

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 175**

51 Int. Cl.:

A61K 9/10 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

G01N 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2009 E 09795398 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 2376060**

54 Título: **Composición de nanopartículas**

30 Prioridad:

15.12.2008 US 122464 P

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

19.02.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**KISSEL, THOMAS;
PETERSEN, HOLGER;
RENETTE, THOMAS y
SEIDEL, NINA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 396 175 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de nanopartículas

Campo de la invención

5 La invención pertenece a nanopartículas de poli(carbonato de etileno) (PEC) que comprenden agentes farmacológicamente activos, su producción y su uso como composiciones farmacéuticas, en particular como suspensiones de nanopartícula.

Antecedentes de la invención

10 Las nanopartículas poliméricas han sido estudiadas exhaustivamente como vehículos particulados en los campos farmacéutico y médico, debido a que éstas proveen ventajas prometedoras como sistemas de suministro de fármaco. Las nanopartículas generalmente se definen como vehículos de tamaño sub-micrónico, sólidas, para fármaco que pueden o no ser biodegradables. El término "nanopartícula" es un nombre colectivo tanto para nanoesferas como para nanocápsulas. Las nanoesferas tienen una estructura tipo matriz. Los fármacos se pueden adsorber en la superficie de la esfera o encapsular dentro de las partículas. Las nanocápsulas son sistemas vasculares en los cuales el fármaco está confinado a una cavidad que consiste de un núcleo líquido interior rodeado por una membrana polimérica. En este caso, las sustancias activas usualmente están disueltas en el núcleo líquido pero también pueden estar adsorbidas en la superficie de la cápsula. Las nanopartículas están recibiendo atención considerable para el suministro de fármacos terapéuticos.

20 En particular, se cree que los vehículos de nanopartícula inyectables tienen la capacidad de revolucionar el tratamiento de enfermedades debido a su mecanismo de suministro de fármaco espacial y temporal controlado. Por ejemplo, ubicar especialmente la liberación de fármacos tóxicos y otros fármacos potentes sólo en sitios terapéuticos específicos puede reducir la dosis sistémica general y el daño que estos fármacos pudieran producir. Controlar en cuanto a tiempo la liberación de un fármaco también puede ayudar a reducir los efectos secundarios no deseados que de otra manera podrían surgir debido a las fluctuaciones circadianas de los niveles de químicos a través de todo el cuerpo. El beneficio general de estas mejoras en el tratamiento de la enfermedad podría ser un incremento en el cumplimiento y calidad de vida del paciente. Los polímeros típicos que se han utilizado para producir nanopartículas poliméricas son por ejemplo poli(metacrilato de metilo), poli(cianoacrilato de etilo), poli(acrilamida), poliuretanos, poli(ácido láctico), poliestireno, poli(láctido-co glucólido) (PLGA) o poli(épsilon-caprolactona).

30 Para que un dispositivo de suministro de fármaco logre los beneficios antes descritos, éste debe estar presente en el torrente sanguíneo lo suficiente para llegar o reconocer su lado de acción terapéutico. Sin embargo, la opsonización o remoción de vehículos de fármaco nanoparticulados desde el cuerpo por el sistema fagocítico mononuclear (MPS por sus siglas en inglés), también conocido como el sistema reticuloendotelial (RES por sus siglas en inglés), es un obstáculo importante para la obtención de estos objetivos. Los macrófagos del MPS tienen la capacidad de remover nanopartículas no protegidas desde el torrente sanguíneo dentro de segundos de la administración por vía intravenosa haciéndolos que sean ineficaces como dispositivos de suministro de fármaco específico de lado. Estos macrófagos, los cuales típicamente son células de Kupffer, o macrófagos del hígado, no pueden identificar directamente las nanopartículas por sí mismas sino sólo reconocer proteínas de opsonina específicas unidas a la superficie de las partículas.

40 Los polímeros actualmente utilizados para producir nanopartículas tienen la desventaja de que éstos son rápidamente reconocidos y por consiguiente eliminados por el sistema de macrófagos o que éstos no son estables contra la hidrólisis. Un método ampliamente utilizado para desacelerar la opsonización de las nanopartículas (y por consiguiente la eliminación por macrófagos) es el uso de grupos protegidos adsorbidos en superficie o injertados los cuales pueden bloquear las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas que ayudan a las opsoninas a unirse a la superficie de la partícula. Estos grupos tienden a ser cadenas poliméricas hidrofílicas largas y agentes tensoactivos no iónicos. Algunos ejemplos de sistemas poliméricos que han sido intentados como grupos de blindaje con el fin de desacelerar la opsonización y por consiguiente la eliminación por macrófagos incluyen polisacáridos, poli(acrilamida), alcohol polivinílico, PEG y copolímeros que contienen PEG. Técnica anterior relevante incluye EP 1249252 y Pinto Reis, C., et al., : "Nano encapsulation I. Methods for Preparation of Drug Loaded Polymeric Nanoparticle", nanomedicine Nul. 2, 2006, páginas 8-21.

55 Es el objetivo de la presente invención proveer nanopartículas y en particular suspensiones de nanopartículas que tengan propiedades de estabilidad mejoradas que sean apropiadas como composiciones farmacéuticas.

Breve descripción de la invención

De conformidad con un aspecto, la solicitud pertenece a una composición farmacéutica que comprende nanopartículas de poli(carbonato de etileno) (PEC) que comprenden un agente farmacológicamente activo. Estas nanopartículas de PEC no sólo presentan una estabilidad física y química, sino también una estabilidad biológica contra fagocitosis en comparación con las nanopartículas poliméricas convencionales. Debido a esta tasa de fagocitosis más baja, las nanopartículas de PEC son eliminadas menos rápidamente por el sistema de macrófagos. Estas características importantes hacen a las nanopartículas de PEC de la presente solicitud apropiadas para uso como una composición farmacéutica para el suministro de agentes farmacológicamente activos. Estas propiedades sobresalientes convierten a PEC en un vehículo de nanopartícula apropiado para la liberación sostenida o controlada del agente farmacológicamente activo contenido, de preferencia encapsulado. En particular, la estabilidad mejorada contra fagocitosis permite el uso de las nanopartículas de PEC de conformidad con la presente invención como un depósito parenteral para la liberación de un agente farmacológicamente activo encapsulado después de la biodegradación de la nanopartícula de PEC, con lo cual dicho agente farmacológicamente activo queda disponible sistémicamente a través de un periodo de liberación más largo. Por lo tanto, el uso de nanopartículas de PEC como vehículos para agentes farmacológicamente activos tiene ventajas significativas con respecto a las nanopartículas poliméricas conocidas en la técnica antecedente.

De conformidad con un aspecto adicional la solicitud pertenece a una suspensión de nanopartículas de poli(carbonato de etileno), que de preferencia incorporan un agente farmacológicamente activo. Una suspensión de nanopartícula de PEC respectiva es físicamente estable y es apropiada para suministro local subcutáneo. De conformidad con un aspecto adicional la solicitud pertenece al uso de una suspensión de nanopartículas de PEC para preparar una composición farmacéutica.

De conformidad con un aspecto adicional, la solicitud pertenece a un método para fabricar una composición farmacéutica que comprenda nanopartículas de poli(carbonato de etileno) que comprenden un agente farmacológicamente activo, en particular mediante preparación de una suspensión de nanopartícula de PEC utilizando el método de desplazamiento de solvente.

Otros objetivos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud se harán evidentes a los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones anexas.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la regulación del tamaño de partícula de las nanopartículas no cargadas mediante variación de la concentración de polímero (Figura 1a para PEC 95 y Figura 1b para PEC 99). La figura muestra el tamaño de partícula en nanómetros obtenido mediante PCS para tres lotes diferentes utilizando concentraciones diferentes de polímero (véase ejemplo 4). El PDI promedio de los triplicados se indica entre paréntesis después del nombre de la carga. La desviación estándar de los tamaños se indica mediante las barras.

La figura 2 muestra la regulación del tamaño de partícula de las nanopartículas cargadas mediante variación de la concentración de polímero. La figura muestra el tamaño de partícula en nanómetros obtenido mediante PCS para tres lotes diferentes utilizando concentraciones diferentes de polímero. La desviación estándar de los tamaños se indica mediante las barras.

La figura 3 muestra el cambio del tamaño de nanopartículas de PEC 95 a diferentes temperaturas. La línea trazada corresponde al tamaño promedio de los triplicados preparados a 4°C, la cual corre a través de todos los cambios de temperatura de una incubadora de clima (véase ejemplo 5.2).

La figura 4 muestra el cambio del tamaño de nanopartículas de PEC 99 a diferentes temperaturas. La línea trazada corresponde al tamaño promedio de los triplicados preparados a 4°C, la cual corre a través de todos los cambios de temperatura de una incubadora de clima (véase ejemplo 5.2).

La figura 5 muestra los resultados de una prueba de hinchamiento de nanopartículas constituidas por PEC 99 (A) o PEC 95 (B) analizadas mediante PCS (véase ejemplo 5.3). El cambio del tamaño se indica durante el procedimiento de evaporación. Las nanopartículas se preparan utilizando PEC 99 o PEC 95. Después de inyectar en solución de PVA (T=0) se toman alícuotas para los puntos de tiempo mostrados y se analizan respecto a tamaño de partícula utilizando PCS. Sólo se muestran los datos para las primeras 24 horas (t=0, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas y 24 horas). La barra de error indica la desviación estándar de los triplicados.

La figura 6a muestra el análisis de partículas de PEC 95 (0.1 mg/5 ml) utilizando microscopia de fuerza atómica (AFM). La figura 6b muestra el análisis de partículas de PEC 95 (3 mg/5 ml) utilizando microscopia de fuerza atómica (AFM).

La figura 7 muestra el análisis de partículas de PEC 99 (0.1 mg/5 ml) utilizando microscopia de fuerza atómica (AFM).

La figura 8 muestra las características de hinchamiento de PEC 95 (3 mg/ml) dentro de la primera media hora del procedimiento de evaporación durante la preparación de las partículas (véase ejemplo 5.3).

La figura 9 muestra la fluorescencia según se determina mediante FACS para suspensiones de nanopartículas de PEC 95 y PEC 99 cargadas a 37°C (véase ejemplo 8).

- 5 La figura 10 muestra la fluorescencia según se determina mediante FACS a 4°C y 37°C (véase ejemplo 8) para diferentes nanopartículas más NaN₃.

Descripción detallada de la invención

De conformidad con un aspecto de esta solicitud, se provee una composición farmacéutica que comprende nanopartículas de poli(carbonato de etileno) que comprenden un agente farmacológicamente activo.

- 10 El uso de poli(carbonato de etileno) (PEC) como un material de matriz para una nanopartícula polimérica es conveniente con respecto al uso de polímeros biodegradables e hidrolíticamente degradables comunes, tales como PLGA o poli(épsilon-caprolactona). Las nanopartículas de PEC tienen una alta capacidad de carga y PEC es químicamente estable en soluciones acuosas y solamente se degrada *in vivo*. PEC es biodegradable *in vivo* e *in vitro* en particular mediante aniones de radical de superóxido O₂⁻¹, cuyos aniones son producidos
15 en forma predominante *in vivo* por células inflamatorias. Esta biodegradación no hidrolítica mediante células que producen O₂⁻¹ es única entre los polímeros biodegradables. Además, los productos de biodegradación de PEC sólo tienen una toxicidad muy baja o incluso no tienen toxicidad.

- Asimismo, los inventores descubrieron en forma sorpresiva que las nanopartículas de PEC son fagocitadas en mucho menor grado y por consiguiente removidas/eliminadas por los macrófagos que otras nanopartículas poliméricas conocidas en la técnica antecedente, tal como por ejemplo nanopartículas de poliestireno. Debido a esta característica importante, las nanopartículas de PEC de la presente invención son biológicamente más estables en el sentido que las nanopartículas de PEC son mucho menos atacadas y por consiguiente eliminadas por los macrófagos y por consiguiente liberan el fármaco contenido a través de un periodo de tiempo más largo que las nanopartículas poliméricas convencionales.

- 25 Estos aspectos importantes, la estabilidad física de las nanopartículas de PEC, la estabilidad química de las nanopartículas de PEC y su estabilidad biológica contra la fagocitosis, hacen que las nanopartículas de PEC de la presente invención sean apropiadas para uso como una composición farmacéutica para el suministro de agentes farmacológicamente activos. Sus propiedades únicas hacen a PEC un vehículo de nanopartícula apropiado para la liberación controlada o sostenida del agente farmacológicamente activo contenido, de preferencia encapsulado. Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término "liberación sostenida" o
30 "liberación controlada" significa que la nanopartícula de PEC utilizada libera no más de 10, 20, 30, 40 o 50% hasta 60, 70, 80, o 90% en peso del agente farmacológicamente activo disuelto o disperso en la misma dentro de 3 a 10, por ejemplo 7, días después de la implantación del dispositivo en el cuerpo humano o animal.

- En particular, la estabilidad mejorada contra la fagocitosis permite el uso de las nanopartículas de PEC de conformidad con la presente invención como un depósito parenteral para la liberación de un agente farmacológicamente activo encapsulado después de la biodegradación de la nanopartícula de PEC, con lo cual se hace que dicho agente farmacológicamente activo esté sistémicamente disponible a través de un periodo de liberación más largo. Por lo tanto, el uso de nanopartículas de PEC como vehículos para agentes farmacológicamente activos tiene ventajas significativas sobre las nanopartículas poliméricas conocidas en la técnica antecedente.

- En la presente invención, la composición farmacéutica comprende por lo menos un agente farmacológicamente activo comprendido dentro de la nanopartícula de PEC, y puede estar, por ejemplo, encapsulado, disuelto o disperso en la misma. Las nanopartículas de la presente invención se pueden utilizar para el suministro controlado o sostenido del agente farmacológicamente activo al paciente. Los términos
45 "liberación sostenida" o "liberación controlada" tal como se utilizan en la presente invención se deberán utilizar como se definieron anteriormente.

- Las nanopartículas de PEC de la presente invención tienen un diámetro que varía de 1 - 1000 nm. El diámetro de las nanopartículas puede ser menor de 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500 nm y/o menor de 450 nm, de preferencia con una distribución de tamaño estrecha. Nanopartículas de un diámetro más pequeño permiten el uso de tamaños de aguja más pequeños en caso que se utilice una suspensión de nanopartícula que se supone se va a inyectar.

- Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término "agente farmacológicamente activo" comprende cualesquiera sustancias que puedan producir una respuesta fisiológica cuando se administran a un organismo vivo. Dicha sustancia usualmente se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva. Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere en términos generales a una cantidad o concentración que es efectiva para reducir, eliminar, tratar, prevenir o controlar los síntomas o el desarrollo de una enfermedad o condición que afecta a un mamífero. Controlar pretende hacer

referencia a todos los procedimientos en los cuales puede haber una desaceleración, interrupción, detención o cese del avance o desarrollo de una enfermedad y condiciones que afectan al mamífero. Sin embargo, "controlar" no necesariamente indica una eliminación total de todos los síntomas de la enfermedad y condición, y se pretende que también incluya el tratamiento profiláctico. La cantidad terapéuticamente efectiva apropiada es conocida por el experto en la técnica debido a que la cantidad varía con el compuesto terapéutico que está siendo utilizado y la indicación que está siendo tratada. Tal como se utiliza en la presente solicitud el significado de los términos "agente activo farmacéutico", "ingrediente activo", "compuesto farmacológicamente activo", "sustancia activa" o "fármaco" se debe entender como equivalente.

Muchos agentes farmacológicamente activos diferentes se pueden suministrar/formular con las nanopartículas de PEC de conformidad con la presente invención. Los ejemplos de clases terapéuticas de fármacos incluyen, pero no se limitan a, anti-hipertensivos, agentes anti-ansiedad, agentes anti-coagulación, anticonvulsivantes, agentes para reducción de glucosa en sangre, antihistaminas, antitumorales, antineoplásicos, beta-bloqueadores, agentes anti-inflamatorios, anti-psicóticos, incrementadores cognitivos, agentes anti-ateroscleróticos, agentes reductores del colesterol, agentes anti-obesidad, agentes para trastorno autoinmune, agentes anti-impotencia, agentes anti-bacterianos y anti-fúngicos, agentes inmunosupresores, agentes hipnóticos, antidepresivos, agentes antivirales, antibióticos, agentes quimioterapéuticos, anticonceptivos, sedantes, esteroides, vitaminas, enzimas, antígenos y combinaciones de los anteriores.

Las nanopartículas de PEC son particularmente apropiadas para agentes farmacológicamente activos, los cuales son farmacológicamente activos en cantidades bajas y necesitan tener un nivel ininterrumpido en sangre durante periodos prolongados, tales como por ejemplo, hormonas, péptidos o proteínas, entidades químicas con afinidad elevada hacia objetivos biológicos, por ejemplo somatostatinas, bifosfonatos, interferón, e interleucinas. Las suspensiones de nanopartícula de PEC de conformidad con la presente invención son en particular apropiadas para el suministro de agentes farmacológicamente activos que son inestables y que se desintegran después del uso oral o en el sistema gastrointestinal y por lo tanto de preferencia se administran por vía parenteral.

La fuerza del polímero PEC es su encapsulación de proteínas sin desnaturalizarlas. Después de la degradación *in vivo* del PEC, no se genera microambiente ácido (lo cual típicamente se observa para polímeros de PLGA) lo cual es otra ventaja ya que las proteínas lábiles a ácido también se pueden aplicar en un depósito de PEC.

El agente farmacológicamente activo utilizado en la presente invención se puede seleccionar a partir del grupo que consiste de compuestos químicos, agentes biológicamente activos, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas. El término "agente biológicamente activo" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un agente que tiene el potencial de reaccionar con componentes biológicos. De manera más particular, los agentes biológicamente activos utilizados en esta descripción están diseñados para cambiar los procesos naturales asociados con una célula viva. Para los propósitos de esta descripción, un proceso natural celular es un proceso que está asociado con una célula antes del suministro de un agente biológicamente activo. Los ejemplos de agentes biológicamente activos incluyen, pero no se limitan a, agentes farmacéuticos, proteínas, péptidos, polipéptidos, inhibidores de enzima, hormonas, citocinas, antígenos, virus, oligonucleótidos, enzimas y polinucleótidos son ejemplos de agentes biológicamente activos.

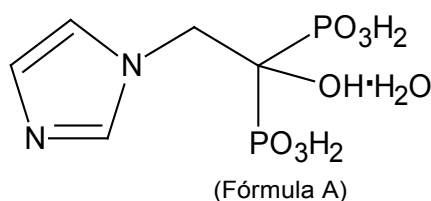
El término "proteína" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un polipéptido (es decir, una cadena de por lo menos dos aminoácidos ligados entre sí mediante enlaces peptídicos). Las proteínas pueden incluir porciones diferentes a los aminoácidos (por ejemplo, pueden ser glucoproteínas, proteoglicanos, etc.) y/o pueden ser procesadas o modificadas de alguna otra manera. Los expertos en la técnica apreciarán que una "proteína" puede ser una cadena de polipéptido completa tal como es producida por una célula (con o sin una secuencia de señal), o puede ser una porción característica de la misma. Los expertos en la técnica apreciarán que algunas veces una proteína puede incluir más de una cadena de polipéptido, ligadas por ejemplo mediante uno o más puentes de disulfuro o asociadas por otros medios. Las modificaciones útiles incluyen, por ejemplo, acetilación terminal, amidación, etc. En algunas modalidades, las proteínas pueden comprender aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, aminoácidos sintéticos, y combinaciones de los mismos. El término "péptido" generalmente se utiliza para hacer referencia a un polipéptido que tiene una longitud de menos de aproximadamente 100 aminoácidos. Los ejemplos de proteínas y péptidos incluyen, pero no se limitan a, citocinas, por ejemplo, interleucinas, G-CSF, M-CSF, GM-CSF o LIF, interferones, eritropoyetinas, ciclosporinas, u hormonas, o sus análogos.

Las nanopartículas de PEC son particularmente apropiadas como vehículos para agentes farmacológicamente activos que tengan un peso molecular bajo (PM) menor de 2,500 Da. Asimismo, de conformidad con una modalidad preferida, el agente farmacológicamente activo tiene un carácter lipofílico o comprende un grupo lipofílico. Los agentes respectivos son encapsulados de manera eficiente por la matriz de PEC para formar las nanopartículas de PEC de la presente invención.

El agente farmacológicamente activo se puede seleccionar a partir del grupo que consiste de la clase de análogos de somatostatina, por ejemplo pasireotida, lanreotida, octreotida, vapreotida y sales de las mismas,

bifosfonatos, por ejemplo, ácido zotetrónico, y sales del mismo, y fármacos que alteran lípido. Un análogo de somatostatina es un compuesto que tiene una actividad tipo somatostatina. Se conocen varios oligopéptidos biológicos activos los cuales tienen actividad tipo somatostatina los cuales inhiben la liberación de hormona del crecimiento a partir de la glándula pituitaria de mamífero. Estos oligopéptidos biológicamente activos son bien conocidos en la técnica junto con el mecanismo de acción de los mismos, lo cual es descrito por ejemplo por Weckbecker et al 2003 (Nature Reviews, Vol. 2, p. 999-1016) y Murray et al. 2004 (J Clin Invest, Vol. 114 p. 349-356), de las cuales ambas se incorporan en la presente solicitud para referencia. Además de la somatostatina por sí misma, estos oligopéptidos biológicamente activos incluyen pero no se limitan a octreotida, lanreotida, vapreotida y pasireotida, junto con las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas, de preferencia el acetato.

Para los propósitos de la presente invención, el término "bisfosfonatos" se refiere a un fármaco que contiene dos grupos fosfonato. Los bisfosfonatos se clasifican en bisfosfonatos que contienen nitrógeno como pamidronato, neridronato, alendronato, ibandronato, o risedronato y bisfosfonatos que no contienen nitrógeno como etidronato, clodronato y tiludronato. Por ejemplo, el ácido zoledrónico se puede utilizar para el sistema de suministro de fármaco de la invención. El bisfosfonato ácido zoledrónico está designado químicamente como ácido (1-hidroxi-2-imidazol-1-il-fosfononoetil)fosfónico mono-hidratado y su fórmula estructural se indica como Fórmula A:



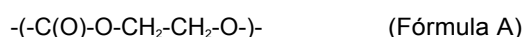
De manera alternativa, los fármacos que alteran lípidos también se pueden cargar en las nanopartículas de la presente invención. Para los propósitos de la presente invención, la expresión "fármacos que alteran lípido" se refiere a cualquier fármaco que cambia la concentración en sangre de lípidos o lipoproteínas tales como por ejemplo colesterol, triglicéridos, la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL por sus siglas en inglés), la lipoproteína de baja densidad (LDL), la lipoproteína de densidad intermedia (IDL), la lipoproteína de alta densidad (HDL), la lipoproteína de muy alta densidad (VHDL), la lipoproteína a y los quilomicrones. Estos fármacos incluyen pero no se restringen a inhibidores de absorción de colesterol, niacina, fibratos o estatinas. Los ejemplos no limitativos para fármacos que alteran lípido son Lescol, activadores del receptor de niacina y activadores del receptor beta de la tiroides.

De manera alternativa, los agentes inmunosupresores también se pueden cargar en las nanopartículas de la presente invención. Los ejemplos no limitativos para agentes inmunosupresores son cortisol, dexametasona, agentes alquilantes, mostazas nitrogenadas, nitrosoureas, y azatioprina, rapamicina, ciclosporina, FK506, y metotrexato.

El agente farmacológicamente activo puede estar presente en una cantidad de hasta aproximadamente 70% en peso de la composición, desde aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 60% en peso de la composición, desde aproximadamente 10% hasta aproximadamente 40% en peso de la composición, o desde aproximadamente 1.0 hasta 10% en peso de la composición. Se pretende, sin embargo, que la elección de un nivel particular de agente farmacológicamente activo se haga de conformidad con factores bien conocidos en las artes farmacéuticas, incluyendo la solubilidad del agente farmacológicamente activo en el PEC utilizado, el modo de administración y la talla y condición del individuo.

Los ejemplos de clases terapéuticas de fármacos incluyen, pero no se limitan a, antihipertensivos, agentes anti-ansiedad, agentes anti-coagulación, anti-convulsivantes, agentes para reducción de glucosa en sangre, descongestionantes, antihistaminas, antitusivos, anti-neoplásicos, beta-bloqueadores, agentes anti-inflamatorios, agentes anti-psicóticos, incrementadores cognitivos, agentes anti-ateroescleróticos, agentes para reducir el colesterol, agentes anti-obesidad, agentes para trastorno autoinmune, agentes anti-impotencia, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes hipnóticos, antibióticos, anti-depresivos, agentes antivirales y combinaciones de los anteriores.

El o los polímeros de PEC utilizados en la preparación de las nanopartículas de PEC de conformidad con la presente invención pueden comprender unidades de carbonato de etileno de la fórmula A:



que tienen por lo menos una de las siguientes características:

- ésta tiene un contenido de carbonato de etileno de 70 a 100% molar, y/o

y/o - ésta tiene una viscosidad intrínseca de 0.4 a 4.0 dl/g según se mide en cloroformo a 20°C,

- ésta tiene una temperatura de transición de vidrio de 5 a 50°C.

5 El polímero PEC utilizado tiene un contenido de carbonato de etileno de 70 a 100% molar. De preferencia, el contenido de etileno del polímero PEC es de 80 a 100%, de preferencia desde 90 hasta 99.9%.

El polímero PEC utilizado tiene una viscosidad intrínseca de 0.4 a 4.0 dl/g medida en cloroformo a 20°C. De preferencia, el polímero PEC tiene una viscosidad inherente, medida a 20°C y a una concentración de 1 g/dl en cloroformo de 0.4 a 3.0 dl/g.

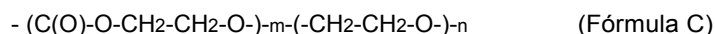
10 El polímero PEC utilizado tiene una temperatura de transición de vidrio de 5°C hasta 50°C, de preferencia desde 15°C hasta 25°C.

El polímero PEC utilizado tiene un peso molecular menor de aproximadamente 2000 kDa. De preferencia, el peso molecular es menor de 500 kDa, según se puede determinar por ejemplo mediante cromatografía de permeación en gel con cloruro de metileno como el eluyente y poliestirol como referencia.

15 En una modalidad adicional, el polímero PEC puede estar presente en forma de un (co)-polímero que contiene por ejemplo como una co-unidad la unidad de óxido de etileno de la fórmula B:



El polímero PEC, si contiene unidades de óxido de etileno, tiene una distribución aleatoria de unidades de carbonato de etileno y de óxido de etileno de conformidad con la fórmula de suma $A_m - B_n =$



20 en la cual $m/(n+m) \times 100 = 70$ a 100. Sin embargo, la mayoría de las unidades de óxido de etileno en los polímeros PEC de la presente invención tienen, estadísticamente, unidades de carbonato de etileno adyacentes, especialmente en aquellos casos en los cuales la relación molar de unidades de óxido de etileno es pequeña. Esto significa que en estos casos la mayoría de las funciones éter resultantes están distribuidas aleatoriamente entre las funciones de carbonato a lo largo de la cadena de polímero. El experto en la técnica
25 entenderá que los espectros de $^1\text{H-RMN}$ de los productos de la invención en DCCl_3 confirman esta suposición.

30 El polímero PEC de la presente invención son estables durante varias horas en agua caliente (90-100°C) sin reducción considerable del peso molecular. Se observa un incremento significativo de la temperatura de transición de vidrio después de exposición a agua bidestilada hirviendo durante horas, por ejemplo, hasta por encima de 18°C, por ejemplo, 28°C.

El polímero PEC puede estar presente en una cantidad de hasta aproximadamente 99% en peso de la composición, desde aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 80% en peso de la composición, desde aproximadamente 10% hasta aproximadamente 30% en peso de la composición, o desde aproximadamente 1 hasta 10% en peso de la composición.

35 De conformidad con una modalidad, la composición farmacéutica toma la forma de una suspensión de nanopartícula. El uso de una suspensión de nanopartícula de PEC biodegradable es conveniente respecto al uso de micropartículas de PEC, debido a que las suspensiones de nanopartículas en contraste con las suspensiones de micropartículas no sedimentan sino que forman suspensiones físicamente estables.

40 Pueden resultar varios perfiles farmacocinéticos después de la inyección de nanosuspensiones. El suministro con depósito a través de las vías de administración subcutánea, intramuscular o intradérmica ofrece liberación prolongada del fármaco, debido a la capacidad de cargar más cantidades de fármaco en forma segura en un volumen inyectable pequeño. La gran capacidad de carga de la suspensión de nanopartículas de PEC es una característica conveniente importante de la suspensión de nanopartícula de la presente invención.

45 Por consiguiente, las nanopartículas de PEC de la presente invención se pueden utilizar convenientemente en forma de una suspensión, en particular en forma de una formulación parenteral. Tal como se utiliza en la presente solicitud el término "formulación parenteral" se refiere a una composición que es administrada mediante vías diferentes a la del tracto digestivo utilizando una jeringa y una aguja y catéter. Esto incluye aplicación por vía intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intracardiaca, subcutánea, intra-ósea, intradérmica, intratecal, intraperitoneal, intravesical, transdérmica, transmucosas, epidural e intravítreo. Las
50 suspensiones de nanopartícula de PEC en particular son apropiadas para suministro local subcutáneo.

Debido a su perfil de estabilidad benéfico, las nanopartículas de PEC de la presente invención se pueden utilizar en forma de un depósito parenteral listo para ser utilizado, el cual se puede inyectar por ejemplo en forma subcutánea. Para este propósito, se puede usar también una aguja de tamaño muy pequeño (por

ejemplo calibre 27 o menor) debido al tamaño pequeño de las nanopartículas de PEC. Estas características hacen que la formulación de depósito respectiva también sea factible para uso doméstico y auto-administración.

5 El experto en la técnica conoce varias formas de aplicación parenteral y las formulaciones de fármaco respectivas e incluyen inyección, infusión, concentrado e implante. La composición farmacéutica que comprende nanopartículas de PEC se puede elaborar trabajándolas con excipientes galénicos apropiados y opcionalmente llevándolas a los dispensadores apropiados.

10 Con el fin de incrementar la estabilidad de las suspensiones de nanopartícula de PEC, la formulación también puede comprender estabilizadores, tales como por ejemplo agentes tensoactivos los cuales evitan la aglomeración o precipitación de las nanopartículas. Por ejemplo, se pueden utilizar agentes tensoactivos iónicos o no iónicos. Los ejemplos de agentes tensoactivos incluyen, pero no se limitan a, ácidos grasos; alquilsulfonatos; ácidos grasos y polioxietileno; derivados de sorbitán; ésteres de ácido graso y polioxietileno-sorbitán; lecitina; fosfolípidos; monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos; y mezclas de los mismos. El uso de un agente tensoactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la técnica. Por 15 conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a edición, 2000.

20 En un aspecto adicional de la solicitud, la composición farmacéutica que comprende el polímero PEC y el agente farmacológicamente activo también puede comprender excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo agentes tensoactivos iónicos o no iónicos, agentes aglutinantes o adhesivos, antioxidantes, lubricantes y/o modificadores de pH. Se apreciará que dichos ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, las nanopartículas de PEC pueden comprender polímeros y/o aditivos adicionales. Los ejemplos incluyen depuradores de radicales en o sobre la nanopartícula, tal como por ejemplo menadiona y/o vitamina C. Los aditivos respectivos se pueden incorporar en el (co)-polímero y, por ejemplo, pueden disminuir la velocidad de degradación del poli(carbonato de etileno) con lo cual se permite una prolongación adicional de la liberación de fármaco y por consiguiente la actividad de depósito de la formulación de nanopartícula.

25 Los ejemplos de dichos agentes tensoactivos incluyen, pero no se limitan a, los productos de reacción de un aceite de ricino natural o hidrogenado y óxido de etileno, tal como la serie CREMOPHOR de BASF Corp. (Mt. Olive, NJ); ésteres de ácido graso y polioxietileno que incluyen ésteres de ácido esteárico y polioxietileno, tales como la serie MYRJ de Uniqema (New Castle, DE); derivados de sorbitán, tales como la serie TWEEN de Uniqema (New Castle, DE); copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno y copolímeros en bloque o 30 poloxámeros, por ejemplo, SYNPERONIC PE/F 87/108/127L44 de Uniqema y PLURONIC (Lutrol F127) de BASF; éteres alquílicos de polioxietileno; ésteres de ácido succínico y tocoferil-PEG disponibles de Eastman Chemical Co. (Kingsport, TN) con un punto de fusión de aproximadamente 36°C; éteres de esteroles y PEG que tienen, por ejemplo, de 5 a 35 unidades [CH₂-CH₂-O], por ejemplo, 20-30 unidades, por ejemplo, SOLULAN C24 (Coleth-24 y Ceteth-24) de Chemron (Paso Robles, CA); ésteres de ácido graso y poliglicerol, tales como 35 DECAGLYN, HEXAGLYN y TETRAGLYN de Nikko Chemicals (Tokio, Japón); y compuestos de éter o éster de alquilen-poliol.

40 Los ejemplos de agentes aglutinantes o adhesivos incluyen, pero no se limitan a, ya sea en forma individual o en combinación, acacia; tragacanto; sacarosa; gelatina; glucosa; almidones tales como, pero sin limitarse a, almidones pregelatinizados; ácido algínico y sales de ácido algínico; silicato de magnesio y aluminio; PEG; goma guar; ácidos de polisacárido; bentonitas; povidona, por ejemplo povidona K-15, K-30 y K-29/32; polimetacrilatos; HPMC; hidroxipropilcelulosa; y etilcelulosa.

Los ejemplos de antioxidantes incluyen, pero no se limitan a, ácido ascórbico y sus derivados, tocoferol y sus derivados, butilhidroxil-anisol y butilhidroxil-tolueno. La vitamina E como α -tocoferol es particularmente útil.

45 Los ejemplos de lubricantes incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, estearato de calcio, éster de ácido graso y sacarosa, polietilenglicol, talco y ácido esteárico.

50 Los ejemplos de modificadores de pH incluyen, pero no se limitan a, NaOH, LiOH, KOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, K₂CO₃, KHCO₃, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, Na₃PO₄, KH₂PO₄, K₂HPO₄, K₃PO₄, meglumina, Ca(OH)₂, Mg(OH)₂, Zn(OH)₂, Al(OH)₃, piridoxina, trietanolamina, hidróxido de amonio, citosina, dietilamina, meglumina, ornitina, glicina, lisina, arginina, valina, prolina, ácido aspártico, alanina, asparagina, isoleucina, leucina, metionina, treonina, hidróxido de colina, procaína, dietiletanolamina, glucosamina, guanina, nicotinamida, piperazina, guanidina, olamina, piperidina, trietilamina, trometamina, benzatina, benzatina, adenina, mezclas de los mismos y similares.

55 En un aspecto adicional de la solicitud, las nanopartículas de poli(carbonato de etileno) están en forma de una suspensión. Las características de la nanopartícula de PEC en la suspensión ya fueron discutidas anteriormente, se hace referencia a la descripción anterior.

De conformidad con una modalidad, la suspensión de nanopartícula de PEC comprende por lo menos un agente farmacológicamente activo y tiene por lo menos una de las siguientes características adicionales:

a) el polímero PEC tiene por lo menos una de las siguientes características:

- éste tiene un contenido de carbonato de etileno de 70 a 100% molar,

y/o

- éste tiene una viscosidad intrínseca de 0.4 a 4.0 dl/g según se mide en cloroformo a 20°C,

5

- éste tiene una temperatura de transición de vidrio de 5 a 50°C;

b) la suspensión de nanopartícula de PEC es una formulación parenteral;

c) la suspensión de nanopartícula de PEC tiene características de liberación sostenida;

d) la suspensión de nanopartícula de PEC es una formulación de depósito parenteral;

10

e) el diámetro de las nanopartículas de la suspensión es menor de 1000 nm, 800 nm, 750 nm, 700 nm, 650 nm, 600 nm, 550 nm, 500 nm y/o menor de 450 nm; y/o

f) el polímero PEC utilizado tiene un peso molecular de menos de 2000 kDa.

Las nanopartículas de PEC de la suspensión comprenden un agente farmacológicamente activo, en particular un agente farmacológicamente activo como el descrito anteriormente. Las nanopartículas de PEC de la suspensión pueden incluir opcionalmente excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales, por ejemplo agentes tensoactivos iónicos o no iónicos, adhesivos, estabilizadores, antioxidantes, lubricantes y/o modificadores de pH y/o aditivos, por ejemplo depuradores de radicales en o sobre las nanopartículas, tales como por ejemplo menadiona y/o vitamina C. Se hace referencia a la descripción detallada anterior la cual también se aplica aquí.

15

La presente invención también pertenece al uso de una suspensión respectiva de nanopartícula de PEC para preparar una composición farmacéutica.

20

La invención también provee un método para fabricar una composición farmacéutica como la descrita anteriormente preparando una suspensión de nanopartículas de poli(carbonato de etileno) que comprenden un agente farmacológicamente activo.

25

Las suspensiones de nanopartícula se pueden obtener mediante varias técnicas. Los métodos apropiados para preparar una suspensión de nanopartícula se describen en detalle por ejemplo en Rice et al., Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 2 (2006) 8-21, incorporada completamente en la presente solicitud para referencia los cuales también se pueden utilizar para preparar las suspensiones de nanopartícula de PEC descritas en la presente solicitud. En particular, el método de evaporación de solvente, el método de salado y el método de desplazamiento de solvente son los más convenientes. El método de desplazamiento de solvente se utiliza en forma subsiguiente ya que éste provee nanopartículas de un tamaño de distribución uniforme.

30

Cuando se utiliza el método de desplazamiento de solvente, el polímero se disuelve primero en un solvente orgánico (por ejemplo acetona, acetonitrilo, sulfóxido de dimetilo (DMSO), N-1-metil-2-pirrolidona (NMP), cloroformo, 1,4-dioxano, dimetilformamida (DMF), o N-2-pirrolidona) el cual es miscible con agua en una concentración definida. Esta mezcla después se inyecta mediante una jeringa o bomba de inyección en una solución acuosa (por ejemplo, solución amortiguadora PBS (pH 7.4, 0.1M) la cual puede comprender opcionalmente un estabilizador. Inmediatamente ocurre una difusión rápida de la fase orgánica en la fase acuosa, lo cual lleva a la creación de un sistema coloidal, tinalizado. Esta solución se mezcla con un agitador magnético a presión normal o a presión reducida hasta que el solvente orgánico se evapora por completo. El tamaño de las nanopartículas que se puede producir mediante el método de desplazamiento de solvente se puede variar cambiando factores diferentes. Los factores importantes que pueden influir en el tamaño es la concentración de polímero, la concentración del estabilizador opcional en la solución acuosa, y la proporción de la fase orgánica con respecto a la fase acuosa, el diámetro del capilar de inyección, la velocidad de inyección de la mezcla polímero/solvente y también la temperatura. En particular la concentración de polímero es decisiva. El método de desplazamiento de solvente muestra en particular para compuestos lipofílicos una alta eficiencia de encapsulación y por consiguiente es muy apropiado para encapsular fármacos lipofílicos, como se muestra en los ejemplos utilizando el marcador fluorescente lipofílico coumarina-6 como una sustancia modelo.

35

40

45

Los ejemplos de solventes orgánicos incluyen, pero no se limitan a, acetona, acetonitrilo, sulfóxido de dimetilo (DMSO), N-1-metil-2-pirrolidona (NMP), cloroformo, 1,4-dioxano, dimetilformamida (DMF), o N-2-pirrolidona; de preferencia sulfóxido de dimetilo (DMSO) o N-1-metil-2-pirrolidona (NMP).

50

Para cargar las nanopartículas con por lo menos un agente farmacológicamente activo, se prepara una primera solución de reserva del agente farmacológicamente activo disolviendo del agente farmacológicamente activo en solvente orgánico (por ejemplo acetona o acetonitrilo) que sea miscible con agua en una

concentración definida. La concentración del agente farmacológicamente activo en la primera solución de reserva puede variar desde 1 hasta 500 microgramos por mililitro de solvente orgánico, de preferencia desde 5 hasta 100 microgramos por mililitro de solvente orgánico, de manera más preferida 25 a 7 microgramos por mililitro de solvente orgánico. Se prepara una segunda solución de reserva disolviendo el polímero PEC en solvente orgánico (por ejemplo acetona o acetonitrilo) que sea miscible con agua en una concentración definida. La concentración del polímero PEC en la segunda solución de reserva puede variar desde 0.1 hasta 100 miligramos por mililitro de solvente orgánico, de preferencia desde 0.5 hasta 50 miligramos por mililitro, de manera más preferida desde 1 hasta 25 miligramos por mililitro. Las cantidades necesarias de la primera solución de reserva y la segunda solución de reserva se transfieren con una pipeta a una copa de Eppendorf y se llena con solvente orgánico hasta 1.5 ml. Después de someter a acción de remolino e inyectar en la solución de PVA, se obtienen las concentraciones finales deseadas. Los métodos para determinar la concentración y cantidad apropiadas de soluciones de reserva para obtener la concentración final deseada son bien conocidos por el experto en la técnica.

Dependiendo de las propiedades físicas y químicas del agente farmacológicamente activo, el contenido de carga del fármaco puede variar entre 0.1 y 70% del peso. Cuando se preparan las nanopartículas de PEC que comprenden un agente farmacológicamente activo, la cantidad de polímero PEC en comparación con el agente farmacológicamente activo en peso puede variar entre 1 y 90 %, de preferencia aproximadamente 30%.

De conformidad con una modalidad, los polímeros PEC se disuelven en acetonitrilo, debido a que el acetonitrilo es miscible con agua y disuelve al polímero PEC.

El solvente que se utiliza para disolver el polímero PEC es desplazado por un segundo solvente, que de preferencia contiene un emulsificante. Los detalles se describen también en la sección de ejemplos. Como emulsificante, se puede utilizar alcohol polivinílico, de preferencia Mowiol 18/88.

De conformidad con una modalidad, el tamaño de las partículas es regulado por la concentración de polímero. Se demostró mediante experimentos, que una concentración de polímero PEC de 0.1 mg / 5 ml de PVA es apropiada para obtener nanopartículas que tengan un tamaño menor de 200 nm. Concentraciones de 3 mg / 5 ml de PVA producen nanopartículas que tienen un tamaño escasamente por encima de 200 nm y por consiguiente siguen estando en un intervalo muy apropiado.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Procedimiento experimental para las síntesis de carbonato de (polietileno)

El PEC se puede obtener a partir de la reacción de CO₂ con óxido de etileno y polimerización subsiguiente (véase por ejemplo Acemoglu et al, Poly(ethylene carbonate)s part I: Syntheses and structural effects on biodegradation, Journal of controlled release, 1997, 49 (2,3): p. 263 – 275 y Vogdanis et al Carbon dioxide as a monomer, The polymerization of ethylene carbonate. Makromol. Chem. 1986. Rapid Commun. 7: p: 543-547, incorporadas en la presente solicitud para referencia).

Los polímeros PEC, PEC 95 y PEC 99 que se utilizan posteriormente para la preparación de las nanopartículas presentan las propiedades físicas mostradas en la Tabla 1. PEC 95 tiene un contenido de carbonato de etileno [% molar] de 97%.

TABLA 1

Propiedades físicas de los poli(carbonatos de etileno)

	PEC 95	PEC 99
Peso molecular [kDa]	406.9	276
Temperatura de vidrio Tg [°C]	19.6	20.2
Viscosidad intrínseca n _{inh} [dl/g] en CHCl ₃ *	1.28	1.41

* a 20°C y una concentración de 10 mg/ml

EJEMPLO 2**Preparación de nanopartículas de PEC utilizando el método de desplazamiento de solvente**

La suspensión de nanopartículas de PEC se prepara de conformidad con el siguiente método modificado de desplazamiento de solvente:

5 Antes que nada, se prepara una solución de reserva de polímero-acetonitrilo de PEC 99 y PEC 95. Se utiliza acetonitrilo debido a que éste es miscible en agua y el PEC se disuelve en el mismo. Se pesan 100 mg de PEC en una tapa púrpura y se disuelve dentro de aproximadamente 24 horas en 10 ml de acetonitrilo. La solución de reserva tiene una concentración de 10 mg de polímero/ml.

10 La preparación de la solución estabilizadora utiliza 100 mg de Mowiol 18/88 bajo la adición de 200 ml de agua ultrapura (concentración final: 0.05% de PVA). La solución se calienta durante 3 horas a 90° aproximadamente en un agitador magnético para disolver el PVA completamente. La solución se filtra después de enfriar a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.2 µm y se almacena en un refrigerador.

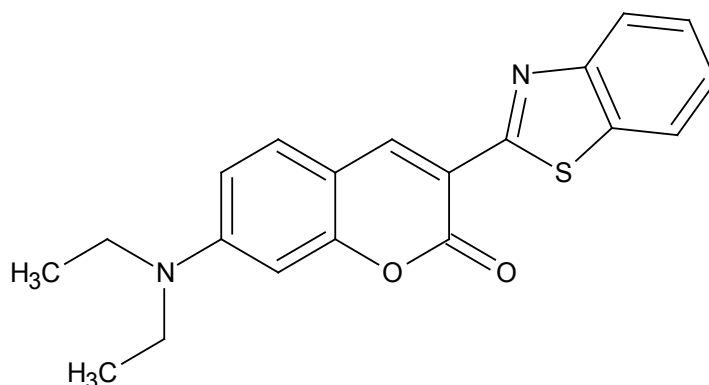
Para preparar las nanosuspensiones, se agregan 5 ml de la solución de PVA (temperatura ambiente) a un frasco de vidrio que se limpió con aire comprimido y la altura y carga de la solución se marca en el exterior.

15 Para la concentración final pretendida, se toma la cantidad deseada de polímero a partir de la solución de PEC/acetonitrilo con una pipeta y se agrega a una copa de Eppendorf de 1.5 ml. Después de esto, se agrega acetonitrilo para obtener un volumen final de 1.5 ml. La copa se cierra y se homogeniza con un aparato para agitación con acción de remolino. La solución obtenida se aspira en una jeringa de 2 ml (B Braun) con una cánula de calibre 23 y el aire se expulsa, con el fin de reducir al mínimo las turbulencias durante la inyección.
20 Después de esto, la cánula se sumerge en la mitad de la solución de PVA y el émbolo se empuja hacia abajo rápida y constantemente.

Después de esto, los frascos se evaporan durante la noche bajo una campana de extracción sin el uso de una barra de agitación magnética. La eliminación de la barra de agitación magnética evita la agregación del PEC. Después de la evaporación, se confirma que no permanezcan residuos de acetonitrilo, y se agrega el agua evaporada hasta la marca.
25

EJEMPLO 3**Preparación de nanopartículas de PEC cargadas**

30 Para las pruebas celulares, se producen suspensiones de nanopartícula las cuales se cargan con el marcador de fluorescencia cumarina-6 (Sigma Aldrich), el cual se utiliza como un fármaco modelo. Estructura de cumarina-6 (C-6):



35 Se utiliza cumarina-6 (absorción: 485 nm, emisión: 505-525 nm) ya que ésta permite detectar ópticamente un proceso de fagocitosis potencial y además, es un modelo apropiado para un agente lipofílico. Debido a sus características lipofílicas y baja solubilidad en agua, la cumarina-6 se puede procesar de manera apropiada mediante el método de desplazamiento de solvente, para obtener una tasa de empacamiento alta. La eficiencia de encapsulación es muy alta y está cerca del 100%. La preparación de las nanopartículas cargadas también se efectúa utilizando el método modificado de desplazamiento de solvente como se describe en el ejemplo 2. La cumarina-6 se utiliza en una solución de reserva de 50 µg/ml en acetonitrilo (la solución de reserva se almacena en el refrigerador y se protege contra la luz utilizando, por ejemplo, lámina delgada de aluminio) y los polímeros PEC 95 y 99 como una solución de reserva de 10 mg/ml en acetonitrilo.
40 Todas las muestras se preparan por triplicado. Para cargar las nanopartículas, se mezclan las cantidades requeridas de solución de reserva de PEC y solución de reserva de cumarina-6, se aforan con acetonitrilo

hasta 1.5 ml y se someten a acción de remolino (véase tabla 2). Esta solución se inyecta después en la solución de PVA de conformidad con el esquema habitual (véase la sección anterior).

En el presente experimento, se elige una concentración de 0.2% de cumarina-6 (relacionada con la masa del PEC). Debido a que las nanopartículas de PEC 95 son más pequeñas que las nanopartículas de PEC 99 a una concentración de 3 mg/5 ml, se produce una solución al 1% de PVA para el PEC 95 a 3 mg / 5 ml por triplicado (0.2% de cumarina-6) en lugar de una solución de PVA al 0.05%.

TABLA 2

Esquema para los lotes de reacción para nanopartículas cargadas con cumarina-6

Concentración de PEC95/99 (mg/5ml)	Solución de reserva de PEC95/99 (10mg/ml)	Solución de reserva de Cumarina-6 (50µg/ml)	Acetonitrilo	Volumen total
0.1 mg	10 µl	4 µl	1486 µl	1500 µl
3 mg	300 µl	120 µl	1080 µl	1500 µl

La determinación del tamaño se efectúa mediante espectroscopia de correlación de fotón con un aparato zetasizer de Malvem instruments.

El análisis de TEM revela que la cumarina-6 se incorpora en las nanopartículas. Las nanopartículas cargadas tienen una forma redonda con una superficie lisa. No se encuentran agregados.

EJEMPLO 4**Regulación del tamaño de nanopartícula mediante la concentración de la solución de polímero**

La preparación de la suspensión de nanopartícula se efectúa utilizando un método modificado de desplazamiento de solvente como se describió anteriormente en el Ejemplo 2 utilizando tres concentraciones diferentes de PEC 95 o PEC 99 (véase tabla 3). Las cantidades necesarias de las soluciones de reserva se transfieren con una pipeta a una copa de Eppendorf y se afora con acetonitrilo hasta 1.5 ml. Después de agitar con acción de remolino e inyectar en la solución de PVA se obtienen las concentraciones finales deseadas. Todas las otras condiciones de reacción (volumen de reacción, temperatura, condiciones de inyección, tiempo y temperatura de evaporación) permanecen constantes. Las reacciones se preparan por triplicado, y el experimento completo se repite por lo menos una vez.

TABLA 3

Esquema para los lotes de reacción para nanopartículas no cargadas

Concentración de PEC (mg/5ml)	Solución de reserva de PEC (10mg/ml)	Acetonitrilo
0.1 mg	10 µl	1490 µl
3 mg	300 µl	1200 µl
6 mg	600 µl	900 µl

El tamaño de partícula de las nanopartículas obtenidas se determina mediante espectroscopia de correlación de fotón (PCS por sus siglas en inglés) utilizando un aparato "Zetasizer Nano ZS" (Malvern Instruments).

Los resultados de la PCS como se muestran en la Figura 1 demuestran tamaño de partícula incrementado con concentraciones cada vez mayores de polímero. Por lo tanto, el tamaño de las nanopartículas se puede regular mediante la concentración del polímero. Para PEC 95 (véase Figura 1a), se obtienen distribuciones de tamaño más uniformes que para PEC 99 (véase Figura 1b). Los mejores resultados se obtienen con una concentración de 3 mg de polímero por cada 5 ml debido a que el índice de polidispersión es bastante estrecho. Concentraciones de polímero de 0.1 mg / 5 ml son muy apropiadas para producir nanopartículas que tienen un diámetro menor de 200 nm. Las concentraciones de 3 mg / 5 ml usualmente llevan a nanopartículas que tienen un diámetro más grande, por ejemplo mayor de 200 nm.

EJEMPLO 5

10 Caracterización de las nanopartículas de PEC

1. Determinación del tamaño de nanopartículas de PEC cargadas con cumarina-6

Se preparan suspensiones de nanopartículas de PEC 95 y PEC99 cargadas como se describió anteriormente en concentraciones de 0.1 mg y 3 mg de polímero por cada 5 ml. La carga se efectúa con 0.2% (p/p) de cumarina-6. Cuando se preparan suspensiones de PEC 99 no cargadas, se obtienen partículas que tienen un tamaño de 300 nm y más grandes, mientras que PEC 95 produce tamaños más uniformes. Debido a que las nanopartículas que tienen un tamaño mayor de 300 nm son más interesantes para los experimentos de célula, el tamaño de las nanopartículas de PEC 95 se puede agrandar con una solución de PVA al 1% para la concentración de 3 mg / 5 ml de solución de PVA. Las nanopartículas de PEC 95 (0.1 mg/5 ml) y PEC 99 (3 mg/5 ml) se preparan como se describió anteriormente. El tamaño se determina en la solución de PVA de 0.05% de PVA mediante espectroscopia de correlación de fotón (PCS) utilizando un aparato Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). La muestra de las nanopartículas de 3 mg de PEC 95 que se prepara en una solución de PVA al 1% se diluye hasta 0.05% de PVA utilizando agua ultrapura.

Los resultados de la PCS se muestran en la Figura 2. En suma el tamaño de las partículas es casi idéntico al tamaño de las partículas no cargadas, debido a que el tamaño se agrandó sólo ligeramente. El uso de PVA al 1% también lleva a un incremento del tamaño, sin embargo no más allá de 300 nm según se determina mediante PCS.

2. Análisis de estabilidad para las nanopartículas de PEC 95 y PEC 99 a temperaturas diferentes

Para los experimentos de clima, se preparan triplicados de la suspensión de nanopartícula de PEC 95 y PEC 99 a una concentración de 3 mg/5 ml a temperaturas diferentes.

Las suspensiones de nanopartícula se preparan a 4°C. Por lo tanto, los frascos de vidrio llenos con la solución de PVA se posicionan durante 2 horas en una incubadora de clima con el fin de que se adapten a la temperatura circundante. Después de esto, se efectúa la inyección de las soluciones de PEC/acetónitrilo (día 0). Después del proceso de evaporación durante 48 horas (debido a la temperatura baja) las muestras se extraen y se determinan el tamaño y el potencial zeta utilizando un aparato zetasizer y los frascos se vuelven a cerrar. Los frascos se mantienen cerrados y se almacenan a 4°C y 3 días después de la inyección se efectúa una medición adicional. Los triplicados de nanopartícula se mantienen en paralelo en el refrigerador y se someten a cambios de temperatura. Cada nueva muestra se prepara a una temperatura más alta y se analiza. 24 horas después de la última medición (día 4) se eleva la temperatura de la incubadora de clima hasta 14°C y se preparan dos nuevos triplicados de ambos polímeros PEC en la misma concentración en la incubadora de clima y por consiguiente a 14°C. Después de 24 horas, se evapora el acetónitrilo de las muestras nuevas y las muestras se miden utilizando un aparato zetasizer (día 5). La temperatura de la incubadora de clima se eleva hasta 24°C y después que llega a esta temperatura (día 6) se preparan triplicados adicionales de PEC 95 y 99. 24 horas después de la preparación de las nanopartículas a 24°C (día 7) se efectúa un análisis adicional de las suspensiones nuevas y anteriores de nanopartículas y la temperatura de la incubadora de clima se incrementa hasta 31°C. Después que se alcanza esta temperatura, se preparan dos nuevos triplicados y 24 horas después (día 10) se analizan/miden los triplicados que se prepararon a 4°C y 31°C.

Los resultados para las nanopartículas de PEC 95 y PEC 99 se proveen en las figuras 3 y 4, respectivamente. Las nanopartículas que se preparan a 4°C no muestran cambio aparente en el tamaño de partícula y permanecen estables a través de por lo menos 10 días. Para las nanopartículas preparadas a 14°C, 24°C y 31°C se pudo demostrar que solamente para una temperatura de reacción de 31°C el tamaño de partícula se incrementa significativamente.

Las suspensiones de nanopartícula preparadas a partir del polímero PEC 95 muestran que la temperatura tiene poca influencia sobre el tamaño de las partículas y el potencial zeta. Los triplicados preparados a 4°C muestran a través del intervalo completo de temperaturas (y por lo tanto también a través de la temperatura de transición de vidrio) básicamente el mismo tamaño y potencial zeta. Para los triplicados que se preparan a temperaturas más altas que la temperatura de transición de vidrio, se detecta un incremento pequeño del tamaño. Por consiguiente, la temperatura tiene, si acaso, sólo una influencia pequeña durante la preparación de las partículas, sin embargo, no durante el almacenamiento de las suspensiones no cargadas.

3. Análisis de tamaño e hinchamiento para nanopartículas no cargadas

5 Se toman alícuotas a partir de la mezcla de reacción de nanopartícula de PEC 95 y PEC 99 poco después de inyectar la solución de polímero en la solución de PVA ($T=0$), durante la evaporación a $t= 30$ minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas y 24 horas. Después de esto, se completa el procedimiento de evaporación y los frascos se sellan con una tapa. Se efectúan mediciones adicionales a partir del contenedor de nanopartícula sellado final a $t= 48$ horas, 4 días, y 9 días después de T_0 .

10 Las alícuotas se analizan respecto a tamaño de partícula mediante PCS como se describió anteriormente. Los resultados para las nanopartículas de PEC95 y PEC99 para las primeras 24 horas se proveen en la figura 5. Para ambos polímeros se puede observar un incremento en el tamaño de partícula durante los primeros 30 minutos. Después de $t= 30$ minutos el tamaño de partícula permanece constante por el resto del periodo de examen:

TABLA 4
Resultados para PEC 99 y PEC 95

Muestra	Tiempo después de T0/min	Tamaño/nm
5 PEC 99	0	235.7
	30	272.5
	60	270.9
	90	274.1
	120	275.2
10	12960	267.3
	PEC 95	0
15	30	193.8
	60	190.1
	90	189.7
	120	192.2
	12960	189.3

Tomando como base estos datos se puede concluir que las nanopartículas básicamente maduran dentro de 30 minutos y no experimentan cambios importantes durante el periodo de evaporación y hasta 9 días de almacenamiento. El análisis paralelo de las nanopartículas mediante microscopia de fuerza atómica revela que el incremento del tamaño de partícula durante los primeros 30 minutos es causado en efecto por el hinchamiento de partículas individuales y no por coalescencia.

Se efectúa un experimento adicional utilizando AFM para aclarar si el incremento en tamaño se debe al hinchamiento de las partículas o si se debe a una coalescencia y agregación de las partículas. Para este propósito las nanopartículas se analizan mediante microscopia de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés) utilizando un aparato "JEM 3010" (Jeol GmbH). Los experimentos se efectúan para determinar el tamaño, distribución de partícula y características de superficie y para analizar las características de hinchamiento.

Las nanopartículas con concentraciones de PEC (PEC 95 y PEC 99) de 0.1 mg / 5 ml y 3 mg / 5 ml se preparan y miden mediante PCS al siguiente día. Después de esto, se efectúa el análisis de distribución de la partícula y de las características de superficie utilizando AFM (véase más adelante) durante la primera parte del análisis para determinar las características de superficie y la distribución de partícula.

Para el análisis de hinchamiento, se determinan el desarrollo de la nanopartícula y las características de hinchamiento utilizando AFM como se describió anteriormente. La primera extracción de muestra para análisis de AFM se efectúa a T0, y por lo tanto directamente después de la inyección de la solución de acetoniitrilo/PEC en la solución de PVA al 0.05%.

Para AFM, se aplican unas cuantas gotas de la suspensión de nanopartícula sobre un portaobjetos de vidrio. Después de la adsorción de las nanopartículas a la superficie el líquido de recubrimiento se remueve mediante ladeo y el portaobjetos se seca. Después de secar, el portaobjetos se introduce dentro del AFM. Para preservar las partículas el análisis microscópico se efectúa con una punta de Si₃N₄ en modo de derivación (tapping) a 160 kHz. El análisis se efectúa utilizando el software "JPK" y la medición de tamaño subsiguiente utilizando el software "ImageJ".

Los resultados de ejemplo se muestran en las figuras 6a, 6b y 7.

PEC 95 (0.1 mg / 5 ml)

La medición de PCS indica un tamaño de 200.5 nm con un PDI de 0.295. Los resultados de AFM se muestran como Figura 6a. Los puntos grandes corresponden a las nanopartículas. La medición de AFM muestra

partículas que tienen una forma redonda con una superficie lisa. Aparentemente, el diámetro medido mediante PCS no corresponde con el tamaño verdadero, ya que las fotografías de AFM indican un tamaño más pequeño. Las partículas tienen un tamaño promedio de 100 nm (desviación estándar 28 nm) de conformidad con la medición de AFM. Sin embargo, los hechos importantes que se pueden reducir a partir de esto son la confirmación de la forma redonda, lisa y el hecho que las partículas están presentes como partículas individuales y no como agregados.

PEC 95 (3 mg / 5 ml)

Para las nanopartículas de PEC 95 (3 mg / 5 ml) el análisis muestra un diámetro promedio de 202 nm el cual es menor de los 235.9 nm (con un PDI de 0.03) observado mediante PCS. Sin embargo se cree que el tamaño de partícula medido con PCS es más grande debido a que PCS detecta la partícula incluyendo su capa de solvente. Las fotos muestran partículas redondas con una superficie lisa las cuales se depositan casi todas como partículas individuales sin signos de coalescencia. Los resultados se muestran en la figura 6b.

PEC 99 (0.1 mg / 5 ml)

Las partículas son de apariencia similar. Se determina que el diámetro es de 106 nm en comparación con 139.8 nm medidos con PCS (con un PDI de 0.216). Las nanopartículas de PEC 99 (3 mg / 5 ml) tienen una tendencia más fuerte a formar agregados y son más grandes.

Los resultados indican que las mediciones mediante AFM son más exactas para determinar el tamaño de las nanopartículas.

Los resultados de los experimentos de hinchamiento con las respectivas nanopartículas de PEC no cargadas se muestran en la figura 8 (para PEC 95 (3 mg / 5 ml)). Los resultados muestran un incremento en el tamaño de las nanopartículas de PEC 95 dentro de la primera media hora del procedimiento de evaporación. Como se indica mediante las gráficas, la mayoría de las partículas no coalescen sino que incrementan su tamaño debido a un proceso de hinchamiento. Las nanopartículas de PEC 99 muestran un incremento más grande en tamaño que las partículas de PEC 95 dentro de la primera hora del procedimiento de evaporación y son más susceptibles a coalescencia.

TABLA 5

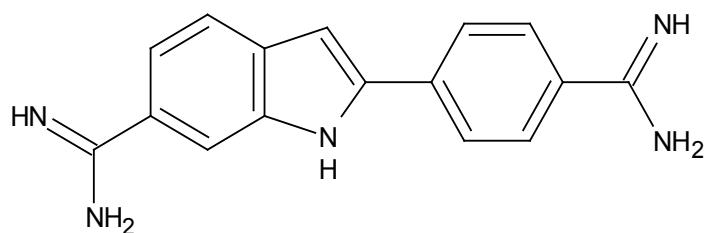
Resultados para PEC 95 y PEC 99

Polímero	Tiempo/min	Tamaño/nm	Desviación estándar/nm
PEC 95	0	154	46
PEC 95	20	227	81
PEC 95	30	241	118
PEC 99	0	261	49
PEC 99	20	450	118
PEC 99	30	400	91

EJEMPLO 6

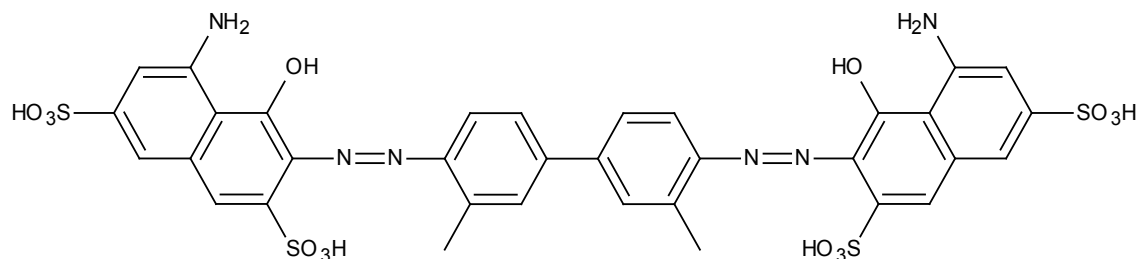
Captación de cumarina-6 dentro de macrófagos cultivados *in vitro*

Para analizar la captación de las nanopartículas cargadas con cumarina-6, se cultiva la línea celular de macrófago de murido J744A.1 (DSMZ Braunschweig) a 37°C y 8.5% de CO₂ con una humedad relativa de 95%. Las células se alimentan cada dos días DMEM (medio PAA listo para usar), glucosa, glutamina y 10% de suero fetal de bovino (FCS Cytogen). Después de llegar al número celular crítico, el cultivo se divide (usualmente 2 a 3 veces por semana). Para el análisis bajo CSLM (microscopia de barrido con láser confocal) los núcleos de las células se tiñen con DAPI:



5

Para extinguir la fluorescencia de las nanopartículas fluorescentes no fagocitadas, se agrega al medio el colorante no fluorescente azul de tripano:



Debido a que este colorante no es incorporado por las células vivas, solamente se extingue la fluorescencia en el exterior de las células.

10 Las células se analizan mediante CLSM con el fin de analizar la manera en la cual las nanopartículas cargadas son procesadas por las células. La microscopia confocal se efectúa utilizando un equipo Axiovert 100M y dispositivo de barrido 510 (Zeiss) y se analizan utilizando el software LSM Image Browser. El análisis de CSLM solamente muestra un análisis cualitativo.

15 Haciendo cortes ópticos a lo largo del eje Z se puede determinar si la fluorescencia de cumarina-6 ocurre dentro o fuera de la célula. Como control, una parte de los macrófagos se incubó a 4°C . A esta temperatura, los procesos energéticos de la célula se inhiben y por consiguiente también el proceso de fagocitosis.

20 La solución amortiguadora de PBS utilizada en este caso tiene la siguiente concentración: KCl 0.2 g; NaCl 8.0 g; KH_2PO_4 0.2 g; Na_2HPO_4 1.51 g, agua destilada hasta 1000 ml). Para los experimentos celulares, es necesaria una solución amortiguadora de PBS concentrada 10X. Para este propósito, la solución amortiguadora se afora con agua destilada hasta 100 ml en lugar de 1000 ml. La solución amortiguadora se ajusta a pH 7 y se esteriliza mediante filtración utilizando un filtro de $0.2\ \mu\text{m}$.

25 Para la primera parte de este experimento, se preparan diferentes cargas de nanopartículas de PEC 99 en concentraciones de 0,1 mg y 3 mg de polímero por cada 5 ml con 0.2% de cumarina-6 utilizando el esquema conocido (véase sección anterior). Para el experimento se eligen una carga de 0.1 mg/5 ml con partículas de 126 nm de tamaño y una carga de 3 mg/5 ml con partículas de 297 nm de tamaño.

30 Para el experimento, se siembran células J774 con una densidad de 0.5×10^4 /cavidad en dos portaobjetos con cámaras con un volumen de trabajo de $400\ \mu\text{l}$ 48 horas antes del experimento de captación. El presente medio se aspira y se agregan $320\ \mu\text{l}$ de suspensión de 0.1 mg de nanopartículas de PEC 99, $40\ \mu\text{l}$ de solución amortiguadora PBS concentrada 10x y $40\ \mu\text{l}$ de suero de ratón (concentración final de PEC: $16\ \mu\text{g/ml}$). En seis cámaras adicionales se agregan $320\ \mu\text{l}$ de suspensión de 3 mg de nanopartícula de PEC 99, de nuevo bajo adición de $40\ \mu\text{l}$ de suero de ratón y solución amortiguadora PBS 10x (concentración final de PEC: $480\ \mu\text{g/ml}$). 4 cámaras de los portaobjetos permanecen con medio y sin la adición de nanopartículas para tener sondas comparativas de células no tratadas. Las células se incuban durante 1 hora a 37°C . Después de esto, se aspira el medio y las células se lavan dos veces con PBS y se tiñen utilizando DAPI. La tinción se efectúa para todas las células incubadas con nanopartículas y para dos cámaras de las células comparativas. Las células de dos cámaras solamente se fijan pero no se tiñen con el fin de analizar si DAPI emite o no fluorescencia en el área de cumarina-6. Las cámaras se retiran de los portaobjetos al final del experimento y se cubren con un cubreobjetos utilizando unas cuantas gotas de Fluorsave (Clabiochem). Las muestras se guardan protegidas de la luz y poco después de esto se analizan mediante CLSM.

40 La segunda parte del experimento analiza la captación de la suspensión de nanopartícula en diferentes concentraciones a 37°C y 4°C . Para este experimento, se prepara una nueva carga de 3 mg de PEC 99 con 0.2% de cumarina-6 (diámetro: aproximadamente 300 nm).

48 horas antes del inicio del experimento los macrófagos se siembran en tres portaobjetos con cámaras a una densidad de 0.5×10^4 /cavidad. Para la incubación de las células a 4°C un portaobjetos con cámaras se

- almacena en un refrigerador. Para el análisis de la dependencia de la concentración, se eligen concentraciones de la suspensión de PEC de 480 µg/ml, 320 µg/ml, 120 µg/ml (referidas a la concentración final en las cámaras de los portaobjetos). Por lo tanto, el medio se aspira en todas excepto cuatro cámaras (muestras comparativas), se agrega 10% de suero de ratón y solución amortiguadora PBS y la suspensión de nanopartícula se agrega dependiendo de la concentración final deseada (80 µl para 120 µg/ml, 160 µl para 240 µg/ml o 320 µl para 480 µg/ml). Se incuban 4 cámaras con las nanopartículas de PEC a las diferentes concentraciones a 37°C durante una hora. La incubación durante más de una hora a 4°C se efectúa en un portaobjetos pre-enfriado en 4 cámaras con 480 µg/ml y 240 µg/ml de nanopartículas de PEC. Como control negativo, 4 cámaras de las células almacenadas a 37°C no se incuban con nanopartículas.
- Después de incubación de una hora, el líquido se aspira, las células se lavan dos veces con PBS y se fijan y tiñen con DAPI (véase Ejemplo 7). Después de esto, las cámaras se retiran de los portaobjetos y se cubren con un cubreobjetos utilizando unas cuantas gotas de Fluorsave (Clabiochem). Las muestras se almacenan protegidas de la luz y poco tiempo después se analizan mediante CLSM.
- Los resultados muestran para la primera parte del análisis (análisis cualitativo) que la incubación con las nanopartículas de PEC (126 nm y 297 nm) conduce a una fluorescencia dentro de las células. Con el fin de analizar si la captación ocurre o no a través de fagocitosis activa, la segunda parte del experimento se efectúa a temperaturas diferentes. Si las nanopartículas de PEC son procesadas mediante un proceso de fagocitosis activa, las células incubadas a 4°C no deberían mostrar fluorescencia o una fluorescencia disminuida en forma considerable. Los resultados de CSLM muestran un incremento de la fluorescencia correspondiente al incremento en la concentración de la nanopartícula. Sin embargo, también las células incubadas a 4°C con 480 µg/ml y 240 µg/ml de nanopartículas muestran una fluorescencia. Esto indica que las nanopartículas de PEC fagocitosis activa más baja por parte de los macrófagos.

EJEMPLO 7

Tinción con DAPI (para un volumen de trabajo de 15 ml)

- Se agregan 2 ml de una solución para fijación (una parte de PBS y una parte de paraformaldehído al 4 %) a las células con medio y después de esto, todo el líquido se aspira. Después de esto, se agregan dos veces 5 ml de solución de fijación a las células, se incuban durante 5 minutos y se aspira. Después de esto, las células se secan durante 15 minutos al aire y se incuban con la solución de DAPI (1 ml de PBS + 20 µl de DAPI) durante 30 minutos en la oscuridad. Al final del procedimiento de tinción el DAPI se aspira y lava tres veces con PBS.

EJEMPLO 8

Comparación de la fagocitosis de nanopartículas de PEC 99 y PEC 95 con glóbulos fluorescentes de látex de poliestireno como patrón de referencia mediante FACS a 37 y 4° y después de la adición de NaN₃

- La clasificación de célula activada por fluorescencia (FACS) provee la posibilidad de analizar y caracterizar un número grande de células respecto a su tamaño, carácter compacto y fluorescencia dentro de un periodo de tiempo corto.
- El objetivo de este experimento es determinar mediante FACS, si las nanopartículas de PEC de tamaños diferentes son captadas/procesadas mejor o peor por los macrófagos que los patrones de referencia de poliestireno (PSS) marcados en forma fluorescente, los cuales se activan a 468 nm y emiten fluorescencia a 508 nm. Se efectúa un control agregando NaN₃ como un inhibidor de fagocitosis. El otro control se efectúa a una temperatura de incubación de 4°C ya que los procesos celulares y por consiguiente la fagocitosis son inhibidos/desacelerados a esta temperatura.

Material	Fabricante
NaN ₃	Acros
DAPI	Invitrogen Karlsruhe
Barrido FACS	BD Biosciences, San
Flujo FACS	BD Biosciences, San
Software Express FACS	Devonsoftware
Patrón de referencia de poliestirol fluorescente 100nm	Duke scientific corporation
Patrón de referencia de poliestirol fluorescente 500nm	Duke scientific corporation
Azul de tripano	Invitrogen

Para el primer experimento, se siembran células J774 a una densidad de 6×10^4 /cavidad en una placa de 24 cavidades (volumen de trabajo 1 ml) 24 horas antes del inicio. Para determinar la velocidad de fagocitosis por los macrófagos, se preparan suspensiones de nanopartícula de PEC 95 y PEC 99 a una concentración de 0.1 mg y 3 mg y 0.2 % de cumarina-6 por cada 5 ml. de manera adicional, se preparan nanopartículas más grandes del tipo PEC 95, utilizando una solución al 1% de PVA como estabilizador. Como un control negativo, seis cavidades de la placa se dejan sin tratar con los macrófagos. Para incubación con las suspensiones de nanopartícula, el medio de las cavidades remanentes se aspira y se agregan PEC 95-NP 0.1 mg (137 nm) y 3 mg (239 nm) y PEC 99-NP 0.1 mg (133 nm) y 3 mg (283 nm) por triplicado bajo adición de suero de ratón al 10% y PBS. La concentración final en las cavidades es para cada triplicado de la PEC-NP de 0.1 mg y 3 mg PEC-NP 16 µg/ml y adicionalmente un triplicado con 3 mg de PEC-NP con 480 µg/ml. La incubación se efectúa a 37° durante una hora en una incubadora. Después del final del tiempo de incubación, las suspensiones y el medio en el caso de las células de control se aspiran y lavan dos veces con PBS. Para extinguir las nanopartículas fluorescentes en la superficie de las células, las células se incuban con azul de tripano al 0.4% durante 5 minutos y se lavan dos veces con PBS. Después de esto, se agregan 100 µl de tripsina y las placas de la cavidad se mueven en forma pivotante para retirar los macrófagos de la placa de la cavidad. Se agregan 200 µl de paraformaldehído: flujo de FACS (1:1) a las células y las muestras se transfieren a un tubo de vidrio y se analizan mediante FACS.

El objetivo de este primer experimento es analizar si hay diferencias en la fagocitosis de las nanopartículas de PEC 99 y PEC 95 cargadas a la misma concentración. Los resultados se muestran en la figura 9. Los valores de fluorescencia indicados corresponden al valor de la media aritmética de la determinación de fluorescencia después de restar la fluorescencia de la sonda testigo, específicamente las células no tratadas. Los resultados muestran que la fluorescencia dentro de las células depende de manera predominante de la concentración de nanopartícula utilizada.

El objetivo del segundo experimento es analizar mediante FACS la fluorescencia de los macrófagos después de incubación de PEC 99 y PEC 95 en comparación con la fluorescencia después de la adición de nanopartículas de poliestirol fluorescentes, las cuales son nanopartículas poliméricas de referencia. Los experimentos se efectúan a 4° y 37°. Con el fin de utilizar una posibilidad adicional para inhibir el proceso de fagocitosis activa, algunas células del experimento a 37° se incuban con el inhibidor de fagocitosis NaN₃. Por lo tanto, se prepara una solución 60 mM de NaN₃, por ejemplo disolviendo 39 mg de NaN₃ en 10 ml de agua ultrapura.

Las células se siembran 24 horas antes del inicio del experimento a una densidad de 6×10^4 /cavidad en dos placas de 24 cavidades. Después de esto, se preparan suspensiones de nanopartícula de PEC 95 y PEC 99 las cuales se cargan con cumarina-6 al 0.2 % en las concentraciones de 0.1 mg y 3 mg por cada 5 ml.

Una hora antes del inicio del experimento una placa de cavidad se deposita a 4° en un refrigerador. 3 horas antes del inicio del experimento, la mitad de las células de la otra placa que se almacenó a 37°C se suplementa con 500 µl de NaN₃ y 500 µl de medio después de aspirar el medio (concentración final de NaN₃: 30 mMol/l). Después de 3 horas de incubación en la solución de NaN₃, respectivamente una hora de almacenamiento a 4° se inician los experimentos de células. Por lo tanto, los medios en las cavidades se aspiran (excepto para las muestras testigo). A cada cavidad de la placa que se enfrió a 4°, se agrega una

- 5 suspensión de PEC-NP 0.1 mg (108 nm), PEC-95 3 mg (285 nm), PEC-99 0.1 mg (110 nm) y PEC-99 3 mg (297 nm). La concentración final de las nanopartículas de PEC en las cavidades después de la adición de suero de ratón al 10% y solución amortiguadora PBS para todas las muestras asciende a 16 µg/ml. Asimismo, el patrón de referencia de poliestirol fluorescente de tamaños 100 nm y 500 nm se agregan a cavidades separadas bajo la adición de suero de ratón al 10% y PBS. La concentración final de los patrones de referencia en las cavidades es de 20 µg/ml.
- Las células que se almacenan a 37°C se preparan de igual manera con partículas, respectivamente en el lado (mitad) tratado con NaN₃ y el lado (mitad) que no fue no tratada con NaN₃ respectivamente.
- 10 Después de la adición de las partículas las células se incuban durante una hora a 4°C o 37°C y después de esto las suspensiones se aspiran, se lavan dos veces con PBS y después de la adición de azul de tripano al 0.4 % se incuban durante 5 minutos. Después de esto, las células se lavan de nuevo con PBS, se digieren con tripsina y se transfieren con flujo de FACS: paraformaldehído (véase sección anterior) hacia un tubo de vidrio.
- 15 Los resultados del análisis FACS se muestran en la figura 10. Los valores de fluorescencia indicados corresponden al valor de la media aritmética de la determinación de fluorescencia después de restar la fluorescencia de la sonda testigo, específicamente las células no tratadas. La intensidad de la fluorescencia es una medida para el grado de fagocitosis de las nanopartículas. Los patrones de referencia de poliestirol muestran los niveles altos esperados de fluorescencia bajo las condiciones en las cuales ocurre la fagocitosis (37°C, sin inhibidor) y una fluorescencia baja en el caso en que la fagocitosis es inhibida/desacelerada (4°C o adición de NaN₃).
- 20 Las nanopartículas de poliestireno por lo tanto son fagocitadas de manera eficiente lo que las hace biológicamente inestables debido a que éstas son eliminadas rápidamente por los macrófagos en el cuerpo. Los resultados para las nanopartículas de PEC de la presente invención muestran un perfil notoriamente diferente, ya que no hay diferencia significativa cuando la fagocitosis es inhibida/desacelerada (véase resultados a 4°C y con NaN₃).
- 25 Especialmente para las nanopartículas más pequeñas la diferencia en fagocitosis entre poliestireno-NP y PEC-NP es grande como se puede deducir cuando se comparan los valores de fluorescencia baja (= nivel bajo de fagocitosis) de "PEC 95 16 µg/ml 108 nm 37°C" y "PEC 99 16 µg/ml 110 nm 37°C" contra el valor de fluorescencia alto (= nivel elevado de fagocitosis) para "poliestirol 20 µg/ml 100 nm 37°C". Por lo tanto, las nanopartículas de PEC de conformidad con la presente invención son mucho menos atacadas por los macrófagos, lo cual permite utilizar las nanopartículas de PEC como depósito parenteral que libera un agente farmacológicamente activo encapsulado después de la biodegradación y hace que el agente farmacológicamente activo esté disponible sistémicamente a través del periodo de liberación completo, respectivamente más largo. Asimismo, los resultados muestran que las nanopartículas de PEC más pequeñas son incluso menos fagocitadas que las nanopartículas de PEC más grandes.
- 30

REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición farmacéutica que comprende nanopartículas constituidas por lo menos por un agente farmacológicamente activo, por lo menos un polímero PEC de poli(carbonato de etileno), estando la composición farmacéutica en la forma de una suspensión de nanopartículas.
- 2.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, la cual es una formulación parenteral.
- 5 3.- La composición farmacéutica, de conformidad con una de las reivindicaciones 1 o 2, en donde las nanopartículas tienen un tamaño menor de 1000 nm.
- 4.- La composición farmacéutica, de conformidad con una de las reivindicaciones 1 o 2, en donde las nanopartículas tienen un tamaño menor de 500 nm.
- 10 5.- La composición farmacéutica de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el peso molecular del polímero PEC es menor de 2000000 g/mol.
- 6.- La composición farmacéutica de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el peso molecular del polímero PEC es menor de 500000 g/mol.
- 15 7.- La composición farmacéutica de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el agente farmacológicamente activo se selecciona a partir del grupo que consiste de compuestos químicos, agentes biológicamente activos, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas.
- 8.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 7, que comprende un agente farmacológicamente activo que se selecciona además a partir del grupo que consiste de la clase de inhibidores análogos de somatostatina, bifosfonatos, fármacos que alteran los lípidos, y agentes inmunosupresores.
- 20 9.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, en donde el PEC tiene por lo menos una de las siguientes características:
- (a) un contenido de carbonato de etileno de 70 hasta 100% molar,
- (b) una viscosidad intrínseca de 0.4 hasta 4.0 dl/g como se mide en cloroformo a 20° C, y/o
- (c) una temperatura de transición de vidrio de 5 hasta 50°C.
- 25 10. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, en donde la suspensión de nanopartículas de PEC tiene características de liberación sostenida.
- 11.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, en donde la suspensión de nanopartículas de PEC es una formulación parenteral de depósito.
- 30 12.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, en donde la suspensión de nanopartículas comprende además excipientes o aditivos farmacéuticamente aceptables.
- 13.- Un método para elaborar una composición farmacéutica de conformidad con por lo menos una de las reivindicaciones 1 a 12 preparando una suspensión de nanopartículas que comprende por lo menos un agente farmacológicamente activo y por lo menos un polímero de poli(carbonato de etileno).
- 35 14.- El método de conformidad con la reivindicación 13, en donde la suspensión de nanopartículas se prepara utilizando el método de desplazamiento de solvente, el método de evaporación de solvente o el método de salado.
- 15.- El método de conformidad con la reivindicación 13 o 14, en donde el tamaño de partícula se regula mediante la variación de la concentración del polímero.

FIGURA 1a

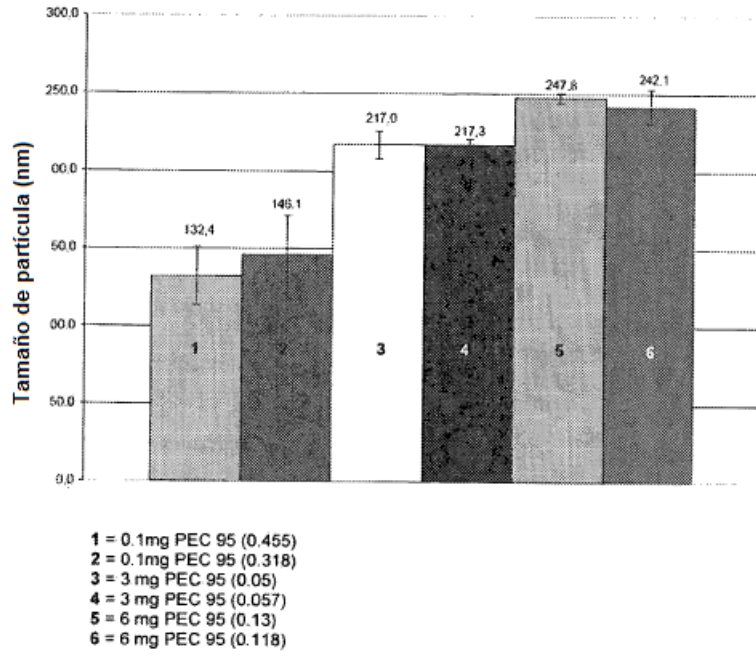


FIGURA 1b

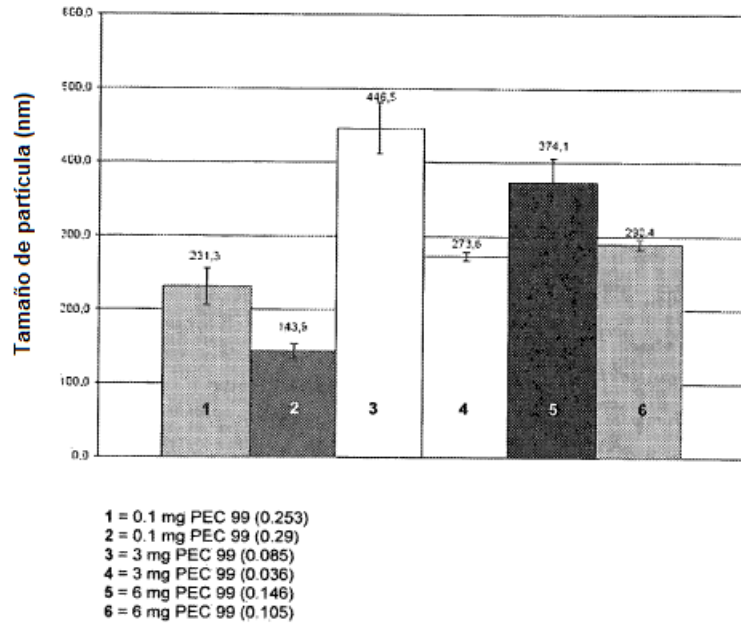
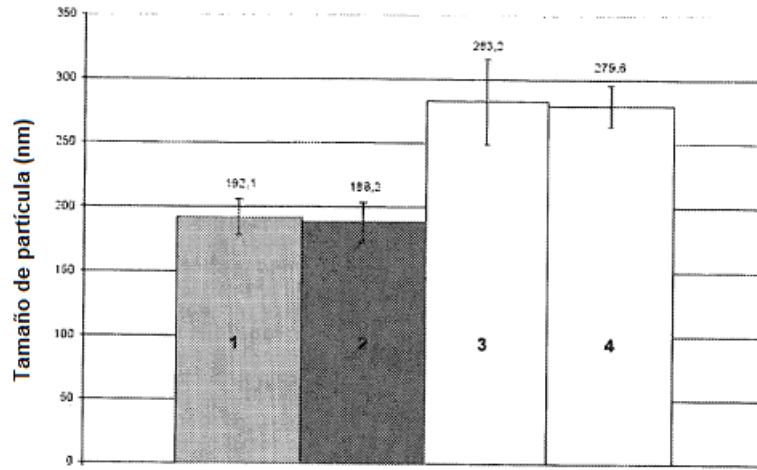
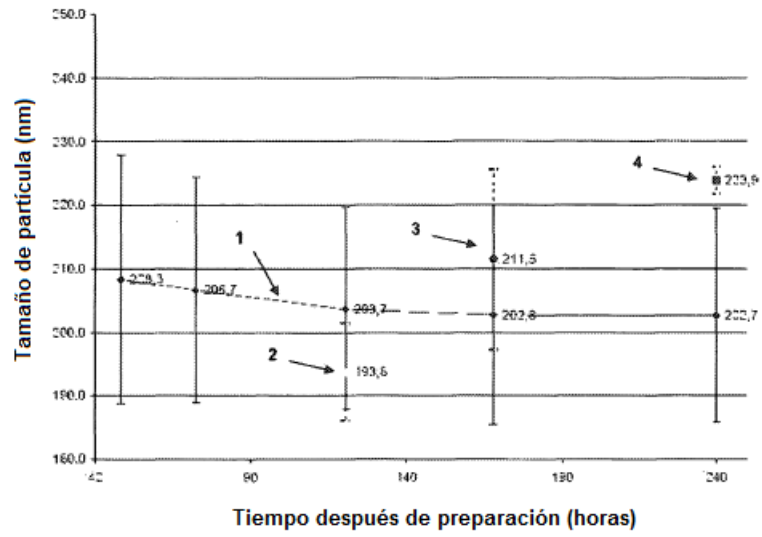


FIGURA 2



- 1 = PEC 95 0.1 mg 0.2% C-6
- 2 = PEC 99 0.1 mg 0.2% C-6
- 3 = PEC 95 3 mg 0.2% C-6
- 4 = PEC 99 3 mg 0.2% C-6

FIGURA 3



- 1 = PEC 95
- 2 = PEC 95 14°C
- 3 = PEC 95 24°C
- 4 = PEC 95 31°C

FIGURA 4

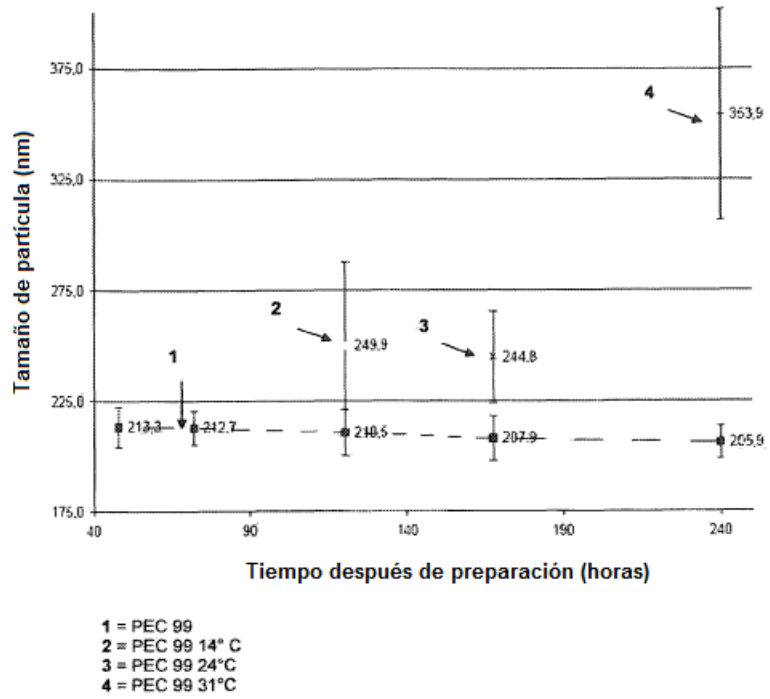


FIGURA 5

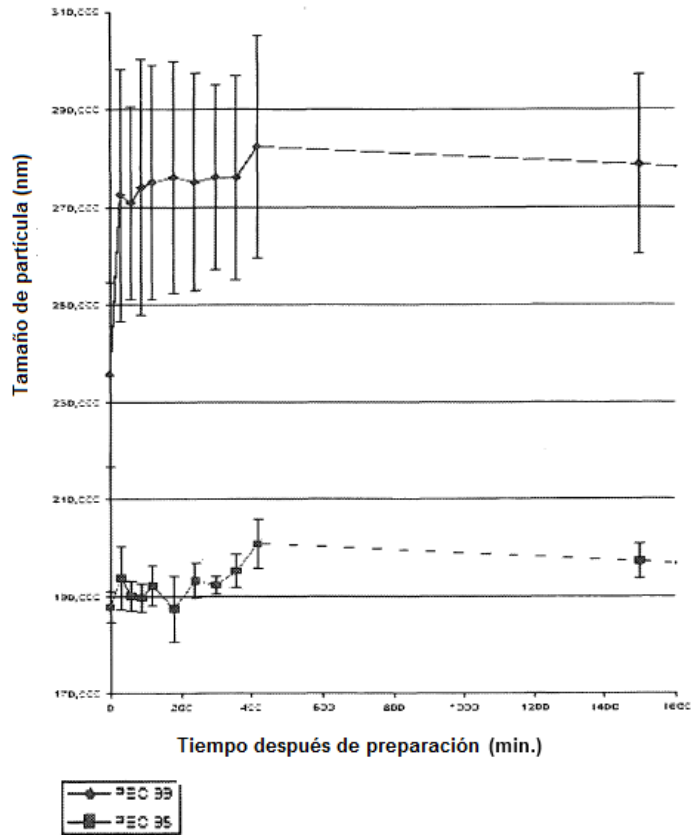


FIGURA 6a

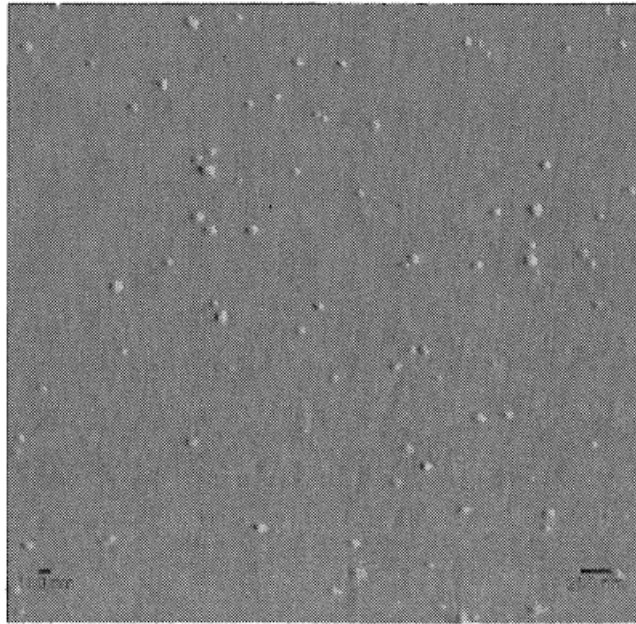


FIGURA 6b

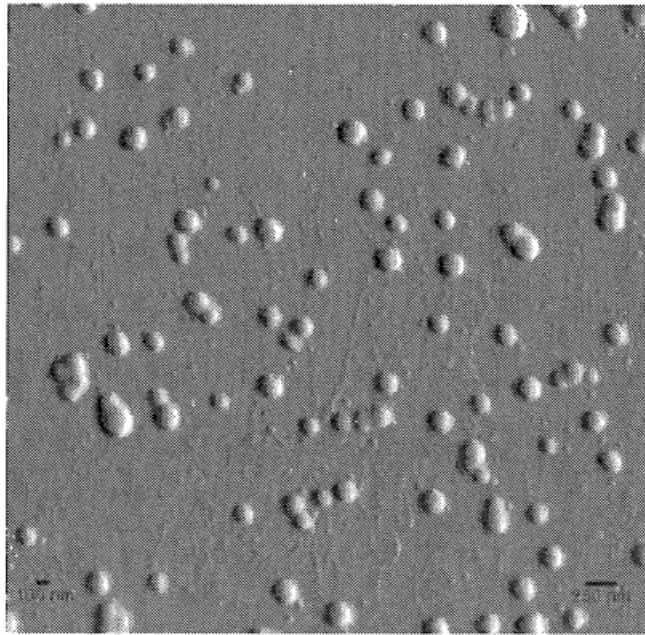


FIGURA 7

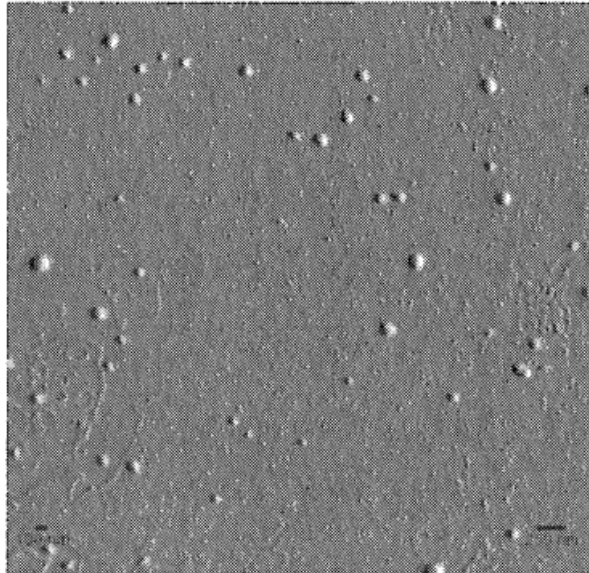


FIGURA 8

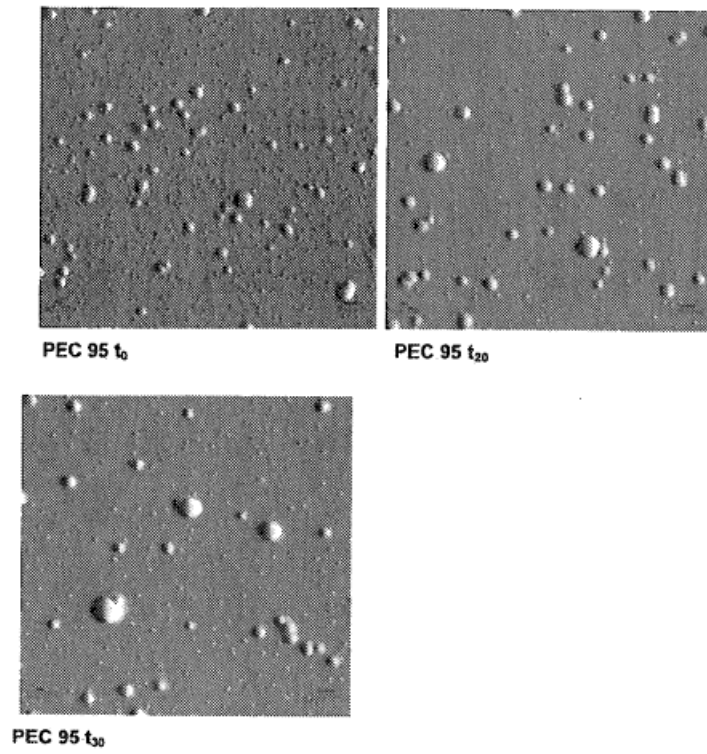


FIGURA 9

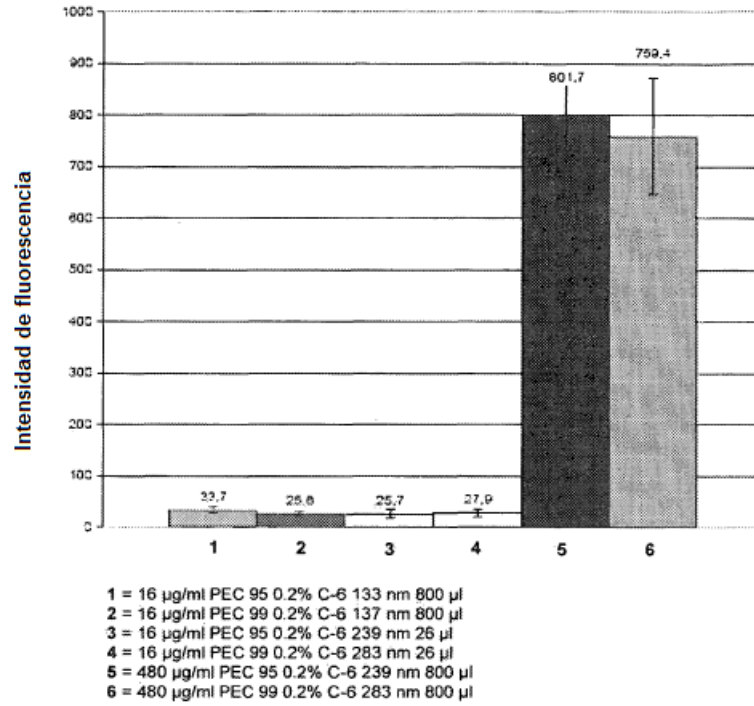
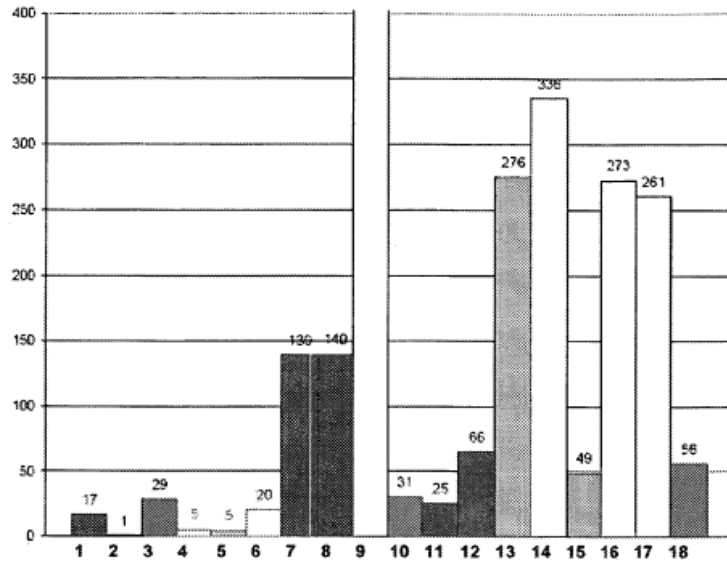


FIGURA 10



- 1 = PEC 95 16 µg/ml 108 nm 37°C
- 2 = PEC 95 16 µg/ml 108 nm NaN₃ 37°C
- 3 = PEC 95 16 µg/ml 108 nm 4°C
- 4 = PEC 99 16 µg/ml 110 nm 37°C
- 5 = PEC 99 16 µg/ml 110 nm NaN₃ 37°C
- 6 = PEC 99 16 µg/ml 110 nm 4°C
- 7 = PEC 95 16 µg/ml 285 nm 37°C
- 8 = PEC 95 16 µg/ml 285 nm NaN₃ 37°C
- 9 = PEC 95 16 µg/ml 285 nm 4°C
- 10 = PEC 99 16 µg/ml 297 nm 37°C
- 11 = PEC 99 16 µg/ml 297 nm NaN₃ 37°C
- 12 = PEC 99 16 µg/ml 297 nm 4°C
- 13 = Polystyrol 20 µg/ml 100 nm 37°C
- 14 = Polystyrol 20 µg/ml 100 nm NaN₃ 37°C
- 15 = Polystyrol 20 µg/ml 100 nm 4°C
- 16 = Polystyrol 20 µg/ml 500 nm 37°C
- 17 = Polystyrol 20 µg/ml 500 nm NaN₃ 37°C
- 18 = Polystyrol 20 µg/ml 500 nm 4°C