

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 919**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 9/14</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/538</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/34</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/551</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/337</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/708</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/365</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/415</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/427</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/444</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/496</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/513</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2010 E 10719211 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2429493**

54 Título: **Composiciones y métodos para la administración de medicamentos**

30 Prioridad:

**15.05.2009 US 467230**

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

**20.10.2014**

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC (50.0%)  
One Baxter Parkway  
Deerfield, IL 60015, US y  
BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RABINOW, BARRETT;  
BAIRSTOW, SHAWN F.;  
CHAUBAL, MAHESH V.;  
LEE, SARAH y  
WERLING, JANE**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

**ES 2 509 919 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

Composiciones y métodos para la administración de medicamentos

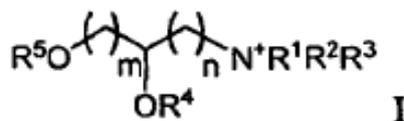
En general, la descripción se refiere a composiciones que comprenden partículas revestidas y a métodos para producir y utilizar dichas composiciones para la administración dirigida de medicamentos.

- 5 Las nanopartículas (incluyendo nanoesferas) y micropartículas (incluyendo microesferas), denominadas aquí colectivamente "partículas", son partículas sólidas o semisólidas con un diámetro entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 10.000 nm (10 micras), preferentemente entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm (2 micras). Estas partículas se pueden formar a partir de diversos materiales, incluyendo proteínas, polímeros sintéticos, polisacáridos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas y combinaciones de los mismos, y han sido  
10 utilizadas en muchas aplicaciones diferentes, principalmente de separación, diagnóstico y administración de medicamentos.

- Se ha comprobado que las composiciones que comprenden este tipo de partículas son útiles para la administración de medicamentos. Por ejemplo, la Publicación de Patente US nº 2006/0073199 demuestra que pueden formularse partículas que comprenden un principio activo como suspensiones acuosas, estando estabilizadas contra la  
15 agregación y el crecimiento de partículas mediante la disposición de revestimientos de agentes tensioactivos sobre o alrededor de las partículas.

Existe una necesidad continua de desarrollar composiciones que comprendan partículas y métodos para producir y utilizar las mismas, en particular para administrar medicamentos de interés.

- Un aspecto de la invención se refiere 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, tal como un agente terapéutico o de diagnóstico (por ejemplo una molécula orgánica pequeña o una biomacromolécula). El revestimiento comprende un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo:  
20



- 25 donde n y m son 1; R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son metilo; y R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo consistente en cis-9-octadecenoilo y cis-9 octadecenilo. Las partículas de superficie modificada de acuerdo con la presente invención tienen un tamaño medio de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm.

- La entrada en contacto con las células de las partículas de superficie modificada de acuerdo con la presente invención permite aumentar la absorción celular de dichas partículas de superficie modificada. Las partículas  
30 comprenden un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, comprendiendo el núcleo de partícula un principio activo, comprendiendo el revestimiento un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm. Estos métodos de puesta en contacto se pueden llevar a cabo *ex vivo* o *in vivo*. Cada uno de los métodos de aumento de la absorción celular de un principio activo se puede llevar a cabo *ex vivo*, es decir, sin tratamiento quirúrgico o terapéutico del cuerpo humano o animal. Alternativamente, los métodos de  
35 aumento de la absorción celular de un principio activo también se pueden llevar a cabo *in vivo*. Las células pueden ser células fagocíticas, tales como macrófagos, monocitos, granulocitos, agranulocitos, neutrófilos, así como combinaciones de los mismos. Además, las células pueden ser células tumorales.

- Otro aspecto de la invención se refiere al uso de múltiples partículas de superficie modificada para la preparación de un medicamento para aumentar la absorción celular de un principio activo, comprendiendo dicha partícula de  
40 superficie modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, comprendiendo el núcleo de partícula un principio activo seleccionado de entre el grupo consistente en moléculas pequeñas, péptidos y proteínas, comprendiendo el revestimiento un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm.

- 45 Pueden emplearse múltiples partículas de superficie modificada de acuerdo con la presente invención para aumentar la absorción celular de un principio activo, comprendiendo dicha partícula de superficie modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, comprendiendo el núcleo de partícula un principio activo seleccionado entre el grupo consistente en moléculas pequeñas, péptidos y proteínas,

comprendiendo el revestimiento un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm.

5 En un método para tratar a un paciente con una enfermedad o afección inflamatoria, que consiste en administrar a dicho paciente múltiples partículas de superficie modificada de acuerdo con la presente invención, 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 un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm, dicha administración es eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a dicha enfermedad o afección inflamatoria.

10 Pueden utilizarse múltiples partículas de superficie modificada de acuerdo con la presente invención para la preparación de un medicamento empleado para tratar una enfermedad o afección inflamatoria, comprendiendo el medicamento una cantidad de partículas de superficie modificada eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a una enfermedad o afección inflamatoria, comprendiendo dicha partícula 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 un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm.

15 Pueden emplearse múltiples partículas de superficie modificada o una composición farmacéutica de las mismas de acuerdo con la presente invención para tratar a un paciente de una enfermedad o afección inflamatoria, comprendiendo dicha partícula 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 un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm.

20 En un método para tratar a un paciente de una enfermedad o afección proliferativa, que consiste en administrar a dicho paciente múltiples partículas de superficie modificada de acuerdo con la presente invención, 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 antiproliferativo tal como un agente antineoplásico), comprendiendo el revestimiento un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm, dicha administración es eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a dicha enfermedad o afección proliferativa.

25 Pueden emplearse múltiples partículas de superficie modificada de acuerdo con la presente invención para la preparación de un medicamento destinado a tratar una enfermedad o afección proliferativa, comprendiendo el medicamento una cantidad de las partículas de superficie modificada eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a una enfermedad o afección proliferativa, comprendiendo dicha partícula 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 antiproliferativo tal como un agente antineoplásico), comprendiendo el revestimiento un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm.

30 Pueden utilizarse múltiples partículas de superficie modificada o una composición farmacéutica de las mismas de acuerdo con la presente invención para tratar a un paciente de una enfermedad o afección proliferativa, comprendiendo dicha partícula 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 antiproliferativo tal como un agente antineoplásico), comprendiendo el revestimiento un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm.

35 En un método para tratar a un paciente de una enfermedad o afección infecciosa, que consiste en administrar a dicho paciente múltiples partículas de superficie modificada de acuerdo con la presente invención, 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 un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm, dicha administración es eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a dicha enfermedad o afección infecciosa.

40 Pueden emplearse múltiples partículas de superficie modificada de acuerdo con la presente invención para la preparación de un medicamento destinado a tratar una enfermedad o afección infecciosa, comprendiendo el medicamento una cantidad de las partículas de superficie modificada eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a una enfermedad o afección infecciosa, comprendiendo dicha partícula 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 un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm.

5 Pueden utilizarse múltiples partículas de superficie modificada o una composición farmacéutica de las mismas de acuerdo con la presente invención para tratar a un paciente de una enfermedad o afección infecciosa, comprendiendo dicha partícula 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 un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm.

10 En un método para tratar a un paciente de una enfermedad o afección neurodegenerativa, que consiste en administrar a dicho paciente múltiples partículas de superficie modificada de acuerdo con la presente invención, 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 un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y  
15 teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm, dicha administración es eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a dicha enfermedad o afección neurodegenerativa.

Se pueden emplear múltiples partículas de superficie modificada de acuerdo con la presente invención para la preparación de un medicamento destinado a tratar una enfermedad o afección neurodegenerativa, comprendiendo  
20 el medicamento una cantidad de las partículas de superficie modificada eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a una enfermedad o afección neurodegenerativa, comprendiendo dicha partícula 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 un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie  
25 modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm.

Se pueden utilizar múltiples partículas de superficie modificada o una composición farmacéutica de las mismas de acuerdo con la presente invención para tratar a un paciente de una enfermedad o afección neurodegenerativa, comprendiendo dicha partícula 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 un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y  
30 teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm.

En un método para tratar a un paciente de una enfermedad o afección infecciosa, una enfermedad o afección inflamatoria, una enfermedad o afección neurodegenerativa o una enfermedad o afección proliferativa, que consiste  
35 en administrar a dicho paciente múltiples partículas de superficie modificada de acuerdo con la presente invención en una cavidad corporal que presenta un sitio de enfermedad o inflamación, 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, comprendiendo el revestimiento un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y  
40 aproximadamente 2.000 nm, dicha administración es eficaz para aliviar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a dicha enfermedad o afección.

Se pueden emplear múltiples partículas de superficie modificada de acuerdo con la presente invención para la preparación de un medicamento destinado a tratar una enfermedad o afección infecciosa, una enfermedad o afección inflamatoria, una enfermedad o afección neurodegenerativa o una enfermedad o afección proliferativa, comprendiendo el medicamento una cantidad de las partículas de superficie modificada eficaz para aliviar, tratar y/o  
45 prevenir síntomas o patologías asociados a dicha enfermedad o afección, comprendiendo dicha partícula de superficie modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, comprendiendo el núcleo de partícula un principio activo, comprendiendo el revestimiento un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y  
50 aproximadamente 2.000 nm.

Se pueden utilizar múltiples partículas de superficie modificada o una composición farmacéutica de las mismas de acuerdo con la presente invención para tratar a un paciente de una enfermedad o afección infecciosa, una enfermedad o afección inflamatoria, una enfermedad o afección neurodegenerativa o una enfermedad o afección proliferativa, comprendiendo dicha partícula de superficie modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, comprendiendo el núcleo de partícula un principio activo, comprendiendo el revestimiento un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y teniendo la partícula de superficie  
55 modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm.

Cada uno de los métodos de tratamiento arriba mencionados se puede llevar a cabo utilizando el transporte celular para suministrar las partículas de superficie modificada a un tejido diana del paciente, o mediante la administración localizada de las partículas de superficie modificada en una cavidad corporal que presenta un sitio de enfermedad (por ejemplo cáncer, infección) y/o inflamación en el paciente, de modo que las células enfermas o inflamatorias localizadas dentro de la cavidad corporal pueden absorber las partículas de superficie modificada.

FIG. 1: gráficos que muestran la absorción de partículas de paclitaxel revestidas con DSPE-mPEG2000/poloxámero 188 y marcadas con Oregon Green (No DOTAP) y de partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP y marcadas con Oregon Green (DOTAP).

FIG. 2: gráficos que muestran la absorción de partículas de paclitaxel revestidas con DSPE-mPEG2000/poloxámero 188 (DSPE-mPEG2000/poloxámero 188), partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP, marcadas con Oregon Green y almacenadas durante 3 meses (DOTAP Muestra 1), partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP recién preparadas y marcadas con Oregon Green (DOTAP Muestra 2) y partículas de paclitaxel revestidas con protamina y marcadas con Oregon Green (Protamina).

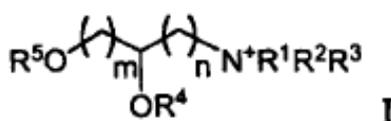
FIG. 3: gráficos que muestran la absorción de partículas de paclitaxel revestidas con DSPE-mPEG2000/poloxámero 188. Las partículas revestidas con Oregon Green contenían DOTAP o no contenían DOTAP (No DOTAP). Las células se cultivaron durante 1, 2 o 6 días antes de exponer las células a las partículas de paclitaxel.

FIG. 4: gráficos que muestran la absorción de partículas de paclitaxel revestidas con DSPE-mPEG2000/poloxámero 188 y marcadas con Oregon Green (DSPE-mPEG2000/poloxámero 188), partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP y marcadas con Oregon Green (DOTAP/DSPE-mPEG2000/poloxámero 188), partículas de paclitaxel revestidas con ácido poliláctico-co-glicólico y marcadas con Oregon Green (PLGA/poloxámero 188) y partículas de paclitaxel revestidas con fosfatidilserina y marcadas con Oregon Green (PS/DSPE-mPEG2000/poloxámero 188).

FIG. 5: gráficos que muestran la absorción de partículas de paclitaxel revestidas con DSPE-mPEG2000/poloxámero 188 y marcadas con Oregon Green (DSPE-mPEG2000/poloxámero 188), partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP y marcadas con Oregon Green (DOTAP/DSPE-mPEG2000/poloxámero 188) y partículas de paclitaxel revestidas con bromuro de cetil-trimetilamonio y marcadas con Oregon Green (CTAB/DSPE-mPEG2000/poloxámero 188).

La invención reivindicada es susceptible de realizaciones de muchas formas diferentes. Las realizaciones preferentes, tal como se dan a conocer aquí, deben considerarse como ejemplos de los principios de la invención reivindicada y, por consiguiente, no se limitan los aspectos generales de la invención reivindicada a las realizaciones ilustradas.

Un aspecto de la invención proporciona 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, típicamente seleccionado de entre el grupo consistente en moléculas pequeñas, péptidos y proteínas, y el revestimiento comprende un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo:



donde n y m son 1; R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son metilo; y R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo consistente en cis-9-octadecenoilo y cis-9 octadecenilo, y la partícula de superficie modificada tiene un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm.

Tal como se utiliza aquí, el término "alquilo" se refiere a grupos hidrocarburo saturados de cadena lineal y ramificados. Ejemplos no limitativos de .estos incluyen metilo, etilo, así como grupos propilo y butilo de cadena lineal o ramificada. Los grupos alquilo pueden estar sustituidos opcionalmente, por ejemplo, con uno o más grupos hidroxilo (-OH), oxo (=O), halo (-F, -Cl, -Br, o -I) y tio (-SH) o combinaciones de los mismos.

Tal como se utiliza aquí, el término "alquenoilo" se refiere a grupos hidrocarburo de cadena lineal y ramificada que contienen al menos un enlace doble carbono-carbono. Ejemplos no limitativos de éstos incluyen grupos hexadecenoilo y octadecenoilo de cadena lineal y ramificada. Los grupos alquenoilo pueden estar sustituidos opcionalmente, por ejemplo, con uno o más grupos hidroxilo (-OH), oxo (=O), halo (-F, -Cl, -Br, o -I) y tio (-SH) o combinaciones de los mismos.

Tal como se utiliza aquí, el término "alquiniilo" se refiere a grupos hidrocarburo de cadena lineal y ramificada que contienen al menos un enlace triple carbono-carbono. Ejemplos no limitativos de éstos incluyen grupos hexadeciniilo y octadeciniilo de cadena lineal y ramificada. Los grupos alquiniilo pueden estar sustituidos opcionalmente, por

ejemplo, con uno o más grupos hidroxilo (-OH), oxo (=O), halo (-F, -Cl, -Br, o -I) y tio (-SH) o combinaciones de los mismos.

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> en la fórmula I son metilo.

5 R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente de entre el grupo consistente en *cis*-9-octadecenoilo y *cis*-9-octadecenoilo.

10 En algunas realizaciones, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son *cis*-9-octadecenoilo, es decir, el agente tensioactivo de fórmula I es N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP) o una sal del mismo (por ejemplo metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio o cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio). En otras realizaciones, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son *cis*-9-octadecenoilo, es decir, el agente tensioactivo de fórmula I es N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) o una sal del mismo (por ejemplo metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio o cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio). En algunas realizaciones, el principio activo es paclitaxel; y R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son *cis*-9-octadecenoilo, es decir, el agente tensioactivo de fórmula I es N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP) o una sal del mismo (por ejemplo metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio o cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio). En otras realizaciones, el principio activo es paclitaxel; y R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son *cis*-9-octadecenoilo, es decir, el agente tensioactivo de fórmula I es N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) o una sal del mismo (por ejemplo metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio o cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio).

20 En métodos para aumentar la absorción de un principio activo por células fagocíticas o no fagocíticas mediante la exposición de las células a una partícula de superficie modificada de acuerdo con la presente invención, que comprende un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, se pueden formar células cargadas con las partículas de superficie modificada. El núcleo de partícula comprende un principio activo típicamente seleccionado de entre el grupo consistente en moléculas pequeñas, péptidos y proteínas, el revestimiento comprende un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo y la partícula de superficie modificada tiene un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm. Se observa un aumento de la absorción del principio activo por las células al menos en comparación con células en contacto con partículas que no tienen un revestimiento que comprende un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo. Estos métodos se pueden llevar a cabo *in vivo* o *ex vivo* para formar células cargadas con las partículas de superficie modificada.

30 En otra realización, la invención proporciona el uso de múltiples partículas de superficie modificada para la preparación de un medicamento para aumentar la absorción celular de un principio activo por células fagocíticas o no fagocíticas.

35 En otra realización más, la invención también proporciona métodos para suministrar un principio activo o una composición farmacéutica que comprende múltiples partículas de superficie modificada a un tejido diana de un individuo mamífero a través de transporte celular utilizando las células arriba mencionadas cargadas con las partículas de superficie modificada. Los métodos eficientes de suministro dirigido de partículas de superficie modificada permiten la administración de concentraciones incrementadas de agente terapéutico a un sitio de enfermedad, tumor o infección con menos efectos sistémicos adversos y menor toxicidad. Se considera que los diversos métodos de administración, como la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, oral y similares, facilitarán un aumento de la absorción de partículas por las células que circulan al sistema linfático, el hígado y otros objetivos tisulares. Por ejemplo, la administración subcutánea está prevista para diversas enfermedades, incluyendo cánceres de cabeza y cuello, que producen una invasión locorregional a lo largo de los vasos linfáticos.

45 Tal como se utiliza aquí, "tejido diana" o "diana tisular" se refiere al tejido particular del paciente a tratar. Ejemplos de estos tejidos diana incluyen, de forma no exclusiva, el cerebro y otras partes del sistema nervioso central, el sistema linfático (por ejemplo, ganglios linfáticos, médula ósea, bazo, timo, etc.), el hígado y cualquier sitio de infección, inflamación o tumor.

50 Además del suministro por transporte celular, el suministro a un tejido diana se puede realizar mediante una administración localizada de las partículas de superficie modificada en una cavidad corporal que tiene un sitio de enfermedad (por ejemplo cáncer, infección) y/o inflamación en el paciente, de modo que las partículas de superficie modificada pueden ser absorbidas por células enfermas o inflamatorias situadas dentro de la cavidad corporal con el fin de suministrar el principio activo muy cerca de la diana tisular enferma. Por ejemplo, los cánceres de la cavidad peritoneal, tales como cáncer de ovario, mesotelioma peritoneal, carcinomatosis peritoneal y similares, pueden ser tratados mediante la administración intraperitoneal de partículas o composiciones farmacéuticas que suministran las partículas en la cavidad peritoneal. Igualmente, los cánceres, infecciones y/o inflamaciones de la vejiga pueden tratarse mediante la administración de las partículas o composiciones farmacéuticas que incluyen las partículas en la cavidad vesical; los cánceres, infecciones y/o inflamaciones pulmonares pueden ser tratados mediante la administración de las partículas en la cavidad pulmonar (por ejemplo por inhalación); los cánceres, infecciones y/o

inflamaciones de la cavidad pleural pueden ser tratados mediante la administración de las partículas en la cavidad pleural; los cánceres, infecciones y/o inflamaciones de la cavidad cardíaca pueden ser tratados mediante la administración de las partículas o composiciones farmacéuticas que incluyen las partículas en la cavidad cardíaca; y los cánceres, infecciones y/o inflamaciones oftálmicos pueden ser tratados mediante la administración de las partículas o composiciones farmacéuticas que incluyen las partículas en el humor acuoso o el humor vítreo del ojo. Además, los cánceres, infecciones y/o inflamaciones gastrointestinales pueden ser tratados mediante la administración de las partículas o composiciones farmacéuticas que incluyen las partículas en el estómago y/o el intestino (por ejemplo, administración vía oral). Ventajosamente, cuando las partículas de superficie modificada o las composiciones farmacéuticas que comprenden las partículas de superficie modificada son administradas cerca y/o junto a un sitio de enfermedad o inflamación mediante una administración en una cavidad corporal que incluye el sitio de enfermedad o inflamación, las partículas de superficie modificada pueden ser absorbidas por las células enfermas (por ejemplo cancerosas, infectadas) o inflamatorias situadas en el sitio de enfermedad o inflamación, de modo que se observa un aumento de la absorción de las partículas de superficie modificada de acuerdo con la invención por las células enfermas o inflamatorias, al menos en comparación con las células en contacto con partículas que no presentan un revestimiento que comprende un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "cavidad corporal" se refiere a un espacio relativamente vacío rodeado por un tejido de soporte o un espacio lleno de fluido rodeado por un tejido de soporte. Tal como se utiliza aquí, el concepto "cavidad corporal" incluye tanto el tejido que rodea (y define) la cavidad como el interior completo de la cavidad. Ejemplos de cavidades corporales incluyen la cavidad peritoneal, la cavidad vesical, la cavidad pulmonar, la cavidad pleural, la cavidad cardíaca, la cavidad gastrointestinal, el humor acuoso del ojo y el humor vítreo del ojo.

En un aspecto, la invención proporciona composiciones y medicamentos para el tratamiento de un paciente de una enfermedad o afección inflamatoria, consistiendo dicho tratamiento 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, normalmente seleccionado entre el grupo consistente en moléculas pequeñas, péptidos y proteínas, comprendiendo el revestimiento un agente tensioactivo de fórmula I, tal como se define aquí, o una sal del mismo, 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 inflamatoria. En un aspecto, el paciente padece una enfermedad o afección inflamatoria y R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son *cis*-9-octadecenoílo. En un aspecto, el principio activo es un agente antiinflamatorio. El suministro del principio activo se puede realizar a través de transporte celular, tal como se describe aquí, o mediante administración local en el sitio de inflamación, tal como se describe aquí.

En otro aspecto, la invención prevé composiciones y medicamentos para el tratamiento de un paciente de una enfermedad o afección neurodegenerativa, consistiendo dicho tratamiento 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, normalmente seleccionado entre el grupo consistente en moléculas pequeñas, péptidos y proteínas, comprendiendo el revestimiento un agente tensioactivo de fórmula I, tal como se define aquí, o una sal del mismo, 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 neurodegenerativa. En un aspecto, el paciente tiene una enfermedad o afección neurodegenerativa y R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son *cis*-9-octadecenoílo. En un aspecto, el principio activo es un agente antineurodegenerativo. El suministro del principio activo se puede realizar a través de transporte celular, tal como se describe aquí.

En un aspecto más, la invención prevé composiciones y medicamentos para el tratamiento de un paciente de una enfermedad o afección proliferativa, consistiendo dicho tratamiento 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, normalmente seleccionado entre el grupo consistente en moléculas pequeñas, péptidos y proteínas, comprendiendo el revestimiento un agente tensioactivo de fórmula I, tal como se define aquí, o una sal del mismo, 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. En un aspecto, el paciente tiene una enfermedad o afección proliferativa y R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son *cis*-9-octadecenoílo. En un aspecto, el principio activo es un agente antiproliferativo, tal como un agente antineoplásico. El suministro del principio activo se puede realizar a través de transporte celular, tal como se describe aquí, o mediante administración local en el sitio de inflamación, tal como se describe aquí.

En otro aspecto, la invención prevé composiciones y medicamentos para el tratamiento de un paciente de una enfermedad o afección infecciosa, consistiendo dicho tratamiento 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,

normalmente seleccionado entre el grupo consistente en moléculas pequeñas, péptidos y proteínas, comprendiendo el revestimiento un agente tensioactivo de fórmula I, tal como se define aquí, o una sal del mismo, 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. En un aspecto, el paciente tiene una enfermedad o afección infecciosa y R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son *cis*-9-octadecenoilo. En un aspecto, el principio activo es un agente antiinfeccioso, tal como un agente antifúngico, antiviral, antibacteriano o antiparasitario. El suministro del principio activo se puede realizar a través de transporte celular, tal como se describe aquí, o mediante administración local en el sitio de inflamación, tal como se describe aquí.

Así, los métodos de administración aquí descritos 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 modificada suficiente para aliviar, mejorar, eliminar, tratar y/o prevenir síntomas o patologías asociados a una enfermedad o afección prevista para el tratamiento de acuerdo con los métodos de tratamiento aquí descritos. La determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz entra dentro de las capacidades del experto en la técnica, en especial teniendo en cuenta la presente descripción.

La siguiente descripción de las partículas de superficie modificada es aplicable a todas las realizaciones dadas a conocer aquí. El principio activo de la partícula de superficie modificada puede ser soluble o poco soluble en agua. El principio activo puede consistir en un agente terapéutico o de diagnóstico. El principio activo puede ser una molécula pequeña o un agente biológico, como una proteína, un péptido, un carbohidrato, o un complejo, conjugado o una combinación de los mismos. En un aspecto preferente, no son principios activos adecuados para ser utilizados con las partículas de superficie modificada de la invención ADN, ARN, oligonucleótidos y polinucleótidos. Los principios activos utilizados de acuerdo con las composiciones y métodos dados a conocer aquí presentan la actividad farmacéutica normalmente asociada a dichos principios activos, independientemente de que los principios activos puedan ser absorbidos y posteriormente suministrados a tejidos diana por células fagocíticas o no fagocíticas. Tal como se describe más arriba, los principios activos también pueden ser administrados localmente en un sitio de enfermedad (por ejemplo cáncer, infección) y/o inflamación de un mamífero y ser absorbido por células enfermas (como células infectadas o cancerosas) o células inflamatorias situadas en el sitio de enfermedad y/o inflamación.

El principio activo se puede seleccionar de entre diversos compuestos farmacéuticos conocidos, tales como, de forma no exclusiva: analgésicos, anestésicos, analépticos, agentes adrenérgicos, agentes de bloqueo adrenérgico, adrenolíticos, adrenocorticoides, adrenomiméticos, agentes anticolinérgicos, anticolinesterinasas, anticonvulsivos, agentes alquilantes, alcaloides, inhibidores alostéricos, esteroides anabólicos, anorexigénicos, antiácidos, antidiarreicos, antidotos, antifolatos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios, agentes psicoterapéuticos, agentes de bloqueo neural, agentes antiinflamatorios, antihelmínticos, anticoagulantes, antidepresivos, antiepilépticos, agentes antifibróticos, agentes antiinfecciosos (por ejemplo antifúngicos, antivirales tales como antirretrovirales como inhibidores de transcriptasa inversa nucleósido, inhibidores de transcriptasa inversa no nucleósido, y antibióticos), antihistaminas, agentes antimuscarínicos, antimicobacterianos, antineoplásicos, agentes antiprotozoicos, sedantes ansiolíticos, agentes de bloqueo de beta-adrenoceptores, corticosteroides, antitusivos, dopaminérgicos, homeostáticos, agentes hematológicos, hipnóticos, agentes inmunológicos, muscarínicos, parasimpaticomiméticos, prostaglandinas, radiofarmacéuticos, sedantes, estimulantes, simpaticomiméticos, vitaminas, xantinas, factores de crecimiento, hormonas, agentes antiprionicos, inhibidores de proteasa y combinaciones de los mismos.

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.

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, atazanavir y combinaciones de los mismos.

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

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

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.

Los agentes de diagnóstico incluyen agentes formadores de imágenes por rayos X y medios de contraste. Ejemplos de agentes formadores de imágenes por rayos X incluyen WIN-8883 (3,5-diacetamido-2,4,6-triyodobenzoato de etilo), también conocido como etil éster de ácido diatrizoico (EEDA), WIN 67722, es decir, (6-etoxi-6-oxohexil-3,5-bis(acetamido)-2,4,6-triyodobenzoato; 2-(3,5-bis(acetamido)-2,4,6-triyodobenzoiloxi)butirato de etilo (WIN 16318); 5 diatrizoixiacetato de etilo (WIN 12901); 2-(3,5-bis(acetamido)-2,4,6-triyodobenzoiloxi)propionato de etilo (WIN 16923); N-etil 2-(3,5-bis(acetamido)-2,4,6-triyodobenzoiloxi) acetamida (WIN 65312); isopropil 2-(3,5-bis(acetamido)-2,4,6-triyodobenzoiloxi) acetamida (WIN 12855); 2-(3,5-bis(acetamido)-2,4,6-triyodobenzoiloxi)malonato de dietilo (WIN 67721); 2-(3,5-bis(acetamido)-2,4,6-triyodobenzoiloxi)fenilacetato de etilo (WIN 67585); ácido propanodioico, [[3,5-bis(acetilamino)-2,4,5-triyodobenzoil]oxi]bis(1-metil)éster (WIN 68165); y ácido benzoico, 3,5-bis(acetilamino)-2,4,6-10 triyodo-4-(etil-3-etoxi-2-butenoato) éster (WIN 68209). Los agentes de contraste incluyen aquellos de los que se espera se desintegren con relativa rapidez bajo condiciones fisiológicas, minimizando así cualquier respuesta inflamatoria asociada con las partículas. La desintegración puede deberse a hidrólisis enzimática, solubilización de ácidos carboxílicos a pH fisiológico, u otros mecanismos. Por consiguiente, también están incluidos ácidos carboxílicos yodados poco solubles, como yodipamida, ácido diatrizoico y ácido metrizoico, junto con especies 15 yodadas hidrolíticamente lábiles, como WIN 67721, WIN 12901, WIN 68165 y WIN 68209.

Otros medios de contraste incluyen, de forma no exclusiva, preparaciones particuladas de ayudas de formación de imágenes por resonancia magnética, tales como quelatos de gadolinio u otros agentes de contraste paramagnéticos. Como ejemplos de compuestos de este tipo se mencionan: gadopentetato dimeglumina (MAGNEVIST®) y gadoteridol (PROHANCE®).

20 En Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 31 Edición, The Pharmaceutical Press, Londres, 1996, se puede encontrar una descripción de tipos de agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos listados están comercialmente disponibles y/o se pueden preparar mediante técnicas conocidas.

En una realización específica, el principio activo es un compuesto poco soluble en agua. El concepto "poco soluble en agua" se refiere a 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 25 preparaciones en suspensión acuosa, dado que existen alternativas limitadas para formular estos compuestos en medios acuosos. Ventajosamente, los agentes tensioactivos de fórmula I, o sales de los mismos, que proporcionan los revestimientos de acuerdo con la invención, se pueden adsorber en la superficie de partículas que comprenden estos principios activos poco solubles en agua formando un revestimiento esencialmente uniforme sobre las mismas. 30 Por ejemplo, las fracciones de cola hidrófobas de los agentes tensioactivos de fórmula I, o sales de los mismos, se pueden asociar con regiones hidrófobas sobre la superficie de la partícula. Además, los agentes tensioactivos de fórmula I o sales de los mismos, están cargados positivamente y, por consiguiente, una fuerte interacción electrostática entre el agente tensioactivo y las regiones cargadas negativamente en la superficie de la partícula puede estabilizar el revestimiento que comprende el agente tensioactivo de fórmula I o la sal del mismo. En un 35 aspecto preferente, el compuesto del principio activo poco soluble en agua es un compuesto orgánico con 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 entre 200 gramos/mol y 900 gramos/mol. Estos compuestos orgánicos se denominan aquí "moléculas pequeñas".

Alternativamente, la invención se puede poner en práctica con compuestos solubles en agua. Para formar 40 suspensiones acuosas de compuestos solubles en agua, éstos pueden estar inmovilizados en una matriz de soporte sólida (por ejemplo 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 poliacrilato. Además, las partículas pequeñas preparadas a partir de estos 45 compuestos solubles en agua se pueden modificar para mejorar la estabilidad química y controlar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos controlando la liberación de los compuestos a partir de las partículas. Ejemplos de compuestos solubles en agua incluyen, de forma no exclusiva, compuestos orgánicos simples, proteínas, péptidos, nucleótidos y carbohidratos.

La siguiente descripción de partículas también es aplicable a todas las realizaciones dadas a conocer aquí. Las 50 partículas pueden ser amorfas, semicristalinas, cristalinas o una combinación de estos tipos de partícula, de acuerdo con la determinación 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 mediante un proceso de homogeneización. Las partículas también se pueden homogeneizar por un proceso de microprecipitación/homogeneización.

Las partículas revestidas tienen un tamaño medio de partícula efectivo de entre aproximadamente 1 nm y 55 aproximadamente 2 µm (o 2.000 nanómetros) según se mide por métodos de dispersión dinámica de la luz (por ejemplo espectroscopia 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 (el 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 60 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 µm, entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 500 nm y/o entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 250 nm.

- 5 En todas las realizaciones, las partículas revestidas son partículas sólidas o semisólidas que incluyen principios activos. En general, las partículas revestidas consisten en al menos en un 5% (p/p) de ingrediente activo, por ejemplo al menos un 10% (p/p), al menos un 25% (p/p), al menos un 50% (p/p) y/o al menos un 75% (p/p) o más de ingrediente activo.

#### Preparación del núcleo de partícula

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

#### I. Técnicas de aportación de energía para formar dispersiones de partículas pequeñas

- 15 En general, el método para preparar dispersiones de partículas pequeñas utilizando técnicas de aportación de energía incluye el paso de añadir el principio activo o el compuesto farmacéuticamente activo, que a veces también se denomina medicamento, a granel, 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 donde el compuesto farmacéutico no es soluble de forma apreciable, formando una primera suspensión, que se denominará 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, con bolas, con martillos, molienda con energía de fluido, con chorro o en húmedo). Estas técnicas se dan a conocer en la Patente US nº 5.145.684.
- 20

- 25 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. Es posible adquirir comercialmente homogeneizadores de ranura de émbolo, por ejemplo bajo las marcas EMULSIFLEX™ (Avestin) y FRENCH® Pressure Cell (Thermo Spectronic). Algunos microfluidizadores adecuados están disponibles en Microfluidics Corp.

- 30 El paso 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. Los dispositivos adecuados incluyen Branson modelo S-450A y Cole-Parmer modelo 500/750 vatios. Estos dispositivos son bien conocidos en la industria. 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 combinación de intervalos dentro de éstos. Los tamaños de las sondas pueden variar y preferentemente tienen diferentes tamaños, como 1/2 pulgada (1,27 cm) o 1/4 pulgada (0,63 cm), o similares.
- 35

- 40 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 proceso de precipitación, antes de formar la dispersión sólida), y mediante aplicación de muy alta presión (superior a 2.000 atmósferas), o mediante una combinación de alta presión y temperatura elevada.

#### II. Métodos de precipitación para preparar dispersiones de partículas con tamaños submicrónicos

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

- 50 Métodos de microprecipitación. En la Patente US nº 5.780.062 se da a conocer un ejemplo de método de microprecipitación. La patente '062 da a conocer un proceso de precipitación de compuestos orgánicos que incluye: (i) disolver el compuesto orgánico en un primer disolvente miscible en agua; (ii) preparar una solución de polímero y un material anfífilico en un segundo disolvente acuoso en el que el compuesto orgánico es esencialmente insoluble, formándose un complejo polímero/material anfífilico; y (iii) mezclar las soluciones de los pasos (i) y (ii) para provocar la precipitación de un agregado del compuesto orgánico y el complejo polímero/material anfífilico.

En las Patentes US nº 6.607.784, 7.037.528, 6.869.617 y 6.884.436 se describen otros procesos de precipitación adecuados. Los procesos descritos incluyen los pasos de: (1) disolver un compuesto orgánico en un primer disolvente orgánico miscible en agua para crear una primera solución; (2) mezclar la primera solución con un

segundo disolvente o con agua para precipitar el compuesto orgánico con el fin de crear una presuspensión; y (3) aportar energía a la presuspensión en forma de una mezcla de alta cizalladura o con calor para obtener una dispersión de partículas pequeñas. Opcionalmente, el primer disolvente orgánico se elimina de la mezcla a través de cualquier medio adecuado, por ejemplo por centrifugación o filtración. Además, la fase continua de la dispersión se puede sustituir opcionalmente por otra fase continua retirando la primera fase continua por 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, a la segunda solución acuosa o a ambas uno o más de los agentes tensioactivos opcionales indicados más abajo.

Métodos de precipitación en emulsión. En la Publicación de Patente US nº 2005/0037083 se da a conocer 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 parte de la fase orgánica con el fin de provocar la precipitación del compuesto en la fase acuosa, generando una dispersión de partículas pequeñas. El paso de preparar un sistema multifase incluye los pasos de: (1) mezclar un disolvente inmisible en 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 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.

En la Patente US nº 6.835.396 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 las partículas pequeñas se pueden reconstituir en un medio acuoso y esterilizar.

El paso de preparar un sistema multifase incluye los pasos de: (1) mezclar un disolvente inmisible en 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.

Precipitación por disolvente-antidisolvente. Las dispersiones de partículas pequeñas también se pueden preparar utilizando una técnica de precipitación por 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. Los dos procesos incluyen los pasos de: (1) preparar una fase líquida de una sustancia biológicamente activa en un disolvente o en 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 aportar energía a la suspensión en forma de mezcla de alta cizalladura o con calor.

Precipitación por inversión de fases. Las dispersiones de partículas pequeñas se pueden formar utilizando la precipitación por inversión de fases dada a conocer en las Patentes US nº 6.235.224, 6.143.211 y 6.616.869. 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 es 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. 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 donde 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 en volumen disolvente:no-disolvente, la concentración

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

Precipitación por cambio de pH. Las dispersiones de partículas pequeñas se pueden formar mediante técnicas de precipitación por cambio de pH. Estas técnicas incluyen habitualmente un paso de disolver un medicamento 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 se describe un proceso adecuado de precipitación por cambio de pH. El proceso incluye el paso de disolver el agente farmacéutico junto con un modificador de crecimiento cristalino (*crystal growth modifier* - CGM) en una solución alcalina y neutralizar después la solución con un ácido en presencia de uno o más agentes tensioactivos modificadores de superficie 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 ajuste de la concentración de la dispersión al nivel deseado.

En las Patentes US nº 5.716.642, 5.662.883, 5.560.932 y 4.608.278 se dan a conocer otros ejemplos de métodos de precipitación por cambio del pH.

Método de precipitación por infusión. En las Patentes US nº 4.997.454 y 4.826.689 se dan a conocer técnicas adecuadas de precipitación por infusión para formar dispersiones de partículas pequeñas. 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 agitar (por ejemplo sacudir) 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.

Precipitación por cambio de temperatura: Las técnicas de precipitación por cambio de temperatura también pueden ser utilizadas para formar dispersiones de partículas pequeñas. Esta técnica se da a conocer en la Patente US nº 5.188.837. 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 mayor que 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.

Precipitación por evaporación de disolvente. En la Patente US nº 4.973.465 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 la precipitación del compuesto. El disolvente también se puede eliminar mediante otras técnicas bien conocidas, como la aplicación de vacío a la solución o purga de nitrógeno por encima de la misma.

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 por modificación en respuesta a la aportación de energía, tal como calor o luz UV o similares, de modo que el compuesto modificado tiene una 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 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 antidisolvente reduciendo 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, como un agente tensioactivo.

Pulverización en fluidos criogénicos. Williams y col., en la Publicación de Patente nº 2004/0022861, dan a conocer 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, generándose partículas congeladas en las que 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 5.981.719, 6.090.925, 6.268.053, 6.458.387 y en la Publicación de Patente US nº 2004/0043077. 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 predeterminado. 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) utilizadas en la presente invención 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 obtener una presuspensión; y
  - 3) aportar energía a la presuspensión en forma de mezclado de alta cizalladura o con 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 paso 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 inferior al de la presuspensión.

En la segunda categoría de procesos, antes del paso de aportación de energía el compuesto orgánico se encuentra en una 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 la agregación o a la formación de 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 una forma cristalina friable y tiene un tamaño de partícula efectivo medio. El término "friable" significa que las partículas son frágiles y se desmenuzan más fácilmente en partículas más pequeñas. Después del paso de aportación de energía, el compuesto orgánico se encuentra en una forma cristalina que tiene un tamaño de partícula efectivo medio menor que 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 el 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 consiste en 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 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 de agente tensioactivo en la interfase 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 combinaciones de agentes tensioactivos, 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 mezcla de disolventes en el que 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 en 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 agua, pero sólo pueden actuar como aceptores de protones porque carecen de grupos donadores de protones efectivos. Una clase de disolventes apróticos 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, mayor de 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 a nitrógeno), éteres, éteres cíclicos, nitrilos, cetonas, sulfonas, sulfóxidos, fosfatos completamente sustituidos, ésteres de 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, tetrahydrofurano (THF), tetrametilensulfona (sulfolano), acetonitrilo, y hexametilfosforamida (HMPA), nitrometano, entre otros, pertenecen a esta clase.

También se pueden elegir disolventes generalmente inmiscibles con agua, pero que tienen suficiente solubilidad en agua en volúmenes pequeños (menos del 10%) para actuar como un primer disolvente miscible con agua en estos volúmenes reducidos. Los ejemplos incluyen hidrocarburos aromáticos, alquenos, alcanos y compuestos aromáticos halogenados, alquenos halogenados y alcanos halogenados. 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 alcanos y alquenos halogenados incluyen, de forma no exclusiva, tricloroetano, cloruro de metileno, dicloruro de etileno (EDC) y similares.

Otros ejemplos específicos de disolventes adecuados para ser utilizados 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 diacilados (como caprilato de glicerilo),

dimetilisorbida, acetona, dimetilsulfona, dimetilformamida, 1,4-dioxano, tetrametilenosulfona (sulfolano), acetonitrilo, nitrometano, tetrametilurea, hexametilfosforamida (HMPA), tetrahidrofurano (THF), dioxano, dietil éter, terc-butil metil éter (TBME), hidrocarburos aromáticos, alcanos, compuestos aromáticos halogenados, alcanos halogenados, 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 metilglucosa éter, PPG-20 metilglucosa éter, PPG-15 estearil éter, dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, laurato de propilenglicol y glicofuroil (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 "medicamento") 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, sulfato de lauril-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 locales dentro de la misma molécula. Agentes tensioactivos zwitteriónicos adecuados incluyen, de forma no exclusiva, fosfolípidos zwitteriónicos. Los fosfolípidos adecuados incluyen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, diacil-glicero-fosfoetanolamina (como dimiristoil-glicero-fosfoetanolamina (DMPE), dipalmitoil-glicero-fosfoetanolamina (DPPE), diestearoil-glicero-fosfoetanolamina (DSPE) y dioleoil-glicero-fosfoetanolamina (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, hidrogenado o parcialmente hidrogenado, o ser natural, semisintético o sintético. El fosfolípido también se puede conjugar con un polímero soluble en agua o hidrófilo para dirigir específicamente el suministro a macrófagos en la presente invención. 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 monometoxi polietilenglicol (mPEG). Los pesos moleculares del PEG pueden variar, por ejemplo entre 200 y 50.000. PEG usados comúnmente 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 pueden 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 por formación de enlaces amida, disulfuro o tioéter, o unión biotina/estreptavidina. Ejemplos de grupos funcionales de unión de ligandos incluyen, de forma no exclusiva, hexanoilamina, dodecanilamina, 1,12-dodecanodicarboxilato, tioetanol, 4-(p-maleimidofenil)butiramida (MPB), 4-(p-maleimidometil)ciclohexanocarboxamida (MCC), 3-(2-piridiltio)propionato (PDP), succinato, glutarato, dodecanoato y biotina.

Agentes tensioactivos catiónicos adecuados incluyen, de forma no exclusiva, compuestos de amonio cuaternarios, como cloruro de benzalconio, bromuro de cetiltrimetilamonio, quitosanos, cloruro de laurildimetilbencilamonio, clorhidratos de acilcarnitina, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), dioleoiltrimetilamonio propano (DOTAP, también conocido como N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio), N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), dimiristoiltrimetilamonio propano (DMTAP), dimetilaminoetanocarboxamida de colesterol (DC-col), 1,2-diacilglicero-3-(O-alquil)fosfolina, O-alquilfosfatidilcolina, haluros de alquilpiridinio, o alquilaminas de cadena larga, por ejemplo n-octilamina y oleilamina. Los agentes tensioactivos de fórmula I, tal como se definen aquí, o sus sales, también son agentes tensioactivos catiónicos adecuados.

Los agentes tensioactivos no iónicos adecuados incluyen: gliceril ésteres, polioxietileno ésteres de alcoholes grasos (MACROGOL™ y BRIJ™), polioxietileno-sorbitano (polisorbatos) ésteres de ácidos grasos, polioxietileno ésteres de ácidos grasos (MYRJ™), ésteres de sorbitano (SPAN™), monoestearato de glicerol, polietilenglicoles, polipropilenglicoles, alcohol cetílico, alcohol cetosteárico, alcohol estearílico, alcoholes de 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, y preferiblemente un copolímero en bloque de propilenglicol y etilenglicol. Estos polímeros se venden bajo el nombre comercial POLOXAMER, también denominado a veces como PLURONIC®, por varios proveedores, incluyendo Spectrum Chemical y Ruger. Entre los polioxietileno ésteres de ácido graso se incluyen aquellos que tienen cadenas alquilo cortas. Un ejemplo de agente tensioactivo de este tipo es SOLUTOL® HS 15, polioxietileno-660-hidroxiestearato, producido por BASF Aktiengesellschaft.

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 polisacáridos, 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.

También puede ser deseable añadir un agente regulador del pH al segundo disolvente. Los agentes de regulación 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 en el intervalo entre aproximadamente 3 y aproximadamente 11. El medio acuoso puede incluir adicionalmente un agente de regulación 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 azúcares tales como manitol, xilitol y sorbitol.

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 de sorbitano, polioxietileno alquil éteres, por ejemplo éteres de macrogol como cetomacrogol 1000, derivados de polioxietileno-aceite de ricino, polioxietileno-sorbitano ésteres de ácidos grasos, por ejemplo los TWEENS™ 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 de superficie son comerciales y/o se pueden preparar mediante técnicas conocidas. También se pueden utilizar combinaciones de dos o más modificadores de superficie.

En una forma preferente, el método para preparar partículas pequeñas de compuesto orgánico incluye los pasos de 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 un paso 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 el 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.

El paso de aportación de energía implica aportar 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, el paso de aportación de energía se lleva a cabo con 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.

Dependiendo de la velocidad de aportación de energía, puede ser deseable ajustar la temperatura de la muestra procesada dentro del intervalo de aproximadamente -30°C a 30°C. Alternativamente, para realizar el cambio de fase deseado en el sólido procesado, también puede ser necesario calentar la presuspensión a una temperatura 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 de entre los grupos de 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 da a conocer 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 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 como grandes cristales. 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 partículas y una 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 un complejo polímero-anfífilo antes de la precipitación. En el Método A no se puede formar un 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 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 exitosa 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 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.

#### Revestimiento de las partículas

Los procesos para revestir las partículas preparadas mediante la presente invención se pueden llevar a cabo mediante diversas técnicas conocidas por los especialistas. El revestimiento se puede asociar con la partícula mediante diversas asociaciones, incluyendo asociaciones covalentes y/o no covalentes (por ejemplo unión covalente, interacciones iónicas, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waal, interacciones dominio hidrófobo/hidrófobo, reticulación y/u otras interacciones).

Los revestimientos por unión no covalente se pueden preparar, por ejemplo, mediante los métodos para preparar núcleos de partícula dados a conocer aquí, siempre que se utilice un agente tensioactivo de acuerdo con la fórmula I, o una sal del mismo, para producir las partículas, o mezclando múltiples partículas previamente producidas con una solución que incluye un agente tensioactivo de fórmula I, tal como se define aquí, o una sal del mismo, para formar las partículas de superficie modificada de acuerdo con la invención. 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 el agente tensioactivo de fórmula I o su sal se pueden modificar con un marcador fluorescente y la absorción del agente tensioactivo de fórmula I o su sal se puede detectar mediante microscopía de fluorescencia. Ventajosamente, los revestimientos que incluyen un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo se pueden asociar con el núcleo de partícula, por ejemplo mediante adsorción en la superficie de las partículas, que es un método eficaz para asociar revestimientos que incluyen agentes tensioactivos de acuerdo con la fórmula I, o una sal de los mismos, con núcleos de partícula, especialmente partículas que incluyen principios activos poco solubles en agua, tal como se explica más arriba.

El revestimiento también puede incluir uno o más agentes tensioactivos adicionales, incluyendo agentes tensioactivos adicionales de fórmula I o sales de los mismos, mediante la adición de los agentes tensioactivos adicionales a la solución que incluye el agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo y mezclando después las partículas previamente producidas con dicha solución. Dicho(s) agente(s) tensioactivo(s) adicional(es) se

puede(n) seleccionar entre una variedad de agentes tensioactivos aniónicos conocidos, agentes tensioactivos catiónicos, agentes tensioactivos zwitteriónicos, agentes tensioactivos no iónicos y modificadores biológicos con actividad superficial. Los agentes tensioactivos adecuados incluyen los 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 adicionales incluyen, de forma no exclusiva, poloxámeros y fosfolípidos, poloxámeros y fosfolípidos conjugados con polietilenglicol, y poloxámeros y polisorbatos.

#### Absorción celular de partículas revestidas

Una realización de la presente invención se refiere al uso de múltiples partículas de superficie modificada en la preparación de un medicamento para un método de aumento de la absorción celular de un principio activo, que consiste en poner en contacto las células con dichas partículas, incluyendo dichas partículas un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de las partículas. Las células pueden ser células fagocíticas, células débilmente fagocíticas o células no fagocíticas. El núcleo de partícula comprende un principio activo que normalmente se selecciona de entre el grupo consistente en moléculas pequeñas, péptidos y proteínas, el revestimiento comprende un agente tensioactivo de fórmula I, tal como se define aquí, o una sal del mismo, y la partícula de superficie modificada tiene un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm. De este modo se aumenta la absorción del principio activo por las células, al menos 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 sea suministrado a tejidos diana que requieren tratamiento, ya que los diversos tipos de células capaces de una mayor absorción de las partículas revestidas de acuerdo con la descripción también se desplazan a tejidos enfermos (por ejemplo cancerosos, infectados) 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 tejidos infectados, y estas células demuestran un aumento de la absorción de las partículas de superficie modificada de acuerdo con la invención al menos en relación con aquellas partículas que no presentan un revestimiento que comprende un agente tensioactivo de acuerdo con la fórmula I o una sal del mismo. Los macrófagos fijos (histiocitos) abundan en el hígado, sistema nervioso, pulmones, ganglios linfáticos, médula ósea y otros tejidos diversos, y estas células también demuestran un aumento de la absorción de las partículas de superficie modificada de acuerdo con la invención, al menos en relación con aquellas partículas que no presentan un revestimiento que comprende un agente tensioactivo de acuerdo con la fórmula I o una sal del mismo. 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 arriba mencionadas, éstas liberan el agente farmacéutico en la región donde es terapéuticamente más necesario. En consecuencia, las células cargadas con partículas revestidas de acuerdo con la invención 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 una mayor absorción de 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 celular. Las partículas asociadas con la superficie celular también pueden ser absorbidas por las células por pinocitosis, que consiste en 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.

Las células enfermas, por ejemplo células cancerosas, también pueden demostrar un aumento de la absorción de las partículas de superficie modificada de acuerdo con la invención al menos en comparación con aquellas células puestas en contacto con partículas que no presentan un revestimiento que comprende un agente tensioactivo de acuerdo con la fórmula I o una sal del mismo. Convencionalmente, las células tumorales no se consideran fagocíticas. No obstante, tal como se describe en el Ejemplo 7, las partículas de superficie modificada fueron absorbidas por células de tumor de ovario dentro de la cavidad peritoneal de ratones. No se conoce el mecanismo exacto del aumento de la absorción, pero éste puede implicar fagocitosis, endocitosis, pinocitosis u otros mecanismos de absorción celular.

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.

5 De acuerdo con la presente 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 de partículas de superficie modificada eficaz para tratar una enfermedad o afección. Los especialistas entenderán que  
10 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.

15 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 de aislamiento *ex vivo*. Estos métodos incluyen, de forma no exclusiva, aféresis de sangre periférica, movilización de células de médula ósea a través de, por ejemplo, G-CSF, M-CSF, o GM-CSF, o extracción directa de células medulares mediante 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,  
20 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 enumerados en Biochemicals & Reagents for Life Science Research, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Mo., EEUU). El objetivo del cultivo así descrito puede ser el simple almacenamiento sin pérdida celular 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.

35 Una vez aisladas, las células se pueden poner en contacto con las partículas revestidas e incubar 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 principio activo empleado, el tamaño de las dispersiones de partículas pequeñas, la enfermedad a tratar, etc. No obstante, por regla 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.

45 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 no útiles para la administración a un sujeto. Por ejemplo, se puede utilizar un suministro de partícula específico a un sitio a través de una molécula de biorreconocimiento. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente US nº 2003/0092069, 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., 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 divulgación. También se conocen métodos químicos para desestabilizar transitoriamente membranas celulares. Algunos 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 utilizado para transferir ADN a células es el reactivo SAINT™ de Synvolux Therapeutics B. V. L. J. (Groningen, Holanda), que se basa en un agente tensioactivo de piridinio.  
60

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 han de 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 forma conocida, se desplazan al tejido diana de interés pueden absorber las partículas, las células liberan finalmente el principio activo o lo suministran de otro modo en las inmediaciones del tejido diana. Además, la concentración de la composición de principio activo se ha de mantener por encima de la solubilidad de saturación de la composición, de modo que la partícula pueda permanecer en estado cristalino durante la absorción.

- 5
- 10 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 mediante diversas técnicas conocidas en el campo de la 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 o de composiciones farmacéuticas de la misma incluyen, de forma no exclusiva, la
- 15 administración de la partícula vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraarticular, intratecal, epidural, intracerebral, bucal, rectal, tópica, transdérmica, oral, intranasal, a través de las vías pulmonares, intraperitoneal y/o intraoftálmica. El paso de administración puede consistir en 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,
- 20
- 25 dos veces por semana, una vez por semana o dos o tres veces al día.

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.

- 30 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 el dengue, infecciones por enterovirus, VIH, hepatitis B, hepatitis C y gripe; infecciones fúngicas; infecciones parasitarias, como la tripanosomiasis africana y la malaria; e infecciones bacterianas, como el cólera, la meningitis y la tuberculosis.
- 35

- 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 de tejidos. 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 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.
- 40
- 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. Los 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 enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) son otros ejemplos de enfermedades inflamatorias resultantes de una respuesta del sistema de defensa específico.
- 50

- 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, el síndrome de dificultad respiratoria (aguda) del adulto (*adult respiratory distress syndrome* - ARDS), síndromes de lesión orgánica múltiple, daños por reperusión, glomerulonefritis aguda, artritis reactivas, dermatitis con componentes inflamatorios agudos, meningitis purulenta aguda, otras enfermedades
- 55
- 60

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.

5 Los métodos terapéuticos que emplean la composición farmacéutica/partícula de superficie modificada de la invención incluyen métodos para mejorar condiciones asociadas con 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 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 10 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.

20 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, encefalomiélitis, 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 25 enfermedades priónicas, también conocidas como encefalopatías espongiformes 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 Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten), enfermedad de Canavan, 30 síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, demencia asociada con el VIH, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Machado-Joseph (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 dorsal.

35 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, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cánceres de la cavidad peritoneal (como el cáncer de ovario, cáncer gastrointestinal, cáncer abdominal y mesotelioma), cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de cerebro (como glioma, meningioma, 40 astrocitoma), cáncer de estómago, cáncer intestinal, 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 sólo exponen ejemplos de realizaciones de acuerdo con la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Preparación de partículas paclitaxel con un revestimiento de DOTAP

50 Se prepararon partículas de paclitaxel utilizando un procedimiento de microprecipitación/homogeneización. Específicamente, el paclitaxel (0,5 g) se disolvió en N-metilpirrolidona (NMP) (3 g) y después se añadió, con mezcla por rotor-estator, a una solución acuosa de agente tensioactivo A (25 ml). La solución A (pH ~ 7,8 a 8,0) contenía fosfato de sodio dibásico anhidro (0,13 g), fosfato de sodio monobásico monohidrato (0,01 g), glicerina (2,2 g), DSPE-mPEG 2000 (0,2 g), y poloxámero 188 (0,5 g) en 100 ml de agua (Tabla 1).

Tabla 1

Componente	% (p/v) Solución A	% (p/v) Solución B
Fosfato de sodio dibásico anhidro	0,127	0,127
Fosfato de sodio monobásico monohidrato	0,0144	0,0144
Glicerina	2,2	2,2
DSPE-mPEG 2000	0,2	0,2
Poloxámero 188	0,5	0,5
DOTAP	0,0	0,1
Agua	QS hasta 100 ml	QS hasta 100 ml

La suspensión resultante se transfirió a un homogeneizador (Avestin C5) y se sometió a circulación a presión estática hasta que la temperatura de la suspensión llegó al menos a 50°C. Después, la suspensión se homogeneizó a una presión de objetivo de 20.000 ± 2.000 psi y una temperatura objetivo de 60°C durante 60 minutos. La suspensión se recogió y centrifugó durante 30 minutos a 10.000 rpm. Una vez completo el ciclo de centrifugación, el sobrenadante se decantó y se substituyó por un volumen igual de una solución acuosa de agente tensioactivo B. La solución B (pH ~ 7,8 a 8,0) contenía el mismo componente que la solución A y adicionalmente contenía metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP, 0,1 g) (Tabla 1). La pella se resuspendió y a centrifugación se repitió otras dos veces, utilizando cada vez la solución B como agente tensioactivo de sustitución. Después de la tercera resuspensión, la nanosuspensión se homogeneizó durante 30 minutos a una presión objetivo de 20.000 ± 2.000 psi y una temperatura objetivo de 60°C. La suspensión final contenía partículas con un tamaño de ~ 160-170 nm.

También se prepararon partículas de paclitaxel marcadas de forma fluorescente de acuerdo con el procedimiento arriba indicado, añadiendo paclitaxel marcado de forma fluorescente al concentrado de fármaco. Específicamente, 400 µg de paclitaxel marcado con Oregon Green (disponible en Invitrogen, Carlsbad, CA) se añadieron al concentrado de fármaco arriba descrito para obtener partículas de paclitaxel marcadas de forma fluorescente con una intensidad de fluorescencia adecuada para su detección en citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

#### **Ejemplo 2: Absorción de partículas de paclitaxel que presentan un revestimiento de DOTAP por células mononucleares humanas**

La absorción de partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP por células mononucleares humanas se comparó con la absorción de partículas de paclitaxel revestidas con protamina y partículas de paclitaxel revestidas con DSPE-mPEG 2000/poloxámero 188. Las partículas de paclitaxel revestidas con protamina se prepararon mediante la adición de 0,08 ml de una solución de 25 mg/ml de protamina a 0,01 ml de una suspensión de paclitaxel marcado con Oregon Green a 10 mg/ml.

Tanto las partículas revestidas con DOTAP como las partículas revestidas con protamina presentan una carga ligeramente positiva bajo las condiciones utilizadas para los experimentos de absorción. Por consiguiente, el experimento comparativo utilizando partículas de paclitaxel revestidas con protamina se diseñó para evaluar si el aumento de la absorción de partículas de paclitaxel podría atribuirse únicamente a la carga positiva de las partículas revestidas.

También se llevaron a cabo mediciones de potencial zeta en las formulaciones de paclitaxel utilizadas en los experimentos de absorción celular mostrados en la FIG. 2 (y la Tabla 2) mediante la adición de 30 µl de suspensión a 10 ml de tampón HEPES 10 mM pH 7,38. Las nanopartículas de paclitaxel revestidas con DOTAP y protamina tienen potenciales zeta ligeramente positivos, mientras que las nanopartículas de paclitaxel revestidas con DSPE-mPEG 2000/poloxámero188 (que carecen de DOTAP o protamina) tienen un potencial zeta negativo bajo las condiciones de ensayo (datos no mostrados).

Se purificaron células mononucleares humanas destinadas a ser utilizadas en los experimentos de absorción a partir de sangre total de donantes humanos. Estas células se cultivaron en placas de 6 pocillos tratadas para cultivo tisular (BD Biosciences) durante 5-7 días en Medio A, cambiándose el medio cada 2-3 días. El Medio A contenía DMEM (Gibco BRL n° cat. 11960-051) suplementado con lo siguiente para completar 1 l: 1000U/ml de factor-1 estimulante de colonias de macrófagos humanos recombinantes (rhM-CSF-1) (Chemicon), 100 ml de suero humano inactivado por calor, 10 ml de L-glutamina 200 mM (Gibco BRL n° cat. 25030-081), 2 ml de 50 mg/ml de gentamicina (Sigma n° cat. G1397), y 400 ml de 25 mg/ml ciprofloxacina (Bayer código n° 89-001-1). Las células también se cultivaron sobre cubreobjetos de vidrio para aplicaciones de microscopía.

Después, los macrófagos derivados de monocitos adherentes se trataron con formulaciones de paclitaxel (partículas de paclitaxel que presentan un revestimiento de DOTAP, partículas de paclitaxel que presentan un revestimiento de protamina, o partículas de paclitaxel que presentan un revestimiento de DSPE-mPEG 2000/poloxámero 188) a 37°C durante diversos períodos de tiempo. Las formulaciones en suspensión contenían paclitaxel (dopado con paclitaxel marcado con Oregon Green) en una concentración final de ~ 10 µM. Después de la incubación, las células se lavaron al menos tres veces con 2 ml/pocillo de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después, las células se recuperaron en PBS y se transfirieron a tubos de microfuga (o fijos y montados si las células se adherían a cubreobjetos).

Para evaluar la absorción de partículas de paclitaxel, las células se tiñeron para expresión de CD14 y se analizaron mediante citometría de flujo. Se establecieron puertas basadas en los gráficos de puntos correspondientes tanto al

control de isotipo (para establecer la puerta de selección de CD14+) como a las células no tratadas (para establecer la puerta de selección de Oregon Green). La absorción de paclitaxel se evaluó tanto en cuanto a la proporción de células CD14+ (macrófagos derivados de monocitos) positivas con respecto a fluorescencia de Oregon Green (% de paclitaxel+/CD14+), es decir, el porcentaje de células que han internalizado o adsorbido partículas de paclitaxel, como en cuanto a la intensidad de fluorescencia media (*Mean Fluorescence Intensity* - MFI). El valor MFI está en correlación directa con la concentración del paclitaxel contenido dentro de la población de células.

Las FIG. 1 y 2 muestran la cinética de absorción de las suspensiones de paclitaxel (los resultados se muestran tanto en forma de porcentaje de células positivas en cuanto al paclitaxel después de la absorción de nanosuspensión como en forma de MFI de partículas asociadas a células/internalizadas). En la FIG. 1, las células habían sido expuestas a las partículas de paclitaxel durante 0, 3, 5 horas, mientras que en la FIG. 2, las células habían sido expuestas a las partículas de paclitaxel durante 0, 0,25, 0,5 y 1 hora. El revestimiento de DOTAP mejoró esencialmente la absorción de partículas de paclitaxel en comparación con las partículas revestidas con DSPE-mPEG 2000/poloxámero 188 (FIG. 1 y 2) y partículas revestidas con protamina (FIG. 2). Estos resultados sugieren que el aumento de la absorción de partículas de paclitaxel no solo es atribuible a la carga positiva de las partículas revestidas.

Además, la FIG. 2 demuestra la estabilidad de las formulaciones de paclitaxel durante el almacenamiento. La Muestra 1 de DOTAP se almacenó durante aproximadamente 3 meses antes de los experimentos de absorción. La Muestra 2 de DOTAP se utilizó en los experimentos de absorción poco después de su preparación. Estos resultados indican que el almacenamiento de partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP durante varios meses no influye de forma significativa en la cinética de absorción de las partículas.

La absorción de partículas de paclitaxel se cuantificó mediante HPLC en fase inversa. La absorción de paclitaxel se midió después de incubar las células con las suspensiones de paclitaxel durante 15, 30 y 60 minutos. Las muestras se prepararon añadiendo acetonitrilo (500 µl) a una parte alícuota de 500 µl de cada suspensión celular y sometiéndolas a vórtice para mezclarlas. Después, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30 minutos a 25°C y los sobrenadantes se analizaron mediante HPLC en fase inversa para determinar la cantidad de paclitaxel en la muestra (Tabla 2).

**Tabla 2 - Niveles de paclitaxel en extractos celulares (mg/ml)**

	15 minutos	30 minutos	60 minutos
<b>Sin tratar</b>	---	---	0,00030
<b>Muestra 1 de DOTAP</b>	0,00083	0,00126	0,00177
<b>Muestra 2 de DOTAP</b>	---	0,00148	0,00203
<b>Protamina</b>	---	0,00046	0,00082
<b>DSPE-mPEG 2000/poloxámero 188</b>	---	---	0,00082

La FIG. 3 muestra la absorción de nanosuspensiones de paclitaxel revestido con DOTAP por macrófagos derivados de monocitos después de 1, 2 o 6 días de cultivo. Las células se expusieron a las partículas de paclitaxel durante diversos períodos de tiempo entre 0 y 3,5 horas. Los resultados indican que cuando más tiempo se cultivan las células, menos sensibles son éstas a las partículas revestidas con DOTAP. En teoría, se supone que toda la fagocitosis aumenta cuando las células maduran de monocitos a macrófagos y, por consiguiente, el revestimiento de DOTAP no puede resultar tan ventajoso para aumentar la absorción celular en células más maduras en comparación con células más jóvenes (células que han sido cultivadas *in vitro* durante períodos de tiempo relativamente cortos). Por otro lado, una absorción incrementada/acelerada de las partículas revestidas con DOTAP por monocitos relativamente más jóvenes puede resultar en un suministro del agente terapéutico dirigido de forma más eficaz, ya que dichos monocitos tienden a ser monocitos circulantes, mientras que las células más antiguas tienden a distinguirse en macrófagos fijos (por ejemplo en el bazo y el hígado).

### **Ejemplo 3: Absorción de partículas de paclitaxel que presentan un revestimiento de PLGA o un revestimiento de fosfatidilserina por células mononucleares humanas**

La absorción de partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP se comparó con la absorción de partículas de paclitaxel revestidas con ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y con la absorción de partículas de paclitaxel revestidas con fosfatidilserina (PS). Las partículas de paclitaxel revestidas con PLGA y las partículas de paclitaxel revestidas con PS se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, excepto que las partículas de PLGA se sometieron a sonicación, en lugar de homogeneizarlas, y se formularon utilizando una solución que contenía tampón de fosfato, glicerina, PLGA y poloxámero 188, y las partículas de PS se formularon utilizando una solución que contenía tampón de fosfato, glicerina, DSPE-mPEG 200, poloxámero 188 y fosfatidilserina.

La FIG. 4 muestra la cinética de absorción de las suspensiones de paclitaxel (los resultados se muestran tanto en forma de porcentaje de células positivas en cuanto al paclitaxel después de la absorción de nanosuspensión como en forma de MFI de partículas asociadas a células/internalizadas). El revestimiento de DOTAP mejoró esencialmente la absorción de partículas en comparación con las partículas revestidas con PLGA o revestidas con fosfatidilserina. Estos resultados sugieren que el aumento de la absorción de partículas de paclitaxel no sólo es atribuible a la presencia de un revestimiento de polímero o de agente tensioactivo.

**Ejemplo 4: Absorción de partículas de paclitaxel que presentan un revestimiento de CTAB por células mononucleares humanas**

La absorción de partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP se comparó con la absorción de partículas de paclitaxel revestidas con bromuro de cetil- trimetilamonio (CTAB). Las partículas de paclitaxel revestidas con CTAB se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, excepto que las partículas de CTAB se formularon utilizando una solución que contenía tampón de fosfato, glicerina, DSPE-mPEG 2000, poloxámero 188 y CTAB.

La FIG. 5 muestra la cinética de absorción de las suspensiones de paclitaxel (los resultados se muestran tanto en forma de porcentaje de células positivas en cuanto al paclitaxel después de la absorción de nanosuspensión como en forma de MFI de partículas asociadas a células/internalizadas). El revestimiento de DOTAP mejoró esencialmente la absorción de partículas en comparación con las partículas revestidas con CTAB. Estos resultados sugieren que el aumento de la absorción de partículas de paclitaxel no sólo es atribuible a la presencia de un revestimiento que incluye tanto un grupo con carga positiva como un grupo hidrófobo.

**Ejemplo 5: Absorción de partículas de paclitaxel que tienen un revestimiento de DOTAP en sangre total**

Con un EDTA vacutainer (BD Biosciences) se extrajo sangre total de un donante humano sano. Se incubaron nanosuspensiones de paclitaxel dopadas con paclitaxel marcado con Oregon Green con la sangre total (concentración final  $\sim 10 \mu\text{M}$ ) durante 1 hora a temperatura ambiente en tubos de microfuga de 1,7 ml sobre un rotador de tubos. Una fracción de la sangre total se expuso a una solución de lisis hipotónica (BD Biosciences) para lisar los glóbulos rojos. Después, las muestras lisadas se tiñeron para expresión de CD14. Tanto la sangre total como las células teñidas se analizaron por citometría de flujo.

No se observó ningún aumento evidente en la fluorescencia de Oregon Green en las poblaciones de glóbulos rojos (*red blood cell* - RBC) ni en las poblaciones de plaquetas. Sí se observó un aumento sustancial de la fluorescencia en la población de monocitos CD14+ en las muestras lisadas utilizando la suspensión de paclitaxel formulada con DOTAP. Las formulaciones de paclitaxel que tenían un revestimiento de DSPE-mPEG 2000/poloxámero 188 también mostraron cierta absorción en la población de monocitos CD14+. No se produjo ninguna absorción evidente en las otras poblaciones celulares principales de acuerdo con la evaluación por fluorescencia de Oregon Green (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que las partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP son absorbidas selectivamente por monocitos más que por glóbulos rojos, plaquetas y otros tipos de células presentes en la sangre. La absorción selectiva de las partículas revestidas con DOTAP por monocitos sugiere un suministro del agente terapéutico dirigido de forma más eficiente a un sitio de enfermedad, tumor o infección.

**Ejemplo 6: Absorción de partículas de paclitaxel que tienen un revestimiento de DOTAP por macrófagos peritoneales de ratón**

Los macrófagos peritoneales se aislaron de ratones y se expusieron a partículas de paclitaxel que tenían un revestimiento de DOTAP y a partículas de paclitaxel sin dicho revestimiento. Las imágenes de fluorescencia mostraron que los macrófagos peritoneales expuestos a las partículas revestidas con DOTAP absorbieron mayores cantidades de paclitaxel que los expuestos a partículas revestidas con DSPE-mPEG 2000/poloxámero 188 (datos no mostrados). Este ejemplo confirma que el DOTAP aumenta la absorción de partículas por macrófagos peritoneales.

**Ejemplo 7: Absorción de partículas de paclitaxel que tienen un revestimiento de DOTAP por células OVCAR-3 humanas**

Las células OVCAR-3 humanas se sometieron a transfección con proteína fluorescente roja (*Red Fluorescent Protein* - RFP), de modo que presentaban una fluorescencia roja. Después, estas células se expusieron a partículas de paclitaxel preparadas utilizando paclitaxel con Oregon Green que tenía un revestimiento de DOTAP y a partículas de paclitaxel sin revestimiento de DOTAP. Las imágenes de fluorescencia mostraban que las células RFP-OVCAR-3 sólo absorbían partículas cuando éstas estaban revestidas con DOTAP (datos no mostrados). No se produjo ninguna absorción visible de las partículas revestidas con DSPE-mPEG 2000/poloxámero 188. Este ejemplo confirma que el DOTAP aumenta la absorción de partículas por células de cáncer de ovario humano. La velocidad de absorción de las partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP por las células OVCAR-3 sugiere que las células tumorales absorben directamente las partículas, pero el mecanismo exacto es desconocido.

**Ejemplo 8: Tiempo de retención en ratones de partículas de paclitaxel con un revestimiento de DOTAP**

Un ratón fue sometido a inyección subcutánea de partículas de paclitaxel marcadas con Oregon Green que presentaban un revestimiento de DOTAP. La persistencia de la fluorescencia verde a los 30 días indicaba que las partículas de paclitaxel permanecían al menos durante 30 días al ser inyectadas vía subcutánea (datos no mostrados).

En un experimento independiente, un ratón sano fue sometido a inyección intraperitoneal (IP) de partículas de paclitaxel que presentaban un revestimiento de DOTAP y un agente tensioactivo marcado con rodamina (Lissamine rhodamine B 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal trietilamónica (rDHPE; Invitrogen, Carlsbad, CA). Después se tomaron imágenes de fluorescencia a lo largo del tiempo para demostrar el tiempo de retención de las

partículas. Los datos indicaban que las nanopartículas de paclitaxel eran eliminadas rápidamente (en un plazo de aproximadamente 24 horas) del espacio peritoneal en un ratón sano (datos no mostrados).

Se estableció un modelo de ratón en el que los ratones de ensayo fueron sometidos a un implante de células RFP-OVCAR-3 y se dejó que éstos desarrollaran tumores. Los tumores expresaban RFP y tenían una fluorescencia roja.

5 Unas partículas de paclitaxel marcadas con Oregon Green que presentaban un revestimiento de DOTAP fueron administradas por inyección intraperitoneal a ratones con tumores que expresaban RFP. La presencia y la localización de las partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP se detectaron en relación con los tumores utilizando fluorescencia.

10 Tanto los tumores como las partículas de paclitaxel se observaron mediante microscopía de fluorescencia (fluorescencia roja en el caso de los tumores, fluorescencia verde en el caso de las partículas). A diferencia de los ratones sanos, en los que las partículas eran eliminadas rápidamente de la cavidad peritoneal, las partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP estaban presentes en los ratones con tumores hasta 30 días después de la inyección, indicando que los tumores presentes en la cavidad peritoneal del ratón eran en parte responsables del aumento del tiempo de retención. Además, las partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP frecuentemente estaban localizadas junto con tumores. Por consiguiente, este ejemplo confirma que las partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP se dirigen a sitios de tumor en vez de a tejidos sanos, y se pueden mantener dentro de los sitios de tumor diana durante periodos de tiempo significativos, de modo que pueden suministrar con eficacia una liberación sostenida del fármaco terapéutico.

20 Adicionalmente, cuando las partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP estaban presentes, la intensidad de la fluorescencia roja disminuía con el paso del tiempo, lo que concuerda con la muerte de células tumorales. A la inversa, en ausencia de partículas de paclitaxel, la fluorescencia roja se intensificaba con el paso del tiempo. Por consiguiente, este ejemplo demuestra además que la administración de partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP trataba el cáncer con eficacia *in vivo*.

25 También se llevó a cabo un estudio de determinación del intervalo de dosis utilizando varias dosis de las partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP (15 mg/kg y 25 mg/kg) con el fin de identificar las dosis efectivas para inducir la muerte de células de tumor de ovario en el modelo de ratón. En respuesta a la administración de las diversas dosis de partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP, se midió el tamaño de los tumores para determinar la eficacia de la dosis administrada. Una dosis de 25 mg/kg administrada el día 1 redujo el tamaño del tumor 25 días después de la administración. Una dosis de 15 mg/kg administrada dos veces (el día 1 y el día 14) erradicó el tumor antes del día 25, dejando un residuo de fármaco con fluorescencia verde. Este estudio confirma adicionalmente que la administración de partículas de paclitaxel revestidas con DOTAP trataba el cáncer con eficacia *in vivo*.

#### Ejemplo 9: Preparación de partículas de inhibidores de la proteasa con un revestimiento de DOTAP

35 Se prepararon partículas de los inhibidores de la proteasa indinavir (IDV) y ritonavir (RTV) utilizando un procedimiento de microprecipitación/ homogeneización (previamente descrito aquí). Después, las partículas se revistieron con diversos agentes tensioactivos, incluyendo DOTAP, y se comparó la absorción y la eficacia de las diferentes formulaciones de partículas de inhibidores de la proteasa. La Tabla 3 muestra las formulaciones de inhibidores de la proteasa utilizadas en este estudio.

Tabla 3

Formulación	Fármaco	Agente tensioactivo	Tamaño (nm)	Potencial zeta
IDV-1	IDV	Lipoide E80	1060	-34,0
IDV-4	IDV	P-188, DSPE-mPEG <sub>2000</sub> , DOTAP	980	+15,0
RTV-1	RTV	DSPE-mPEG <sub>2000</sub>	200	-25,6
RTV-4	RTV	P-188, DSPE-mPEG <sub>2000</sub> , DOTAP	620	+15,5

40 Las partículas se suspendieron en una solución que incluía Lipoide E80 (1,4%), P-188 (0,5%), DSPE-mPEG<sub>2000</sub> (0,2%) y/o DOTAP (0,1%) para revestir las partículas. Las partículas se añadieron a la solución en una relación peso-volumen de aproximadamente un 2%. Las suspensiones de las partículas de superficie modificada se prepararon añadiendo partículas a la solución de revestimiento y mezclándolas durante 4-7 minutos utilizando una mezcladora de rotor-estator Ultra-Turrax T-18 (IKA Works Inc., Wilmington, NC, EEUU) para reducir el tamaño de partícula inicial. Después, las suspensiones se homogeneizaron a 1.378,95 bar (20.000 libras por pulgada cuadrada) durante aproximadamente 30 pasadas o hasta alcanzar el tamaño de partícula deseado. En el caso de las suspensiones que contenían DOTAP, la suspensión homogeneizada se centrifugó (12,100 x g durante 30 minutos a 5°C) para formar pellas de las partículas de fármaco. El fármaco se resuspendió en agente tensioactivo que contenía DOTAP mediante mezcla con una Ultra-Turrax T-18. Las nanosuspensiones se formularon a un pH ligeramente alcalino de 7,8 utilizando como tampón bien fosfato de sodio 10 mM, bien HEPES 10 mM. La tonicidad se ajustó con glicerina (2,24%) o sacarosa (9,25%). Para marcar las partículas se utilizó un marcador fluorescente rojo, Lissamine rhodamine B 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal trietilamónica (rDHPE; Invitrogen, Carlsbad, CA). En todas las formulaciones, el tamaño de partícula se midió utilizando un instrumento de dispersión de luz HORIBA LA 920 (HORIBA Instruments Inc., Irvine, CA, EEUU; RRI = 1,08 para IDV y 1,20 para RTV). El potencial zeta se midió diluyendo 0,1 ml de la suspensión en 9,9 ml de HEPES 10 mM, pH 7,4, en un instrumento de la serie Malvern

Zetasizer Nano (Malvern Instruments Inc., Westborough, MA, EEUU). El contenido final de fármaco de las formulaciones se determinó mediante RP-HPLC.

**Ejemplo 10: Absorción de partículas de inhibidores de la proteasa con un revestimiento de DOTAP por macrófagos derivados de monocitos humanos**

- 5 Los monocitos humanos se obtuvieron mediante leucoféresis de donantes seronegativos en cuanto a VIH-1 y hepatitis y se purificaron por elutriación centrífuga en contracorriente de acuerdo con la descripción de Dou y col. (Blood, 108(8):2827-2835, 2006). También se prepararon citospinas con tinción de Wright y la pureza celular se ensayó mediante inmunomarcado con anti-CD68 (clon KP-1). Los monocitos se cultivaron en una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml a 37°C en una atmósfera humidificada (5% CO<sub>2</sub>) en medio Eagle modificado de Dulbecco complementado con un 10% de suero humano agrupado inactivado por calor, un 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 humanos recombinantes. Para inducir la diferenciación en macrófagos, los monocitos se cultivaron durante 7 días en presencia de factor estimulador de colonias de macrófagos de acuerdo con la descripción de Gendelman y col. (J. Exp. Med. 167:1428-1441, 1988).
- 10 Los MDM ( $2 \times 10^6$  por pocillo) se cultivaron con las partículas de inhibidores de la proteasa de superficie modificada en concentraciones de 1, 10 y 100 µM. La absorción de las partículas se evaluó sin cambio de medio durante 24 horas, realizándose la recogida de células cada hora. Los MDM se recogieron por lavado tres veces con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato, seguido de recuperación de células en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato. Las muestras se centrifugaron a 950 x g durante 10 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante. Las pellas celulares se sometieron a sonicación en 200 µl de metanol y se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El extracto de metanol se almacenó a -80°C hasta la realización del análisis por RP-HPLC.
- 15 Se desarrollaron dos formulaciones de RTV diferentes (véase la Tabla 3). La formulación de RTV con la velocidad más lenta y la cantidad absoluta más baja de absorción era RTV-1, que estaba revestido solo con DSPE-mPEG<sub>2000</sub>, tenía un tamaño de 200 nm y un potencial zeta de -25,6 mV (Tabla 3). La formulación de RTV con la velocidad de absorción más rápida y la mayor acumulación de RTV era RTV-4, que estaba revestido con una combinación de P-188, DSPE, mPEG<sub>2000</sub> y DOTAP, tenía un tamaño de 620 nm y un potencial zeta de +15,5 mV. La absorción máxima se produjo a las 8 horas en el caso del RTV-4 y a las 12 horas en el caso del RTV-1. La cantidad absoluta de absorción era aproximadamente 1,5 veces mayor en el caso del RTV-4 (40,98 µg/1 x 10<sup>6</sup> células) que en el caso del RTV-1 (24,68 µg/1 x 10<sup>6</sup> células). Las propiedades físicas del RTV-4 eran similares a las del IDV-4, que también contenía DOTAP. Esto sugiere que las propiedades físicas que optimizan la absorción de partículas de IDV también optimizan la absorción de partículas de RTV.
- 20 Después de una exposición inicial de 12 horas a las partículas de superficie revestida, en un período de 2 semanas se evaluó la liberación de fármaco de los MDM con cambios de la mitad del medio cada dos días. Se guardaron muestras del medio junto con células de replicación y se almacenaron a -80°C hasta que se pudo realizar un análisis RP-HPLC utilizando una versión modificada del método descrito en Dou y col. (Virology 358:148-158, 2007). Se centrifugaron suspensiones celulares extraídas con metanol a 21.800 x g a 4°C durante 10 minutos. Las muestras de medio se descongelaron y desproteinizaron mediante la adición de metanol. Las muestras se centrifugaron a 21.800 x g a 4°C durante 10 minutos; los sobrenadantes se evaporaron hasta sequedad bajo vacío y se resuspendieron en 70 µl de metanol 100%. Después se evaluaron muestras de 20 µl por triplicado de medios procesados o células mediante RP-HPLC utilizando una columna YMC Pack Octyl C8 (Waters Inc., Milford, MA, EEUU) con un cartucho de seguridad C8. Una fase móvil consistente en un 47% acetonitrilo/53% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, pH 4,15 (ajustado con HCl 1N) se bombeó a 0,4 ml/min con detección UV/Vis a 212 nm. En todas las preparaciones de inhibidores de la proteasa se evaluaron cuantificaciones en comparación con una curva estándar de fármaco libre (0,025-100 µg/ml) preparado en metanol.
- 25 En los diversos fármacos y formulaciones se observaron diversos perfiles de liberación. Se evaluó la cantidad de fármaco todavía contenido dentro de las células y liberado en el medio. En comparación con MDM tratados con IDV-1 o IDV-4, el contenido del fármaco en las células difería considerablemente ( $p < 0,05$ ) en todos los momentos. En las células tratadas con IDV-1 no se podía detectar nada de fármaco antes del día 11, mientras que en el caso del IDV-4 el fármaco seguía claramente presente el día 15 (1,61 µg/1 x 10<sup>6</sup> células). La concentración de fármaco dentro del medio también difería considerablemente ( $p < 0,05$ ) entre los días 3 a 15. En las células tratadas con IDV-1 no se podía detectar nada de fármaco en el medio antes del día 13, mientras que el fármaco seguía claramente presente en el caso de los MDM tratados con IDV-4 (16,37 µg/ml).
- 30 En comparación con los MDM tratados con RTV-1 o RTV-4, el contenido de fármaco tanto en las células como en el medio era diferente ( $p < 0,05$ ) en todos los momentos. Tanto en el caso del RTV-1 (0,19 µg/1 x 10<sup>6</sup> células) como en el caso del RTV-4 (8,69 µg/1 x 10<sup>6</sup> células), el día 15 el fármaco seguía presente dentro de las células. El fármaco también seguía presente dentro de los medios el día 15 tanto en el caso del RTV-1 (0,28 µg/ml) como del RTV-4 (11,62 µg/ml). Los MDM retenían las partículas revestidas con DOTAP (IDV-1 y RTV-1) durante un tiempo considerablemente más largo que las partículas que no estaban revestidas con DOTAP (IDV-1 y RTV-1).
- 35 Estos experimentos demuestran que los MDM absorben de modo más eficiente las partículas de inhibidores de la proteasa revestidas con DOTAP, y que estas partículas de inhibidores de la proteasa revestidas con DOTAP son retenidas dentro de los MDM durante períodos de tiempo más largos que en el caso de partículas de inhibidores de la proteasa no revestidas con DOTAP. Por consiguiente, los MDM cargados con partículas de inhibidores de la proteasa revestidas con DOTAP son vehículos de fármaco eficaces para transportar éstos a tejidos infectados.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

**Ejemplo 11: Evaluación de las propiedades funcionales de células cargadas con partículas que contienen DOTAP**

- Se llevaron a cabo estudios para evaluar si la función celular resultaba afectada en monocitos y MDM cargados con partículas de superficie modificada. Los monocitos y MDM se trataron con 100  $\mu\text{M}$  de partículas durante 12 horas, y la citotoxicidad se evaluó a lo largo de 24 horas utilizando el ensayo ALAMARBLUE™ (AbD Serotec, Raleigh, NC, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los reactivos de ALAMARBLUE incorporan un indicador de oxidación-reducción que provoca fluorescencia y cambia el color en respuesta a una reducción química del medio de cultivo resultante del crecimiento celular. Por consiguiente, la intensidad del indicador de oxidación-reducción es proporcional al crecimiento celular y la viabilidad celular.
- Los resultados muestran que ninguna de las formulaciones de partículas de IDV cambió de forma significativa la viabilidad de los monocitos o MDM en la concentración más alta utilizada (100  $\mu\text{M}$ ). Además, todas las preparaciones de partículas de RTV, también ensayadas en una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , no alteraron la viabilidad de los macrófagos, pero redujeron la viabilidad de los monocitos en un 15%.
- La migración de monocitos a través de la barrera hematoencefálica se llevó a cabo de acuerdo con la descripción de Gendelman y col. (J. Exp. Med. 167(4): 1428-1441, 1988) y Chaudhuri y col. (J. Cereb. Blood Flow Metab. 28(4): 697-711). Para este ensayo se sembraron  $2 \times 10^4$  células endoteliales de microvasos cerebrales humanos (HBMEC) sobre inserciones de cultivo tisular (tamaño de poro 3  $\mu\text{m}$ ) teñidos con FLUOROBLOK™ revestido de colágeno de BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, EEUU). Dado que las monocapas de HBMEC no son visibles sobre estas inserciones, se evaluaron lecturas manuales de resistencia eléctrica transepitelial con un voltímetro EVOM (World Precision Instruments, Sarasota, FL, EEUU) para confirmar la formación y confluencia de monocapas. Los monocitos se marcaron con calceína-AM (Invitrogen) a 5  $\mu\text{M}/1 \times 10^6$  células durante 45 minutos y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato. Para la migración,  $2,5 \times 10^5$  monocitos marcados se dispusieron sobre monocapas de HBMEC (cámara superior de la inserción de FLUOROBLOK) y se dejó que éstos migraran a través de la monocapa durante 2 horas (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ). Los monocitos que migraban a la cámara inferior se cuantificaron utilizando un lector de placas por fluorescencia (absorbancia: 494 nm; emisión: 517 nm) y se compararon con una curva estándar derivada de una dilución en serie de una cantidad conocida de células marcadas con calceína. Aunque la carga de partículas aumentaba la migración de monocitos a través de modelos artificiales de barrera hematoencefálica tanto en el caso del IDV-4 como en el caso del RTV-4 en relación con los monocitos y MDM o cargados, dicho aumento no era estadísticamente significativo.
- Estos estudios demuestran que la carga de MDM con partículas de inhibidores de la proteasa revestidas con DOTAP no es tóxica para las células y que los MDM conservan sus funciones celulares. Por consiguiente, los MDM cargados con partículas de inhibidores de la proteasa revestidas con DOTAP son eficaces para suministrar fármacos a tejidos infectados.

**Ejemplo 12: Eficiencia antirretroviral de preparaciones de partículas que contienen DOTAP**

- Para determinar los efectos antirretrovirales *in vitro* de las partículas de inhibidores de la proteasa de superficie modificada absorbidas por los MDM, las células se trataron con partículas individuales de superficie modificada en concentraciones de 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  durante 12 horas y se provocaron con VIH-1 (ADA aislado) en una multiplicidad de infección de 0,01 partículas de virus infecciosos/célula los días 1, 5, 10 y 15 después del tratamiento con el fármaco. Después de la infección viral, las células se cultivaron durante 10 días con cambios de la mitad del medio cada dos días. Los días 5, 7 y 10 se recogieron muestras de medio de los cultivos celulares para medir la producción de viriones de descendencia, de acuerdo con el ensayo por actividad de RT. El día 10 después de la infección se realizaron análisis por inmunotinción de la expresión de antígeno p24 de VIH-1 por células infectadas.
- Para medir la actividad de RT, muestras de medio (10  $\mu\text{l}$ ) se mezclaron con 10  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía Tris-HCl 100 mM (pH 7,9), KCl 300 mM, ditiotreitól 10 mM (DTT), 0,1% de nonilfenoxilpolietoxilanol-40 y agua. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 15 minutos y en cada pocillo se añadieron 25  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,9), KCl 150 mM, DTT 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  15 mM, 0,05% nonilfenoxilpolietoxilanol-40, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de poli(A), 0,250 U/ml de oligo d(T)<sub>12-18</sub>, y 10  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$   $^3\text{H}$ -timidina 5'-trifosfato (TTP); y las placas se incubaron a 37°C durante 18 horas. Después de la incubación, en cada pocillo se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de TCA al 10% frío, los pocillos se cosecharon sobre filtros de fibra de vidrio y los filtros se evaluaron en cuanto a la incorporación de  $^3\text{H}$ -TTP mediante espectrometría de (3-centelleo utilizando un contador TopCount NXT (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, EEUU).
- Las mismas formulaciones en las mismas concentraciones utilizadas para el estudio de absorción y liberación descrito en el Ejemplo 10 se ensayaron en cuanto a las actividades antirretrovirales para asegurar la posibilidad de comparación de los conjuntos de datos. En todos los momentos de examen se observó un efecto de actividad de RT dependiente de la dosis para IDV-4, mientras que el IDV-1 presentaba una respuesta potencial dependiente de la dosis únicamente los días 1 y 5. Cuando se administraron dosis el día 1 a 100  $\mu\text{M}$ , se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las dos formulaciones a partir del día 5. Antes del día 15, los grupos de tratamiento con IDV-1 no se diferenciaban de los controles infectados, mientras que los grupos de tratamiento con IDV-4 mantenían una supresión viral significativa ( $p < 0,05$ ), demostrando de este modo la mayor eficacia de formulaciones que incluyen DOTAP.
- La comparación de la supresión de actividad de RT en los casos del RTV-1 y el RTV-4 mostró tendencias de respuesta potencial dependiente de la dosis para ambos fármacos en todos los momentos. Una actividad de RT reducida se mantuvo a lo largo del tiempo en el caso de las células tratadas con RTV-4, pero no en el caso de las

células tratadas con RTV-1. Antes del día 15, el RTV-1 mostraba una reducción del 34,84% en la actividad de RT en comparación con los controles, mientras que el RTV-4 eliminó la actividad de RT en un 98,42%, demostrando de nuevo la mayor eficacia de formulaciones que incluyen DOTAP.

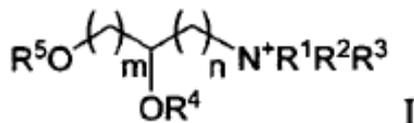
5 También se utilizó la expresión de antígeno p24 de VIH-1 para confirmar la actividad antirretroviral en MDM tratados con partículas de superficie modificada e infectados posteriormente con VIH-1. Las células se fijaron con un 4% de paraformaldehído tamponado con fosfato 10 días después de la infección por VIH-1. Luego se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón para el p24 de VIH-1 (1:10, Dako, Carpintería, CA, EEUU) para determinar la densidad de células infectadas por VIH-1. La cuantificación de la inmunotinción se llevó a cabo mediante densitometría utilizando Image-Pro Plus, v. 4.0 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, EEUU). La expresión de p24 se cuantificó  
10 determinando el área positiva (índice) como un porcentaje del área de imagen total por campo de microscopía.

La evaluación de la expresión de p24 por MDM infectados tratados con IDV-1 e IDV-4 mostró un efecto de respuesta dependiente de la dosis en la expresión de p24 en todos los momentos en el caso de las células tratadas con IDV-4, pero sólo el día 1 en el caso de las células tratadas con IDV-1. En todas las concentraciones, a partir del día 1 se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las dos formulaciones. El día 14, las células tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de IDV-1 no se diferenciaban de los controles infectados, mientras que las células tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de IDV-4 mostraban diferencias significativas ( $p = 0,0003$ ). La comparación de la densidad de antígeno p24 de VIH-1 en grupos tratados con RTV-1 o RTV-4 mostró efectos de respuesta potencial dependiente de la dosis en todos los momentos, en las dos formulaciones y en todas las concentraciones. A partir del día 1 se observaron diferencias significativas ( $p = 0,0156$ ) en la densidad de p24 de VIH-1 en el caso de las células tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de partículas de RTV. Antes del día 15, todas las concentraciones de tratamiento se diferenciaban de forma considerable entre las formulaciones de RTV ( $p < 0,021$ ).

En conjunto, el IDV-4 y el RTV-4 inhibieron la producción de viriones de descendencia de VIH-1 en células infectadas durante 15 días, mientras que el IDV-1 y el RTV-1 no lo hicieron. Esto se demostró mediante la pérdida gradual de la inhibición de p24 y el avance de la propagación viral con el tiempo, tal como demuestra el aumento de la densidad del marcado con p24. Este conjunto de datos refleja el de los análisis de RT y demuestra una  
25 disminución de las tasas de replicación viral en el caso del IDV-4 y RTV-4, mostrando reducciones tanto en la actividad de RT como en el p24 de VIH-1 a lo largo del tiempo. Por consiguiente, las partículas de inhibidores de la proteasa revestidas con DOTAP mantienen la actividad retroviral y los MDM cargados con partículas de inhibidores de la proteasa revestidas con DOTAP son eficaces para el tratamiento de la infección por VIH.

## REIVINDICACIONES

1. Partícula de superficie modificada que comprende un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, comprendiendo el núcleo de partícula un principio activo seleccionado de entre el grupo consistente en moléculas pequeñas, péptidos y proteínas, comprendiendo el revestimiento un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y presentando la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm:

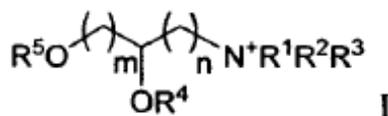


donde n y m son 1;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son metilo; y

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo consistente en *cis*-9-octadecenoilo y *cis*-9-octadecenilo.

2. Partícula según la reivindicación 1, caracterizada porque R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son *cis*-9-octadecenoilo.
3. Partícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el revestimiento comprende adicionalmente un segundo agente tensioactivo que incluye al menos un poloxámero y un fosfolípido.
4. Partícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el principio activo es un agente terapéutico seleccionado de entre el grupo consistente en 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, agentes antirreumáticos, agentes psicoterapéuticos, agentes de bloqueo neural, agentes antiinflamatorios, antihelmínticos, antibióticos, anticoagulantes, antidepresivos, antiepilépticos, antifúngicos, agentes antifibróticos, agentes antiinfecciosos, agentes antiparasitarios, antihistaminas, agentes antimuscarínicos, agentes antimicobacterianos, agentes antineoplásicos, agentes antiprotozoicos, agentes antivirales, sedantes ansiolíticos, 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, agentes antipriónicos, y combinaciones de los mismos.
5. Partícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el principio activo es paclitaxel.
6. Partícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el principio activo se selecciona de entre el grupo consistente en un inhibidor de proteasa, un inhibidor de transcriptasa inversa nucleósido y un inhibidor de transcriptasa inversa no nucleósido.
7. Partícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el principio activo es un agente antiinflamatorio.
8. Composición farmacéutica que comprende múltiples partículas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
9. Uso de múltiples partículas de superficie modificada para preparar un medicamento para aumentar la absorción celular de un principio activo, comprendiendo dicha partícula de superficie modificada un núcleo de partícula y un revestimiento asociado al núcleo de partícula, comprendiendo el núcleo de partícula un principio activo seleccionado de entre el grupo consistente en moléculas pequeñas, péptidos y proteínas, comprendiendo el revestimiento un agente tensioactivo de fórmula I o una sal del mismo, y presentando la partícula de superficie modificada un tamaño medio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 2.000 nm:



donde n y m son 1;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son metilo; y

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo consistente en *cis*-9-octadecenoílo y *cis*-9-octadecenilo.

5

10. Uso según la reivindicación 9, caracterizado porque las células son células fagocíticas.

11. Uso según la reivindicación 9, caracterizado porque las células son células tumorales.

10

12. Uso según las reivindicaciones 9-11, pudiendo ser administrado el medicamento por 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 estas vías.

15

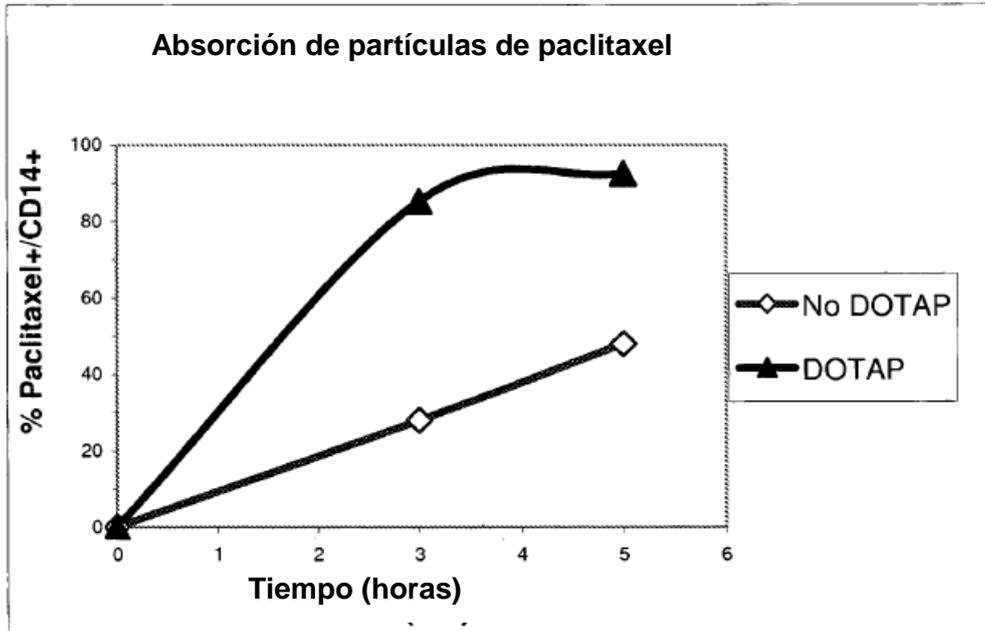
13. Uso según las reivindicaciones 9-12, caracterizado porque el medicamento es utilizado para tratar una enfermedad o afección inflamatoria seleccionada de entre el grupo consistente en artritis reumatoide, enfermedad de Grave, miastenia gravis, tiroiditis, diabetes, enfermedad intestinal inflamatoria, ooforitis autoinmune, lupus eritomatoso sistémico y síndrome de Sjögren.

14. Uso según las reivindicaciones 9-12, caracterizado porque el medicamento es utilizado para tratar una enfermedad o afección infecciosa seleccionada de entre el grupo consistente en infección por virus del dengue, infecciones por enterovirus, infección por VIH, hepatitis B, hepatitis C, gripe, infecciones fúngicas; tripanosomiasis africana, malaria, cólera, meningitis y tuberculosis.

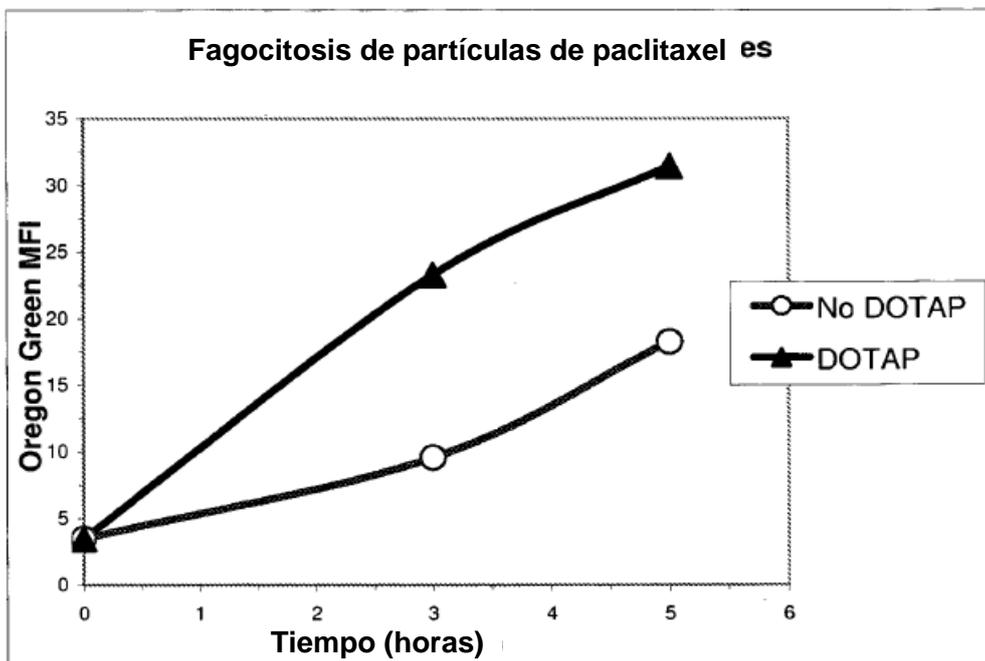
20

15. Uso según las reivindicaciones 9-12, caracterizado porque el medicamento es utilizado para tratar 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 de cabeza y cuello, cánceres de la cavidad peritoneal, cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, sarcoma, melanoma, leucemia, leucemia linfofocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfofocítica crónica, leucemia mieloide crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma y glioblastoma.

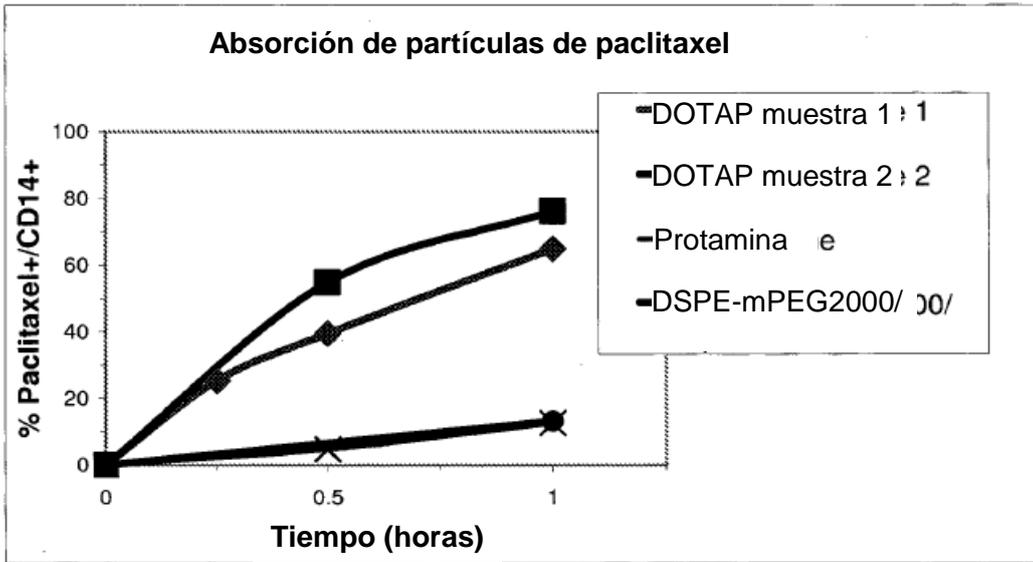
25



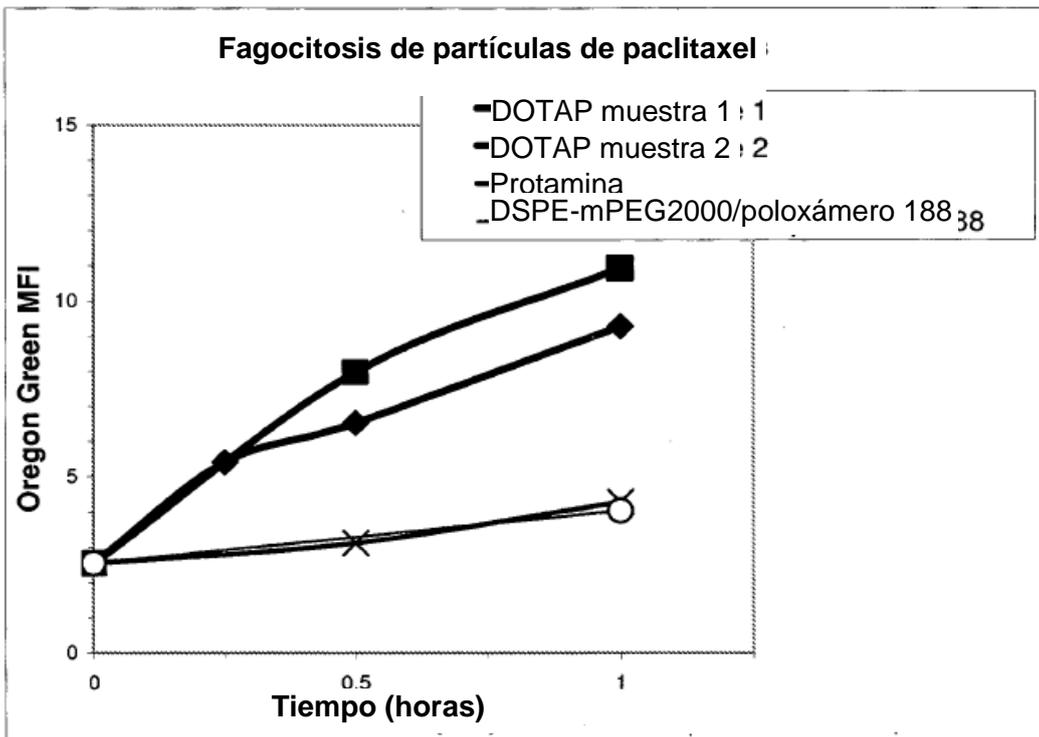
**FIG. 1A**



**FIG. 1B**



**FIG. 2A**



**FIG. 2B**

1 Día de Cultivo *ure*

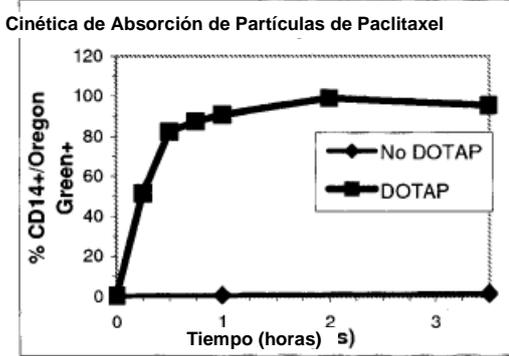


FIG. 3A

1 Día de Cultivo *ure*

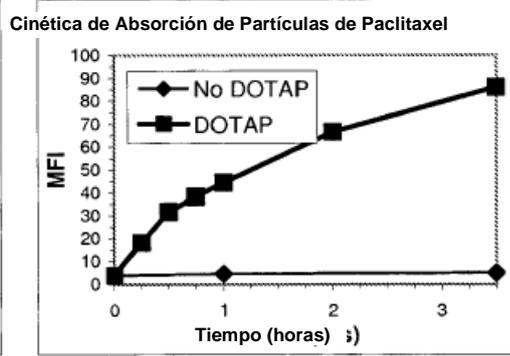


FIG. 3B

2 Días de Cultivo *ure*

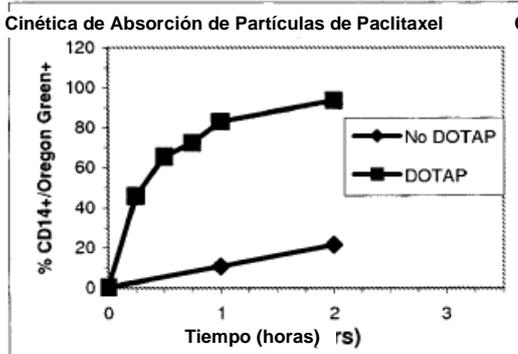


FIG. 3C

2 Días de Cultivo *ure*

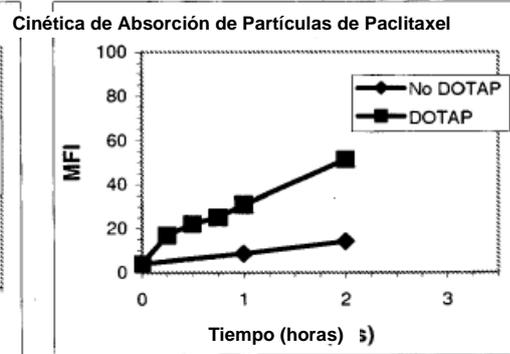


FIG. 3D

6 Días de Cultivo *ure*

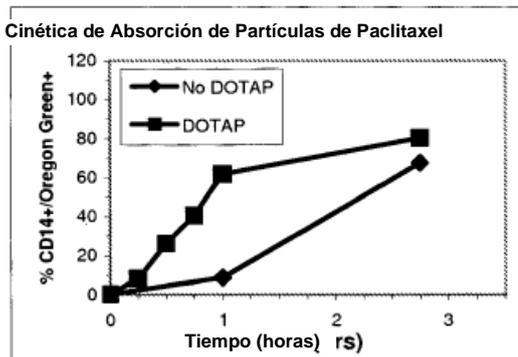


FIG. 3E

6 Días de Cultivo *ure*

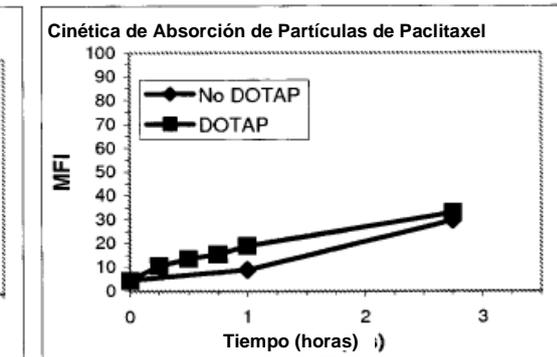
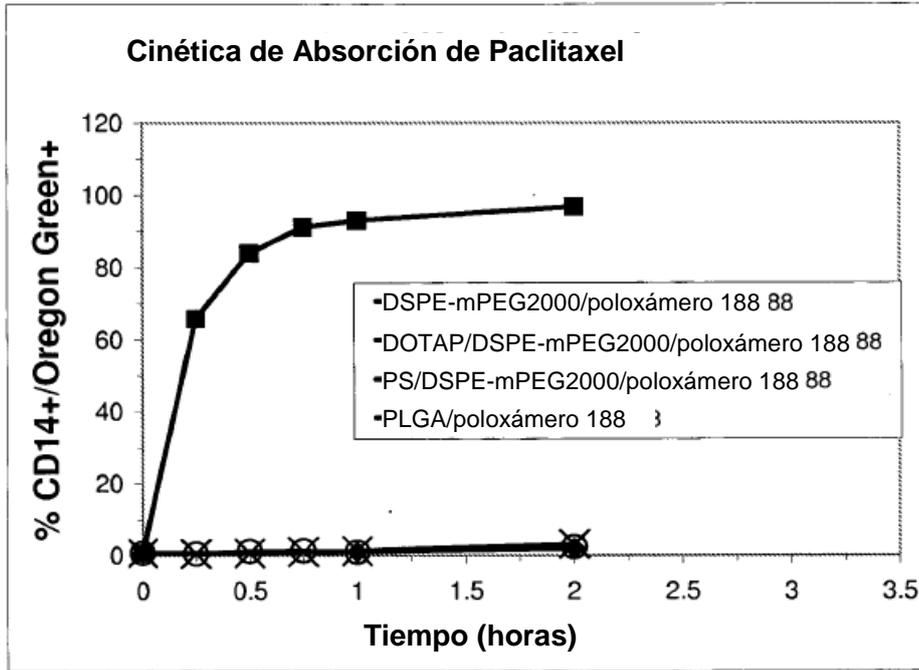
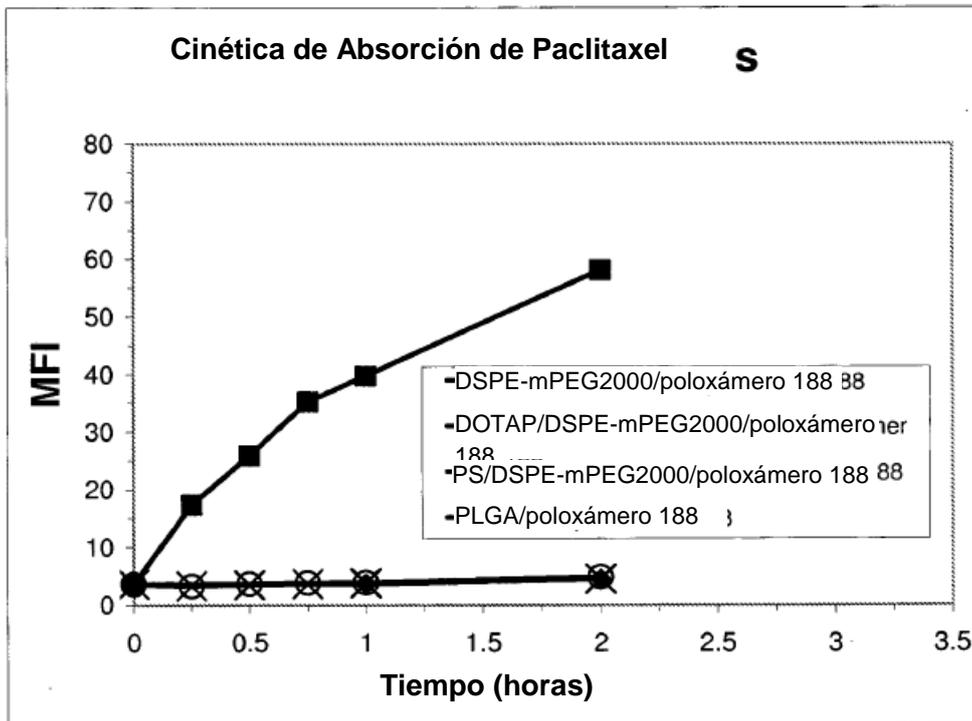


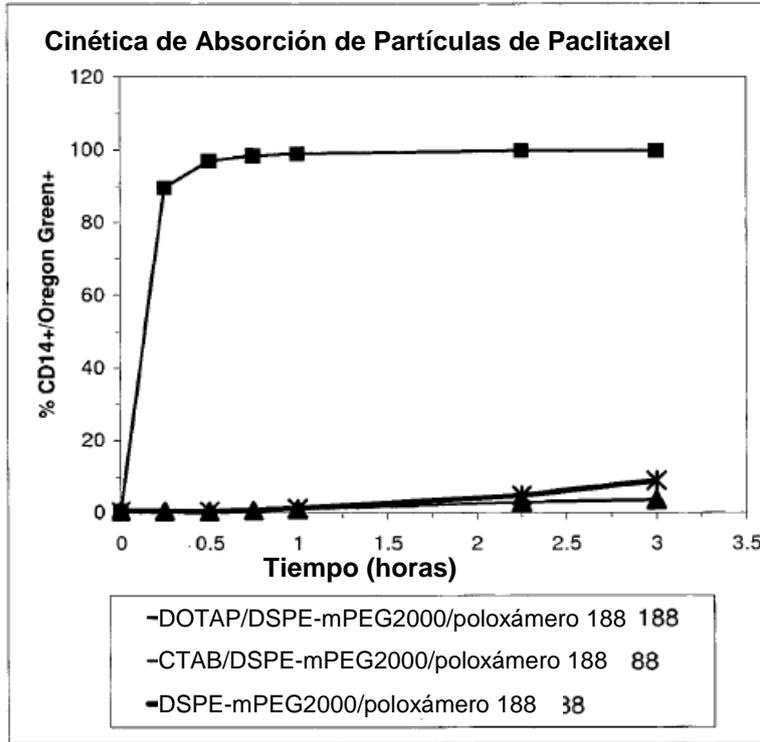
FIG. 3F



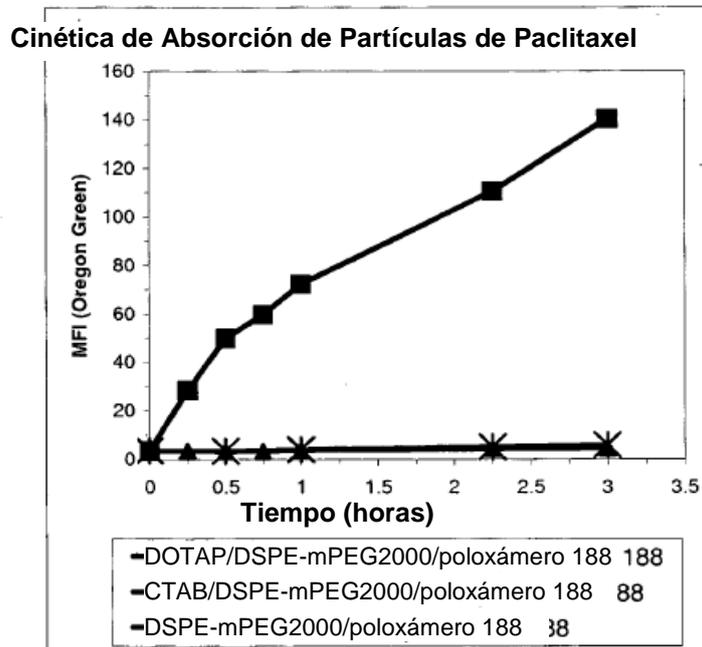
**FIG. 4A**



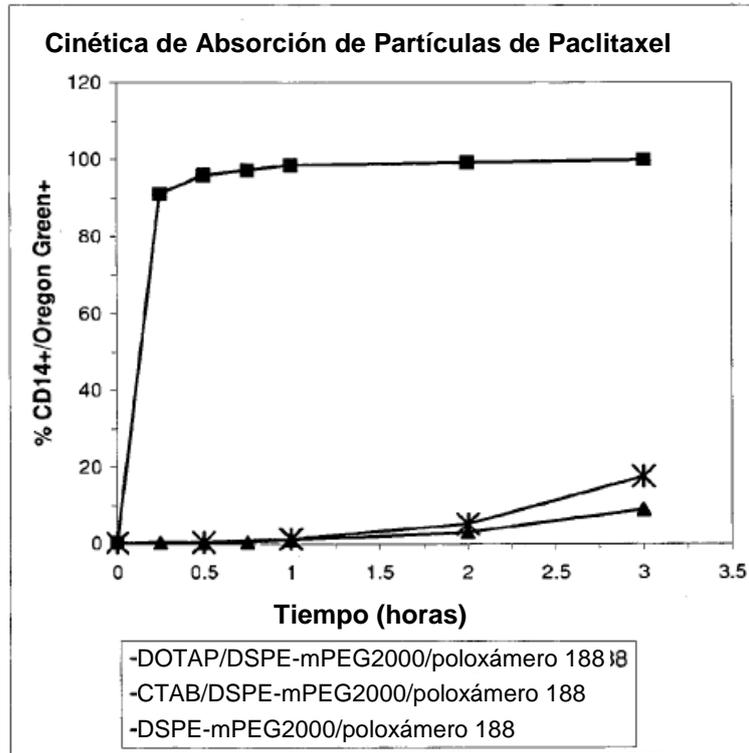
**FIG. 4B**



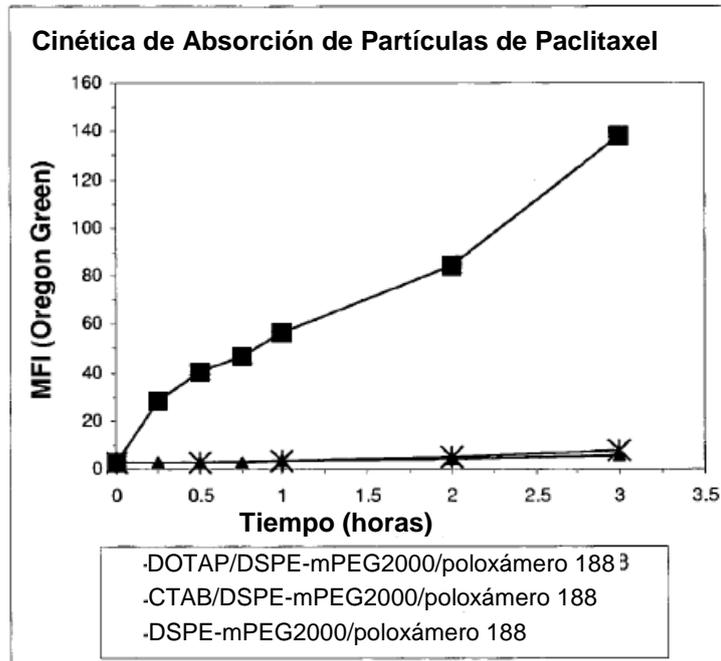
**FIG. 5A**



**FIG. 5B**



**FIG. 5C**



**FIG. 5D**