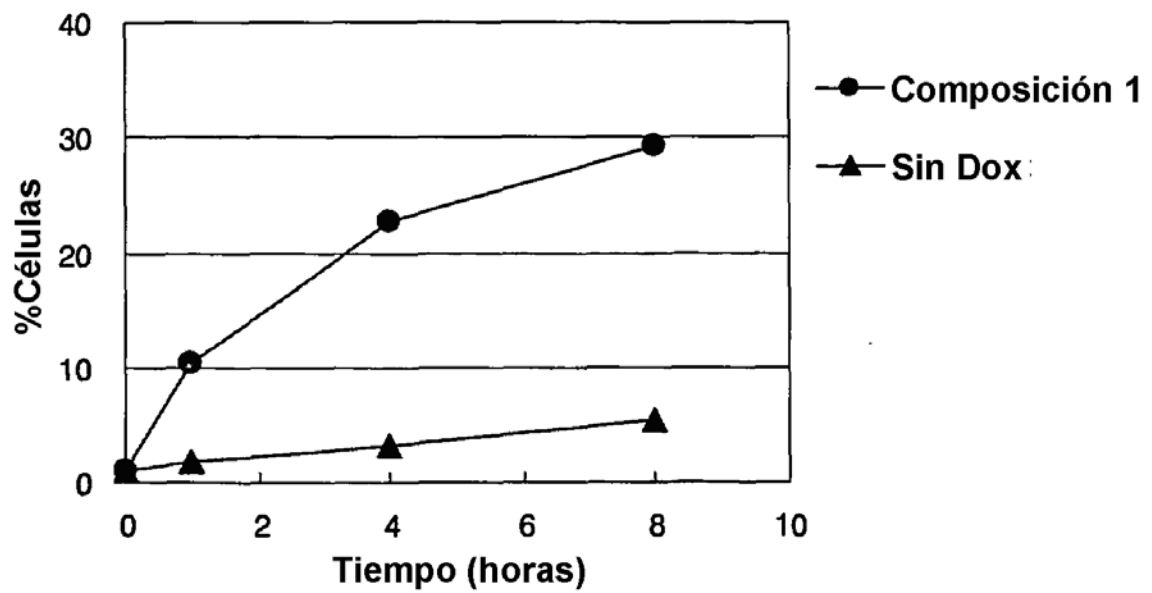


Fig. 3A

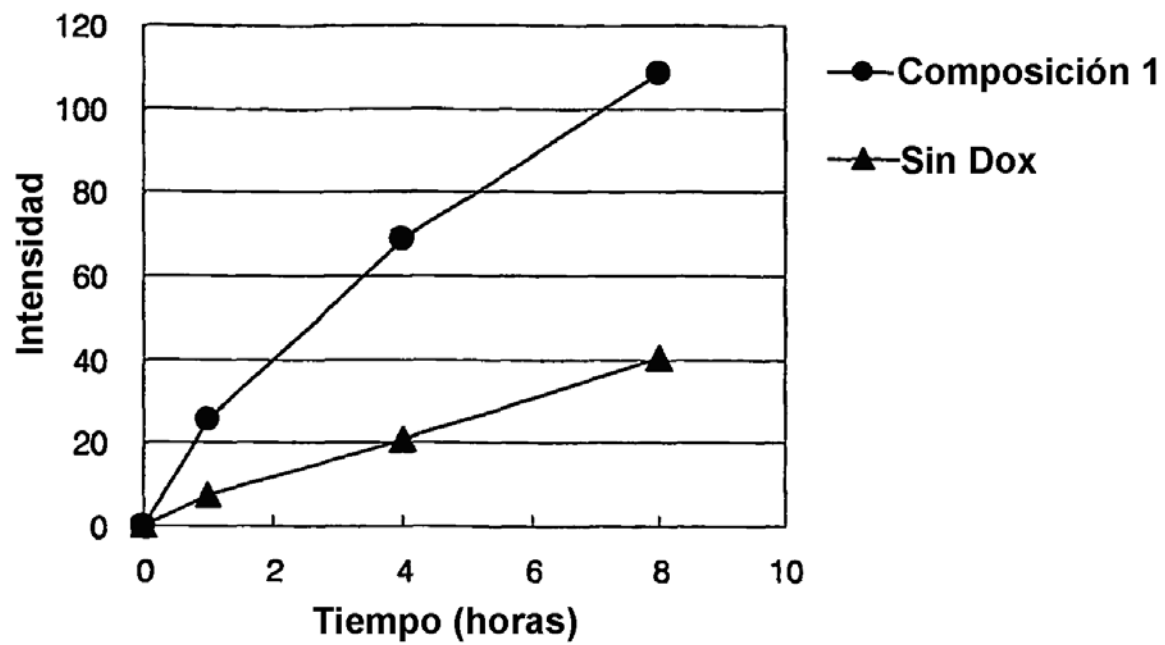


Fig. 3B

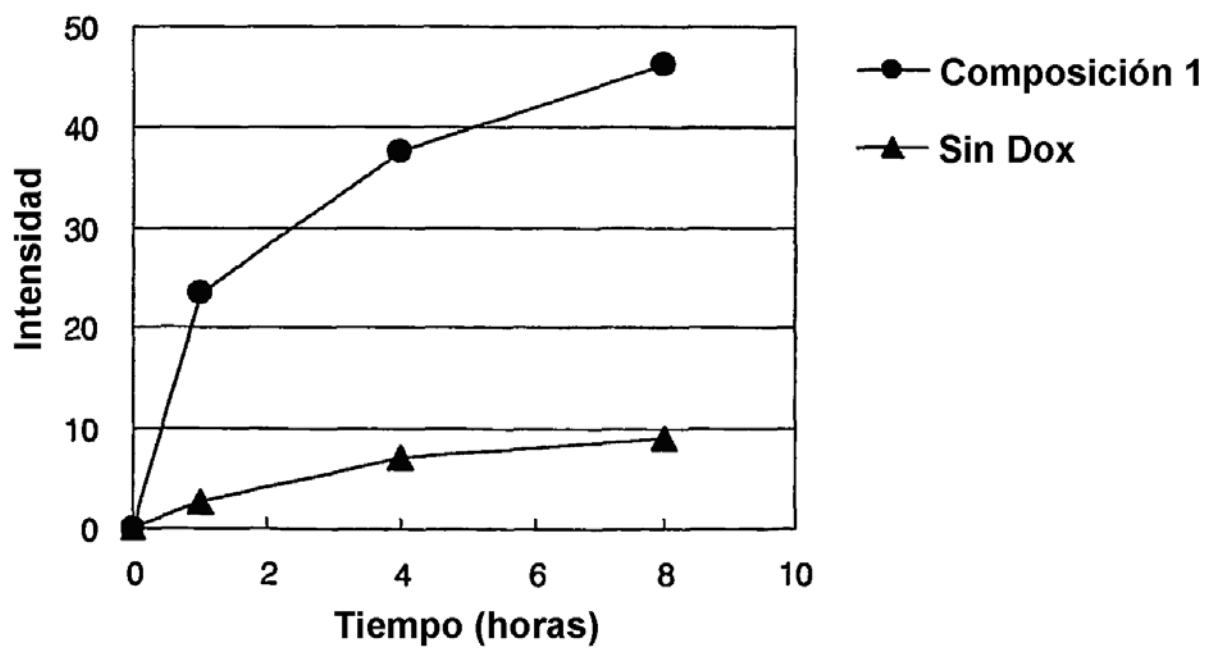


Fig. 4A

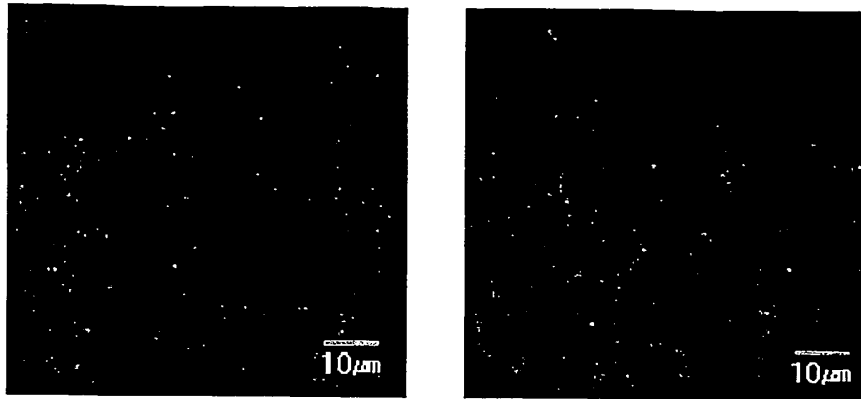


Fig. 4B

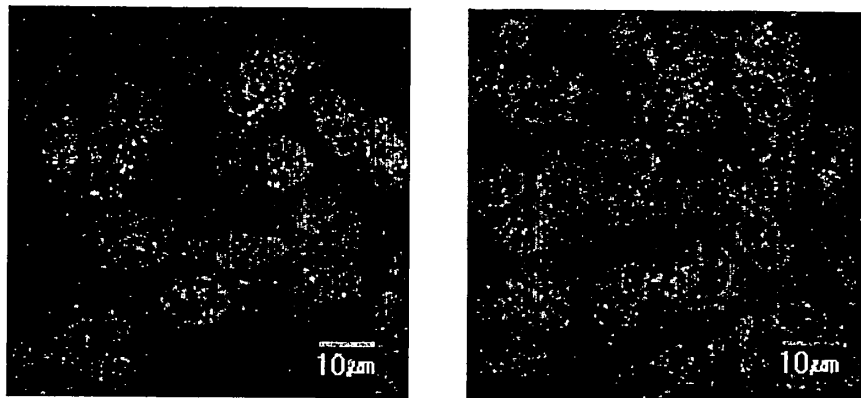


Fig. 4C

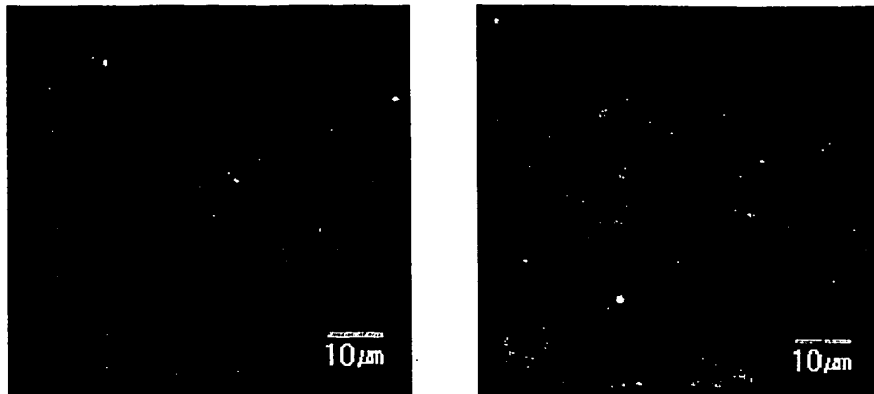


Fig. 4D

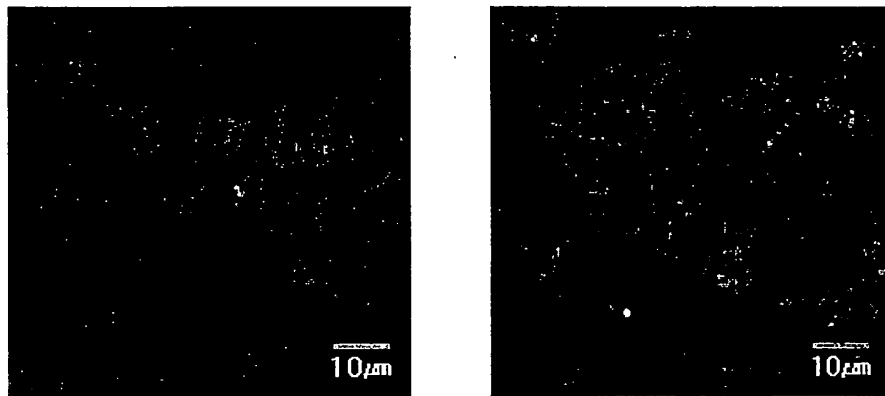


Fig. 4E

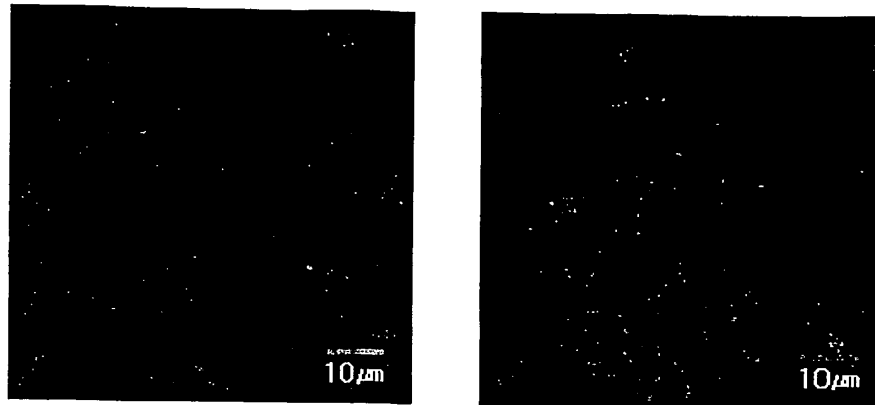


Fig. 4F

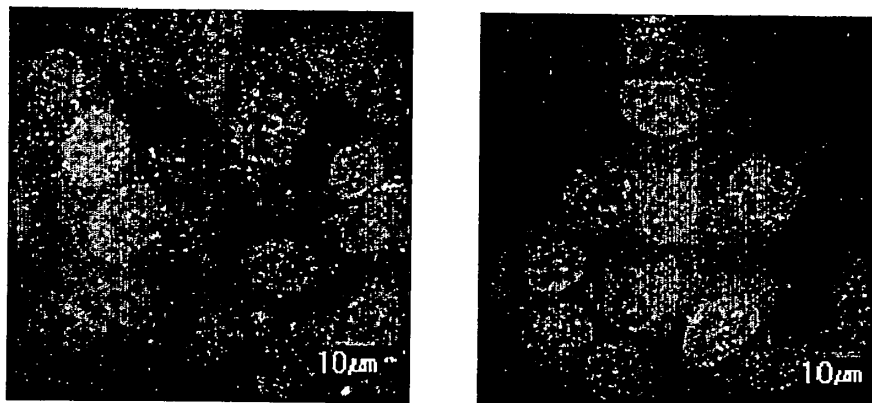


Fig. 4G

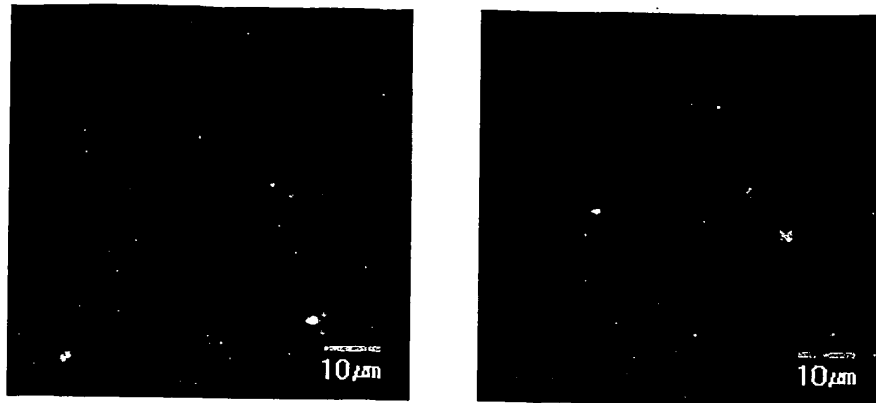


Fig. 4H

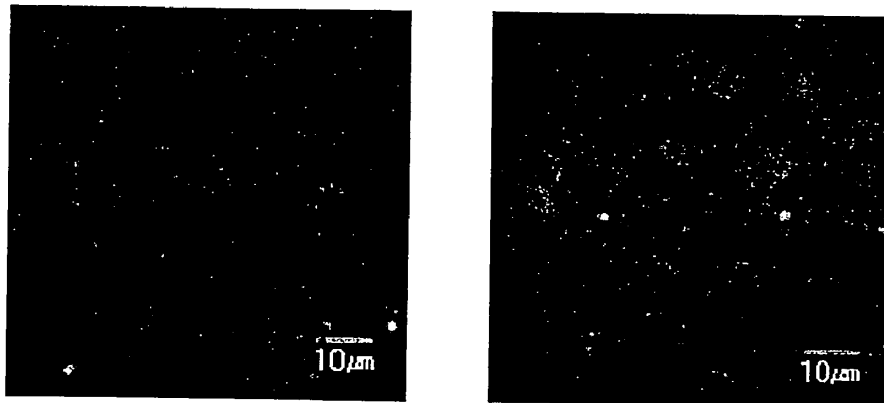


Fig. 5A

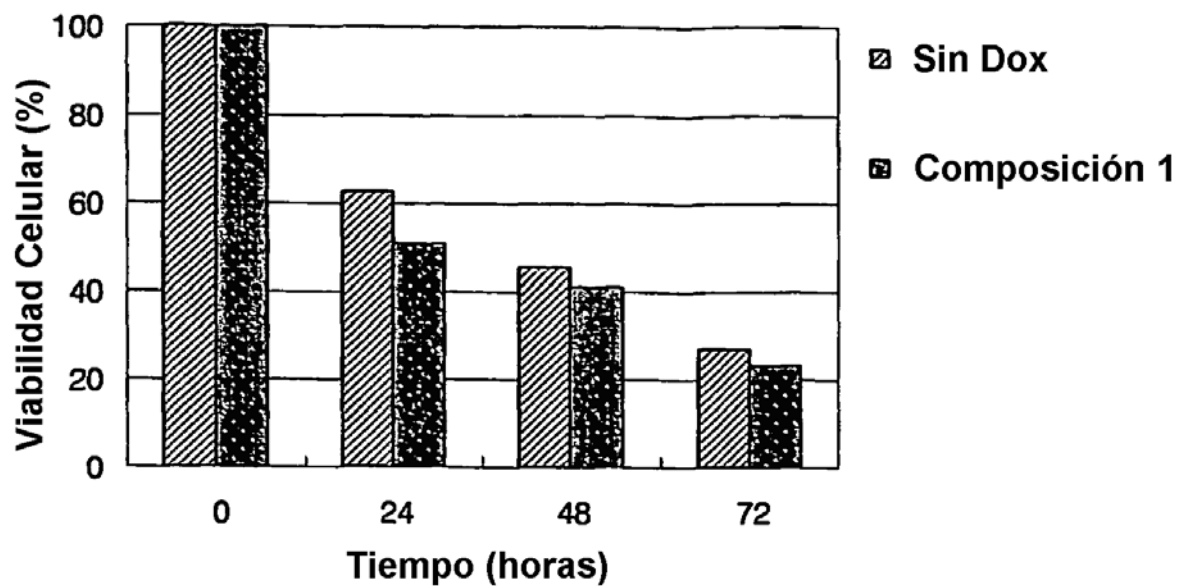


Fig. 5B

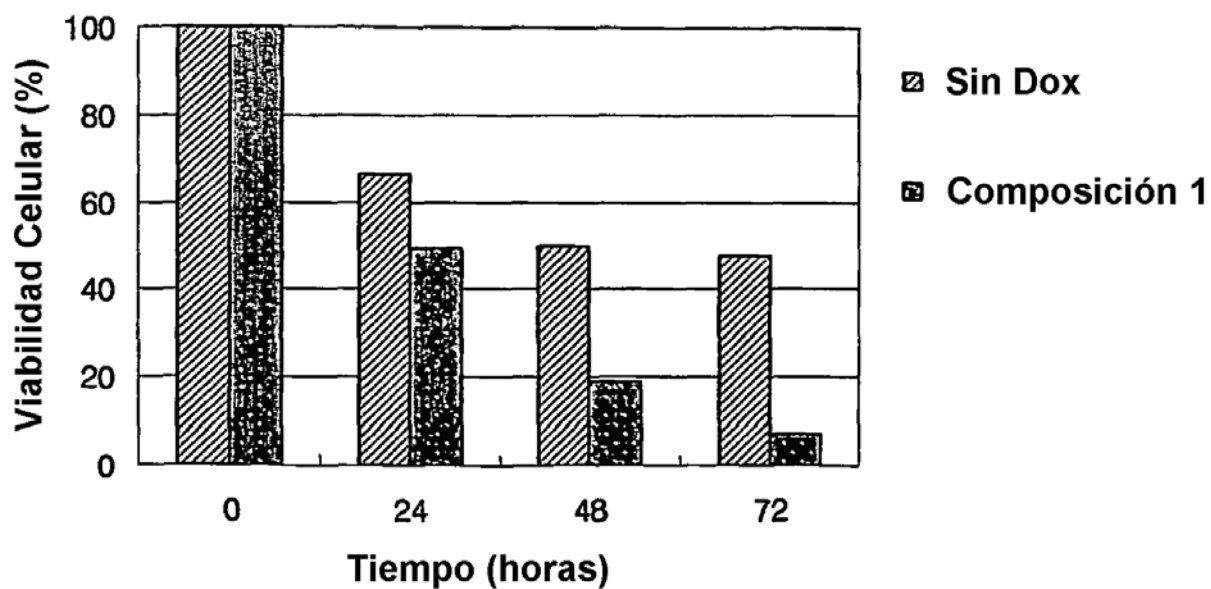


Fig. 6

