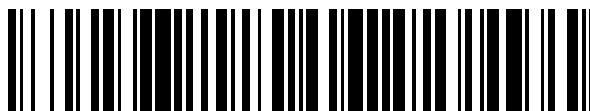


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 465**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 39/44** (2006.01)

**A61K 31/337** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2009 E 09716981 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 2259798**

54 Título: **Partículas de superficie modificada y métodos para la administración dirigida de fármacos**

30 Prioridad:

**05.03.2008 US 68151 P**

**20.01.2009 US 205259 P**

**30.01.2009 US 148917 P**

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

**12.03.2014**

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC. (33.3%)**

**One Baxter Parkway**

**Deerfield, IL 60015, US;**

**BAXTER HEALTHCARE SA (33.3%) y**

**THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF NEBRASKA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BEDUNEAU, ARNAUD;**

**GENDELMAN, HOWARD;**

**RABINOW, BARRETT y**

**WERLING, JANE**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

ES 2 447 465 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**

Partículas de superficie modificada y métodos para la administración dirigida de fármacos

**ANTECEDENTES**

**Campo de la Invención**

5 En general, la invención se refiere a composiciones que comprenden partículas revestidas y a métodos para producir y utilizar dichas composiciones para la administración dirigida de fármacos.

*Breve Descripción de Tecnología Relacionada*

10 Las nanopartículas (incluyendo las nanoesferas) y las micropartículas (incluyendo las microesferas), denominadas aquí colectivamente como "partículas", son partículas sólidas o semisólidas con un diámetro de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 10.000 nm (10 micras). Estas partículas se pueden formar a partir de diversos materiales, incluyendo proteínas, polímeros sintéticos, polisacáridos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas y sus combinaciones, y han sido utilizadas en muy diversas aplicaciones diferentes, principalmente para la separación, el diagnóstico y la administración de fármacos.

15 Se ha encontrado que las composiciones que comprenden este tipo de partículas son útiles para la administración de fármacos. Por ejemplo, la Publicación de Patente US nº 2006/0073199 describe que partículas que comprenden un principio activo pueden ser formuladas como suspensiones acuosas, y pueden estabilizarse contra la agregación y el crecimiento de las partículas por la disposición de revestimientos de agentes tensioactivos sobre o alrededor de las partículas.

20 Otros antecedentes relacionados incluyen Thiele y col., "Competitive adsorption of serum proteins at microparticles affects phagocytosis by dendritic cells", *Biomaterials* 24 (2003), 1409-1418.

Existe una necesidad continua de desarrollar composiciones que comprendan partículas y métodos para producirlas y utilizarlas, en particular para administrar fármacos de interés.

**SUMARIO**

25 Un aspecto de la invención se refiere a una suspensión que contiene partículas de superficie modificada que comprenden un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula tal como se define en la reivindicación 1. El núcleo de partícula comprende un agente terapéutico (por ejemplo una molécula orgánica pequeña o una biomacromolécula). El revestimiento comprende una opsonina, por ejemplo un anticuerpo que tiene un isotipo de IgG o una proteína de complemento como C3b y C5. También se pueden utilizar otras proteínas conocidas que actúan como opsoninas. En general, las partículas de superficie modificada de acuerdo con la  
30 presente invención tienen un tamaño medio de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para mejorar la absorción celular de un principio activo tal como se define en la reivindicación 9. El método comprende poner en contacto las células con las partículas de superficie modificada bajo condiciones suficientes para mejorar la absorción celular de las partículas de superficie modificada. Las partículas comprenden un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, comprendiendo el núcleo de partícula un principio activo, comprendiendo el revestimiento una opsonina (por ejemplo un anticuerpo que tiene un isotipo de IgG o una proteína de complemento tal como C3b o C5), y teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm.

40 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de partículas de superficie modificada para la producción de un medicamento para tratar a un paciente con una enfermedad o afección inflamatoria, que consiste en administrar a dicho paciente múltiples partículas de superficie modificada, comprendiendo dichas partículas de superficie modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, comprendiendo el núcleo de partícula un principio activo (por ejemplo un agente antiinflamatorio), comprendiendo el revestimiento una opsonina (por ejemplo un anticuerpo que tiene un isotipo de IgG o una proteína de complemento tal como C3b o C5), teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000  
45 nm, y siendo dicha administración eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a dicha enfermedad o afección inflamatoria.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de partículas de superficie modificada en la producción de un medicamento para tratar a un paciente con una enfermedad o afección proliferativa, que consiste en administrar a dicho paciente múltiples partículas de superficie modificada, comprendiendo dichas partículas de superficie  
50 modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, comprendiendo el núcleo de partícula un principio activo (por ejemplo un antiproliferativo tal como un agente antineoplásico), comprendiendo el

revestimiento una opsonina (por ejemplo un anticuerpo que tiene un isotipo de IgG o una proteína de complemento tal como C3b o C5), teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm, y siendo dicha administración eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a dicha enfermedad o afección proliferativa.

5 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de partículas de superficie modificada en la producción de un medicamento para tratar a un paciente con una enfermedad o afección infecciosa, que consiste en administrar a dicho paciente múltiples partículas de superficie modificada, comprendiendo dichas partículas de superficie modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, comprendiendo el núcleo de partícula un principio activo (por ejemplo un agente antiinfeccioso), comprendiendo el revestimiento una opsonina (por ejemplo un anticuerpo que tiene un isotipo de IgG o una proteína de complemento tal como C3b o C5), teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm, y siendo dicha administración eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a dicha enfermedad o afección infecciosa.

15 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de partículas de superficie modificada en la producción de un medicamento para tratar a un paciente con una enfermedad o afección neurodegenerativa, que consiste en administrar a dicho paciente múltiples partículas de superficie modificada, comprendiendo dichas partículas de superficie modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, comprendiendo el núcleo de partícula un principio activo (por ejemplo un agente antineurodegenerativo), comprendiendo el revestimiento una opsonina (por ejemplo un anticuerpo que tiene un isotipo de IgG o una proteína de complemento tal como C3b o C5), teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm, y siendo dicha administración eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a dicha enfermedad o afección neurodegenerativa.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 FIG. 1: gráfico que muestra los perfiles de elución de diversas nanopartículas (NP) de óxido de hierro superparamagnético (OHSP) en una columna de Sepharose 4B-CL. La figura muestra NP OHSP conjugadas con IgG (IgG-OHSP) después de incubación de IgG con OHSP oxidado (círculos rellenos), IgG incubada con OHSP no oxidado (cuadrados rellenos); y OHSP oxidado bloqueado mediante la adición de un exceso de grupos amina (círculos vacíos).

30 FIG. 2: gráfico que muestra medidas del tamaño (en nanómetros) y del índice de polidispersidad de IgG-OHSP en diferentes momentos después de la conjugación, almacenado a 4°C.

FIG. 3: gráfico que muestra la absorción de OHSP e IgG-OHSP por monocitos después de diversos períodos de tiempo, de acuerdo con la evaluación en un ensayo de ferrocina colorimétrico.

FIG. 4: gráfico que muestra la absorción de OHSP e IgG-OHSP por monocitos después de diversos períodos de tiempo, de acuerdo con la evaluación mediante medición de la relajación (R<sub>2</sub>) por IRM.

35 FIG. 5: gráficos que muestran la absorción de OHSP e IgG-OHSP por monocitos y macrófagos bajo diversas condiciones. **(A)** es un gráfico de la absorción por monocitos de partículas de OHSP de diversos tamaños (62 nm, 122 nm, 266 nm y 394 nm) unidas a dextrano de 100 kDa y de partículas de OHSP de 130-170 nm unidas a dextrano de 10 kDa. **(B)** es un gráfico de la absorción por monocitos de partículas de IgG-OHSP preparadas utilizando soluciones que tienen diferentes concentraciones de IgG. **(C)** es un gráfico de absorción por monocitos de OHSP nativo incubado con IgG libre. **(D)** es un gráfico de absorción por monocitos de partículas de IgG-OHSP a 4°C y a 37°C. **(E)** es un gráfico de absorción por monocitos y macrófagos derivados de monocitos (MDM) de partículas de IgG-OHSP. **(F)** es un gráfico de absorción por monocitos de partículas de IgG-OHSP coincubadas con un exceso de IgG libre. **(G)** es un gráfico de absorción por monocitos de partículas de OHSP conjugadas con seroalbúmina humana (ASH). **(H)** es un gráfico que muestra la carga superficial de partícula (potencial zeta) y el tamaño de partícula en el caso de partículas de OHSP nativo, oxidado, conjugado con IgG y conjugado con ASH.

40 FIG. 6: gráficos que muestran la cuantificación de partículas de OHSP *in vivo* e IgG-OHSP utilizando IRM de representación de T<sub>2</sub> de ciclo de fase CPMG. **(A)** es un gráfico que muestra el cambio de relaxividad (R<sub>2</sub> = 1/T<sub>2</sub>) en el bazo después de una inyección de 12,5 µg de OHSP o IgG-OHSP en la vena caudal de ratones (n = 6). **(B)** es un gráfico que muestra el cambio de relaxividad (R<sub>2</sub> = 1/T<sub>2</sub>) en el bazo después de una inyección de 62,5 µg de OHSP o IgG-OHSP en la vena caudal de ratones (n = 5). **(C)** es un gráfico que muestra el cambio de relaxividad (R<sub>2</sub> = 1/T<sub>2</sub>) en el hígado después de una inyección de 12,5 µg de OHSP o IgG-OHSP en la vena caudal de ratones (n = 6). **(D)** es un gráfico que muestra el cambio de relaxividad (R<sub>2</sub> = 1/T<sub>2</sub>) en el hígado después de una inyección de 62,5 µg de OHSP o IgG-OHSP en la vena caudal de ratones (n = 6). **(E)** es un gráfico que muestra el cambio de relaxividad (R<sub>2</sub> = 1/T<sub>2</sub>) en el riñón después de una inyección de 12,5 µg de OHSP o IgG-OHSP en la vena caudal de ratones (n = 6). **(F)** es un gráfico que muestra el cambio de relaxividad (R<sub>2</sub> = 1/T<sub>2</sub>) en el riñón después de una inyección de 62,5 µg de OHSP o IgG-OHSP en la vena caudal de ratones (n = 5).

- FIG. 7: gráfico que muestra el potencial zeta de partículas de paclitaxel revestidas con IgG en diferentes proporciones de IgG con respecto al paclitaxel.
- FIG. 8: gráfico que muestra el potencial zeta de partículas de ritonavir revestidas con IgG en diferentes proporciones de IgG con respecto al ritonavir.
- 5 FIG. 9: gráfico que muestra la absorción de partículas de paclitaxel no revestidas marcadas con Verde Oregón (no revestidas), partículas de paclitaxel revestidas con IgG marcadas con Verde Oregón (IgG) y partículas de paclitaxel revestidas con protamina marcadas con Verde Oregón (protamina).
- FIG. 10: gráfico que muestra la absorción de partículas de paclitaxel no revestidas (no revestidas), partículas de paclitaxel revestidas con IgG marcadas con Verde Oregón (IgG) y partículas de paclitaxel revestidas con protamina marcadas con Verde Oregón (protamina).
- 10 FIG. 11: gráficos que muestran la absorción de partículas de paclitaxel no revestidas marcadas con Verde Oregón (no revestidas) y partículas de paclitaxel revestidas con IgG marcadas con Verde Oregón (IgG).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 15 La invención reivindicada se puede poner en práctica de muchas formas diferentes. Las realizaciones preferentes, tal como se dan a conocer aquí, han de ser consideradas como ejemplos de los principios de la invención reivindicada y, por consiguiente, no se pretende limitar los aspectos generales de la invención reivindicada a las realizaciones ilustradas.

- 20 La presente invención utiliza una partícula de superficie modificada que comprende un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula. El núcleo de partícula comprende un principio activo, el revestimiento comprende una opsonina (por ejemplo un anticuerpo que tiene un isotipo de IgG o una proteína de complemento tal como C3b o C5), teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm. En algunas realizaciones se pueden utilizar partículas con revestimientos que comprenden proteínas de complemento en combinación con sustancias que pueden atenuar los efectos de la liberación de histamina, que puede ser inducida mediante proteínas de complemento activadas.
- 25

- Otro aspecto de la presente invención proporciona métodos para mejorar la absorción de un principio activo por células fagocíticas o no fagocíticas mediante la exposición de las células a una partícula de superficie modificada que comprende un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula. El núcleo de partícula comprende un principio activo, el revestimiento comprende una opsonina (por ejemplo un anticuerpo que tiene un isotipo de IgG o una proteína de complemento tal como C3b o C5), teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm. Se observa una absorción mejorada del principio activo por las células en comparación con células puestas en contacto con partículas que no tienen un revestimiento que incluye una opsonina.
- 30

- En otro aspecto, la invención también proporciona métodos para suministrar una partícula de superficie modificada a un tejido diana de un paciente mamífero a través de transporte celular. Tal como se utilizan aquí, los conceptos "tejido diana" o "tejido destino" se refiere al tejido particular del mamífero a tratar. Ejemplos de tejidos diana incluyen, de forma no exclusiva, cerebro y otras partes del sistema nervioso central, sistema linfático, hígado y cualquier sitio de infección, inflamación o tumor.
- 35

- Por ejemplo, en un aspecto están previstas composiciones destinadas a ser utilizadas en el tratamiento de un paciente con una enfermedad o afección inflamatoria, que consiste en administrar a dicho paciente múltiples partículas de superficie modificada, comprendiendo dichas partículas de superficie modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, incluyendo el núcleo de partícula un principio activo, incluyendo el revestimiento una opsonina (por ejemplo un anticuerpo que tiene un isotipo de IgG o una proteína de complemento tal como C3b o C5), teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm, y siendo dicha administración eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a dicha enfermedad o afección inflamatoria. En un aspecto, el principio activo es un agente antiinflamatorio.
- 40
- 45

- En otro aspecto están previstas composiciones destinadas a ser utilizadas en el tratamiento de un paciente con una enfermedad o afección neurodegenerativa, que consiste en administrar a dicho paciente múltiples partículas de superficie modificada, comprendiendo dichas partículas de superficie modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, incluyendo el núcleo de partícula un principio activo, incluyendo el revestimiento una opsonina (por ejemplo un anticuerpo que tiene un isotipo de IgG o una proteína de complemento tal como C3b o C5), teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm, y siendo dicha administración eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a dicha enfermedad o afección neurodegenerativa. En un aspecto, el principio activo es un agente antineurodegenerativo.
- 50
- 55

5 En un aspecto más están previstas composiciones destinadas a ser utilizadas en el tratamiento de un paciente con una enfermedad o afección proliferativa, que consiste en administrar a dicho paciente múltiples partículas de superficie modificada, comprendiendo dichas partículas de superficie modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, incluyendo el núcleo de partícula un principio activo, incluyendo el revestimiento una opsonina (por ejemplo un anticuerpo que tiene un isotipo de IgG o una proteína de complemento tal como C3b o C5), teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm, y siendo dicha administración eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a dicha enfermedad o afección proliferativa. En un aspecto, el principio activo es un agente antiproliferativo tal como un agente antineoplásico.

10 En otro aspecto más están previstas composiciones destinadas a ser utilizadas en el tratamiento de un paciente con una enfermedad o afección infecciosa, que consiste en administrar a dicho paciente múltiples partículas de superficie modificada, comprendiendo dichas partículas de superficie modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, incluyendo el núcleo de partícula un principio activo, incluyendo el revestimiento una opsonina (por ejemplo un anticuerpo que tiene un isotipo de IgG o una proteína de complemento tal como C3b o C5), teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm, y siendo dicha administración eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a dicha enfermedad o afección infecciosa. En un aspecto, el principio activo es un agente antiinfeccioso tal como un agente angifúngico, antiviral, antibacteriano o antiparasitario.

20 Así, los métodos de administración dados a conocer aquí prevén la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de dichas partículas de superficie modificada. Tal como se utiliza aquí, el concepto "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de partículas de superficie revestida suficiente para aliviar, mejorar, eliminar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a una enfermedad o afección consideradas para el tratamiento de acuerdo con los métodos de tratamiento aquí descritos.

25 Tal como se utiliza aquí, el término "opsonina" se refiere a proteínas o péptidos que se unen a partículas o células, aumentando así la susceptibilidad de dicha partícula o célula a la fagocitosis. Tal como se emplea aquí dicho término, los fragmentos de opsoninas conocidas que tienen una actividad biológica comparable a la de la opsonina correspondiente de longitud completa son considerados como opsoninas. Por ejemplo, los fragmentos de IgG normalmente incluyen un fragmento suficiente para unirse a un fagocito. Dichos fragmentos también pueden incluir fracciones suficientemente hidrófobas para asociarse de forma no covalente a una superficie de partícula hidrófoba.

30 Fragmentos de IgG adecuados incluyen, por ejemplo, fragmentos de IgG-Fab y fragmentos de IgG-Fc. Del mismo modo, tal como se utiliza aquí dicho término, los compuestos miméticos de opsonina también se consideran opsoninas. Tal como se utiliza aquí, el concepto "compuestos miméticos de opsonina" se refiere a compuestos (incluyendo péptidos) que tienen una actividad biológica comparable a la de una opsonina o que imitan la actividad de la opsonina. El experto medio en la materia puede determinar fácilmente si una fracción es un compuesto mimético de opsonina a la vista de la actividad biológica conocida de la opsonina.

35

La siguiente descripción de las partículas de superficie modificada es aplicable normalmente a todas las realizaciones aquí descritas. El principio activo de la partícula de superficie modificada puede ser soluble en agua o poco soluble en agua. El principio activo puede ser un agente terapéutico o un agente diagnóstico. Los principios activos utilizados de acuerdo con las composiciones y métodos aquí descritos presentan las actividades farmacéuticas asociadas normalmente con dichos principios activos, aunque los principios activos sean absorbidos y a continuación suministrados por células fagocíticas o no fagocíticas.

40

El principio activo se puede seleccionar de entre diversos compuestos farmacéuticos conocidos, por ejemplo, de forma no exclusiva: analgésicos, anestésicos, analépticos, agentes adrenérgicos, agentes de bloqueo adrenérgico, adrenolíticos, adrenocorticoides, adrenomiméticos, agentes anticolinérgicos, antiolesterinasas, anticonvulsivos, agentes alquilantes, alcaloides, inhibidores alostéricos, esteroides anabólicos, anorexigénicos, antiácidos, antidiarreicos, antidotos, antifolatos, antipiréticos, antirreumáticos, agentes psicoterapéuticos, agentes de bloqueo neural, antiinflamatorios, antihelmínticos, anticoagulantes, antidepresivos, antiepilépticos, antiinfecciosos (por ejemplo antifúngicos, antivirales tales como agentes antirretrovirales, y antibióticos), antihistaminas, agentes antimuscarínicos, agentes antimicobacterianos, antineoplásicos, agentes antiprotazoicos, sedantes ansiolíticos,

45

50 agentes de bloqueo de beta-adrenoceptores, corticosteroides, antitusivos, dopaminérgicos, hemostáticos, agentes hematológicos, hipnóticos, agentes inmunológicos, muscarínicos, parasimpaticomiméticos, prostaglandinas, radiofarmacéuticos, sedantes, estimulantes, simpaticomiméticos, vitaminas, xantinas, factores de crecimiento, hormonas y agentes antipirínicos.

Ejemplos de agentes antineoplásicos incluyen, de forma no exclusiva, paclitaxel, compuestos derivados de paclitaxel, alcaloides, antimetabolitos, inhibidores enzimáticos, agentes alquilantes y combinaciones de los mismos.

55

El principio activo también puede ser un inhibidor de la proteasa, como un inhibidor de la proteasa de VIH. Ejemplos de inhibidores de la proteasa incluyen, de forma no exclusiva, indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir y combinaciones de los mismos.

El principio activo puede ser un nucleósido inhibidor de la transcriptasa inversa. Ejemplos de nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa incluyen, de forma no exclusiva, cidovudina, didanosina, estavudina, zalcitabina, lamivudina y combinaciones de las mismas.

5 El principio activo puede ser un inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa. Ejemplos de inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa incluyen, de forma no exclusiva, efavirenz, nevirapina, delaviradina y combinaciones de los mismos.

10 Ejemplos de agentes antiinflamatorios incluyen, de forma no exclusiva, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de ciclooxigenasa (COX) no selectivos, inhibidores de COX-1, inhibidores de COX-2, inhibidores de lipoxigenasa, corticosteroides, antioxidantes, inhibidores del factor de necrosis tumoral (FNT) y combinaciones de los mismos. Ejemplos de inhibidores de COX-2 incluyen, de forma no exclusiva, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, lumiracoxib, etoricoxib y combinaciones de los mismos.

15 En Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 31 Edición, The Pharmaceutical Press, Londres, 1996, que se incorpora aquí por referencia y se considera como parte de este documento, se puede encontrar una descripción de los tipos de agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos enumerados son comerciales y/o se pueden preparar mediante técnicas conocidas.

20 En una realización específica, el principio activo es un compuesto poco soluble en agua. El concepto "poco soluble en agua" indica una solubilidad del compuesto en agua inferior a aproximadamente 10 mg/ml, preferentemente inferior a aproximadamente 1 mg/ml. Los compuestos poco solubles en agua son particularmente adecuados para preparaciones en suspensión acuosa, dado que existen alternativas limitadas para formular estos compuestos en medios acuosos. Ventajosamente, las opsoninas como la IgG, que proporcionan los revestimientos de acuerdo con la invención, se pueden adsorber en la superficie de las partículas que comprenden estos principios activos poco solubles en agua, formando un revestimiento esencialmente uniforme sobre las mismas. Por ejemplo, las fracciones de cola hidrófobas de opsoninas tales como la IgG se pueden asociar con regiones hidrófobas sobre la superficie de la partícula. Además, las opsoninas como la IgG están cargadas positivamente cuando el pH está por debajo del punto isoeléctrico de la opsonina y, por consiguiente, una fuerte interacción electrostática entre la opsonina y la partícula hidrófoba (que puede estar cargada negativamente) puede estabilizar el revestimiento que comprende la proteína de opsonina. En un aspecto preferente, el compuesto del principio activo poco soluble en agua es un compuesto orgánico que tiene un peso molecular inferior a 2.500 gramos/mol, inferior a 2.000 gramos/mol y, en general, inferior a 1.000 gramos/mol, por ejemplo de entre 200 gramos/mol y 900 gramos/mol. A veces, estos compuestos orgánicos se denominan "moléculas pequeñas".

30 Alternativamente, la invención se puede poner en práctica con compuestos solubles en agua. Estos principios activos solubles en agua pueden estar inmovilizados en una matriz soporte sólida (por ejemplo, un copolímero de polilactato-poliglicolato, albúmina, almidón), o encapsulados en una vesícula circundante esencialmente impermeable al principio activo. Dicha vesícula de encapsulamiento puede consistir en un revestimiento polimérico, como poliácido. Además, las partículas pequeñas preparadas a partir de estos compuestos solubles en agua se pueden modificar para mejorar la estabilidad química y controlar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos mediante el control de la liberación de los compuestos desde las partículas. Ejemplos de compuestos solubles en agua incluyen, de forma no exclusiva, compuestos orgánicos simples, proteínas, péptidos, nucleótidos, oligonucleótidos y carbohidratos.

40 La siguiente descripción de las partículas también es aplicable a todas las realizaciones dadas a conocer aquí. Las partículas pueden ser amorfas, semicristalinas, cristalinas o una combinación de estos tipos de partícula según se determina mediante métodos analíticos adecuados, como calorimetría diferencial de barrido (*differential scanning calorimetry* - DSC) o difracción de rayos X. Antes de la administración, las partículas se pueden homogeneizar por un proceso de homogeneización. Las partículas también se pueden homogeneizar mediante un proceso de microprecipitación/homogeneización.

45 Generalmente, las partículas revestidas tienen un tamaño medio efectivo de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  (o 2.000 nanómetros) tal como se mide por métodos de dispersión dinámica de luz (por ejemplo espectroscopía de fotocorrelación, difracción láser, dispersión de luz láser de ángulo pequeño (*low-angle laser light scattering* - LALLS), dispersión de luz láser de ángulo medio (*medium-angle laser light scattering* - MALLS), métodos de ocultación de luz (método Coulter, por ejemplo), reología, o microscopía (óptica o electrónica). El tamaño de partícula efectivo medio preferente depende de factores tales como la vía de administración prevista, la formulación, la solubilidad, la toxicidad y la biodisponibilidad del compuesto. Otros tamaños de partícula adecuados incluyen, de forma no exclusiva, entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 500 nm, y/o entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 250 nm.

Preparación del núcleo de partícula

Los procesos para preparar las partículas utilizadas en la presente invención se pueden poner en práctica a través de numerosas técnicas. A continuación se ofrece una descripción representativa, pero no exhaustiva, de técnicas para la preparación de partículas.

5 *I. Técnicas de aportación de energía para formar dispersiones de partículas pequeñas*

En general, el método para preparar dispersiones de partículas pequeñas utilizando técnicas de aportación de energía incluye el paso de adicionar el principio activo o el compuesto farmacéuticamente activo, que a veces también se designa fármaco, en forma masa, a un vehículo adecuado, como agua o una solución acuosa, que generalmente contiene uno o más de los agentes tensioactivos mencionados más abajo u otro líquido en el que el compuesto farmacéutico no es esencialmente soluble, formando una primera suspensión, que se denomina  
10 presuspensión. Luego se aporta energía a la presuspensión para formar una dispersión de partículas que es físicamente más estable que la presuspensión. La energía se añade mediante molienda mecánica (por ejemplo molienda con perlas, molienda con bolas, molienda con martillos, molienda con energía de fluido, molienda con chorro o molienda en húmedo). Estas técnicas se dan a conocer en la Patente US nº 5.145.684, que se incorpora aquí por referencia y se considera como parte de este documento.  
15

Las técnicas de aportación de energía también incluyen someter la presuspensión a condiciones de alta cizalladura, incluyendo fuerzas de cavitación, cizalladura o impacto utilizando un microfluidizador. La presente invención también tiene en cuenta la aportación de energía a la presuspensión utilizando un homogeneizador de ranura de émbolo u homogeneizador de flujo en contracorriente tales como los descritos en la Patente US nº 5.091.188, que se  
20 incorpora aquí por referencia y se considera como parte de este documento. Los homogeneizadores de ranura de émbolo son comerciales, por ejemplo con los nombres de producto EMULSIFLEX™ (Avestin) y FRENCH® Pressure Cell (Thermo Spectronic). Microfluidizadores adecuados están disponibles de Microfluidics Corp.

El peso de aportar energía también se puede llevar a cabo utilizando técnicas de sonicación. El paso de sonicación se puede llevar a cabo con cualquier dispositivo de sonicación adecuado. Dispositivos adecuados incluyen Branson modelo S-450A y Cole-Parmer modelo 500/750 vatios. Estos dispositivos son bien conocidos en la industria.  
25 Normalmente, el dispositivo de sonicación tiene una bocina o sonda de sonicación que se inserta en la presuspensión para emitir energía sónica en la solución. En una forma preferente de la invención, el dispositivo de sonicación se utiliza a una frecuencia entre aproximadamente 1 kHz y aproximadamente 90 kHz y de forma especialmente preferente entre aproximadamente 20 kHz y aproximadamente 40 kHz, o cualquier intervalo o  
30 combinación de intervalos dentro de éstos. Los tamaños de las sondas pueden variar y preferentemente tienen diferentes tamaños, como 1/2 pulgada o 1/4 pulgada, o similares.

La dispersión de partículas pequeñas se puede esterilizar antes de la administración. La esterilización se puede llevar a cabo mediante esterilización en caliente, irradiación gamma, filtración (directamente como una dispersión con tamaños de partícula por debajo de 200 nm, o mediante filtración estéril de las soluciones utilizadas en el  
35 proceso de precipitación, antes de formar la dispersión sólida), y mediante aplicación de una alta presión (superior a 2.000 atmósferas), o mediante una combinación de alta presión y temperatura elevada.

*II. Métodos para preparar dispersiones de partículas con tamaños submicrónicos*

También se pueden preparar dispersiones de partículas pequeñas mediante técnicas de precipitación. A continuación se describen ejemplos de técnicas de precipitación.

40 Métodos de microprecipitación. En la Patente US nº 5.780.062, que se incorpora aquí por referencia y se considera como parte de este documento, se da a conocer un ejemplo de método de microprecipitación. La patente '062 describe un proceso de precipitación de compuestos orgánicos que incluye: (i) disolver el compuesto orgánico en un primer disolvente miscible con agua; (ii) preparar una solución de polímero y un material anfifílico en un segundo disolvente acuoso donde el compuesto orgánico es esencialmente insoluble, formándose un complejo  
45 polímero/material anfifílico; y (iii) mezclar las soluciones de los pasos (i) y (ii) para provocar la precipitación de un agregado del compuesto orgánico y el complejo de polímero/material anfifílico.

En las Patentes US nº 6.607.784, 7.037.528, 6.,869.617, 6.884.436, que se incorporan aquí por referencia y se consideran como parte de este documento, se dan a conocer otros procesos de precipitación adecuados. Los procesos aquí descritos incluyen los pasos de: (1) disolver un compuesto orgánico en un primer disolvente orgánico miscible con agua para crear una primera solución; (2) mezclar la primera solución con un segundo disolvente o con  
50 agua para precipitar el compuesto orgánico con el fin de crear una presuspensión; y (3) aportar energía a la presuspensión en forma de mezclado de alta cizalladura o calor para obtener una dispersión de partículas pequeñas. Opcionalmente, el primer disolvente orgánico se retira de la mezcla por cualquier medio adecuado, por ejemplo métodos de centrifugación o filtración. Además, la fase continua de la dispersión se puede sustituir  
55 opcionalmente por otra fase continua retirando la primera fase continua utilizando métodos tales como centrifugación

y filtración, y añadiendo una segunda fase continua y a continuación redispersando el material sólido en la segunda fase continua. También se pueden añadir al primer disolvente orgánico o a la segunda solución acuosa uno o más de los agentes tensioactivos opcionales indicados más abajo.

5 Métodos de precipitación en emulsión. En la publicación de Patente US nº 2005/0037083, que se incorpora aquí por referencia y se considera como parte de este documento, se describe una técnica de precipitación en emulsión adecuada. En este método, el proceso incluye los pasos de: (1) preparar un sistema multifase que tiene una fase orgánica y una fase acuosa, incluyendo la fase orgánica un compuesto farmacéuticamente activo; y (2) someter el sistema a sonicación para evaporar una parte de la fase orgánica con el fin de provocar la precipitación del compuesto en la fase acuosa formando una dispersión de partículas pequeñas. El paso de preparación de un sistema multifase incluye los pasos de: (1) mezclar un disolvente inmiscible con agua con el compuesto farmacéuticamente activo para definir una solución orgánica; (2) preparar una solución de base acuosa con uno o más compuestos tensioactivos; y (3) mezclar la solución orgánica con la solución acuosa para formar el sistema multifase. El paso de mezcla de la fase orgánica y la fase acuosa puede incluir el uso de homogeneizadores de ranura de émbolo, molinos coloidales, equipos de agitación de alta velocidad, equipos de extrusión, equipos de agitación o sacudida manual, microfluidizadores u otros equipos o técnicas para crear condiciones de alta cizalladura. La emulsión bruta tendrá gotas de aceite en el agua con un tamaño aproximadamente inferior a 1 µm de diámetro. La emulsión bruta se somete a sonicación para definir una microemulsión y finalmente obtener una dispersión de partículas pequeñas.

20 En la Patente US nº 6.835.396, que se incorpora aquí por referencia y se considera como parte de este documento, se da a conocer otro método para preparar una dispersión de partículas pequeñas. Este proceso incluye los pasos de: (1) preparar una dispersión bruta de un sistema multifase que tiene una fase orgánica y una fase acuosa, incluyendo la fase orgánica un compuesto farmacéutico; (2) aportar energía a la dispersión bruta para formar una dispersión fina; (3) congelar la dispersión fina; y (4) liofilizar la dispersión fina para obtener partículas pequeñas del compuesto farmacéutico. Las partículas pequeñas se pueden esterilizar mediante las técnicas indicadas más abajo, o se pueden reconstituir en un medio acuoso y esterilizar.

30 El paso de preparar un sistema multifase incluye los pasos de: (1) mezclar un disolvente inmiscible con agua con el compuesto farmacéuticamente eficaz para definir una solución orgánica; (2) preparar una solución de base acuosa con uno o más compuestos tensioactivos; y (3) mezclar la solución orgánica con la solución acuosa para formar el sistema multifase. El paso de mezcla de la fase orgánica y la fase acuosa incluye el uso de homogeneizadores de ranura de émbolo, molinos coloidales, equipos de agitación de alta velocidad, equipos de extrusión, equipos de agitación o sacudida manual, microfluidizadores u otros equipos o técnicas para crear condiciones de alta cizalladura.

35 Precipitación disolvente-antidisolvente. Las dispersiones de partículas pequeñas también se pueden preparar utilizando la técnica de precipitación disolvente-antidisolvente dada a conocer por Fessi y col. en la Patente US nº 5.118.528 y por Leclef y col. en la Patente US nº 5.100.591, que se incorporan aquí por referencia y se consideran como parte de este documento. Los dos procesos incluyen los pasos de: (1) preparar una fase líquida de una sustancia biológicamente activa en un disolvente o una mezcla de disolventes a la que se le pueden añadir uno o más agentes tensioactivos; (2) preparar una segunda fase líquida de un no-disolvente o una mezcla de no-disolventes, siendo el no-disolvente miscible con el disolvente o la mezcla de disolventes para la sustancia; (3) juntar las soluciones (1) y (2) con agitación; y (4) retirar los disolventes no deseados para producir una dispersión de partículas pequeñas. Estos métodos se diferencian de los arriba descritos bajo la sección "Métodos de Microprecipitación" en que no prevén un último paso de aportación de energía a la suspensión en forma de un mezclado por alta cizalladura o calor.

45 Precipitación por inversión de fases. Las dispersiones de partículas pequeñas se pueden formar utilizando una precipitación por inversión de fases tal como se da a conocer en las Patentes US nº 6.235.224, 6.143.211 y 6.616.869, que en cada caso se incorporan aquí por referencia y se consideran como parte de este documento. La inversión de fases es un concepto utilizado para describir los fenómenos físicos por los que un polímero disuelto en un sistema disolvente en fase continua se invierte en una red macromolecular sólida donde el polímero es la fase continua. Un método para inducir la inversión de fases consiste en la adición de un no-disolvente a la fase continua. El polímero experimenta una transición de una fase simple a una mezcla de dos fases inestable: fracciones ricas en polímeros y pobres en polímeros. Unas pequeñas gotas micelares de no-disolvente en la fase rica en polímeros sirven como sitios de nucleación y quedan revestidas por el polímero. La patente '224 muestra que la inversión de fases de soluciones poliméricas bajo determinadas condiciones puede provocar una formación espontánea de micropartículas discretas, incluyendo nanopartículas. La patente '224 da a conocer la disolución o dispersión de un polímero en un disolvente. En el disolvente también se disuelve o dispersa un agente farmacéutico. Para que el paso de siembra de cristal sea eficaz en este proceso, es deseable que el agente se disuelva en el disolvente. El polímero, el agente y el disolvente juntos forman una mezcla que tiene una fase continua, en la que el disolvente es la fase continua. Después, la mezcla se introduce en un exceso al menos diez veces mayor de un no-disolvente miscible para provocar la formación espontánea de las micropartículas microencapsuladas del agente con un tamaño de partícula medio entre 10 nm y 10 µm. En el tamaño de partícula influye la relación volumen disolvente:no-



disolvente, la concentración de polímero, la viscosidad de la solución polímero-disolvente, el peso molecular del polímero y las características de la pareja disolvente - no-disolvente.

5 Precipitación por cambio de pH. Las dispersiones de partículas pequeñas se pueden formar mediante técnicas de precipitación por cambio de pH. Esta técnicas incluyen normalmente un paso de disolver un fármaco en una solución a un pH en el que el fármaco es soluble, seguido de un paso de cambio del pH hasta un punto en el que el fármaco ya no es soluble. El pH puede ser ácido o básico, dependiendo del compuesto farmacéutico en particular. Después, la solución se neutraliza para formar una dispersión de partículas pequeñas. En la Patente US nº 5.665.331, que se incorpora aquí por referencia y se considera como parte de este documento, se da a conocer un proceso adecuado de precipitación por cambio de pH. El proceso incluye el paso de disolver el agente farmacéutico junto con un modificador del crecimiento cristalino (*crystal growth modifier* - CGM) y neutralizando después la solución con un ácido en presencia de uno o más agentes tensioactivos modificadores superficiales adecuados para formar una dispersión de partículas pequeñas del agente farmacéutico. El paso de precipitación puede ir seguido de pasos de depuración de la dispersión por diafiltración y después del ajuste de la concentración de la dispersión a un nivel deseado.

15 En las Patentes US nº 5.716.642, 5.662.883, 5.560.932 y 4.608.278, que se incorporan aquí por referencia y se consideran como parte de este documento, se dan a conocer otros ejemplos de métodos de precipitación por cambio del pH.

20 Método de precipitación por infusión. En las Patentes US nº 4.997.454 y 4.826.689, que se incorporan aquí por referencia y se consideran como parte de este documento, se dan a conocer técnicas adecuadas de precipitación por infusión. En primer lugar, un compuesto sólido adecuado se disuelve en un disolvente orgánico adecuado para formar una mezcla disolvente. Después, un no-disolvente de precipitación miscible con el disolvente orgánico se introduce por infusión en la mezcla disolvente a una temperatura entre aproximadamente -10°C y aproximadamente 100°C y a una velocidad de infusión entre aproximadamente 0,01 ml por minuto y aproximadamente 1.000 ml por minuto por un volumen de 50 ml, para producir una suspensión de partículas sólidas precipitadas no agregadas del compuesto con un diámetro medio esencialmente uniforme inferior a 10 µm. Es preferible una agitación (por ejemplo por sacuda) de la solución incorporada por infusión con el no-disolvente de precipitación. El no-disolvente puede contener un agente tensioactivo para estabilizar las partículas contra la agregación. Después, las partículas se separan del disolvente. Los parámetros de temperatura, relación entre no-disolvente y disolvente, velocidad de infusión, velocidad de agitación y volumen se pueden variar de acuerdo con la invención dependiendo del compuesto sólido y del tamaño de partícula deseado. El tamaño de partícula es proporcional a la relación de los volúmenes de no-disolvente:disolvente y la temperatura de infusión y es inversamente proporcional a la velocidad de infusión y la velocidad de agitación. El no-disolvente de precipitación puede ser acuoso o no acuoso, dependiendo de la solubilidad relativa del compuesto y del vehículo de suspensión deseado.

35 Precipitación por cambio de temperatura: Pueden emplearse técnicas de precipitación por cambio de temperatura también para formar dispersiones de partículas pequeñas. Esta técnica se describe en la Patente US nº 5.188.837, que se incorpora aquí por referencia y se considera como parte de este documento. En una realización de la invención se preparan lipoesferas mediante los pasos de: (1) fundir o disolver una sustancia, como un fármaco a administrar, en un vehículo fundido para formar un líquido de la sustancia a administrar; (2) añadir un fosfolípido junto con un medio acuoso a la sustancia o vehículo fundido a una temperatura superior a la temperatura de fusión de la sustancia o vehículo; (3) mezclar la suspensión a una temperatura superior a la temperatura de fusión del vehículo hasta obtener una preparación fina homogénea; y después (4) enfriar rápidamente la preparación a temperatura ambiente o por debajo de ésta.

45 Precipitación por evaporación de disolvente. En la Patente US nº 4.973.465, que se incorpora aquí por referencia y se considera como parte de este documento, se dan a conocer técnicas de precipitación por evaporación de disolvente. La patente '465 da a conocer métodos para preparar microcristales, que incluyen los pasos de: (1) preparar una solución de una composición farmacéutica y un fosfolípido disuelto en un disolvente orgánico común o una combinación de disolventes; (2) evaporar el o los disolventes; y (3) suspender la película obtenida por evaporación del o de los disolventes en una solución acuosa mediante agitación vigorosa para formar una dispersión de partículas pequeñas. El disolvente se puede eliminar evaporando una cantidad suficiente del mismo para provocar una precipitación del compuesto. El disolvente también se puede retirar mediante otras técnicas bien conocidas, como aplicación de vacío a la solución o soplado de nitrógeno por encima de la misma.

55 Precipitación por reacción. La precipitación por reacción incluye los pasos de disolver el compuesto farmacéutico y opcionalmente otros excipientes en un disolvente adecuado para formar una solución. El compuesto se puede añadir en una cantidad correspondiente al punto de saturación del compuesto en el disolvente o por debajo de dicho punto de saturación. El compuesto o cualquiera de los excipientes precipitan en la solución por reacción con un agente químico o mediante modificación en respuesta a la aportación de energía tal como calor o luz UV o similares, de modo que el compuesto modificado tiene menor solubilidad en el disolvente y precipita en la solución, formando una dispersión de partículas pequeñas. La precipitación del excipiente proporciona una matriz sólida en la que se absorbe el fármaco.

Precipitación por fluido comprimido. En el documento WO 97/14407 de Johnston, que se incorpora aquí por referencia y se considera como parte de este documento, se da a conocer una técnica adecuada para la precipitación mediante fluido comprimido. El método incluye los pasos de disolver un fármaco insoluble en agua en un disolvente para formar una solución. Después, la solución se pulveriza en un fluido comprimido, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. La adición del fluido comprimido a una solución de un soluto en un disolvente hace que el soluto llegue o se acerque a un estado supersaturado y precipite en forma de partículas finas. En este caso, el fluido comprimido actúa como un antidisolvente que reduce la densidad de energía cohesiva del disolvente en el que está disuelto el fármaco.

Alternativamente, el fármaco se puede disolver en el fluido comprimido, que después se pulveriza en una fase acuosa. La rápida expansión del fluido comprimido reduce el poder disolvente del fluido, lo que a su vez hace que el soluto precipite en forma de partículas pequeñas en la fase acuosa. En este caso, el fluido comprimido actúa como disolvente.

Con el fin de estabilizar las partículas contra la agregación, en esta técnica se incluye un modificador superficial, tal como un agente tensioactivo.

Pulverización en fluidos criogénicos. Williams y col., en la Publicación de Patente nº 2004/0022861, que se incorpora aquí por referencia y se considera como parte de este documento, describen una técnica adecuada para la precipitación por fluido comprimido. El método proporciona un sistema y un método para la producción de partículas pequeñas donde el ingrediente activo se mezcla con agua, uno o más disolventes o una combinación de éstos, y la mezcla resultante se pulveriza en la superficie de un fluido criogénico o por debajo de ésta. De este modo se preparan partículas congeladas. También se pueden añadir materiales para encapsular las partículas sólidas, con lo que se generan partículas congeladas donde el agente de encapsulación rodea el principio activo.

Precipitación de nanoesferas/microesferas de proteína. Las partículas utilizadas en esta invención también se pueden producir a partir de un proceso que incluye la mezcla o disolución de macromoléculas, como proteínas, con un polímero soluble en agua. Este proceso se da a conocer en las Patentes US nº 5.849.884, 5.981.719, 6.090.925, 6.268.053, 6.458.387 y en la Publicación de Patente US nº 2004/0043077, que se incorporan aquí por referencia y se consideran como parte de este documento. En una realización de la invención se preparan partículas mezclando una macromolécula en solución con un polímero o una mezcla de polímeros en solución a un pH cercano al punto isoeléctrico de la macromolécula. La mezcla se incuba en presencia de una fuente de energía, como calor, radiación o ionización, durante un tiempo determinado. Las partículas resultantes se pueden retirar de cualquier componente no incorporado presente en la solución mediante métodos de separación físicos.

También existen otras numerosas metodologías adecuadas para preparar dispersiones de partículas pequeñas que pueden ser utilizadas de acuerdo con la invención.

### *III. Métodos adicionales para preparar dispersiones de partículas de composiciones farmacéuticas*

Los siguientes procesos adicionales para preparar partículas de composiciones farmacéuticas (es decir, principio activo o compuesto orgánico) se pueden dividir en cuatro categorías generales. Todas las categorías de procesos comparten los pasos de: (1) disolver un compuesto orgánico en un primer disolvente miscible con agua para crear una primera solución; (2) mezclar la primera solución con un segundo disolvente acuoso para precipitar el compuesto orgánico con el fin de crear una presuspensión; y (3) aportar energía a la presuspensión en forma de un mezclado de alta cizalladura o calor, o una combinación de ambos, para obtener una forma estable del compuesto orgánico con los intervalos de tamaños arriba definidos. Los pasos de mezcla y el de aportación de energía se pueden llevar a cabo en pasos consecutivos o de forma simultánea.

Las categorías de procesos se diferencian en función de las propiedades físicas del compuesto orgánico determinadas mediante estudios de difracción de rayos X, estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) u otro estudio adecuado realizado antes y después del paso de aportación de energía. En la primera categoría de procesos, antes del paso de aportación de energía, el compuesto orgánico de la presuspensión adopta una configuración amorfa, una forma semicristalina o una forma líquida superenfriada y tiene un tamaño de partícula efectivo medio. Después del paso de aportación de energía, el compuesto orgánico está en una forma cristalina que tiene un tamaño de partícula efectivo medio esencialmente igual o menor que el de la presuspensión.

En una segunda categoría de procesos, antes del paso de aportación de energía el compuesto orgánico se encuentra en forma cristalina y tiene un tamaño de partícula efectivo medio. Después del paso de aportación de energía, el compuesto orgánico se encuentra en una forma cristalina que tiene esencialmente el mismo tamaño de partícula efectivo medio que antes del paso de aportación de energía, pero después del paso de aportación de energía los cristales son menos propensos a la agregación o a la formación de cristales grandes.

La menor tendencia del compuesto orgánico a agregarse o a formar cristales grandes se observa mediante dispersión dinámica de luz láser y microscopía óptica.

En la tercera categoría de procesos, antes del paso de aportación de energía, el compuesto orgánico se encuentra en forma cristalina friable y tiene un tamaño de partícula efectivo medio. El término "friable" significa que las partículas son frágiles y se desmenuzan fácilmente en partículas más pequeñas. Después del paso de aportación de energía, el compuesto orgánico se encuentra en una forma cristalina con un tamaño de partícula efectivo medio inferior al de los cristales de la presuspensión. Si se toman las medidas necesarias para poner el compuesto orgánico en una forma cristalina friable, el paso de aportación de energía subsiguiente se puede llevar a cabo más rápida y eficazmente que en caso de un compuesto orgánico con una morfología cristalina menos friable.

En la cuarta categoría de procesos, la primera solución y el segundo disolvente se someten simultáneamente al paso de aportación de energía. Por ello no se han medido las propiedades físicas del compuesto orgánico antes y después del paso de aportación de energía.

El paso de aportación de energía se puede llevar a cabo de cualquier modo en el que la presuspensión o la primera solución y el segundo disolvente se exponen a cavitación, cizalladura o fuerzas de impacto. En una forma, el paso de aportación de energía es un paso de templado. El "templado" se define en esta invención como el proceso de convertir una materia que es termodinámicamente inestable en una forma más estable mediante una aplicación individual o reiterada de energía (calor directo o tensión mecánica), seguida de relajación térmica. Esta reducción de la energía se puede lograr mediante conversión de la forma sólida de una estructura de red cristalina menos ordenada a una más ordenada. Alternativamente, esta estabilización se puede llevar a cabo mediante una reordenación de las moléculas del agente tensioactivo en la interfaz sólido-líquido.

Más abajo se muestran estas cuatro categorías de procesos por separado. No obstante, se ha de entender que las condiciones de proceso, como la selección de agentes tensioactivos o de sus combinaciones, la cantidad de agente tensioactivo utilizado, la temperatura de reacción, la tasa de mezcla de soluciones, la velocidad de precipitación y similares, se pueden seleccionar para permitir que cualquier fármaco sea procesado bajo cualquiera de las categorías tratadas a continuación.

La primera categoría de procesos, al igual que la segunda, tercera y cuarta categoría de procesos, se puede dividir además en dos subcategorías: los Métodos A y B.

El primer disolvente de acuerdo con los siguientes procesos es un disolvente o una mezcla de disolventes donde el compuesto orgánico de interés es relativamente soluble y que es miscible con el segundo disolvente. Dichos disolventes incluyen, de forma no exclusiva, compuestos próticos miscibles con agua en los que un átomo de hidrógeno de la molécula está unido a un átomo electronegativo, como oxígeno, nitrógeno u otro elemento de los Grupos VA, VIA y VII A de la Tabla Periódica de los Elementos. Ejemplos de estos disolventes incluyen, de forma no exclusiva, alcoholes, aminas (primarias o secundarias), oximas, ácidos hidroxámicos, ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, ácidos fosfónicos, ácidos fosfóricos, amidas y ureas.

Otros ejemplos de primer disolvente también incluyen disolventes orgánicos apróticos. Algunos de estos disolventes apróticos pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua, pero sólo pueden actuar como aceptores de protones porque carecen de grupos donadores de protones efectivos. Un tipo de disolvente aprótico es un disolvente aprótico dipolar de acuerdo con la definición de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2ª Edición, 1997): un disolvente con una permitividad relativa (o constante dieléctrica) comparativamente alta, superior a aproximadamente 15, y un momento dipolar permanente considerable, que no puede donar átomos de hidrógeno adecuadamente lábiles para formar enlaces de hidrógeno fuertes, por ejemplo sulfóxido de dimetilo.

Los disolventes apróticos dipolares se pueden seleccionar de entre el grupo consistente en amidas (completamente sustituidas, con nitrógeno sin átomos de hidrógeno unidos), ureas (completamente sustituidas, sin átomos de hidrógeno unidos al nitrógeno), éteres, éteres cíclicos, nitrilos, cetonas, sulfonas, sulfóxidos, fosfatos completamente sustituidos, ésteres fosfonato, fosforamidas, compuestos nitro y similares. Los compuestos sulfóxido de dimetilo (DMSO), N-metil-2-pirrolidinona (NMP), 2-pirrolidinona, 1,3-dimetilimidazolidinona (DMI), dimetilacetamida (DMA), dimetilformamida (DMF), dioxano, acetona, tetrahidrofurano (THF), tetrametilensulfona (sulfolano), acetonitrilo y hexametilfosforamida (HMPA), nitrometano, entre otros, son miembros de esta clase.

También se pueden elegir disolventes generalmente inmiscibles con agua, pero de suficiente solubilidad en agua en volúmenes pequeños (menos del 10%) como para actuar como un primer disolvente miscible con agua a estos volúmenes reducidos. Como ejemplos se incluyen hidrocarburos aromáticos, alquenos, alcanos y compuestos aromáticos halogenados, haloalquenos y haloalcanos. Los compuestos aromáticos incluyen, de forma no exclusiva, benceno (sustituido o no sustituido) y arenos monocíclicos o policíclicos. Ejemplos de bencenos sustituidos incluyen, de forma no exclusiva, xilenos (orto, meta o para) y tolueno. Ejemplos de alcanos incluyen, de forma no exclusiva, hexano, neopentano, heptano, isooctano y ciclohexano. Ejemplos de compuestos aromáticos halogenados incluyen, de forma no exclusiva, clorobenceno, bromobenceno y clorotolueno. Ejemplos de haloalcanos y haloalquenos incluyen, de forma no exclusiva, tricloroetano, cloruro de metileno, dicloruro de etileno (EDC) y similares.

Otros ejemplos específicos de disolventes adecuados para su uso como primer disolvente incluyen, de forma no exclusiva, N-metil-2-pirrolidinona (también denominada N-metil-2-pirrolidona), 2-pirrolidinona (también denominada 2-pirrolidona), 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI), sulfóxido de dimetilo, dimetilacetamida, ácido acético, ácido láctico, metanol, etanol, isopropanol, 3-pentanol, n-propanol, alcohol bencílico, glicerol, butilenglicol (butanodiol), etilenglicol, propilenglicol, monoglicéridos monoacilados y diacetilados (como caprilato de glicerilo), dimetil isosorbida, acetona, dimetilsulfona, dimetilformamida, 1,4-dioxano, tetrametilsulfona (sulfolano), acetonitrilo, nitrometano, tetrametilurea, hexametilfosforamida (HMPA), tetrahidrofurano (THF), dioxano, dietil éter, tec-butil metil éter (TBME), hidrocarburos aromáticos, alcanos, compuestos aromáticos halogenados, haloalcanos, xileno, tolueno, benceno, benceno sustituido, acetato de etilo, acetato de metilo, acetato de butilo, clorobenceno, bromobenceno, clorotolueno, tricloroetano, cloruro de metileno, dicloruro de etileno (EDC), hexano, neopentano, heptano, isooctano, ciclohexano, polietilenglicol (PEG, por ejemplo PEG-4, PEG-8, PEG-9, PEG-12, PEG-14, PEG-16, PEG-120, PEG-75, PEG-150), polietilenglicol ésteres (por ejemplo PEG-4 dilaurato, PEG-20 dilaurato, PEG-6 isoestearato, PEG-8 palmitoestearato, PEG-150 palmitoestearato), polietilenglicol sorbitanos (como PEG-20 isoestearato de sorbitano), polietilenglicol monoalquil éteres (por ejemplo PEG-3 dimetil éter, PEG-4 dimetil éter), polipropilenglicol (PPG), alginato de polipropileno, PPG-10 butanodiol, PPG-10 éter de metilglucosa, PPG-20 éter de metilglucosa, PPG-15 estearil éter, dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, laurato de propilenglicol, y glicofurol (alcohol tetrahidrofurfurílico polietilenglicol éter). Un primer disolvente preferente es N-metil-2-pirrolidinona. Otro primer disolvente preferente es ácido láctico.

El segundo disolvente es un disolvente acuoso. Este disolvente acuoso puede ser agua. Este disolvente también puede contener tampones, sales, agente(s) tensioactivo(s), polímeros solubles en agua y combinaciones de estos excipientes.

Método A. En el Método A, el compuesto orgánico ("principio activo" o "fármaco") se disuelve primero en el primer disolvente para producir una primera solución. El compuesto orgánico se puede añadir en una cantidad entre aproximadamente un 0,1% p/v y aproximadamente un 50% (p/v) dependiendo de la solubilidad del compuesto orgánico en el primer disolvente. Puede ser necesario calentar el concentrado de aproximadamente 30°C a aproximadamente 100°C para asegurar la disolución total del compuesto en el primer disolvente.

Un segundo disolvente acuoso está provisto de uno o más modificadores superficiales opcionales, tales como un agente tensioactivo aniónico, un agente tensioactivo catiónico, un agente tensioactivo zwitteriónico, un agente tensioactivo no iónico o una molécula con actividad superficial biológica añadidos al mismo. Agentes tensioactivos aniónicos adecuados incluyen, de forma no exclusiva, sulfonatos de alquilo, fosfatos de alquilo, fosfonatos de alquilo, laurato de potasio, estearato de trietanolamina, lautilsulfato de sodio, dodecilsulfato de sodio, polioxietileno-sulfatos de alquilo, alginato de sodio, sulfosuccinato de dioctil-sodio, fosfatidilglicerol, fosfatidilinosina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol, fosfatidilserina, ácido fosfatídico y sus sales, carboximetilcelulosa sódica, ácido cólico y otros ácidos biliares (por ejemplo ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido glicocólico, ácido taurocólico, ácido glicodesoxicólico) y sales de los mismos (por ejemplo desoxicolato de sodio, etc.)

Los agentes tensioactivos zwitteriónicos son eléctricamente neutros pero poseen cargas positivas y negativas dentro de la misma molécula. Los agentes tensioactivos zwitteriónicos adecuados incluyen, de forma no exclusiva, fosfolípidos zwitteriónicos. Los fosfolípidos adecuados incluyen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, diacil-glicerofosfoetanolamina (como dimiristoil-glicerofosfoetanolamina (DMPE), dipalmitoil-glicerofosfoetanolamina (DPPE), diestearoil-glicerofosfoetanolamina (DSPE) y dioleoil-glicerofosfoetanolamina (DOPE)). En esta invención se pueden utilizar mezclas de fosfolípidos que incluyen fosfolípidos aniónicos y zwitteriónicos. Estas mezclas incluyen, de forma no exclusiva, lisofosfolípidos, fosfolípido de huevo o soja o cualquier combinación de éstos. El fosfolípido, ya sea aniónico, zwitteriónico o una mezcla de fosfolípidos, puede estar salificado o no salificado, hidrogenado o parcialmente hidrogenado, o ser natural, semisintético o sintético. En la presente invención, el fosfolípido también se puede conjugar con un polímero soluble en agua o hidrófilo para dirigir específicamente el suministro a macrófagos. No obstante, también se pueden utilizar fosfolípidos conjugados para dirigirse a otras células o tejidos en otras aplicaciones. Un polímero preferente es polietilenglicol (PEG), que también es conocido como monometoxipolietilenglicol (mPEG). Los pesos moleculares del PEG pueden variar, por ejemplo entre 200 y 50.000. Ciertos PEG de uso común que están disponibles comercialmente incluyen PEG 350, PEG 550, PEG 750, PEG 1000, PEG 2000, PEG 3000, y PEG 5000. El fosfolípido o el conjugado de PEG-fosfolípido también puede incorporar un grupo funcional que se puede unir de forma covalente a un ligando, incluyendo, de forma no exclusiva, proteínas, péptidos, carbohidratos, glicoproteínas, anticuerpos o agentes farmacéuticamente activos. Estos grupos funcionales se pueden conjugar con los ligandos, por ejemplo mediante formación de enlaces amida, formación de disulfuro o tioéter, o unión biotina/estreptavidina. Ejemplos de grupos funcionales de unión a ligandos incluyen, de forma no exclusiva, hexanolamina, dodecanilamina, 1,12-dodecanodicarboxilato, tioetanol, 4-(p-maleimidofenil)butiramida (MPB), 4-(p-maleimidometil)ciclohexanocarboxamida (MCC), 3-(2-piridil)propionato (PDP), succinato, glutarato, dodecanoato y biotina.

Los agentes tensioactivos catiónicos adecuados incluyen, de forma no exclusiva, compuestos amonio cuaternarios, como cloruro de benzalconio, bromuro de cetiltrimetilamonio, quitosanos, cloruro de laurildimetilbencilamonio, clorhidratos de acilcarnitina, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), dioleoiltrimetilamonio-propano (DOTAP),

dimiristoiltrimetilamonio-propano (DMTAP), dimetilaminoetanocarbamoil-colesterol (DC-col), 1,2-diacilglicero-3-(O-alquil)fosfocolina, O-alquilfosfatidilcolina, haluros de alquilpiridinio, o alquilaminas de cadena larga, por ejemplo n-octilamina y oleilamina.

5 Los agentes tensioactivos no iónicos adecuados incluyen gliceril ésteres, polioietilen ésteres de alcohol graso (MACROGOL™ y BRIJ™), polioxietilen-sorbitano ésteres de ácido graso (polisorbatos), polioxoetilen ésteres de ácido graso (MYRJ™), ésteres de sorbitano (SPAN™), monoestearato de glicerol, polietilenglicoles, polipropilenglicoles, alcohol cetílico, alcohol cetosteárico, alcohol estearílico, alcoholes aril alquil poliéter, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno (poloxámeros), poloxaminas, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa no cristalina, polisacáridos, incluyendo almidón y derivados de almidón como hidroxietilalmidón (HES), alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona. En una forma preferente, el agente tensioactivo no iónico es un copolímero de polioxietileno y polioxipropileno, preferiblemente un copolímero en bloque de propilenglicol y etilenglicol. Estos polímeros se venden bajo el nombre comercial POLOXAMER, también denominado a veces PLURONIC®, por varios proveedores, incluyendo Spectrum Chemical y Ruger. Entre los ésteres de ácido graso de polioxietileno se incluyen aquellos de cadena alquilo cortas. Un ejemplo de agente tensioactivo de este tipo es SOLUTOL® HS 15, polioxietileno-660-hidroxiestearato, producido por BASF Aktiengesellschaft.

20 Las moléculas biológicas tensioactivas incluyen moléculas tales como albúmina, caseína, hirudina u otras proteínas apropiadas. Por ejemplo, también se pueden utilizar proteínas con dominios hidrófilos o hidrófobos. También están incluidos materiales biológicos tensioactivos de polisacárido, que consisten, de forma no exclusiva, en almidones, heparinas y quitosanos. Otros agentes tensioactivos adecuados incluyen cualquier aminoácido, tal como leucina, alanina, valina, isoleucina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, metionina, fenilalanina, o cualquier derivado de estos aminoácidos, por ejemplo derivados amida o éster y polipéptidos formados a partir de estos aminoácidos.

25 También puede ser deseable añadir un agente regulador del pH al segundo disolvente. Agentes reguladores del pH adecuados incluyen, de forma no exclusiva, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácidos monocarboxílicos (por ejemplo ácido acético y ácido láctico), ácidos dicarboxílicos (por ejemplo ácido succínico), ácidos tricarboxílicos (por ejemplo ácido cítrico), THAM (tris(hidroximetil)aminometano), meglumina (N-metilglucosamina), hidróxido de sodio, y aminoácidos tales como glicina, arginina, lisina, alanina, histidina y leucina. El segundo disolvente debería tener un pH dentro del intervalo entre aproximadamente 3 y aproximadamente 11. El medio acuoso puede incluir adicionalmente un agente regulador de la presión osmótica, tal como, de forma no exclusiva, glicerina, un monosacárido como dextrosa, un disacárido como sacarosa, un trisacárido como rafinosa, y alcoholes de azúcar tales como manitol, xilitol y sorbitol.

35 Para las formas de dosificación orales se pueden utilizar uno o más de los siguientes excipientes: gelatina, caseína; lecitina (fosfatidas), goma acacia, colesterol, tragacanto, ácido esteárico, cloruro de benzalconio, estearato de calcio, monestearato de glicerilo, alcohol cetosteárico, cera emulsionante de cetomacrogol, ésteres sorbitano, alquil éteres de polioxietileno, por ejemplo éteres de macrogol como cetomacrogol 1000, derivados de aceite de ricino-polioxietileno, sorbitan ésteres de ácido graso de polioxietileno, por ejemplo TWEEN™ comerciales, polietilenglicoles, estearatos de polioxietileno, dióxido de silicio coloidal, fosfatos, dodecilsulfato de sodio, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa no cristalina, silicato de magnesio-aluminio, trietanolamina, alcohol polivinílico (PVA) y polivinilpirrolidona (PVP). La mayor parte de estos excipientes se describe detalladamente en el Handbook of Pharmaceutical Excipients, publicado conjuntamente por la American Pharmaceutical Association y The Pharmaceutical Society of Great Britain, Pharmaceutical Press, 1986. Los modificadores superficiales son comerciales y/o se pueden preparar mediante técnicas conocidas. También se pueden utilizar combinaciones de dos o más modificadores superficiales.

45 En una forma preferente, el método para preparar partículas pequeñas de compuesto orgánico incluye los pasos añadir la primera solución al segundo disolvente. La velocidad de adición depende del tamaño del lote y de la cinética de precipitación del compuesto orgánico. Normalmente, para un proceso de laboratorio a pequeña escala (preparación de 1 litro), la velocidad de adición oscila entre aproximadamente 0,05 cc por minuto y aproximadamente 10 cc por minuto. Durante la adición, las soluciones deben estar bajo agitación constante. Mediante microscopía óptica se ha observado que se forman partículas amorfas, sólidos semicristalinos o un líquido superenfriado para crear una presuspensión. El método también incluye el paso de someter la presuspensión a una etapa de aportación de energía para pasar las partículas amorfas, el líquido superenfriado o el sólido semicristalino a un estado sólido cristalino más estable. Las partículas resultantes tendrán un tamaño de partícula efectivo medio medido por métodos de dispersión luminosa dinámica (por ejemplo espectroscopía de fotocorrelación, difracción láser, dispersión de luz láser de ángulo bajo (LALLS), dispersión de luz láser de ángulo medio (MALLS), métodos de oscurecimiento de luz (por ejemplo método de Coulter), reología, o microscopía (óptica o electrónica) dentro de los márgenes arriba indicados. En la cuarta categoría de procesos, la primera solución y el segundo disolvente se combinan realizando simultáneamente el paso de aportación de energía.

La etapa de aportar energía implica la aportación de energía por sonicación, homogeneización, homogeneización por flujo en contracorriente, microfluidización u otros métodos para producir fuerzas de impacto, cizalladura o cavitación. La muestra se puede enfriar o calentar durante esta etapa. En una forma, la etapa de aportación de energía se lleva a cabo en un homogeneizador de ranura de émbolo tal como el vendido por Avestin Inc. bajo la denominación de producto EmulsiFlex-C160. En otra forma, el paso de aportación de energía se lleva a cabo por ultrasonificación utilizando un procesador ultrasónico, tal como Vibra-Cell Ultrasonic Processor (600 W), fabricado por Sonics and Materials, Inc. En otra forma más, el paso de aportación de energía se lleva a cabo empleando un aparato de emulsión tal como se describe en la Patente US nº 5.720.551, que se incorpora aquí por referencia y se considera como parte de este documento.

Dependiendo de la velocidad de aportación de energía, puede ser deseable ajustar la temperatura de la muestra procesada en el intervalo de aproximadamente -30°C a 30°C. Alternativamente, para conseguir el cambio de fase deseado en el sólido procesado, también puede ser necesario calentar la presuspensión a una temperatura de entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 100°C durante el paso de aportación de energía.

Método B. El Método B se diferencia del Método A en los aspectos indicados a continuación. La primera diferencia es que se añade un agente tensioactivo o una combinación de agentes tensioactivos a la primera solución. Los agentes tensioactivos se pueden seleccionar entre los agentes tensioactivos aniónicos, no iónicos y catiónicos, y modificadores biológicos con actividad superficial arriba indicados.

Ejemplo Comparativo del Método A y el Método B y la Patente US nº 5.780.062. La Patente US nº 5.780.062 proporciona un proceso para preparar partículas pequeñas de un compuesto orgánico disolviendo primero el compuesto en un primer disolvente adecuado miscible con agua. Se prepara una segunda solución disolviendo un polímero y un anfífilo en un disolvente acuoso. Después, la primera solución se añade a la segunda solución para formar un precipitado que consiste en el compuesto orgánico y un complejo polímero-anfífilo. La Patente '062 no da a conocer la utilización del paso de aportación de energía de este proceso en los Métodos A y B. La falta de estabilidad se evidencia típicamente por una rápida formación de agregados y un crecimiento de las partículas. En algunos casos, las partículas amorfas recristalizan en cristales grandes. La aportación de energía a la presuspensión del modo arriba descrito produce típicamente partículas que muestran menores tasas de formación de agregados y crecimiento de partícula y ausencia de recristalización durante el almacenamiento del producto.

Los Métodos A y B se distinguen además del proceso de la Patente '062 por la ausencia de un paso de formación de complejo polímero-anfífilo antes de la precipitación. En el Método A no se puede formar ningún complejo de este tipo, ya que no se añade ningún polímero a la fase diluyente (acuosa). En el método B, el agente tensioactivo, que también puede actuar como anfífilo, o el polímero, se disuelve con el compuesto orgánico en el primer disolvente. Esto impide la formación de complejos anfífilo-polímero antes de la precipitación. En la Patente '062, la precipitación con éxito de partículas pequeñas se basa en la formación de un complejo anfífilo-polímero antes de la precipitación. La Patente '062 indica que el complejo anfífilo-polímero forma agregados en la segunda solución acuosa. La Patente '062 explica que el compuesto orgánico hidrófobo interacciona con el complejo anfífilo-polímero, reduciendo así la solubilidad de estos agregados y provocando la precipitación. En el presente proceso se ha demostrado que la inclusión del agente tensioactivo o el polímero en el primer disolvente (Método B) conduce, tras la adición subsiguiente al segundo disolvente, a la formación de un material particulado más uniforme y fino que el producido mediante el proceso resumido en la Patente '062.

#### 40 Revestimiento de las partículas

Los procesos para revestir las partículas preparadas mediante la presente invención se pueden poner en práctica mediante diversas técnicas conocidas por los especialistas. El revestimiento se puede asociar a la partícula mediante varias asociaciones, incluyendo asociaciones covalentes y/o no covalentes (por ejemplo unión covalente, interacción iónica, interacción electrostática, interacción dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waal's, interacciones hidrófobo/dominio hidrófobo, reticulación y/u otras interacciones).

Por ejemplo, los revestimientos por unión no covalente se pueden preparar mezclando múltiples partículas con una solución que incluye una opsonina tal como inmunoglobulina (IgG) o una proteína de complemento tal como C3b o C5. La solución se puede mezclar bajo condiciones de alta cizalladura utilizando, por ejemplo, un microfluidizador, un homogeneizador de ranura de émbolo, un homogeneizador por flujo en contracorriente o un procesador ultrasónico. Para confirmar que el revestimiento se adsorbe con éxito en las partículas, se puede determinar el potencial eléctrico superficial de éstas midiendo el potencial zeta antes y después del proceso de revestimiento. También se pueden emplear otros métodos conocidos para medir la adsorción de revestimientos, por ejemplo la opsonina se puede modificar con un marcador fluorescente, detectándose la absorción de la opsonina marcada con fluorescencia mediante microscopía de fluorescencia. También se pueden utilizar métodos ELISA u otros sistemas de detección basados en anticuerpos para detectar la opsonina. Ventajosamente, los revestimientos de opsonina pueden ser adsorbidos fácilmente en la superficie de las partículas, es especial en las partículas que incluyen principios activos poco solubles en agua, tal como se explica más arriba.

El revestimiento también se puede asociar de forma covalente al núcleo de la partícula. Los revestimientos unidos de forma covalente se pueden preparar, por ejemplo, mezclando múltiples partículas, incluyendo dichas partículas un grupo funcional reactivo con una solución que incluye una opsonina. Los grupos funcionales reactivos incluyen grupos funcionales electrófilos que pueden reaccionar, por ejemplo, con los aminoácidos de la opsonina que contienen amino, hidroxilo y/o tiol. Grupos funcionales reactivos adecuados incluyen, por ejemplo, aldehídos, ésteres de N-hidroxi-succinimida y maleimidias. Los enlaces covalentes inestables formados mediante las anteriores reacciones se pueden estabilizar mediante otros pasos de reacción. Por ejemplo, la reacción de una amina con un aldehído forma una imina hidrolíticamente inestable que se puede estabilizar por reducción del enlace imina utilizando un agente reductor tal como borohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio.

En otro aspecto, el revestimiento puede incluir una opsonina unida de forma covalente con otra molécula del revestimiento, tal como un polisacárido. Normalmente, la partícula que comprende un principio activo se reviste primero con un polisacárido y el polisacárido se somete después a reacción con la opsonina, por ejemplo utilizando los métodos de unión covalente recién descritos. Pueden utilizarse el polisacárido u otra molécula adecuada conjugada con la opsonina para modificar las propiedades del revestimiento, por ejemplo para mejorar la afinidad de unión del revestimiento al núcleo de la partícula. Polisacáridos adecuados incluyen, de forma no exclusiva, dextranos, glucanos, celulosas, almidones, glicógeno, fructanos, quitinas y heparinas. En general, los polisacáridos tienen un peso molecular entre aproximadamente 5.000 dalton y aproximadamente 250.000 dalton, por ejemplo entre aproximadamente 8.000 dalton y aproximadamente 200.000 dalton y/o entre aproximadamente 10.000 dalton y aproximadamente 150.000 dalton, pero también se pueden utilizar polisacáridos de peso molecular superior o inferior.

El revestimiento también puede incluir un agente tensioactivo individual o una combinación de agentes tensioactivos. El agente tensioactivo se puede seleccionar de entre diversos agentes tensioactivos aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos, no iónicos y modificadores biológicos con actividad superficial. Los agentes tensioactivos adecuados incluyen aquellos agentes tensioactivos indicados más arriba. Ejemplos de agentes tensioactivos incluyen, de forma no exclusiva, poloxámeros, fosfolípidos, fosfolípidos conjugados con polietilenglicol, y polisorbatos. Ejemplos de combinaciones de agentes tensioactivos incluyen, de forma no exclusiva, poloxámeros y fosfolípidos, poloxámeros y fosfolípidos conjugados con polietilenglicol, y poloxámeros y polisorbatos. Alternativamente, el revestimiento puede estar esencialmente libre de tensioactivos (por ejemplo, menos de un 2 por ciento en peso de agente tensioactivo, menos de un 1 por ciento en peso de agente tensioactivo, o menos de un 0,5 por ciento en peso de agente tensioactivo).

#### Absorción celular de partículas revestidas

Una realización de la presente invención se refiere a un método para mejorar la absorción celular de un principio activo, que consiste en poner en contacto múltiples partículas de superficie modificada, comprendiendo dichas partículas un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula. Las células pueden ser células fagocíticas, células débilmente fagocíticas o células no fagocíticas. El núcleo de la partícula comprende un principio activo, el revestimiento comprende una opsonina (por ejemplo un anticuerpo que tiene un isotipo de IgG o una proteína de complemento tal como C3b o C5), y la partícula de superficie modificada con un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm. De este modo se mejora la absorción del principio activo por las células en comparación con la absorción del principio activo cuando se utilizan partículas que no comprenden el revestimiento arriba mencionado.

La absorción por las células permite que el principio activo a suministrar se dirija a tejidos que requieren tratamiento, ya que los diversos tipos de células capaces de una mayor absorción de las partículas revestidas de acuerdo con la invención también se desplazan a tejidos enfermos o inflamados. Por ejemplo, los neutrófilos predominan al principio en infecciones o inflamaciones, seguidos de fagocitos derivados de monocitos que abandonan la vasculatura sanguínea y penetran en el tejido infectado. Los macrófagos fijos (histiocitos) abundan en el hígado, sistema nervioso, pulmones, ganglios linfáticos, médula ósea y otros tejidos diversos. Los tejidos más afectados por patógenos bacterianos, víricos o fúngicos y que están inflamados pueden ser fijados como objetivo para el suministro de células cargadas de fármaco (granulocitos, por ejemplo), que tienen propensión a dirigirse a dichos sitios de inflamación por quimiotaxia. Por consiguiente, favoreciendo la absorción por las células, éstas liberan el agente farmacéutico en la región donde es terapéuticamente más necesario. En consecuencia, las células cargadas con partículas revestidas facilitan el suministro de dicho agente a un tejido diana para el tratamiento de una enfermedad o afección. Estas enfermedades y afecciones incluyen, de forma no exclusiva, enfermedades o afecciones infecciosas, enfermedades o afecciones inflamatorias, enfermedades o afecciones neurodegenerativas y enfermedades o afecciones proliferativas.

Existen numerosos tipos de células fagocíticas capaces de absorber partículas revestidas. Estas células incluyen, de forma no limitativa, macrófagos, monocitos, granulocitos, agranulocitos y neutrófilos. La presente invención también incluye células débilmente fagocíticas y células no fagocíticas. Por consiguiente, otros tipos de células incluyen, de forma no exclusiva, linfocitos T, linfocitos B, células nulas, células asesinas naturales, linfocitos, eritrocitos, células musculares, células de médula ósea, citoblastos, células óseas, células vasculares, células de tejidos de órganos,

células neuronales, basófilos, eosinófilos, células dendríticas y células endoteliales. También se pueden utilizar otras células para suministrar los compuestos farmacéuticamente activos a un sujeto. En la presente invención se puede utilizar cualquier tipo de célula, siempre que ésta sea capaz de absorber la partícula. La absorción de las partículas por las células puede incluir fagocitosis u otros medios de endocitosis, o unión/adsorción de la partícula sobre la superficie de las células. Las partículas asociadas con la superficie celular también pueden ser absorbidas por las células por pinocitosis, que es una invaginación de la membrana celular para formar una cápsula intracelular alrededor de la partícula. En la pinocitosis ("célula que bebe"), la partícula tragada es relativamente pequeña (por ejemplo 20 nm) (Watts y col., Endocytosis: what goes in and how?, Journal of Cell Science, 1992, volumen 103(1), páginas 1-8). La pinocitosis se produce continuamente en casi todas las células eucarióticas.

Tal como se explica aquí, las partículas incluyen ventajosamente un revestimiento que facilita la absorción celular. En particular, el revestimiento puede facilitar la absorción por células tales como monocitos, macrófagos y linfocitos T, que son capaces de desplazarse mediante mecanismos conocidos, como quimiotaxia, a un sitio de inflamación, infección y/o tumor y de este modo suministrar las partículas a un tejido diana particular.

En un aspecto de la invención, el contacto de las células con la partícula de superficie modificada (para formar células cargadas con el principio activo) se lleva a cabo *ex vivo* (es decir, fuera de un individuo mamífero). Alternativa o adicionalmente, el contacto de las células con la partícula de superficie modificada se puede llevar a cabo *in vivo* (es decir, dentro de un individuo mamífero). Durante el paso de contacto se utiliza una cantidad eficaz de partículas de superficie modificada para tratar una enfermedad o afección. Los especialistas entenderán que una cantidad determinada de las partículas puede ser absorbida por un tipo de células que no se desplaza a un tejido diana de interés, o no es liberado por la célula en el tejido diana de interés. Por consiguiente, los especialistas entenderán que la cantidad de partículas administradas se pueden optimizar mediante protocolos rutinarios, siempre que dichas cantidades estén dentro de los protocolos de administración establecidos.

Para la administración *ex vivo*, las células se pueden aislar de un individuo mamífero utilizando un separador celular o dispositivo de aféresis. Por ejemplo, para aislar diversas células se puede utilizar el separador celular CS-3000™ (Fenwal Inc., Lake Zurich, Ill.) o el separador celular ISOLEX™ (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, Ill). Para obtener células útiles en la presente invención se pueden emplear otros métodos conocidos por los especialistas en la técnica del aislamiento *ex vivo*. Estos métodos incluyen, de forma no exclusiva, aféresis de sangre periférica, movilización de células de médula ósea mediante, por ejemplo, G-CSF, M-CSF, o GM-CSF, o extracción directa de células medulares por punción espinal, esternal, lumbar o de la cresta ilíaca. Las células *ex-vivo* se pueden mantener en un medio de cultivo celular u otro sistema aislante conocido por los especialistas en la técnica. Ejemplos de estos medios son: Solución de Alserver, Medio de Ames, Medio Basal de Eagle, medio de cultivo de células de CHO (Ovario de Hámster Chino), Medio de Click, Medio de Eagle Modificado según Dulbecco, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa o sacarosa tamponadas con fosfato, Solución Salina Equilibrada de Earle, Medio de Terapia Genética 3, Solución Salina Equilibrada de Gey, Medio Esencial Mínimo de Glasgow, Soluciones Salinas Equilibradas de Hanks, Medio de Hibridoma, Medio de Dulbecco Modificado según Iscove, Tampón de Krebs-Henseleit con azúcares, Medio de Leibovitz (L-15), Medio M16, Medio de McCoy, MCDB, MDBK (Riñón Bovino de Madin-Darby), MDCK (Riñón Canino de Madin-Darby), Medio 199, NCTC, Medio de Ham (por ejemplo Mezcla Nutriente F-10), Medio de Ham Modificado según Coon, RPMI, y otros tales como los citados en Biochemicals & Reagents for Life Science Research, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Mo., USA). El objetivo del cultivo así descrito puede ser el simple almacenamiento sin pérdida de células o la proliferación o el desarrollo celular mediante la adición apropiada de factores de crecimiento, citoquinas y nutrientes para fomentar el desarrollo celular. Este desarrollo reduciría al mínimo la cantidad de veces que tendría que prepararse un paciente para la toma de muestras celulares.

Una vez aisladas, las células se pueden poner en contacto con las partículas revestidas e incubadas durante un corto período de tiempo para permitir la absorción de las partículas por las células. Las concentraciones de partículas utilizadas en el procedimiento *ex vivo* variarán debido a diversos factores, incluyendo, de forma no exclusiva, el tipo de células utilizadas, la concentración de células, el agente activo empleado, el tamaño de las dispersiones de partículas pequeñas, la enfermedad a tratar, etc. No obstante, en general, los materiales celulares aislados se ponen en contacto con aproximadamente 1 a aproximadamente 300 mg/ml de partículas de la presente invención. Durante el contacto de las partículas con las células, las partículas están en una concentración mayor que la solubilidad de saturación termodinámica, permitiendo así que las partículas permanezcan en forma particulada durante la absorción y el suministro al individuo mamífero. Las células se pueden incubar con las partículas durante hasta 24 horas o más para permitir una absorción suficiente de las partículas de fármaco por las células.

Para llevar a cabo la absorción de partículas de principio activo por células *ex vivo* se puede emplear cualquier método, con la condición de que éste no destruya o inutilice de otro modo las células para su administración a un sujeto. Por ejemplo se puede utilizar un suministro de la partícula específico a un sitio a través de una molécula de biorreconocimiento. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente US nº 2003/0092069, incorporada aquí por referencia, que da a conocer la transferencia de genes en células o tejidos específicos a través de una nanopartícula hueca. Otros métodos de carga de las células *ex vivo* incluyen electroporación, sonoporación y otros medios mecánicos que alteran la membrana celular (por ejemplo sonicación) y permiten la inserción de partículas sólidas en



- las células. Zarnitsyn y col. (Zarnitsyn y col., Physical parameters influencing optimization of ultrasound-mediated DNA transfection, *Ultrasound Med. Biol.*, 2004, volumen 30(4), páginas 527-538) utilizaron ultrasonidos con éxito para alterar transitoriamente membranas celulares y facilitar así la carga de ADN en células viables. Los expertos en la técnica conocen otros procedimientos mecánicos, que se incluyen como parte de esta descripción. También se
- 5 conocen métodos químicos para desestabilizar transitoriamente membranas celulares. Ciertos reactivos de transfección contienen agentes tensioactivos e incluyen 293FECTIN™ Transfection Reagent y LIPOFECTAMINE™, ambos productos de Invitrogen Corporation (Carlsbad, Calif.). Otro ejemplo de agente tensioactivo para transferir ADN a las células es el reactivo SAINT™ de Synvolux Therapeutics B. V. L. J. (Groningen, Holanda), que se basa en un agente tensioactivo de piridinio.
- 10 La siguiente descripción de partículas también es aplicable a todas las realizaciones aquí descritas. El procedimiento de carga celular se puede utilizar en el caso de los fármacos ligeramente solubles siempre que las células puedan absorber las partículas de principio activo revestidas a mayor velocidad que el proceso de disolución competidor. Las partículas deben tener un tamaño apropiado para permitir que las células absorban las partículas revestidas y las suministren al tejido diana antes de la disolución completa de la partícula. Dado que las células que, de
- 15 conocida, se desplazan al tejido diana de interés pueden absorber las partículas, las células liberan el principio activo finalmente en las inmediaciones del tejido diana. Además, la concentración de la composición de principio activo se debe mantener por encima de la solubilidad de saturación de la composición, de modo que la partícula pueda permanecer en estado cristalino durante la absorción.
- 20 La siguiente descripción de partículas también es aplicable a todas las realizaciones aquí descritas. La administración de la partícula de superficie modificada se puede llevar a cabo por diversas técnicas conocidas de administración de partículas. La administración incluye la administración de la partícula de superficie modificada a un individuo mamífero. Métodos adecuados para la administración de la partícula de superficie modificada incluyen, de forma no exclusiva, la administración de la partícula vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraarticular, intratecal, epidural, intracerebral, bucal, rectal, tópica, transdérmica, oral, intranasal, a
- 25 través de las vías pulmonares, intraperitoneal y/o intraoftálmica. El paso de administración puede consistir en una inyección de bolo, infusión intermitente o infusión continua. Los clínicos cualificados pueden determinar la cantidad de partículas de superficie modificada y el método de administración. Diversos factores influirán en la cantidad y el método de administración, incluyendo, de forma no exclusiva, el tipo de células utilizadas (para métodos de administración *ex vivo*), el sexo, peso y edad del individuo a tratar, el tipo y la madurez de la enfermedad o afección a tratar, el principio activo a administrar, etc. En general, el principio activo se puede administrar en dosis entre 1 pg de compuesto/kg de peso corporal y 1.000 mg/kg, entre 0,1 mg/kg y 100 mg/kg, entre 0,1 mg/kg y 50 mg/kg, y entre 1 y 20 mg/kg, administrados en dosis diarias o en dosis equivalentes a intervalos más largos o cortos, por ejemplo cada dos días, dos veces por semana, una vez por semana, o dos o tres veces al día.
- 30 Los presentes métodos permiten tratar diversas enfermedades o afecciones, incluyendo, de forma no exclusiva, enfermedades o afecciones infecciosas, enfermedades o afecciones inflamatorias, enfermedades o afecciones neurodegenerativas y enfermedades o afecciones proliferativas. A este respecto, los presentes métodos pueden aliviar los síntomas de dichas enfermedades o afecciones.
- 35 Tal como se utiliza aquí, el concepto "enfermedades o afecciones infecciosas" se refiere a una enfermedad provocada por microorganismos patógenos, como bacterias, virus, parásitos u hongos. Las enfermedades o afecciones infecciosas en las que se pueden utilizar de forma beneficiosa los métodos dados a conocer incluyen, de forma no exclusiva, infecciones virales (incluyendo infecciones retrovirales), como dengue, infecciones por enervirus, VIH, hepatitis B, hepatitis C y gripe; infecciones fúngicas; infecciones parasitarias, como tripanosomiasis africana y malaria; e infecciones bacterianas, como cólera, meningitis y tuberculosis.
- 40 Tal como se utiliza aquí, el concepto "enfermedad o afección inflamatoria" se refiere a una enfermedad caracterizada por enrojecimiento, calor, hinchamiento y dolor (es decir, inflamación), que típicamente implica lesión o destrucción tisular. Las enfermedades o afecciones inflamatorias están asociadas en particular con la afluencia de leucocitos y/o la quimiotaxia de leucocitos. Las enfermedades inflamatorias pueden ser el resultado de una infección por organismos patógenos o virus y de eventos no infecciosos, incluyendo, de forma no exclusiva, traumatismo o reperusión después de infarto de miocardio o ictus, respuestas inmunológicas a antígenos extraños y respuestas autoinmunes. Por consiguiente, las enfermedades inflamatorias que pueden ser tratadas con los métodos y compuestos de la invención incluyen enfermedades asociadas con reacciones del sistema de defensa específico, enfermedades asociadas con reacciones del sistema de defensa no específico y enfermedades asociadas con la activación celular inflamatoria.
- 45 Tal como se utiliza aquí, el concepto "sistema de defensa específico" se refiere al componente del sistema inmunológico que reacciona a la presencia de antígenos específicos. Ejemplos de enfermedades inflamatorias resultantes de una respuesta del sistema de defensa específico incluyen, de forma no exclusiva, la respuesta clásica a antígenos extraños, enfermedades autoinmunes y respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado mediadas por células B y/o células T (es decir, linfocitos B y/o linfocitos T). Las enfermedades inflamatorias crónicas, el rechazo de tejido sólido y órganos trasplantados, incluyendo, de forma no exclusiva, trasplantes de riñón y médula ósea, y la
- 50
- 55

enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) son otros ejemplos de enfermedades inflamatorias resultantes de una respuesta del sistema de defensa específico.

5 Tal como se utiliza aquí, el concepto "sistema de defensa no específico" se refiere a enfermedades inflamatorias mediadas por leucocitos que no tienen capacidad de memoria inmunológica (por ejemplo granulocitos, incluyendo, de forma no exclusiva, neutrófilos, eosinófilos y basófilos, mastocitos, monocitos, macrófagos). Ejemplos de enfermedades inflamatorias resultantes, al menos en parte, de una reacción del sistema de defensa no específico incluyen, de forma no exclusiva, síndrome de dificultad respiratoria (aguda) del adulto (*adult respiratory distress syndrome* - ARDS), síndromes de lesión orgánica múltiple, daños por reperfusión, glomerulonefritis aguda, artritis reactivas, dermatitis con componente inflamatorio agudo, meningitis purulenta aguda, otras enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central, incluyendo, de forma no exclusiva, ictus, lesión térmica, enfermedad intestinal inflamatoria, síndromes asociados con transfusión de granulocitos y toxicidad inducida por citoquinas.

10 Los métodos terapéuticos de la invención incluyen métodos para mejorar condiciones asociadas a la activación celular inflamatoria. El concepto "actividad celular inflamatoria" se refiere a la inducción mediante un estímulo (incluyendo, de forma no exclusiva, citoquinas, antígenos y auto-anticuerpos) de una respuesta celular proliferativa, la producción de mediadores solubles (incluyendo, de forma no exclusiva, citoquinas, radicales oxígeno, enzimas, prostanoïdes y aminos vasoactivas), o la expresión superficial celular de nuevos mediadores o cantidades mayores de mediadores (incluyendo, de forma no exclusiva, antígenos de histocompatibilidad principales y moléculas de adhesión celular) en células inflamatorias (incluyendo, de forma no exclusiva, monocitos, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, granulocitos (leucocitos polimorfonucleares incluyendo neutrófilos, basófilos y eosinófilos), mastocitos, células dendríticas, células de Langerhans y células endoteliales). Los especialistas en la técnica entenderán que la activación de uno de estos fenotipos o de una combinación de los mismos en dichas células puede contribuir a la iniciación, perpetuación o exacerbación de una enfermedad inflamatoria.

15 Otras enfermedades o afecciones que pueden ser tratadas con éxito incluyen enfermedades o afecciones caracterizadas por inflamación o infección, incluyendo, de forma no exclusiva, artritis reumatoide, enfermedad de Grave, miastenia gravis, tiroiditis, diabetes, enfermedad intestinal inflamatoria, ooforitis autoinmune, lupus eritomatoso sistémico y síndrome de Sjögren.

25 Ejemplos de enfermedades o afecciones neurodegenerativas que pueden ser tratadas con éxito incluyen, de forma no exclusiva, la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, encefalomiéltis, encefalitis (incluyendo encefalitis por VIH), enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (también conocida como enfermedad de Lou Gehrig), demencia frontotemporal, enfermedades priónicas, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y adenoleucodistrofia. Otras enfermedades o afecciones neurodegenerativas que pueden ser tratadas con éxito incluyen la enfermedad de Pick, degeneración lobar frontotemporal, afasia progresiva y demencia semántica. Las enfermedades priónicas, también conocidas como encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET), incluyen la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el síndrome de Gerstmann-Sträussler, el insomnio familiar fatal y el kuru. Las enfermedades o afecciones neurodegenerativas también pueden consistir en la enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten (también conocida como enfermedad de Spielmeier-Vogt-Sjogren-Batten), enfermedad de Canavan, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, demencia asociada a VIH, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, demencia por cuerpos de Lewy, enfermedad de Machado (ataxia espinocerebelar de tipo 3), atrofia multisistémica, neuroborreliosis, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, esclerosis lateral primaria, enfermedad de Refsum, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Schilder, esquizofrenia, ataxia espinocerebelar, atrofia muscular espinal, enfermedad de Steele-Richardson-Olszewski y tabes dorsalis.

30 Las enfermedades o afecciones proliferativas en las que se pueden emplear ventajosamente los métodos dados a conocer incluyen, de forma no exclusiva, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, sarcoma, melanoma, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma y glioblastoma. Las tiroiditis incluyen la tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis subcutánea (también conocida como tiroiditis de Quervain), tiroiditis silente (también conocida como tiroiditis indolora), tiroiditis posparto, tiroiditis inducida por fármacos, tiroiditis inducida por radiación y tiroiditis supurativa aguda.

45 La descripción se puede entender mejor con referencia a los siguientes ejemplos, que no están concebidos para ser limitativos, sino que muestran ejemplos de realizaciones de acuerdo con la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 (Ejemplo de Referencia)

55 **Preparación de partículas de óxido de hierro superparamagnético (OHSP) con revestimiento de IgG**

Se adquirieron peryodato de sodio, cianoborohidruro de sodio, neocuproína, acetato de amonio, ácido ascórbico y permanganato de potasio de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Los fragmentos de IgG F(ab')<sub>2</sub> murina y humana se adquirieron en Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA. La IgG2a de rata anti-MsCD16/CD32 (FcγRIII/FcγRII) (2.4G2), la IgG2a de rata anti-trinitrofenol (TNP) isotipo control, la IgG1 anti-Hu CD16 (FcγRIII) (3G8), la IgG1 anti-Hu CD32 (FcγRII) (3D3) y la IgG1 anti-TNP (107.3) se adquirieron en BD Biosciences, San Jose, CA. La IgG1 anti-Hu CD64 (FcγRI) (10.1) se adquirió en eBioscience, San Diego, CA. El succinidimil éster de ácido carboxílico Alexa Fluor® 488 y la hidroxilamina Alexa Fluor® 488 se adquirieron de Invitrogen. El Ferumóxidos (Feridex IV®, Bayer Healthcare Pharmaceuticals, Wayne, NJ) es una partícula de óxido de hierro superparamagnético (OHSP) con un tamaño hidrodinámico medio de 150 nm y una concentración de hierro de 11,2 mg/ml.

Las nanopartículas (NP) de OHSP se concentraron utilizando una unidad de filtro centrífugo Microcon YM-30 (Millipore, Billerica, MA) y se dializaron contra tampón de acetato (0,1M, pH 5,5) durante una noche a 4°C. El dextrano T-10 que rodea el núcleo de hierro del OHSP se oxidó por reacción con metaperyodato de sodio 10 mM en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. Para eliminar el reactivo en exceso, los OHSP oxidados se dializaron contra una solución tampón de fosfatos (*phosphate-buffered saline* - PBS) durante una noche a 4°C. Después se añadió IgG humana (Baxter Healthcare Corporation, Westlake Village, CA) o IgG murina (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) a la suspensión de NP oxidadas en PBS con cianocarbhidruro de sodio 50 mM en NaOH 1M a concentraciones finales de 2 mg/ml de IgG y 10 mg/ml de OHSP. La incubación se llevó a cabo durante una noche bajo agitación suave a temperatura ambiente y la reacción se extinguió mediante adición de Tris-HCl 50 mM. La IgG libre se separó de las NP utilizando una columna Sepharose CL-4B. La cromatografía en Sepharose CL-4B de las reacciones conjugadas de NP mostró que las NP se eluyeron entre 20 ml y 25 ml y la IgG libre entre 45 ml y 60 ml (FIG. 1).

El tamaño de partícula se midió mediante dispersión dinámica de la luz. La presencia de IgG unida de forma covalente a NP y la cantidad de IgG libre se estimaron utilizando en ensayo de ácido microbicinconírico (BCA) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). El rendimiento de acoplamiento se estimó en aproximadamente un 50%.

En preparaciones paralelas, la hidroxilamina Alexa Fluor® 488 y fragmentos de IgG de ratón y de IgG F(ab')<sub>2</sub> de ratón y humana se sometieron a reacción con OHSP aldehído a temperatura ambiente en tampón PBS para obtener reactivos de control para estudios de bloqueo de Fc y para sintetizar preparaciones de OHSP combinadas de fluorescencia y conjugadas con anticuerpos. Para las nanoformulaciones fluorescentes, se conjugó succinidimil éster de ácido carboxílico Alexa Fluor® 488 con IgG OHSP en tampón de carbonato-bicarbonato durante 2 horas. El colorante libre se separó de los conjugados utilizando columnas PD-10.

La estabilidad del IgG-OHSP se estudió a 4°C en momentos seleccionados durante un período de un mes por mediciones del tamaño e índice de polidispersidad (FIG. 2). Inmediatamente después de la conjugación, los IgG-OHSP tenían un tamaño de 175 nm y un índice de polidispersidad de aproximadamente 0,2. Durante las dos primeras semanas no se observó ningún cambio significativo en el diámetro hidrodinámico y en la distribución de tamaños. Sin embargo, 30 días después de la conjugación, los IgG-OHSP aumentaron hasta 270 nm y el índice de polidispersidad a aproximadamente 0,3, lo que sugería una agregación de NP limitada.

### **Ejemplo 2 (Ejemplo de Referencia)**

#### **Aislamiento y cultivo de monocitos, macrófagos derivados de monocitos (MDM) y macrófagos derivados de médula espinal (MME)**

Los monocitos humanos se obtuvieron por leucoféresis de donantes seronegativos de VIH-1 y hepatitis y se purificaron mediante elutriación centrífuga en contracorriente. Se prepararon citospinas con tinción de Wright y la pureza celular se ensayó mediante inmunomarcación con anti-CD68 (clon KP-1). Para generar macrófagos derivados de monocitos (MDM), se cultivaron monocitos elutriados durante un tiempo de hasta siete días en una concentración de  $2 \cdot 10^6$  células/ml a 37°C en atmósfera humidificada en medio Eagles modificado según Dulbecco (MEMD) complementado con un 10% de suero humano común inactivado por calor, 1% de glutamina, 50 µg/ml de gentamicina, 10 µg/ml de ciprofloxacina y 1.000 U/ml de factor de estimulación de colonia de macrófagos (FECM) humano recombinante, un regalo generoso de Wyeth Inc., Cambridge, MA. Como donantes de macrófagos derivados de médula espinal (MME) se utilizaron ratones BALB/c macho (Charles River Laboratory, Inc., MA) de 4-5 semanas de edad. Se extirpó el fémur, se expulsó la médula espinal y las células se disociaron en suspensiones celulares simples y se cultivaron durante 10 días complementadas con 1.000 unidades/ml de FECM (Wyeth, Inc.). Los MME cultivados demostraron ser un 98% CD11b+ mediante análisis de flujo citométrico utilizando un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences).

### **Ejemplo 3 (Ejemplo de Referencia)**

#### **Absorción de OHSP revestido por monocitos y macrófagos**

Los monocitos o MDM humanos se transfirieron a portaobjetos de cámara Lab-Tek II de 8 pocillos ( $0,5 \cdot 10^6$  células/pocillo). Después se añadieron OHSP en una concentración final de hierro de 0,5 mg/ml y se incubaron

durante 1 hora a 37°C. Después de tres lavados, las células se fijaron con un 4% de paraformaldehído durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para los estudios de bloqueo de Fc se añadió un fragmento de IgG Fc humana o anticuerpos de receptor anti-Fc (clones 3G8, 3D3 y 10.1) (10 µg/ml) a cultivos de MDM, incubados a 37°C durante 20 minutos, seguido por incubación de OHSP, IgG-OHSP o F(ab')<sub>2</sub>-OHSP hasta una concentración final de hierro de 0,5 mg/ml durante 0,5, 1, 2 y 4 horas. Como controles se utilizaron células con medio solo y con control de isotipo anti-TNP, 107.3. En el caso de los MME, el procedimiento fue idéntico al de las células humanas, pero como bloqueadores de Fc se utilizaron un fragmento de IgG Fc de ratón e IgG FcγRIII/FcγRII. Después de 2 lavados con PBS, las células se observaron por microscopía de fluorescencia.

El contenido de hierro se estimó mediante ferrocina (véase más abajo). La presencia de hierro se observó mediante tinción con azul de Prusia con un 5% de ferrocianuro de potasio y un 5% de ácido clorhídrico. Después de tres lavados, las células se sometieron a contratinción con rojo sólido nuclear. Se observó una alta acumulación de hierro con IgG-OHSP, mientras que la absorción de OHSP nativo por monocitos humanos era limitada. La viabilidad de monocitos y MDM se estimó mediante un ensayo vivo/muerto (Axxora, LLC, San Diego, CA). Los monocitos marcados con hierro se incubaron con una mezcla de 0,5 µM de homodímero-1 de etidio con 1 µM de calceína AM a 37°C bajo atmósfera humidificada durante 25 minutos. Las células se lavaron tres veces, se fijaron con un 4% de paraformaldehído durante 30 minutos a temperatura ambiente y se observaron mediante microscopía fluorescente. La acumulación de calceína-AM y la disociación por estearasa citosólica marcan las células vivas de color verde y el homodímero-1 de etidio marca los núcleos de células muertas de color rojo. La viabilidad de monocitos humanos era normalmente mayor del 90%. La viabilidad celular se confirmó mediante exclusión de azul triptán, en la que se incubaron monocitos humanos marcados con hierro con azul triptán durante 15 minutos y se lavaron tres veces. La mayor parte de los monocitos marcados con hierro excluyeron el azul triptán, confirmando la que la internalización de IgG-OHSP no inducía ningún efecto tóxico. Como control se utilizaron células no marcadas y monocitos humanos que fueron destruidos utilizando una solución de metanol al 70%.

Para estudiar la localización de OHSP en monocitos humanos se utilizó microscopía electrónica por transmisión (MET). Para la MET se cultivaron monocitos humanos y MDM sobre cubreobjetos Thermanox revestidos con poli-D-lisina (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY), se incubaron con OHSP durante 1 hora a 37°C y se lavaron tres veces con solución tampón de fosfatos. Se fijaron en 2% glutaraldehído, 2% paraformaldehído, 0,5% acroleína en tampón de fosfatos de Sorensen 0,1M, pH 7,2, y se fijaron posteriormente en 1% tetróxido de osmio en agua durante 30 minutos. Después del lavado, los monocitos humanos se deshidrataron durante 5 minutos en cada paso en una serie graduada de soluciones de etanol y se infiltraron con medio de inserción de araldite pasándolos a través de una serie graduada de soluciones de etanol/araldite. Los cubreobjetos se insertaron con el lado del cultivo boca abajo sobre discos de araldite lisos, se dispusieron en un horno a 65°C durante una noche para la polimerización y se retiraron sumergiéndolos en nitrógeno líquido. Las colonias de monocitos y MDM se recortaron y se montaron *en face* para sección ultrafina. Las secciones se dispusieron sobre rejillas de cobre de 200 mesh y las rejillas se tiñeron con 1% acetato de uranilo y citrato de plomo de Reynold. Las células se examinaron con un Philips LS410 TEM operado a 80 kV. En la periferia nuclear de monocitos humanos se observó una acumulación de cromatina. El IgG-OHSP se absorbió en células dentro de vesículas endocíticas con un tamaño que llega a 0,7-1 µm. La distribución de IgG-OHSP era intracitoplasmática, con localización preferente de NP en pequeñas arrugas de membrana. En las formulaciones de IgG-OHSP se incrementaron tanto la cantidad como el tamaño de las vesículas cargadas con hierro.

El contenido de hierro se estimó utilizando un ensayo de ferrocina colorimétrico. Para este ensayo se cultivaron lotes duplicados de monocitos humanos y MDM en placas de 24 pocillos (1·10<sup>6</sup> células/pocillo). Los OHSP se incubaron en una concentración final de 0,5 mg/ml durante 0,5, 1, 2, 4 y 8 horas, a 4°C y 37°C. Las células marcadas con hierro se lavaron tres veces con PBS y se sometieron a lisis con NaOH 50 mM durante 1 hora a temperatura ambiente sobre un agitador. Se mezclaron partes alícuotas de lisados celulares a volúmenes iguales con ácido clorhídrico 10 mM (HCl) para disolver los OHSP. Se añadió un reactivo de liberación de hierro, una mezcla de HCl 1,4M y 4,5% (p/v) KMnO<sub>4</sub> en agua destilada a los lisados y las mezclas se incubaron durante 2 horas a 60°C. Los reactivos de ensayo de ferrocina se prepararon en agua destilada a partir de ferrocina 6 mM, acetato de amonio 2,5M, ácido ascórbico 1M y neocuproína 6,5 mM predisuelta en metanol. Las muestras se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se leyeron a 540 nm. Se prepararon patrones de hierro bajo las mismas condiciones de reacción utilizando una solución madre de hierro a 0,2 mg/ml (Ricca Chemical Company, Arlington, TX). Los valores de concentración de hierro se normalizaron a concentraciones de proteínas de acuerdo con la determinación mediante el ensayo micro BCA (Pierce Biotechnology).

La unión covalente de IgG humana aceleró la absorción de OHSP de acuerdo con la determinación por ensayos colorimétricos (FIG. 3). Después de 1 hora, el contenido de hierro de las células, ~0,2 µg hierro/µg proteína, alcanzó la mitad el valor máximo. En comparación con el IgG-OHSP, la internalización de OHSP en función del tiempo fue lineal hasta las 8 horas de incubación, pasando de ~0,03 a 0,06 µg hierro/µg de proteína entre 4 y 8 horas. En la mayoría de los casos investigados, el contenido de NP era prácticamente un orden de magnitud superior al de las células tratadas con NP no revestidas.

También se llevaron a cabo mediciones de relajación de  $T_2$  de monocitos humanos marcados con hierro, mediante análisis de IRM de muestras por triplicado en cada momento de análisis. La IRM se utilizó para detectar el marcado de monocitos y asegurar que el procedimiento de acoplamiento no alteraba las propiedades magnéticas de las NP. Se prepararon objetos de prueba de células marcadas con OHSP como 100  $\mu\text{l}$  de  $0,5 \cdot 10^6$  células/ml suspendidos en 100  $\mu\text{l}$  de 2% agarosa en tubos de plástico de 200  $\mu\text{l}$ . De acuerdo con los resultados del ensayo de ferrocina colorimétrica, la absorción de hierro mejoró drásticamente cuando los monocitos humanos se expusieron a IgG-OHSP (FIG. 4). Los niveles máximos de OHSP se alcanzaron después de 4 horas de incubación. A pesar del paso de oxidación se conservaron las propiedades de relajación del IgG-OHSP.

#### Ejemplo 4 (Ejemplo de Referencia)

##### Absorción celular de partículas

Para analizar el efecto del tamaño y el revestimiento de dextrano en la absorción celular, OHSP revestidos con 100 kDa dextrano con tamaños entre 62 y 394 nm se incubaron con monocitos humanos durante 1 hora a 37°C (FIG. 5A). En el caso de las NP más grandes con el mismo peso molecular de dextrano se detectó una mayor absorción de hierro. Los OHSP revestidos con 10 kDa dextrano (Feridex®) se absorbieron en monocitos en un nivel mayor que otras NP revestidas con 100 kDa dextrano. Después de 1 hora de oxidación, el OHSP se conjugó con diferentes concentraciones de IgG (0,5, 1, 2 y 4 mg/ml) y cada complejo de IgG-OHSP conjugado se incubó con monocitos humanos durante 0,5 y 1 hora a 37°C. La absorción celular de IgG-OHSP preparado a diferentes concentraciones de IgG no fue drásticamente diferente después de la incubación con monocitos durante 0,5 y 1 hora (FIG. 5B). Estos resultados sugerían que la superficie celular estaba saturada con OHSP o que la internalización no dependía de la densidad del ligando. La unión no covalente de IgG no indujo ningún incremento de la absorción en estos experimentos específicos (FIG. 5C). No obstante, la barrera estérica generada por el dextrano que rodea el núcleo de hierro de NP podría haber impedido la adsorción de IgG. La absorción de IgG-OHSP se inhibió parcialmente cuando la incubación se llevó a cabo a 4°C (FIG. 5D). A continuación se comparó la absorción de IgG-OHSP por monocitos y MDM y se comprobó que era prácticamente igual en ambos tipos de células (FIG. 5E). Los resultados respaldan la idea de que entre ambos tipos de células estaban operativos unos mecanismos de absorción de hierro similares. Con el fin de estudiar el mecanismo de internalización, un IgG-OHSP y un IgG libre, a una concentración de 1 mg/ml, se cocultivaron con monocitos humanos (FIG. 5F). Después del bloqueo de receptores de Fc de monocitos con IgG libre no se detectó ninguna diferencia significativa. Estos resultados sugerían un mecanismo independiente de los receptores de Fc para la entrada celular de IgG-OHSP. Para comprobar esta posibilidad, se unió seroalbúmina humana (ASH) de forma covalente a OHSP utilizando el procedimiento de oxidación/reducción idéntico al de la conjugación de IgG. De modo similar a la IgG, la ASH aumentó significativamente la absorción de OHSP (FIG. 5G). También se llevaron a cabo estudios de bloqueo con el fin de confirmar la idea de que la absorción de partículas era independiente del receptor de Fc. Un análisis de regresión la absorción de hierro intracelular de IgG-OHSP y F(ab')<sub>2</sub>-OHSP por MDM durante 4 horas de cocultivo no mostró ninguna diferencia en la cinética de absorción ( $P = 0,271$ ), indicando que la presencia de la porción de IgG Fc no proporcionaba ninguna ventaja significativa para la cinética de absorción de IgG-OHSP. Del mismo modo, tampoco había ninguna diferencia perceptible en la cinética de absorción de IgG-OHSP mediante el tratamiento de MDM con fragmentos de Fc humano, anticuerpos de receptor- $\gamma$  anti-Fc (CD16/CD32/CD64) o anticuerpo de control de isotipo en comparación con MDM no tratado ( $P = 0,624$ ). Adicionalmente, los resultados con MDM humanos se validaron en MME de ratón, no observándose ninguna diferencia en la cinética de absorción de IgG-OHSP de ratón por MME tratados con fragmentos de Fc de ratón, receptor- $\gamma$  anti-ratón Fc de rata (CD16/CD32), o anticuerpo de control de isotipo de rata en comparación con MME no tratados ( $P = 0,988$ ). Estos resultados confirmaron la hipótesis de que la internalización de IgG-OHSP no estaba mediada por los receptores de Fc. Aunque la internalización de ASH-OHSP era similar a la de la IgG-OHSP, el contenido de hierro en monocitos humanos era mayor en monocitos incubados con IgG-OHSP que en monocitos incubados con ASH-OHSP. Esto se podía deber al hecho de que la propia ASH modificaba el OHSP. Para analizar esta última posibilidad se llevaron a cabo mediciones de las propiedades físico-químicas de OHSP, incluyendo el potencial zeta y el tamaño, de las nanopartículas en tampón HEPES a pH 7,4. Las modificaciones con ASH del OHSP no influían en su tamaño (FIG. 5H). Además, el potencial zeta de NP no cambió significativamente después de la unión de ligando; por consiguiente, el OHSP siguió con carga negativa.

#### Ejemplo 5 (Ejemplo de Referencia)

##### Formación de imágenes de distribución en el tejido de OHSP e IgG-OHSP en ratones mediante IRM

Para todos los experimentos se utilizaron ratones BALB/c macho (Charles River Laboratory, Inc., Wilmington, MA) de 5-8 semanas de edad. Los animales se alojaron en jaulas de microaislamiento estériles y se mantuvieron de acuerdo con las directrices éticas para el cuidado de animales de laboratorio del University of Nebraska Medical Center y los National Institutes of Health. A los ratones se les inyectó OHSP u IgG-OHSP en dosis de 12,5  $\mu\text{g}/0,2$  ml/ratón o 62,5  $\mu\text{g}/0,2$  ml/ratón vía intravenosa a través de la vena caudal. La dosis recomendada para un humano adulto o adolescente es de 560  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Para los análisis *in vivo* se utilizaron dos grupos de ratones con 3-5 animales por grupo. Antes de la inyección, continuamente durante 4 horas después de la inyección, y de nuevo a las 24 horas, se formaron imágenes de grupos tratados con OHSP e IgG-OHSP. Los ratones recibieron la inyección en un plazo de 24 horas después de la preparación de OHSP conjugado.

La acumulación de partículas de OHSP en el tejido provoca un aumento de la relajación *spin-spin* magnética ( $R_2$ ) del agua tisular, que depende del campo. Las mediciones de la relajación *spin-spin* utilizando dos sistemas 7T IRM (sistemas Bruker 21 cm Biospec/16 cm Pharmascan ejecutando Paravision 4.0) demostraron en objetos de prueba de células marcadas con OHSP que la relajación está relacionada directamente con la densidad celular. Las mediciones de relajación permiten un seguimiento de la absorción celular y han sido utilizadas para seguir la migración de células al hígado, riñón y bazo después de la inyección. Se realizaron exploraciones por IRM de mapeo de  $T_2$  de ciclo de fase CPMG multi-sección de alta resolución de cuerpo de ratón utilizando una bobina de volumen de jaula de pájaros de 25 mm que cubre una región desde el cuello hasta las caderas con parámetros de adquisición de tiempo de eco (TE) = 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ms, tiempo de repetición (TR) = 4650 ms, número de promedios (NA) = 4, campo de visión = 40 x 40 mm con una resolución de 256 x 128 (tamaño vóxel = 156 x 312  $\mu\text{m}$ ), reconstrucción a 256 x 256, 50 secciones contiguas intercaladas de 1 mm de espesor, tiempo de adquisición total = 39 minutos. La intensidad de señal se normalizó a un patrón externo para tener en cuenta la desviación de la señal con el tiempo. La acumulación de OHSP se determinó mediante cambios en  $R_2$  ( $1/T_2$ ) dentro de regiones de interés seleccionadas. Después de la inyección de OHSP o IgG-OHSP se tomaron mapas de  $T_2$  cada 40 minutos durante 4 horas y a las 24 horas. Las intensidades de las regiones de interés en el bazo, hígado y riñón de los números pares de ecos (reenfocados con precisión en trenes de eco de ciclo de fase CPMG) se ajustaron a una caída exponencial con un mínimo para corresponder al nivel de ruido medido en las imágenes. La calidad de los datos se controló mediante la determinación  $T_2$  de patrones externos en cada grupo de imágenes.

Los cambios de relajación ( $R_2 = 1/T_2$ ) se midieron en el bazo (FIG. 6A y 7B), el hígado (FIG. 6C y 6D) y el riñón (FIG. 6E y 6F) después de la inyección de OHSP o IgG-OHSP en la vena caudal del ratón. Las inyecciones de 12,5  $\mu\text{g}$  (FIG. 6A, 6C y 6E) ( $n = 6$ ) y 62,5  $\mu\text{g}$  (FIG. 6B, 6D y 6F) ( $n = 5$ ) muestran una mayor absorción en monocitos circulantes con revestimiento de IgG en la concentración inferior mediante 0,5 horas después de la inyección y en momentos posteriores ( $p < 0,05$ , mediciones ANOVA repetidas bilaterales para el efecto del tiempo y el tipo de OHSP en el bazo y el hígado). En el caso de la dosis superior, 62,5  $\mu\text{g}$ , no se observó en ningún momento ninguna diferencia en la absorción de PHSP en comparación con IgG-OHSP.

#### **Ejemplo 6 (Ejemplo de Referencia) Evaluaciones Histológicas**

Cuatro y 24 horas después de la administración de OHSP o IgG-OHSP se recogieron los bazos e hígados. Inmediatamente después de la IRM se fijaron tejidos por perfusión con un 4% de paraformaldehído, se fijaron posteriormente durante 24 horas, se insertaron en parafina y se cortaron en secciones de 5  $\mu\text{m}$  de espesor para el análisis histológico. Para la tinción con azul de Prusia, las secciones montadas en portaobjetos se desparafinaron, rehidrataron y sometieron a reacción durante 30 minutos en un 2% de ferrocianuro de potasio y un 3,7% de ácido clorhídrico para visualizar las partículas de hierro férrico mediante azul de Prusia. Las secciones teñidas se lavaron y se sometieron a contratinción con rojo sólido nuclear para obtener las distribuciones celulares histológicas. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Optronics (Buffalo Grove, IL) con *software* MagnaFire 2.0 (Goleta, CA) y se procesaron mediante *software* Adobe® Photoshop 7.0. En las imágenes de 0,5 horas y 24 horas se observó una pérdida de señal de la acumulación de OHSP.

Se observó la absorción de OHSP en monocitos de sangre circulante y macrófagos tisulares mediante análisis de especímenes de tejido del bazo y el hígado de animales a los que se les habían inyectado nanoformulaciones de IgG-OHSP hidroxilamina Alexa Fluor® 488 después de los análisis por IRM.

#### **Ejemplo 7 Preparación de partículas de paclitaxel con revestimiento de IgG**

Se prepararon partículas de paclitaxel cristalinas precipitando el fármaco a partir de un disolvente orgánico miscible con agua en una solución acuosa que contiene agentes tensioactivos, seguido por un paso de homogeneización utilizando un homogeneizador de ranura de émbolo. Los agentes tensioactivos, que se utilizaron para evitar la agregación de partículas, se emplearon en diversas combinaciones para generar formulaciones de nanosuspensiones PTX-1, PTX-2 y PTX-3. Todas las nanosuspensiones de paclitaxel se tamponaron a pH 7,8-7,9 utilizando tampón fosfato 10 mM. El tamaño medio de las partículas de paclitaxel estaba en el intervalo de 150-300 nm, medido por dispersión de luz láser (Horiba LA-920, índice de refracción relativa = 116A001I). El potencial zeta de las partículas de paclitaxel se midió utilizando tampón HEPES 10 mM pH 7,4 como diluyente (Malvern Nano ZS). La Tabla 1 muestra los valores de potencial zeta de las suspensiones de paclitaxel antes del revestimiento de IgG.

Tabla 1

Formulación	Componentes	Potencial zeta nanosuspensiones de paclitaxel (PTX), pH 7,4 (mV)
PTX-1	Poloxámero 188 desoxicolato	-30,5
PTX-2	Poloxámero 188 1,2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-[fosforac-(1-glicerol)] (DMPG)	-40,3
PTX-3	Poloxámero 188, 1,2-diestearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina-metoxipolietilenglicol (DSPE-MPEG2000)	-22,7

5 Se prepararon partículas de paclitaxel con un revestimiento de IgG humana incubando nanosuspensiones de paclitaxel con soluciones de IgG en diversas proporciones en peso de IgG:paclitaxel a temperatura ambiente. Las soluciones de IgG se prepararon diluyendo un producto comercial (GAMMAGARD LIQUID 10%, Baxter Healthcare) con un tampón de glicina 0,25M pH 5 hasta unas concentraciones finales de 50, 25, 10, 5 y 2,5 mg/ml de IgG. Para confirmar que los cambios en el potencial zeta observados después de la incubación con IgG se debían a la adsorción de IgG y no a la alta fuerza iónica de la solución tampón de IgG, también se llevaron a cabo incubaciones en el tampón de glicina solo (sin IgG).

10 La adsorción de IgG se investigó midiendo el potencial zeta de las mezclas de IgG-nanosuspensión. Las mediciones se llevaron a cabo a pH 5 y pH 7,4 utilizando tampones de glicina 10 mM y HEPES 10 mM, respectivamente, como diluyentes. Para calcular los potenciales zeta a partir de las movilidades electroforéticas medidas se utilizó el modelo Smoluchowsky.

15 La FIG. 7 muestra los resultados de los experimentos de adsorción de las formulaciones de paclitaxel. Los datos indican que, en las tres formulaciones, la presencia de IgG influye notablemente en el potencial zeta (las líneas sólo son líneas visuales). A pH 5, la IgG tiene una carga positiva neta (punto isoeléctrico = 6,9-7,3) mientras que las partículas de fármaco tienen carga negativa. Las tres suspensiones muestran un potencial zeta cercano a cero medido a pH 7,4, ligeramente por encima del punto isoeléctrico de la IgG. A este pH, el potencial zeta sigue presentando una diferencia significativa con respecto a los valores no revestidos, lo que indica que la IgG sigue adsorbida sobre la superficie.

20 El efecto de la adsorción de IgG en la estabilidad física de la suspensión se determinó mediante observación microscópica con una ampliación 400x. En algunas formulaciones de nanosuspensión, la incubación con IgG condujo a una agregación de las partículas de fármaco. En el caso de estas formulaciones se plantea la hipótesis de que la adsorción de IgG conduce a niveles de carga superficial en las partículas que son insuficientes para producir la estabilización electrostática de la suspensión.

### Ejemplo 8

#### Preparación de partículas de ritonavir con revestimiento de IgG

30 Se prepararon partículas de ritonavir cristalinas mediante homogeneización de los cristales de fármaco en presencia de una solución acuosa que contenía DSPE-MPEG(2000) tamponada a pH 7,7 utilizando tampón fosfato 10 mM. El tamaño de partícula medio era de aproximadamente 0,5 micras, medido por dispersión de luz láser (Horiba LA-920, índice de refracción relativo = 120A010I). El potencial zeta de esta suspensión era de -49,8 mV utilizando tampón HEPES 1 mM, pH 7,4 como diluyente (Malvern Nano ZS, modelo Smoluchowsky).

35 Se prepararon partículas de ritonavir con un revestimiento de IgG humana incubando suspensiones de ritonavir con soluciones de IgG. La relación en peso IgG:ritonavir se varió diluyendo la solución de IgG con tampón de glicina tal como se describe en el Ejemplo 7, o variando la relación en volumen de la suspensión de ritonavir con respecto a la solución de IgG sola (100 mg/ml).

40 Se llevaron a cabo mediciones del potencial zeta a pH 5 y pH 7,4 utilizando tampones de glicina 1 mM y HEPES 1 mM, respectivamente, como diluyentes. Se midió el pH de las muestras diluidas en tampón pH 7,4 para confirmar que la adición de la mezcla de suspensión/IgG no cambia de modo apreciable el pH del tampón. Se comprobó que los datos de potencial zeta resultantes de los dos métodos de revestimiento con IgG concordaban bien (FIG. 8). La agregación de las partículas de ritonavir revestidas con IgG se evaluó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 7. No se observó ninguna agregación mediante análisis microscópico a ninguna de las relaciones en peso IgG:ritonavir.

### Ejemplo 9 (Ejemplo de Referencia)

#### Preparación de partículas de indinavir con revestimiento de IgG

45 Se prepararon partículas de indinavir cristalinas mediante homogeneización de los cristales de fármaco en presencia de una solución acuosa que contenía Poloxámero 188 y 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-metoxi-

polietilenglicol (DSPE-MPEG2000) tamponada a pH 7,8 utilizando tampón HEPES 10 mM. El tamaño de partícula medio era de aproximadamente 0,9 micras, medido por dispersión de luz láser (Horiba LA-920, índice de refracción relativa = 108A000I).

- 5 Se prepararon partículas de indinavir con un revestimiento de IgG humana incubando una suspensión de indinavir con GAMMAGARD LIQUID 10% solo (Baxter Healthcare). El procedimiento incluía la combinación de 0,5 ml de suspensión de indinavir al 2,22% (p/v) (equivalente a 11,1 mg de fármaco) con 0,33 ml de la solución de IgG al 10% para obtener una proporción en peso IgG:indinavir igual a 3:1.

- 10 Paralelamente se prepararon partículas de indinavir con un revestimiento de IgG murina mediante la incubación de una suspensión de indinavir con IgG murina (Sigma). La IgG murina liofilizada (10 mg) se reconstituyó con 1 ml de solución de cloruro de sodio al 0,9%. Después se añadieron 0,15 ml de suspensión de indinavir al vial para obtener una proporción en peso IgG:indinavir igual a 3:1. Un examen microscópico con una ampliación 400x indicaba que las partículas no se agregaban en presencia de la IgG humana ni de la IgG murina.

- 15 El potencial zeta se midió utilizando tampón HEPES 1 mM pH 7,4 como diluyente (Malvern Nano ZS, modelo Smoluchowsky). La Tabla 2 muestra los resultados. La disminución sustancial de la carga superficial negativa en el caso de las suspensiones incubadas con las soluciones de IgG es indicativa de la adsorción de IgG en la superficie de las partículas.

**Tabla 2**

Formulación	Potencial zeta de suspensión de indinavir (IDV), pH 7,4 (mV)
Suspensión IDV	-45,4
Suspensión IDV + IgG humana	-1,78
Suspensión IDV + IgG murina	-6,96

**Ejemplo 10 (Ejemplo de Referencia)**

20 **Preparación de partículas de celecoxib con revestimiento de IgG**

- 25 Se prepararon partículas de celecoxib cristalinas mediante precipitación a partir de disolvente orgánico seguida de homogeneización (CXB-2) o mediante homogeneización directa de los cristales de fármaco (CXB-1, CXB-3). Las partículas se prepararon utilizando soluciones acuosas que contenían agentes tensioactivos tamponados a pH 7,5-7,8 utilizando tampón fosfato 10 mM. Se prepararon partículas de celecoxib con un revestimiento de IgG humana preparado utilizando una solución al 10% de IgG de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 7.

- 30 La Tabla 3 muestra los componentes de formulación, las mediciones del tamaño de partícula medio ponderado en volumen y las mediciones del potencial zeta de las suspensiones de celecoxib. El tamaño de partícula se midió por dispersión de luz láser (Horiba LA-920, índice de refracción relativa = 119A001I). El potencial zeta se midió utilizando tampón HEPES 10 mM (CXB-1, CXB-2) o 1 mM (CXB-3) pH 7,4 como diluyente (Malvern Nano ZS, modelo Smoluchowsky). La disminución de la carga superficial negativa en el caso de las suspensiones incubadas con las soluciones de IgG es indicativa de la adsorción de IgG en la superficie de las partículas.

**Tabla 3**

Formulación	Componentes	Potencial zeta nanosusp. de celecoxib no revestidas, pH 7,4 (mV)	Potencial zeta nanosusp. de celecoxib revestidas con IgG, pH 7,4 (mV)	Tamaño de partícula medio (nm)
CXB-1	Lipoide E80 1,2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-[fosfo- <i>rac</i> -(1-glicerol)] (DMPG)	-69,9	-0,663	1220
CXB-2	Poloxámero 188, 1,2-diestearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-etanolamina-metoxipolietilenglicol (DSPE-MPEG2000)	-21,7	-4,87	315
CXB-3	Poloxámero 188 Polisorbato 80	-20,6	-8,18	988



**Ejemplo 11 (Ejemplo de Referencia)**

**Absorción de partículas de paclitaxel revestidas con IgG**

5 Se prepararon partículas de paclitaxel marcadas de forma fluorescente utilizando 0,5 g de paclitaxel y 400 µg de paclitaxel marcado con verde Oregón (de Invitrogen). Las partículas de paclitaxel marcadas de forma fluorescente (tamaño de partícula aproximadamente 160 nm a 170 nm) se revistieron añadiendo 0,2 ml de una solución intravenosa de inmunoglobulina (IVIG) al 10% a 0,1 ml de una suspensión de paclitaxel. Las partículas de paclitaxel marcadas de forma fluorescente también se revistieron con protamina mediante la adición de 0,8 ml de una solución de 25 mg/ml de protamina a 0,1 ml de una suspensión de paclitaxel.

10 La FIG. 9 y la FIG. 10 muestran la cinética de absorción de las nanosuspensiones de paclitaxel (los resultados se muestran ambos como porcentajes de células positivas en paclitaxel después de la absorción de nanosuspensiones y MFI de partículas asociadas/internalizadas de células). El revestimiento de IgG mejoró la absorción de partículas en comparación con partículas no tratadas.

15 La FIG. 11 muestra la absorción por monocitos de nanosuspensiones de paclitaxel revestidas con IgG después de 1, 2 o 6 días de cultivo. Los resultados indican que cuanto más tiempo se cultivan las células, más sensibles son a la IgG.

## REIVINDICACIONES

1. Suspensión que contiene una partícula de superficie modificada, comprendiendo dicha partícula de superficie modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, siendo adsorbido dicho revestimiento en una superficie del núcleo de la partícula, comprendiendo el núcleo de la partícula un agente terapéutico, comprendiendo el revestimiento una opsonina, teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm, y seleccionándose dicha opsonina entre proteínas o péptidos que se unen a partículas o células de modo que aumenta la susceptibilidad de dichas partículas o células a la fagocitosis, donde el pH de la suspensión es inferior al punto isoeléctrico de la opsonina y donde el agente terapéutico es un compuesto poco soluble en agua con una solubilidad en agua inferior a 10 mg/ml.
2. Suspensión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la opsonina se selecciona de entre el grupo consistente en un anticuerpo que tiene un isotipo de IgG, proteína de complemento C3b y proteína de complemento C5.
3. Suspensión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el revestimiento comprende un agente tensoactivo seleccionado de entre el grupo consistente en agentes tensoactivos aniónicos, agentes tensoactivos catiónicos, agentes tensoactivos zwitteriónicos, agentes tensoactivos no iónicos, modificadores biológicos con actividad superficial y combinaciones de los mismos.
4. Suspensión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el agente terapéutico se selecciona de entre el grupo consistente en analgésicos, anestésicos, analépticos, agentes adrenérgicos, agentes de bloqueo adrenérgico, adrenolíticos, adrenocorticoides, adrenomiméticos, agentes anticolinérgicos, anticolosterinasas, anticonvulsivos, agentes alquilantes, alcaloides, inhibidores alostéricos, esteroides anabólicos, anorexigénicos, antiácidos, antidiarreicos, antidotos, antifolatos, antipiréticos, agentes antirreumáticos, agentes psicoterapéuticos, agentes de bloqueo neural, agentes antiinflamatorios, antihelmínticos, antibióticos, anticoagulantes, antidepresivos, antiepilépticos, antifúngicos, antiinfecciosos, antiparasitarios, antihistaminas, agentes antimuscarínicos, agentes antimicobacterianos, agentes antineoplásicos, agentes antiprotozoicos, antivirales, sedantes ansiolíticos, agentes de bloqueo de beta-adrenoceptores, corticosteroides, antitusivos, dopaminérgicos, hemostáticos, agentes hematológicos, hipnóticos, agentes inmunológicos, muscarínicos, parasimpaticomiméticos, prostaglandinas, inhibidores de proteasa, radiofarmacéuticos, inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa, inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa, sedantes, estimulantes, simpaticomiméticos, vitaminas, xantinas, factores de crecimiento, hormonas, agentes antipriónicos y combinaciones de los mismos.
5. Suspensión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el agente terapéutico comprende un agente biológico seleccionado de entre el grupo consistente en proteínas, polipéptidos, carbohidratos, polinucleótidos, ácidos nucleicos, y complejos, conjugados y combinaciones de los mismos.
6. Suspensión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el agente terapéutico tiene una solubilidad en agua inferior a 1 mg/ml.
7. Composición farmacéutica que comprende una suspensión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
8. Suspensión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el agente terapéutico es un compuesto farmacéutico.
9. Método para aumentar la absorción celular de un principio activo, que comprende:
 

poner en contacto las células con partículas de superficie modificada bajo condiciones suficientes para aumentar la absorción celular de las partículas de superficie modificada, llevándose a cabo dicha puesta en contacto *ex vivo*, comprendiendo dichas partículas de superficie modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, siendo adsorbido dicho revestimiento en una superficie del núcleo de la partícula, comprendiendo el núcleo de la partícula un principio activo e incluyendo el principio activo un compuesto poco soluble en agua que tiene una solubilidad en agua inferior a 10 mg/ml, comprendiendo el revestimiento una opsonina, siendo adsorbido dicho revestimiento en la superficie del núcleo de la partícula mediante la puesta en contacto del núcleo de la partícula con una solución acuosa que comprende opsonina, siendo el pH de la solución inferior al punto isoeléctrico de la opsonina, teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm, y seleccionándose dicha opsonina entre proteínas o péptidos que se unen a partículas o células de modo que aumenta la susceptibilidad de dichas partículas o células a la fagocitosis.

10. Utilización de partículas de superficie modificada en la producción de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o afecciones infecciosas, enfermedades o afecciones inflamatorias, enfermedades o afecciones neurodegenerativas o enfermedades o afecciones proliferativas, comprendiendo dichas partículas de superficie modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, siendo adsorbido dicho revestimiento en una superficie del núcleo de la partícula, comprendiendo el núcleo de la partícula un agente terapéutico e incluyendo el agente terapéutico un compuesto poco soluble en agua con una solubilidad en agua inferior a 10 mg/ml, comprendiendo el revestimiento una opsonina, siendo adsorbido dicho revestimiento en la superficie del núcleo de la partícula mediante la puesta en contacto del núcleo de la partícula con una solución acuosa que comprende la opsonina, siendo el pH de la solución inferior al punto isoeléctrico de la opsonina, teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm, y seleccionándose dicha opsonina entre proteínas o péptidos que se unen a partículas o células de modo que aumenta la susceptibilidad de dichas partículas o células a la fagocitosis.
11. Utilización según la reivindicación 10, caracterizada porque las partículas de superficie modificada son adecuadas para ser administradas vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraarticular, intratecal, epidural, intracerebral, bucal, rectal, tópica, transdérmica, oral, intranasal, a través de las vías pulmonares, intraperitoneal, intraoftálmica o una combinación de éstas.
12. Utilización según las reivindicaciones 10-11, caracterizada porque el medicamento se utiliza para el tratamiento de una enfermedad o afección neurodegenerativa seleccionada de entre el grupo consistente en la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, encefalomiелitis, encefalitis, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal, enfermedades priónicas, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y adenoleucodistrofia.
13. Utilización según las reivindicaciones 10-11, caracterizada porque el medicamento se utiliza para el tratamiento de una enfermedad o afección inflamatoria seleccionada de entre el grupo consistente en artritis reumatoide, enfermedad de Grave, miastenia gravis, tiroiditis, diabetes, enfermedad intestinal inflamatoria, ooforitis autoinmune, lupus eritomatoso sistémico y síndrome de Sjögren.
14. Utilización según las reivindicaciones 10-11, caracterizada porque el medicamento se utiliza para el tratamiento de una enfermedad o afección proliferativa seleccionada de entre el grupo consistente en cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, sarcoma, melanoma, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma y glioblastoma.
15. Utilización según las reivindicaciones 10-14, caracterizada porque el agente terapéutico es un compuesto farmacéutico.
16. Utilización según las reivindicaciones 10-15, caracterizada porque el agente terapéutico tiene una solubilidad en agua inferior a 1 mg/ml.
17. Método para preparar una partícula de superficie modificada que comprende un núcleo de partícula y un revestimiento que incluye una opsonina asociado al núcleo de partícula, siendo adsorbido dicho revestimiento en una superficie del núcleo de la partícula, método que comprende:
- poner en contacto el núcleo de la partícula con una solución acuosa que comprende opsonina, siendo el pH de la solución inferior al punto isoeléctrico de la opsonina, comprendiendo el núcleo de la partícula un agente terapéutico, comprendiendo el agente terapéutico un compuesto poco soluble en agua con una solubilidad en agua inferior a 10 mg/ml, teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm, y seleccionándose dicha opsonina entre proteínas o péptidos que se unen a partículas o células de modo que aumenta la susceptibilidad de dichas partículas o células a la fagocitosis.
18. Método según la reivindicación 17, caracterizado porque el agente terapéutico tiene una solubilidad en agua inferior a 1 mg/ml.

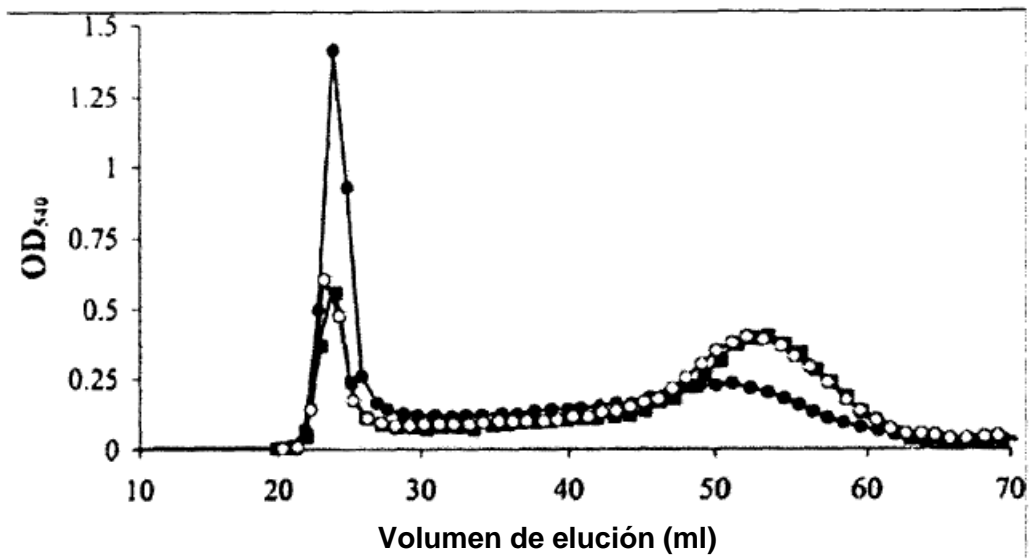


FIG. 1

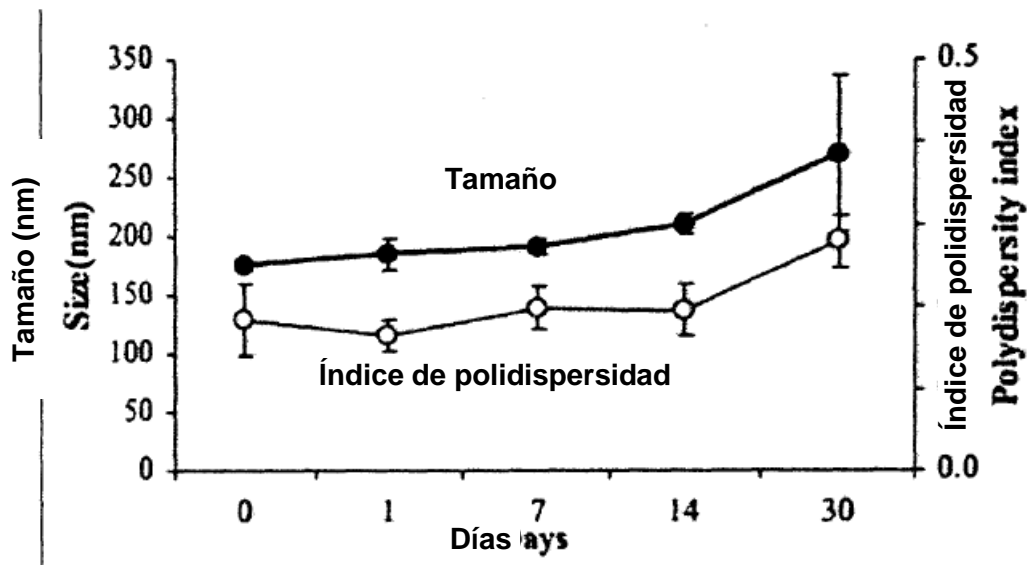


FIG. 2

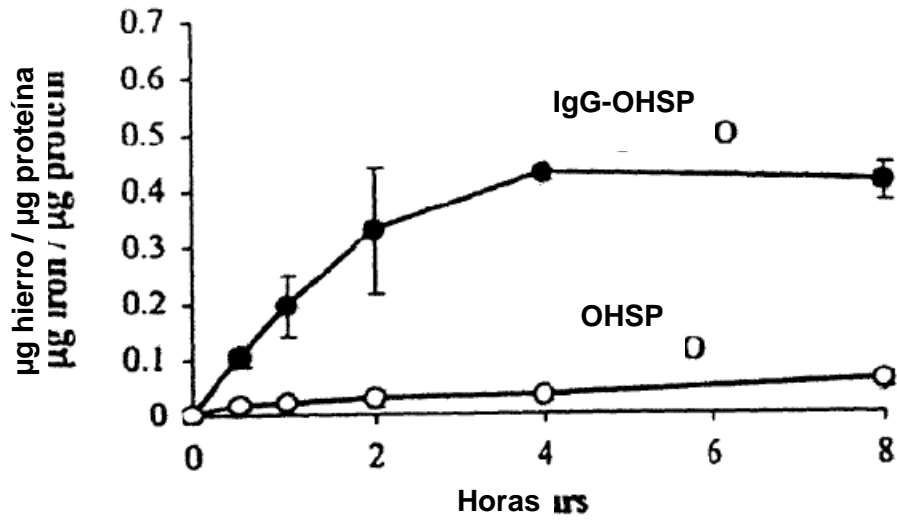


FIG. 3

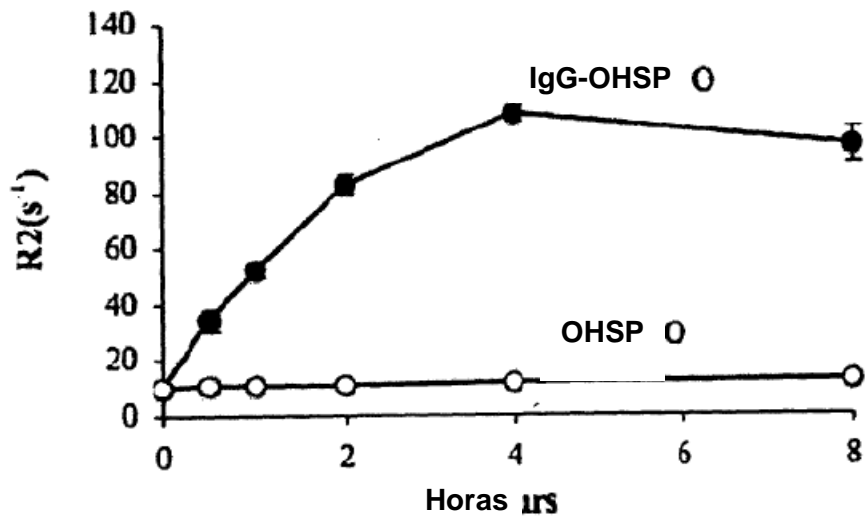


FIG. 4

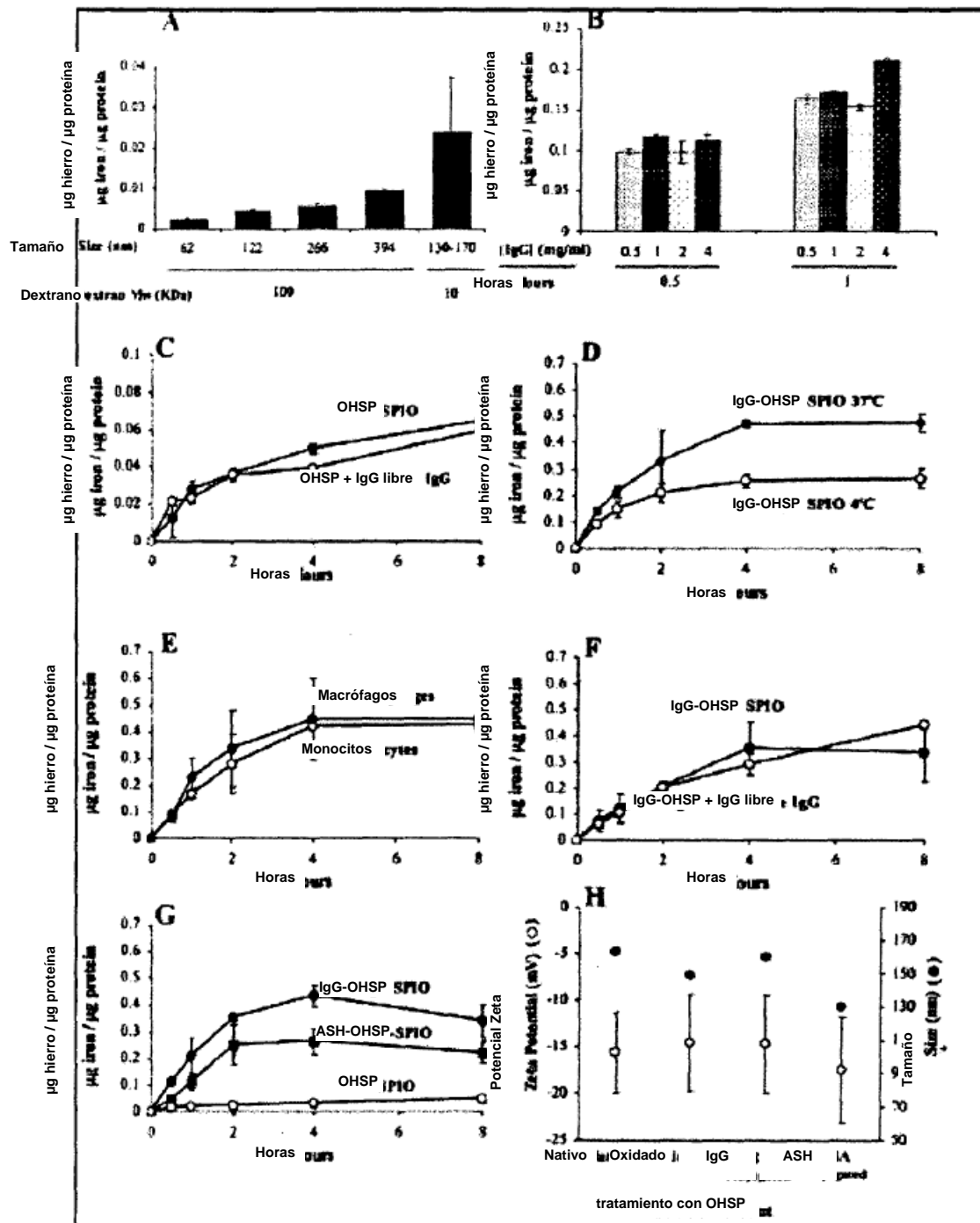


FIG. 5

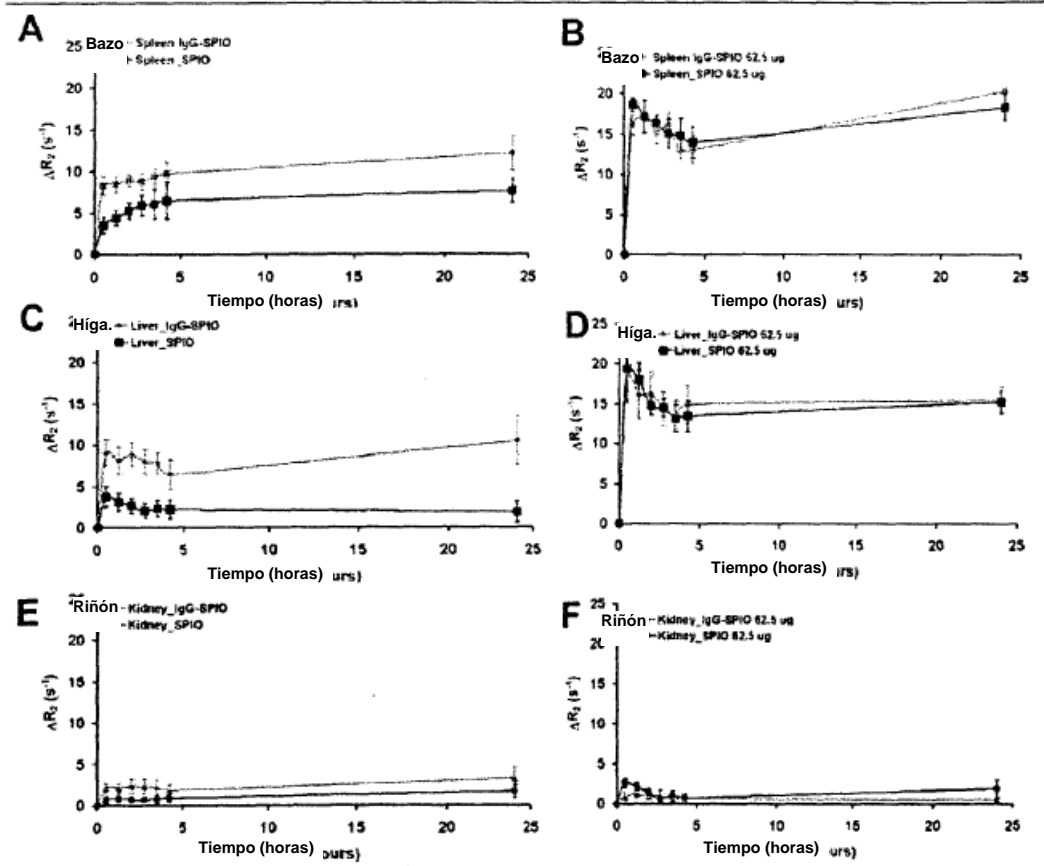


FIG. 6

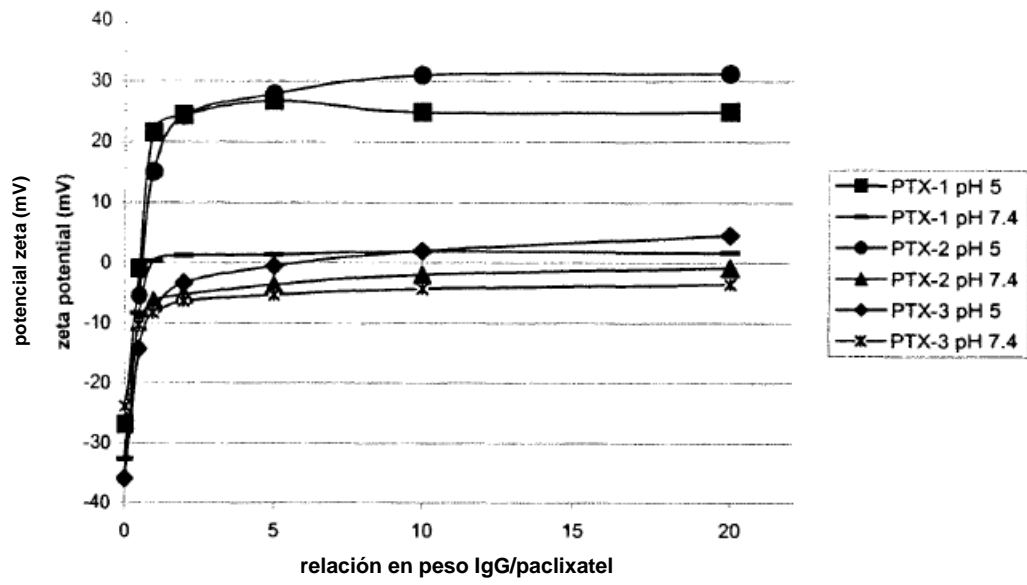


FIG. 7



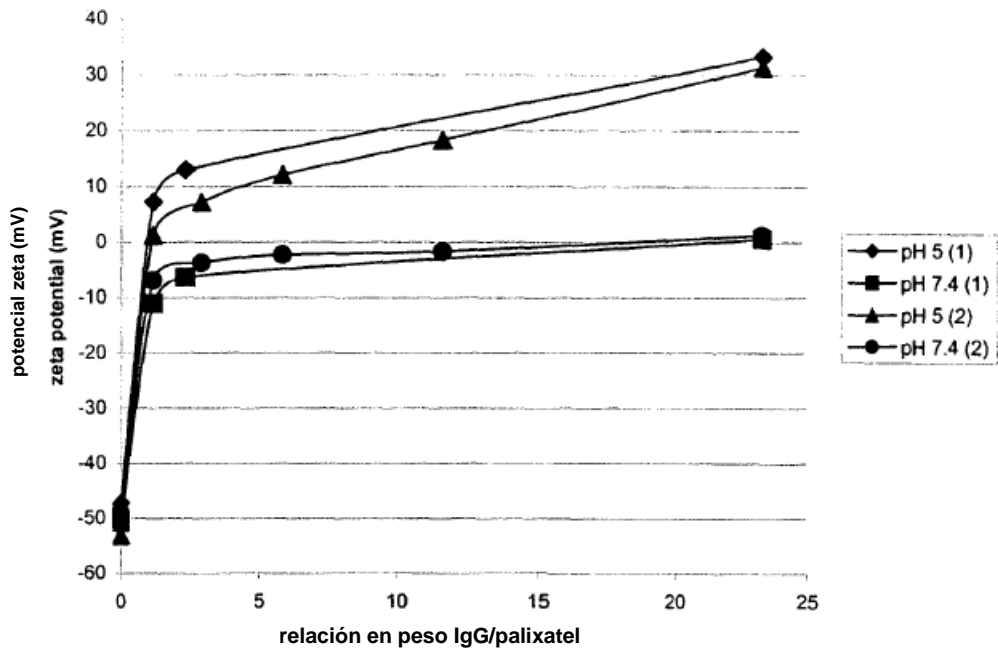


FIG. 8

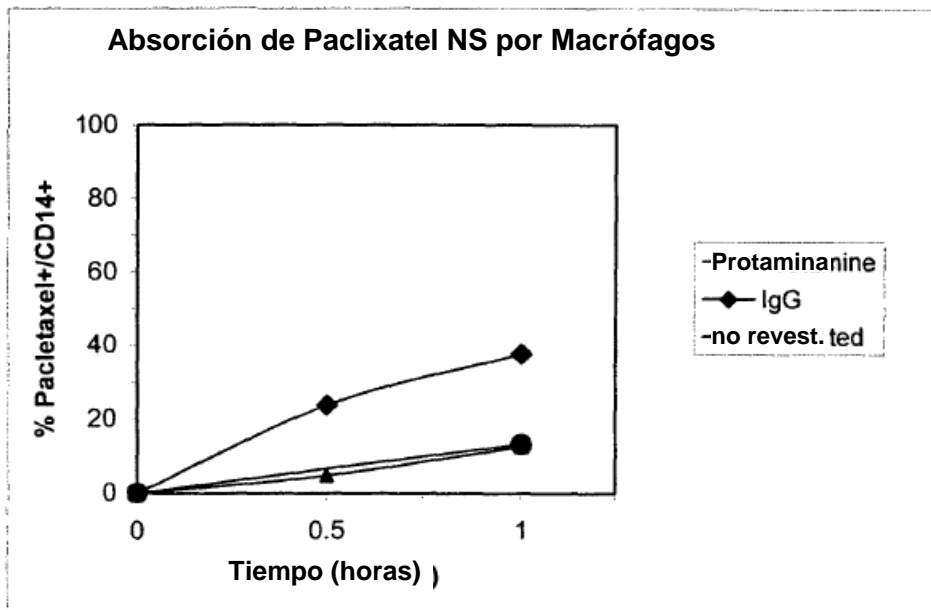


FIG. 9

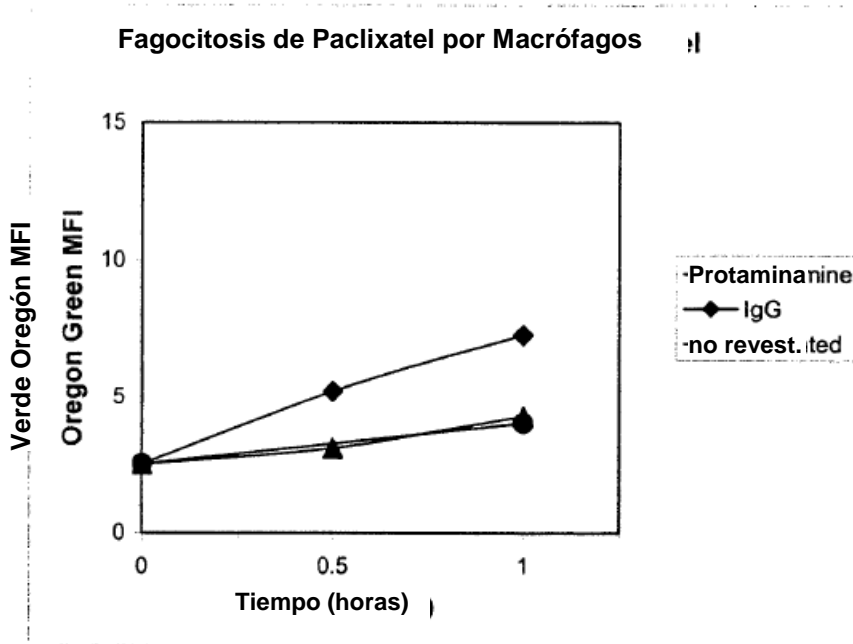


FIG. 10

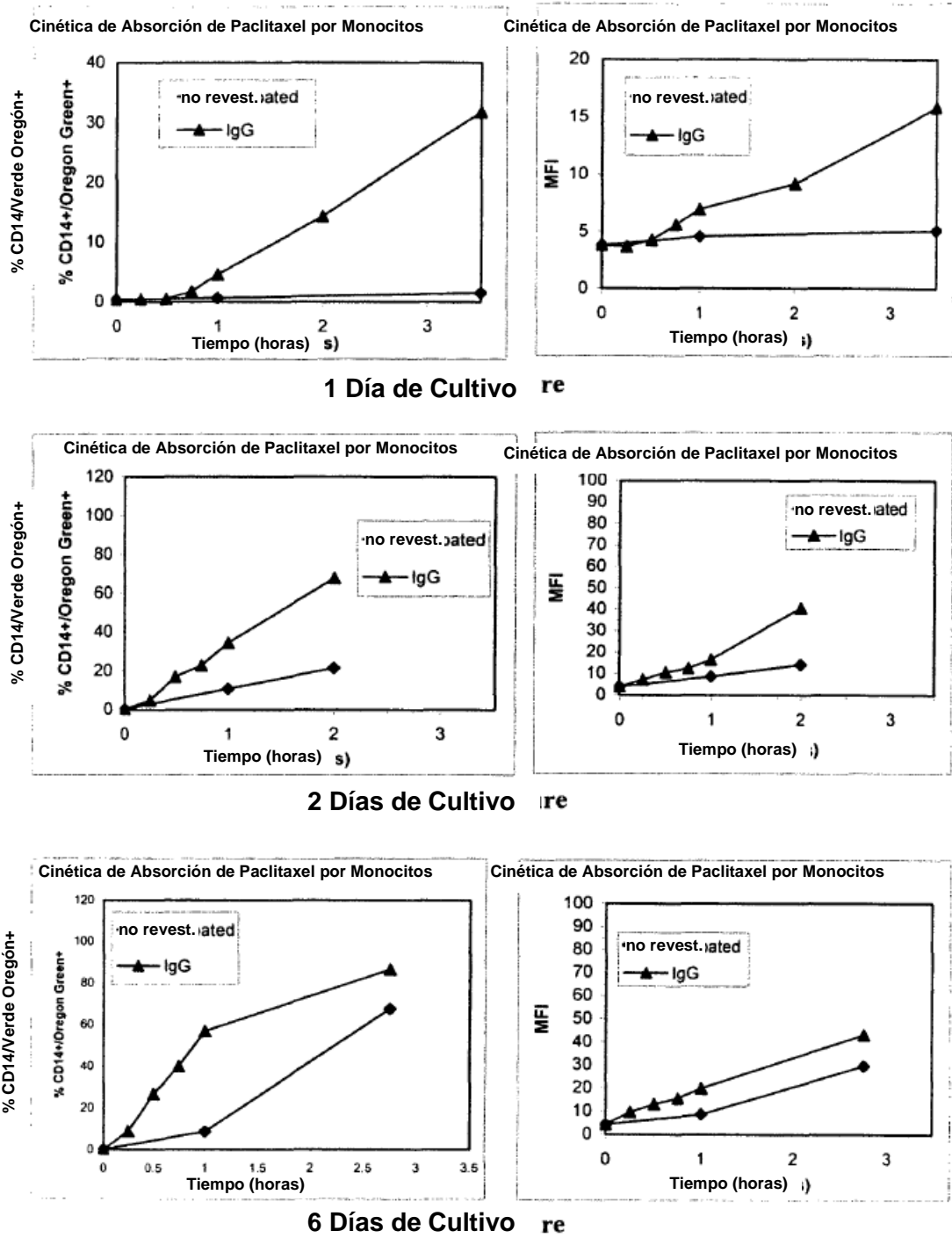


FIG. 11