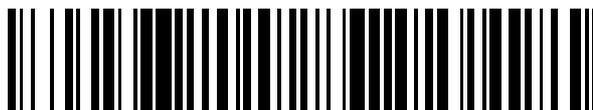


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 095**

51 Int. Cl.:

A61K 47/32 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

C08F 293/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2009 E 09745809 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2291198**

54 Título: **Vesículas que comprenden un copolímero en bloque anfífilos para uso en administración epitelial**

30 Prioridad:

15.05.2008 EP 08156269

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

05.01.2015

73 Titular/es:

**BIOCOMPATIBLES UK LTD. (100.0%)
Chapman House Farnham Business Park
Weydon Lane
Farnham Surrey GU9 8QL, GB**

72 Inventor/es:

BATTAGLIA, GIUSEPPE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 526 095 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

Vesículas que comprenden un copolímero en bloque anfífilicos para uso en administración epitelial

Campo de la invención

5 La invención se refiere a sistemas de administración trans- e intra-epitelial para introducir ingredientes farmacéuticamente o cosméticamente activos en el cuerpo humano o animal.

Antecedentes de la invención

10 Los sistemas vesiculares, que incluyen los liposomas, se han incorporado en muchas formulaciones cosméticas. Los liposomas son partículas coloidales, que en general comprenden principalmente fosfolípidos y colesterol. Las moléculas lipídicas forman bicapas alrededor de un núcleo acuoso. Tanto la bicapa como el núcleo se pueden usar para retener y presentar agentes al tejido con el que entran en contacto (por ejemplo, la piel). La mayoría de estudios describen un efecto selectivo inespecífico, por lo que las vesículas permiten la acumulación de ingredientes en la capa córnea u otras capas superiores de la piel. Varios estudios han informado de la administración mejorada de una diversidad de sustancias farmacéuticas, que incluyen triamcinolona, metotrexato, hidrocortisona, tretinoína, tacrólimus, rodamina, ciclosporina y antiandrógenos en y a través de la piel mediante el uso de formulaciones liposómicas.

15 La administración transdérmica mediante el uso de liposomas como vehículo se ha ilustrado en algunos casos en los que el fármaco retenido pudo atravesar todas las capas de la piel (Kato *et al.*, J Pharm. Pharmacol, 1987 39(5): págs. 399-400). Varios estudios han demostrado que la composición de las vesículas, por ejemplo, la inclusión de lípidos cutáneos (Fresta *et al.*, J. Drug Target, 1996 4(2): p.95-101), lípidos cargados positivamente (Kitagawa *et al.*, Chem Pharm Bull (Tokio), 2006 54(2): p.242-4), y la presencia de tensioactivos en la bicapa (Hoffland *et al.*, Pharmaceutical Research, 1994 11(5): p.659-664) pueden tener efecto sobre la permeabilidad a las sustancias.

20 El estado de las bicapas lipídicas de las vesículas, concretamente la fase de cristal líquido o la fase de gel, también afecta a la administración dérmica y transdérmica: se cree que las vesículas en estado de cristal líquido son más eficaces. Tales resultados se han confirmado *in vivo* (Ogiso *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996 85(1): págs. 57-64). Otras propiedades fisicoquímicas, tales como la carga de las partículas, el tamaño de las partículas y el grado de formación de lamelas también pueden influir en el grado de transporte de sustancias.

25 Se han ideado vesículas distintas de los liposomas con el objetivo de mejorar la administración transdérmica y tópica de sustancias. Los ejemplos de estas incluyen las vesículas hechas de tensioactivos no iónicos (NiosomasTM) (Schreier *et al.*, Journal of Controlled Release, 1994 30(1): p.1-15), vesículas que contienen un porcentaje elevado de etanol (etosomas) (Touitou *et al.*, Drug Development Research, 2000b 50(3-4): págs. 406-415) y vesículas ultraflexibles conocidas de otra manera como transfersomas. Los polimerosomas (vesículas formadas a partir de copolímeros en bloque anfífilicos) son los equivalentes poliméricos de los liposomas, y debido a su naturaleza macromolecular, se sabe que son mucho más resistentes y estables que sus homólogos lipídicos (Discher *et al.*, Science 284 (1991), 1143-6). Además, su naturaleza macromolecular también permite un ajuste muy eficaz del grosor de la membrana. Recientemente, se han desarrollado polimerosomas sensibles al pH que pueden encapsular y transportar ADN plasmídico al citosol celular (Lomas *et al.*, 2007 Adv. Mater 19, 4238-4234).

30 Liaw *et al.* en Journal of Controlled Release 68 (2000) 273-282, describe la administración percutánea de fentanilo mediante el uso de geles de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno). El polímero forma micelas que son capaces de penetrar en la piel de un ratón atómico en 24 horas.

35 Jun Li *et al.*, en Polymer Int., 2008 57(2): págs. 268-274 (2008), describe las propiedades de administración transdérmica de fármacos de nanopartículas de copolímeros anfífilicos mediante penetración cutánea *in vivo*. Se prepararon nanopartículas de copolímero de metoxi poli(etileno glicol)-bloque-poli(ácido D,L-láctico) cargadas de paclitaxel.

Sumario de la invención

40 En vista de la técnica anterior, sigue existiendo el deseo de proporcionar sistemas mejorados de administración trans- e intra-epitelial para introducir agentes químicos, en particular ingredientes farmacéuticamente o cosméticamente activos, en el cuerpo humano o animal. De acuerdo con este deseo, se proporciona una composición según la reivindicación 1 que comprende nanovesículas y, asociado a las vesículas, un agente químico, para el uso en un método de tratamiento mediante terapia, en la que el agente químico se administra de manera trans- y/o intra-epitelial a un cuerpo humano o animal, en la que las vesículas comprenden un copolímero en bloque anfífilico que tiene un bloque hidrófilo y uno hidrófobo.

45 Las vesículas son biocompatibles y no experimentan ninguna interacción citotóxica con las células epiteliales. Una célula acepta bien el polímero que forma las vesículas, y no induce ninguna respuesta inflamatoria, y se puede usar para administrar agentes químicos a células sin una toxicidad indebida. Las tasas de administración mejoran en comparación con los sistemas de administración descritos en la técnica anterior.

La invención descrita en la presente memoria se ocupa del uso de copolímeros en bloque que forman vesículas para la encapsulación de ingredientes farmacéuticamente y cosméticamente activos, y para la administración posterior de estos en y a través de los epitelios.

5 En esta invención se usan estructuras encerradas en membranas que comprenden copolímeros en bloque anfífilos. Estos son capaces de imitar a los fosfolípidos biológicos. Los pesos moleculares de estos polímeros son mucho mayores que los de los tensioactivos basados en fosfolípidos naturales, de forma que se pueden ensamblar en membranas más intrincadas (Battaglia, G. y Ryan, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 8757), lo que proporciona una estructura final con propiedades mecánicas y estabilidad coloidal mejoradas. Además, la naturaleza flexible de la síntesis de copolímeros permite la aplicación de diferentes composiciones y funcionalidades en un amplio intervalo de pesos moleculares, y por lo tanto de grosores de membrana. Así, el uso de estos copolímeros en bloque como vehículos de administración ofrece ventajas significativas respecto de los vehículos usados en la técnica anterior.

10 En vez de usar micelas, que se han descrito en la técnica anterior, la presente invención usa vesículas, que en general se forman a partir de un número mayor de unidades de copolímero anfífilo que las micelas, y tienen moléculas de agua encapsuladas en su núcleo. Las vesículas permiten encapsular un mayor número de agentes químicos, y son más eficaces en la disociación y la liberación de este agente químico una vez absorbidas en el citosol celular.

Descripción detallada de la invención

20 Una vez que las vesículas detalladas anteriormente se absorben en las células, de manera ventajosa se disocian y liberan el agente químico dentro de la célula. La disociación se puede favorecer mediante una diversidad de mecanismos, pero en general se favorece mediante la sensibilidad al pH del copolímero en bloque. Preferiblemente, uno de los bloques tiene un grupo pendiente con un pK_a en el intervalo de 3,0 a 6,9. Sin desear limitarse a ninguna teoría, el mecanismo de interiorización celular (endocitosis) de las vesículas implica la envoltura dentro de membranas fosfolípidicas producidas por orgánulos endocíticos tales como las vesículas de transporte, fagosomas, o pinosomas, dependiendo de la ruta endocítica concreta. El orgánulo endocítico se separa de la membrana celular y lleva las vesículas al interior de la célula para su procesamiento posterior. Independientemente de la ruta endocítica, las vesículas interiorizadas experimentan una reducción del pH local desde un pH 7,4 hasta pH 5-6 una vez dentro del orgánulo. Esta caída del pH es suficiente para desencadenar la ruptura de las vesículas cargadas de agente activo y para liberar del agente químico. Como esta transición está limitada dentro de una semi-permeable membrana de un orgánulo, el incremento repentino del número de partículas se corresponde con un gran incremento de la presión osmótica. Esto provoca la lisis de la membrana fosfolípidica del orgánulo endocítico, lo que libera el agente químico en el citosol de la célula.

30 La composición de esta invención normalmente es acuosa y, por lo tanto, en general las vesículas están en disolución acuosa. Un pH típico de la composición acuosa es 7,0 a 7,6, preferiblemente 7,2 a 7,4. Las vesículas en general son sustancialmente esféricas y comprenden una membrana en bicapa. La bicapa se forma en general a partir de dos capas de moléculas anfífilas, que se alinean para formar un núcleo encerrado con los grupos de la cabeza hidrófila hacia el núcleo y el exterior de la vesícula, y los grupos de la cola hidrófoba formando el interior de la membrana.

35 Un diámetro típico de una vesícula sustancialmente esférica está en el intervalo de 50-5000 nm. Más en general, el diámetro está en el intervalo de 50-1000 nm. Las vesículas que tienen un diámetro en este intervalo normalmente se denominan "nanovesículas". Las nanovesículas tienen preferiblemente una forma sustancialmente esférica. En general, las nanovesículas tienen un diámetro medio numérico menor de 300 nm, preferiblemente menor de 250 nm, lo más preferiblemente menor de 200 nm o 150 nm. El grosor de la bicapa es en general de entre 2 y 50 nm, más en general entre 5 y 20 nm. Estas dimensiones se pueden medir mediante microscopía electrónica de transmisión (T.E.M), y dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) (Battaglia *et al.*, *JAGS* 127,8757 (2005)).

40 En disolución acuosa, normalmente existe un equilibrio entre diferentes tipos de estructuras, por ejemplo entre vesículas y micelas.

45 El agente químico se asocia en general a las vesículas por medio de una interacción física o química, tal como la atracción electrostática o hidrófoba. Normalmente el agente no se une de manera covalente a las vesículas. El agente puede estar asociado al interior de la membrana, o a la superficie externa de las vesículas encerradas en la membrana. Sin embargo, preferiblemente, el agente está encapsulado dentro del núcleo acuoso de las vesículas, que son preferiblemente nanovesículas.

50 Se puede usar una diversidad de técnicas experimentales para determinar la asociación entre el agente activo y las vesículas. Por ejemplo, se puede usar la microscopía electrónica de transmisión y la dispersión dinámica de luz (DLS) para demostrar que el agente está encapsulado en el núcleo de las vesículas.

55 El bloque hidrófobo o hidrófilo del copolímero en bloque anfífilo comprende preferiblemente grupos pendientes que tienen un pK_a en el intervalo de 3,0 a 6,9. Esto confiere "sensibilidad al pH" en el copolímero. pK_a significa el pH al que la mitad de los grupos pendientes están ionizados. En general, el bloque hidrófobo tiene los grupos pendientes con un pK_a en el intervalo de 3,0 a 6,9.

Preferiblemente, el pK_a de los grupos pendientes está en el intervalo de 4,0 a 6,9, más preferiblemente de 5,5 a 6,9. Las vesículas son capaces, en consecuencia, de disociarse en tales intervalos de pH.

El pK_a se puede determinar mediante una diversidad de métodos que incluyen la valoración del pH, potenciometría, espectroscopía UV y dispersión dinámica de luz (DLS). Se debería seleccionar un método adecuado para medir el pK_a según el copolímero que se esté analizando y su solubilidad en los medios de ensayo.

La DLS es el método especialmente preferido para medir el pK_a . Tal como se indica en el artículo de Du *et al.*; J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 17982-17983, la señal de DLS del copolímero PMPC₂₅-*b*-PDPA₁₂₀ en agua varía con el pH. A un cierto pH, la señal se incrementa rápidamente a medida que el copolímero experimenta una transición desde estar molecularmente disociado hasta estar asociado. El pK_a se obtiene como el pH del punto medio de este incremento rápido. Estos experimentos se describen adicionalmente en Giacomelli *et al.*, Biomacromolecules 2006, 7, 817-828. En esta referencia, los experimentos se llevan a cabo con micelas del copolímero en bloque PMPC-*b*-PDPA, pero las técnicas también se pueden usar cuando la transición de fases implica la formación de vesículas.

En la memoria descriptiva, el pK_a de un grupo de un polímero se determina en base a un sistema polimérico (y no suponiendo que sea el mismo que los pK_a s de restos similares en sistemas no poliméricos).

Se prefiere que el bloque hidrófobo comprenda restos pendientes que pueden transformarse en cationes como grupos pendientes. Los restos que pueden transformarse en cationes son, por ejemplo, aminas primarias, secundarias o terciarias capaces de protonarse a pHs por debajo de un valor en el intervalo de 3 a 6,9. De manera alternativa, el grupo puede ser una fosfina.

En una realización de la invención, el bloque hidrófobo tiene un grado de polimerización de al menos 50, más preferiblemente al menos 70. Preferiblemente, el grado de polimerización del bloque hidrófobo no es mayor de 250, aún más preferiblemente, no mayor de 200. En general, el grado de polimerización del bloque hidrófilo es al menos 15, más preferiblemente al menos 20. La proporción del grado de polimerización del bloque hidrófilo respecto del hidrófobo está en el intervalo de 1:2,5 a 1:8. Todas estas limitaciones favorecen la formación de vesículas, en vez de la formación de micelas.

El bloque hidrófilo se basa en un polímero de adición de radicales de monómeros insaturados etilénicamente. En general, los monómeros a partir de los cuales se forma el bloque tienen por sí mismos grupos pendientes dipolares que permanecen sin carga en el proceso de polimerización. De manera alternativa, puede ser posible derivatizar un grupo funcional pendiente de un monómero para hacerlo dipolar tras la polimerización.

En una realización de la invención, la composición comprende dos poblaciones de vesículas, la primera de las cuales tiene un bloque hidrófilo que es un poli(óxido de alquileo) (preferiblemente PEG) y la segunda de las cuales tiene un bloque hidrófilo que comprende un monómero dipolar.

El bloque hidrófilo se forma a partir de monómeros dipolares insaturados etilénicamente.

El monómero dipolar es 2-metacrililoiloxietilfosforilcolina (MPC).

Para una formación óptima de vesículas, los copolímeros en bloque deberían tener unos pesos moleculares controlados. Es preferible que cada uno de los bloques tenga un peso molecular controlado dentro de una banda estrecha, es decir, que tengan una polidispersidad estrecha. La polidispersidad del peso molecular debería ser, por ejemplo, menor de 2,0, más preferiblemente menor de 1,5, por ejemplo en el intervalo de 1,1 a 1,4.

Por supuesto, en la realización preferida de esta invención en la que uno de los bloques tiene un pK_a que está en el intervalo de 3,0 a 6,9, los bloques se deberían seleccionar de forma que tengan el pK_a necesario.

El monómero a partir del cual se forma el bloque hidrófobo es metacrilato de 2-(diisopropilamino)etilo (DPA) o metacrilato de 2-(dietilamino)etilo (DEA). El bloque hidrófilo es PMPC. Preferiblemente, el copolímero es un copolímero en bloque PMPC-*b*-PDPA. Preferiblemente, el copolímero en bloque tiene la fórmula general PMPC_m-*b*-PDPA_n, en la que m está en el intervalo de 15-30 (por ejemplo, 25) y n es de 50 a 180 ó 70 a 180, preferiblemente 100 a 160, más preferiblemente 120 a 160.

El copolímero en bloque puede ser un copolímero en bloque A-B simple, o puede ser un copolímero en bloque A-B-A o B-A-B (en el que A es el bloque hidrófilo y B es el bloque hidrófobo). También puede ser un copolímero en bloque A-B-C, A-C-B o B-A-C, en el que C es un tipo diferente de bloque. Los bloques C pueden comprender, por ejemplo, grupos funcionales, p.ej. grupos entrecruzadores o iónicos, para permitir las reacciones del copolímero, por ejemplo en las composiciones nuevas. Las reacciones de entrecruzamiento, especialmente de los copolímeros de tipo A-C-B, pueden conferir una estabilidad útil a las nanovesículas. El entrecruzamiento puede ser de naturaleza covalente, o, a veces, electrostática. El entrecruzamiento puede implicar la adición de un reactivo diferente para unir grupos funcionales, tal como mediante el uso de un agente alquilante difuncional para unir dos grupos amino. El copolímero en bloque puede ser de manera alternativa una molécula de tipo estrella con un núcleo hidrófilo o hidrófobo, o puede ser un polímero de tipo peine, que tiene un esqueleto hidrófilo (bloque) y bloques pendientes hidrófobos o *viceversa*. Tales polímeros se pueden formar por ejemplo mediante la copolimerización aleatoria de monómeros y macrómeros

monoinsaturados.

Los detalles del proceso para polimerizar los monómeros que se usan en esta invención se pueden hallar en el documento WO 03/074090.

5 Se ha descubierto que el proceso de polimerización viva de radicales proporciona polímeros de monómeros dipolares que tienen una polidispersidad (del peso molecular) de menos de 1,5, tal como se determina mediante cromatografía de permeabilidad en gel. Se prefieren las polidispersidades en el intervalo de 1,2 a 1,4 para el bloque o para cada bloque.

10 Una ventaja de la presente invención en la que uno de los bloques es sensible al pH, es que las vesículas se pueden cargar mediante el uso de un sistema de cambio del pH. En tal proceso, el polímero se dispersa en un líquido acuoso en una forma ionizada, en la que se solubiliza a concentraciones relativamente elevadas sin formar vesículas. Posteriormente, el pH se cambia de forma que algunos o todos los grupos ionizados se desprotonan de manera que están en forma no iónica. A este segundo pH, la hidrofobicidad del bloque se incrementa, y las vesículas se forman espontáneamente.

15 Un método para formar vesículas con un agente químico asociado (en general, encapsulado en su núcleo), en el que uno de los bloques del copolímero es sensible al pH, puede implicar las etapas siguientes:

- (i) dispersar el copolímero anfílico en un medio acuoso;
- (ii) acidificar la composición formada en la etapa (i);
- (iii) añadir el agente químico a la composición acidificada; y
- (iv) elevar el pH hasta aproximadamente un pH neutro.

20 Este método puede comprender una etapa preliminar en la que el copolímero anfílico se disuelve en un disolvente orgánico en un recipiente de reacción, y el disolvente se evapora después para formar una película en el interior del recipiente de reacción.

25 "Sensible al pH" significa que uno de los bloques tiene un grupo que se protona/desprotona a un pH particular. Preferiblemente, uno de los bloques, y en general el bloque hidrófobo, comprende grupos pendientes que tienen un pK_a en el intervalo de 3,0 a 6,9, por ejemplo, 4,0 a 6,9. La Etapa (ii) de acidificar la composición en general reduce el pH hasta un valor por debajo del pK_a del grupo pendiente.

30 Con más detalle, en general se preparan vesículas disolviendo el copolímero en un disolvente orgánico, tal como una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 en un recipiente de vidrio. Si el agente químico es insoluble en agua, en general se añade en esta etapa. El disolvente se puede evaporar a vacío, lo que deja una película copolimérica depositada en las paredes del recipiente. La película se rehidrata después con una disolución acuosa, por ejemplo mediante el uso de solución salina tamponada con fosfato. El pH de la suspensión resultante se reduce hasta un pH de alrededor de 2 para solubilizar la película, y después se incrementa lentamente hasta un pH de alrededor de 6. Una vez que el pH ha alcanzado este valor, se puede añadir un agente químico hidrosoluble. El pH se incrementa después hasta aproximadamente el pH neutro, para encapsular el agente. Después, se puede sonicar y extruir la dispersión, por ejemplo mediante el uso de un extrusor de mesa. Se puede usar la espectroscopía UV para calcular la eficacia de encapsulación, mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica.

35 Un método alternativo para formar las vesículas con el agente químico encapsulado puede implicar el equilibrio simple del agente químico y las vesículas en agua. Por ejemplo, el agente químico se puede poner en contacto en forma sólida con una dispersión acuosa de vesículas poliméricas e incubarlo, opcionalmente con agitación, para solubilizar el agente activo en las vesículas dispersadas. De manera alternativa, el agente químico disuelto en un disolvente orgánico se puede emulsionar en una dispersión acuosa de vesículas poliméricas, por lo que el disolvente y el agente se incorporan en el núcleo de las vesículas, seguido por la evaporación del disolvente del sistema.

40 Las vesículas usadas en la invención se pueden formar a partir de dos o más copolímeros en bloque diferentes. Por ejemplo, se pueden formar a partir de un copolímero en bloque que comprende un bloque hidrófilo de poli(óxido de alquileo), y a partir de un copolímero en bloque que tiene un bloque hidrófilo que comprende un monómero dipolar. En esta realización, en el método de formación de vesículas, se usa una mezcla de los dos copolímeros en bloque. Una mezcla adecuada sería, por ejemplo, una proporción 75:25 en peso de PMPC-PDPA y PEO-PDPA.

En general, en los métodos descritos anteriormente se mezcla del 0,01% al 10% (p/p) de agente químico con el copolímero.

45 Las vesículas se usan en esta invención para administrar ingredientes farmacéuticamente y cosméticamente activos a través de o en una capa epitelial en el cuerpo humano o animal.

Epitelio significa un tejido celular membranoso que cubre una superficie libre o que recubre un tubo o cavidad de un cuerpo humano o animal y que sirve especialmente para encerrar y proteger las otras partes del cuerpo, para

producir secreciones y para funcionar en la asimilación. Dicho tejido que se aísla del cuerpo humano o animal, o que se cultiva *in vitro*, que incluye los modelos epiteliales conocidos en la técnica, también está incluido dentro del término "epitelio".

5 Existen muchos tipos diferentes de células epiteliales, que incluyen las células escamosas, cúbicas, columnares y transicionales. Una capa epitelial puede ser simple (comprende una única capa de células), estratificada (comprende más de una capa de células) o puede ser pseudoestratificada con cilios (capa simple de células con cilios).

Las células epiteliales recubren la mayoría del sistema digestivo, el aparato reproductor de hembras y machos, el aparato respiratorio y urinario, y también forman la piel. La capa más externa de la piel humana está compuesta de células epiteliales muertas, estratificadas y queratinizadas. Esto se conoce como epidermis.

10 Las vesículas de esta invención se usan en la administración de agentes químicos a través de la epidermis, la mucosa oral o la cavidad bucal. En una realización preferida adicional, las vesículas se usan en la administración bronquial, por lo que las vesículas entran en el cuerpo mediante inhalación.

15 Como se detalló anteriormente, los epitelios pueden comprender más de una capa de células. La composición de vesículas se puede adaptar para la administración a través de los epitelios para seleccionar como objetivo inmediatamente las células de las capas superiores, o para permitir el transporte y la difusión a través de las capas hacia los niveles inferiores. Preferiblemente, al menos una proporción de las vesículas entran en las células epiteliales y liberan el agente químico en el citosol celular. En esta memoria descriptiva esto se denomina administración "intra-epitelial". Por ejemplo, cuando el agente químico es un agente anti-fúngico y las vesículas se aplican en la piel, es importante que el agente químico se libere entre y dentro de las células, para asegurar que se erradica toda la infección. En una realización alternativa, las vesículas pasan completamente a través del epitelio. Esto se denomina administración "trans-epitelial".

20 Las vesículas que tienen un bloque hidrófilo que comprende un monómero dipolar, en particular PMPC, son absorbidas fácilmente por las células de las capas superiores de los epitelios, mientras las vesículas que tienen un bloque hidrófilo de PEG tienen una absorción más lenta. Así, mediante el uso de una mezcla de vesículas que tienen diferentes bloques hidrófilos, se puede controlar la difusión de las vesículas a través de la piel.

25 El agente químico es cualquier entidad que se pueda asociar con las vesículas, y que se administre de manera deseable a través de un epitelio. Preferiblemente, el agente químico se encapsula dentro de las vesículas. El agente químico puede ser, por ejemplo, un ingrediente farmacéuticamente o cosméticamente activo. De manera alternativa puede ser un agente de formación de imágenes. En una realización de la invención, un agente de formación de imágenes actúa como una "molécula indicadora", y se administra en el epitelio junto con uno o más agentes químicos diferentes.

El agente químico se puede conjugar con un agente de formación de imágenes, tal como un colorante fluorescente. En una realización adicional, se asocian independientemente un agente activo y un agente de formación de imágenes con las vesículas.

35 Un agente de formación de imágenes adecuado para el uso en la presente invención es cualquier marcador que emite fluorescencia cuando se excita con radiación electromagnética, y se puede asociar con las vesículas. En general, el marcador fluorescente se encapsula dentro del núcleo acuoso de las vesículas. Sin embargo, cuando el marcador fluorescente es hidrófobo, se asocia más generalmente con la membrana hidrófoba. Los colorantes fluorescentes, tales como rodamina, fluoresceína, BODIPY® y NBD son especialmente adecuados.

40 Cuando el ingrediente activo es cosméticamente activo, la composición se puede denominar composición cosmética, y puede comprender además uno o más adyuvantes dermatológicamente aceptables.

45 En una realización de esta invención, la composición es una composición cosmética, y el ingrediente cosméticamente activo es un antioxidante, tal como Coenzima Q₁₀ o Vitamina C. La encapsulación de antioxidantes puede incrementar su solubilidad, estabilidad y administración, y mejorar su distribución en la piel. Debido a que la mayoría de antioxidantes son insolubles en agua, la administración de estos compuestos por medio de los liposomas existentes y de otras preparaciones tópicas, tales como cremas y geles, es mala debido a la naturaleza de barrera de la piel.

50 En una composición cosmética, el o los adyuvantes dermatológicamente aceptables no deberían producir efectos secundarios irritantes en la piel. La composición puede estar en forma de un gel acuoso, un producto sólido, tal como un polvo compactado, o de manera alternativa estar en forma de una barra. Los adyuvantes pueden comprender vitaminas, hormonas, antioxidantes, agentes conservantes, rellenos, perfumes, espesantes, hidratantes, agentes humectantes, polímeros aniónicos, no iónicos o anfotéricos y cosméticos adicionales o agentes activos dermatológicos. Los rellenos pueden estar en forma de polvos muy finos, y pueden ser de origen natural o sintético. Los rellenos incluyen polvos minerales tales como talco, polvos vegetales tales como polvo de almidón de maíz o polvos orgánicos tales como nailon o polvo de poliéster. Además de los rellenos, los colorantes y pigmentos también pueden formar parte de la composición cosmética.

Cuando el ingrediente activo es farmacéuticamente activo, la composición de la invención se puede denominar composición farmacéutica, y puede comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 El ingrediente farmacéuticamente activo puede ser, por ejemplo, un antibiótico, un antifúngico, un antineoplásico o agente inmunosupresor, un anestésico local, antiviral, antiséptico, antipruriginoso, compuesto parasiticida, corticoesteroide o un tratamiento para el eccema, psoriasis, verrugas, callos, alopecia y disfunción eréctil.

10 La composición puede estar en forma de una disolución, dispersión, crema, gel, implante, pomada, emulsión, suspensión, polvo, pasta, parche, cápsula, supositorio, spray o aerosol. Preferiblemente, la composición está en forma de una crema para aplicarla a la piel. Las vesículas pueden estar dispersadas en una crema, pomada o gel farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las vesículas pueden estar en suspensión acuosa. De manera alternativa, la composición según el primer aspecto de la invención se puede secar, y de ese modo la composición farmacéutica se proporciona en forma de polvo.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para el uso en tales composiciones se conocen bien en la técnica.

15 En el uso terapéutico, la composición se puede administrar mediante inhalación, de manera tópica, transdérmica, o en la cavidad bucal. Se prefiere la administración tópica. Preferiblemente, la composición pasa a través de la piel.

20 Las vesículas asociadas con el agente químico (o "activo") se ponen en contacto con las células de tal manera que estimulan la absorción de las vesículas por las células. *In vitro*, en general, las células se cultivan en un medio de cultivo y después se siembran en compuestos adecuados tales como los basados en alodermis humana esterilizada (Chakrabary *et al.*; Br J Dermatol. 1999, 141 (5): 811-23). Las vesículas se añaden después directamente a las células en el soporte. En general, se añade un volumen conocido de dispersión acuosa de vesículas (por ejemplo, 5-20 mg/ml en PBS) a las células en sus medios de cultivo.

Las células que se ponen en contacto con las vesículas cargadas de agente activo pueden ser células epiteliales humanas o animales.

La invención se ilustrará a continuación mediante los siguientes Ejemplos y Figuras, en los que:

25 la Figura 1 muestra la tasa de absorción de polimerosomas en Fibroblastos Dérmicos Humanos (HDF) mediante el uso de citometría de flujo;

la Figura 2 muestra la tasa de absorción de polimerosomas mediante citometría de flujo para polimerosomas de PMPC, polimerosomas de PEG, y una mezcla de polimerosomas de MPC y PEG;

la Figura 3 muestra la cantidad de absorción de polimerosomas por las células HDF;

30 la Figura 4 muestra (a) la penetración cutánea de vesículas de PMPC-PDPA en función del tiempo; (b) el cuadrado de la penetración cutánea en función del tiempo;

la Figura 5 muestra la difusión de polimerosomas a través de piel humana extirpada, que muestra que después de 5 horas el 50% de los polimerosomas han difundido a través de la piel que comprende un epitelio y dermis intactas (barras de error, DE, n=3); y

35 la Figura 6 muestra una imagen de CLSM de la administración mediada por polimerosomas de rodamina a piel modificada mediante ingeniería tisular.

la Figura 7 muestra el *P. gingivalis* intracelular recuperado tras el tratamiento con concentraciones crecientes de metronidazol libre (Met), metronidazol encapsulado (MV), vesículas solamente (Vesícula) o DMEM, gentamicina (Gen) y gentamicina encapsulada (GV) (eje Y = % de invasión celular); y

40 la Figura 8 muestra las células H-357 inviables tras el tratamiento con concentraciones crecientes de metronidazol libre (Met), metronidazol encapsulado (MV), vesículas solamente (Vesícula) o DMEM, gentamicina (Gen) y gentamicina encapsulada (GV) (eje Y = % de muerte celular);

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de copolímeros

45 Se usó 2-(metacriloiloxi)etil fosforilcolina (MPC; > 99 %) tal como se recibió (Biocompatibles UK Ltd). Se adquirió metacrilato de 2-(diisopropilamino)etilo (DPA) de Scientific Polymer Products (EE.UU.). Se adquirió bromuro de cobre (I) (CuBr; 99,999 %), 2,2'-bipiridina (bpy), metanol e isopropanol de Aldrich, y se usaron tal como se recibieron. La sílice usada para la eliminación del catalizador de cobre para ATRP fue gel de sílice 60 de grado de cromatografía en columna (0,063-0,200 mm) adquirido de E. Merck (Darmstadt, Alemania). El iniciador de 2-bromo-2-metilpropanoato de 2-(*N*-morfolino)etilo (ME-Br) se sintetizó según un procedimiento informado previamente (Robinson, K. L., *et al.*, *J. Mater. Chem.* 2002, 12, 890).

50

El copolímero PMPC₂₅-PDPA₇₀ se sintetizó mediante un procedimiento ATRP, como se informó en otra parte (Du, J., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 17982). Brevemente, un matraz Schlenk con una barra agitadora magnética y un tapón de caucho se cargó con Cu (I) Br (25,6 mg, 0,178 mmol) y MPC (1,32 g, 4,46 mmol). El iniciador ME-Br (50,0 mg, 0,178 mmol) y el ligando bpy (55,8 mg, 0,358 mmol) se disolvieron en metanol (2 ml), y esta disolución se desoxigenó haciendo burbujear N₂ durante 30 minutos antes de inyectarla en el matraz mediante el uso de una jeringa. Las proporciones molares relativas de [MPC]: [ME-Br]: [CuBr]: [bpy] fueron 25: 1: 1: 2. La reacción se llevó a cabo bajo una atmósfera de nitrógeno a 20 °C. Después de 65 minutos, se inyectó una mezcla desoxigenada de DPA (6,09 g, 28,6 mmol) y metanol (7 ml) en el matraz. Después de 48 h, la disolución de reacción se diluyó mediante la adición de isopropanol (alrededor de 200 ml) y después se hizo pasar a través de una columna de sílice para eliminar el catalizador.

Para la síntesis de PEO-PDPA, se adaptó el procedimiento seguido en Vamvakaki *et al.* en *Macromolecules*; 1999; 32(6) págs. 2088-2090, tal como se detalla a continuación.

El poli(óxido de etileno) (PEO) protegido con monohidroxilo fue donado por Inspec U.K. Los análisis mediante GPC proporcionaron valores de Mw/Mn de 1,10 para PEO; los grados de polimerización fueron 22 ó 45 para PEO. En una síntesis típica, se añadió PEO (5,0 g) disuelto en 100 mL de THF seco a un matraz de fondo redondo bajo nitrógeno seco. Se añadió naftaleno potásico (2,50 mmol) en THF a través de una aguja de dos puntas, y la disolución de reacción se agitó a 30 °C durante 1-2 h para formar el macro-iniciador de alcoholato. Se añadió metacrilato de amina terciaria recién destilado (5-15 mL), y se dejó desarrollar la polimerización durante 4 h antes de detenerla con metanol. En ciertos casos, las polimerizaciones se llevaron a cabo a 35 ó 50 °C. El disolvente se eliminó a vacío, el copolímero se redisolvió en HCl diluido, y el naftaleno insoluble en agua se eliminó mediante filtración. Se obtuvo PEG₁₁₃-PDPA₇₁ y PEG₁₀-PDPA₃₀ con rendimientos elevados (95-100%). Se obtuvo un buen control del peso molecular de los copolímeros.

Ejemplo 2: Preparación de polimerosomas

Se produjeron polimerosomas de poli(2-metacriloxietil fosforilcolina)-poli(metacrilato de 2-(diisopropilamino)-etilo), (PMPC-PDPA) y poli(óxido de etileno)-poli(metacrilato de 2-(diisopropilamino)-etilo), composición de referencia (PEO-PDPA). Ambas formulaciones de polimerosomas se formaron mezclando los copolímeros en condiciones ácidas en PBS. El pH se elevó después y la dispersión de polimerosomas se extruyó a través de una malla de 200 nm y se sometió a sonicación para controlar su tamaño medio.

Ejemplo 3: Absorción de polimerosomas de MPC, PEG y mixtos en las células

Se produjeron polimerosomas de poli(2-metacriloxietil fosforilcolina)-poli(metacrilato de 2-(diisopropilamino)-etilo), (PMPC-PDPA), poli(óxido de etileno)-poli(metacrilato de 2-(diisopropilamino)-etilo) (PEO-PDPA, composición de referencia) y una mezcla 50:50 de los dos que contenía rodamina con una diversidad de tamaños alterando el tamaño de la malla de extrusión. Los polimerosomas se expusieron a fibroblastos dérmicos humanos y se usó la citometría de flujo para monitorizar la absorción celular de los polimerosomas a lo largo del tiempo. La Figura 1 muestra que existe una dependencia del tamaño para los polimerosomas de PMPC, pero no para los polimerosomas de PEG. Los polimerosomas de PMPC entran en las células de manera extremadamente rápida, mientras que existe un gran retraso para los polimerosomas de PEG (Fig. 2). La cantidad de polimerosomas absorbidos por las células se determinó mediante lisis celular y espectroscopía, y demostró que hubo una absorción mucho mayor de los polimerosomas de PMPC en comparación con los análogos de PEG (Fig. 3). Estas propiedades sugieren que los sistemas de polimerosomas se pueden adaptar para la administración a través de los epitelios para seleccionar como objetivo inmediatamente las células de las capas superiores (sistemas ricos en PMPC), o para permitir el transporte y la difusión a través de las capas a los niveles inferiores con el tiempo mediante la mezcla con sistemas de PEG.

Ejemplo 4: Difusión de polimerosomas a través de la piel

La difusión a través de la piel de dos formulaciones diferentes de polimerosomas sensibles al pH (PMPC-PDPA y la composición de referencia PEO-PDPA) como se describieron en el Ejemplo 2 se estudió en tres modelos diferentes: piel humana y de ratón modificada mediante ingeniería tisular, piel humana *ex vivo*, y experimentos *in vivo* en ratones afeitados. La difusión de polimerosomas se monitorizó marcando químicamente y físicamente los polimerosomas con el colorante fluorescente Rodamina B (como se describió en *Adv. Mater.* 2007, 19, 4238-4243). Los modelos de piel se expusieron a la dispersión de polimerosomas durante diferentes tiempos, y después se analizaron mediante microscopía de barrido láser confocal e histología criogénica, que mostraron la difusión de los polimerosomas de PMPC-PDPA a través de la piel. La primera técnica permite una monitorización en tiempo real de la difusión a través de la piel mediante la formación de imágenes simultáneas de la autofluorescencia natural que se genera de las diferentes proteínas de la ECM que comprende la piel y la rodamina de los polimerosomas.

El estudio en los tres modelos diferentes ha demostrado que los polimerosomas son capaces de difundir a través de la capa córnea y atravesar rápidamente la membrana basal hacia la dermis. La difusión depende de la química superficial del polimerosoma. De hecho, los polimerosomas de PEG tienen un coeficiente de difusión mayor que los polimerosomas de PMPC, y alcanzan más rápidamente la dermis. De hecho, se ha observado que los

polimerosomas de PMPC interaccionan con las células y se interiorizan de manera más eficaz que los análogos de PEG.

Ejemplo 5: Difusión de polimerosomas a través de la piel modificada mediante ingeniería tisular

5 Se usó una técnica no destructiva para visualizar la difusión de nanopartículas a través de los tejidos, que implicó un tejido cutáneo modificado que se incubó con una suspensión de polimerosomas y después se analizó mediante microscopía de barrido láser confocal (CLSM). Este microscopio permite la formación de imágenes multifuorescentes con una resolución sub-micrométrica en un espacio tridimensional. La técnica permitió la visualización tridimensional simultánea de la piel viva en verde (autofluorescencia de la piel) y la onda de difusión de las vesículas poliméricas en rojo. Parece que los polimerosomas penetran en los tejidos cutáneos según dos regímenes diferentes: primero de manera relativamente rápida, y después entran en una fase más lenta (Figura 4a). Esto indica que a medida que los polimerosomas alcanzan la capa epidérmica se ralentizan, según los datos obtenidos a partir de la histología. Esto se puede confirmar adicionalmente representando el cuadrado de la penetración cutánea de las vesículas, L^2 , en función del tiempo (Figura 4b). Los polimerosomas siguen una difusión doble según la ley de Fick (es decir, L^2 cambia linealmente con el tiempo), y este resultado sugiere que la difusión de los polimerosomas varía según la parte del tejido cutáneo que han alcanzado.

Ejemplo 6: Difusión de polimerosomas en modelos tridimensionales

Los modelos de modificación mediante ingeniería tisular de la mucosa oral imitan las condiciones *in vivo* mejor que las monocapas de células. Estos modelos tridimensionales son importantes para posibilitar el estudio del comportamiento y la respuesta de las células en una situación tridimensional. Este ejemplo demuestra cómo se pueden formar imágenes de la penetración de polimerosomas marcados de manera fluorescente en modelos de la mucosa oral.

Difusión de Polimerosomas a través de la Mucosa Oral

La mucosa oral modificada mediante ingeniería tisular de grosor completo está compuesta de queratinocitos orales normales y fibroblastos orales normales cultivados en un soporte de dermis desepidermizada (DED). Se cultivan durante 2 semanas en una interfase aire-líquido para estimular la organización. La formación de imágenes de la mucosa oral se consigue mediante el uso de la microscopía de barrido láser confocal.

Los polimerosomas se interiorizaron con avidez y penetraron en las capas epiteliales del modelo de mucosa oral de una manera dependiente del tiempo. Se pudo observar la difusión a través de la epidermis después de 6 horas.

Ejemplo 7: Velocidad de difusión de polimerosomas a través de piel humana

30 Se colocó piel humana extirpada que comprendía un epitelio y dermis intactas en una celda diseñada especialmente como se muestra en la Figura 5, en la que se hizo pasar un flujo circulatorio continuo de PBS por debajo de la superficie de la piel y a través de un espectrofotómetro UV-visible, mientras se colocaba una disolución de polimerosomas marcados con rodamina sobre la superficie superior de la piel. Como se muestra en la Figura 5, la difusión de polimerosomas a través de la capa de piel se pudo seguir a lo largo del tiempo, y un ~50% de los polimerosomas difundieron a través de la piel en 5 horas.

Ejemplo 8: Administración mediada por polimerosomas de rodamina en piel modificada mediante ingeniería tisular

Se prepararon polimerosomas como en el Ejemplo 2 y se cargaron con éster octadecílico de Rodamina como se describe más adelante.

40 La piel modificada mediante ingeniería tisular se expuso a los polimerosomas durante 24 hr, y después se formaron imágenes de la piel mediante microscopía de barrido láser confocal para determinar el grado de administración de la rodamina en las capas de la piel. La profundidad de la penetración y administración se puede apreciar en la vista lateral (ambos planos x-z e y-z).

Preparación de Vesículas

45 Se añadió el copolímero PMPC-PDPA a un vial de vidrio y se disolvió en una disolución de cloroformo:metanol 2:1, a una concentración de 4 mg/ml. El disolvente se evaporó a vacío, lo que dio como resultado una película copolimérica depositada sobre las paredes del vial. La película de copolímero se esterilizó en un autoclave y después se rehidrató en condiciones estériles mediante el uso de solución salina tamponada con fosfato (PBS 100 mM) para formar una suspensión de copolímero de 5 mg/ml. El pH de esta suspensión se redujo hasta pH 2 para solubilizar de nuevo la película, y el pH se incrementó hasta pH neutro. La dispersión se sometió a sonicación y se extruyó mediante el uso de un aparato LiposoFast con una membrana de filtro de 200 nm.

Encapsulación de Marcador Fluorescente Anfífilico e Hidrófobo

Se usó el siguiente colorante: octadecil éter rodamina B. Se disolvió en cloroformo para formar una disolución de 0,2 mg/ml. Se añadieron alícuotas de esta disolución a la muestra de copolímero PMPC-PDPA disuelto en

cloroformo/metanol 2:1. Los polimerosomas se prepararon después mediante rehidratación y sonicación de la película, como se describió anteriormente en el Ejemplo 2.

Ejemplo 9a: Encapsulación de metronidazol en vesículas

Se mezcló metronidazol con MPC₂₅-DPA₇₀ a pH 2 y después se elevó el pH a 7 para permitir la formación de vesículas, por lo que se encapsuló el fármaco en su núcleo central. El fármaco encapsulado se aisló del fármaco libre mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño. Se observó que las fracciones hasta los 8 mL fueron claras y no tuvieron densidad óptica, y así se consideraron el PBS de fondo. Sin embargo, las fracciones de 8 mL hasta 11 mL fueron turbias, lo que demuestra la presencia de vesículas. Al romper las vesículas reduciendo el pH, no se pudo detectar metronidazol. Después de 11 mL, las fracciones fueron claras de nuevo y se detectó metronidazol desde 25 hasta 32 mL, lo que constituye la fracción de metronidazol libre. Estos datos sugieren que durante el fraccionamiento en la columna, el fármaco se repartió desde las vesículas y hasta la disolución (ya que el metronidazol tiene un logP negativo y puede difundir fácilmente a través de la membrana de las vesículas). Por lo tanto, se supuso que tras la encapsulación de metronidazol, existe un equilibrio entre el fármaco encapsulado y el libre. Para el estudio de la actividad antimicrobiana del fármaco encapsulado, se usó esta formulación sin separar y se comparó con el fármaco libre solo para determinar la eficacia de la porción encapsulada en vesículas.

Ejemplo 9b: Generación de vesículas con metronidazol para el ensayo de invasión celular

El polímero se preparó como en el Ejemplo 9a. La película se disolvió añadiendo 2 ml de PBS esterilizado (pH 2) hasta que la disolución fue clara. La concentración de polímero fue 10 mg/ml. Después se esterilizó mediante el uso de un filtro de 0,2 µm. El pH de la disolución se ajustó a 7,4 con NaOH 1 M esterilizado, y las vesículas se purificaron mediante cromatografía de filtración en gel mediante el uso de sefrosa-agar 4B esterilizado (Sigma, Poole, Dorset, UK.). Para encapsular el metronidazol se prepararon disoluciones de metronidazol a una diversidad de concentraciones en DMEM: 0,0125, 0,125, 1,25 y 12,5 µg/ml. Se resuspendieron 200 µl de disolución de vesículas de 10 mg/ml en PBS en 1 ml de disolución de metronidazol-DMEM para proporcionar disoluciones de metronidazol de 0,01, 0,1, 1,0 y 10 µg/ml, respectivamente, con 2 mg/ml de vesículas. Después la disolución se sometió a sonicación durante 30 minutos para incrementar la eficacia de la encapsulación de metronidazol.

Ejemplo 9c: Comparación de la eficacia del fármaco antibiótico intracelular con la del fármaco libre con respecto a la destrucción intracelular de *P. gingivalis*

En este ejemplo se usó el ensayo de invasión de *P. gingivalis* (cepa ATCC 11834) para queratinocitos H-357, y el metronidazol encapsulado se preparó como en el Ejemplo 9b. Después de eliminar el *P. gingivalis* extracelular mediante 200 µg/ml de metronidazol y de lavar las células H357 3 veces con DMEM, se dispensaron cantidades crecientes de metronidazol encapsulado en 1 ml de DMEM en cada pocillo durante 3 horas a 37 °C con un 5% de CO₂. Después, se recogieron 200 µl del medio para el ensayo de viabilidad de H357 mediante el uso del ensayo de LDH. Además, la viabilidad de los queratinocitos H357 se ensayó en una placa diferente tratada de manera idéntica mediante el uso de yoduro de propidio y Hoechst. El metronidazol encapsulado se descartó y se lavó 3 veces con DMEM. Las membranas celulares de H357 se lisaron mediante el uso de saponina al 0,1% durante 5 minutos. Se usaron diluciones en serie del lisado para determinar el recuento de colonias.

Se mezcló metronidazol a concentraciones crecientes con las vesículas (2 mg/ml) a pH 2 y después el pH se elevó hasta pH 7 para encapsular el metronidazol. Después se sometió a sonicación durante 30 minutos para mejorar la encapsulación. La mezcla no se separó mediante cromatografía de intercambio por tamaño, de forma que el metronidazol libre estuvo en equilibrio con el metronidazol encapsulado. Se usó *P. gingivalis* (ATCC 33277) a un MOI de 100 para infectar células H357 durante 90 min. Después se lavaron 3 veces con PBS seguido de un tratamiento de 60 minutos con 200 µg/ml de metronidazol para destruir las bacterias extracelulares. Finalmente, la mezcla de metronidazol libre/encapsulado se añadió a las células H357 y se compararon con las células infectadas tratadas con metronidazol libre, DMEM (sin tratamiento con vesículas ni antibiótico), vesículas solas (sin metronidazol), gentamicina (un antibiótico que no destruye *P. gingivalis*) y metronidazol encapsulado. Después se usó saponina para liberar las bacterias intracelulares de las células H357, y se midió el número de *P. gingivalis* intracelular contando las colonias de diluciones en serie.

La Figura 7 muestra que una mezcla de metronidazol libre y encapsulado reduce significativamente ($p < 0,001$ (*), 0,007 (**), 0,020 (*) y 0,006 (**), respectivamente) la cantidad de bacterias intracelulares en comparación con DMEM o metronidazol libre solamente, a todas las concentraciones ensayadas. Sin embargo, la mezcla de metronidazol libre/vesículas no erradicó todas las bacterias intracelulares. Además, la gentamicina no pudo destruir las *P. gingivalis* intracelulares ni en forma libre ni en forma encapsulada, lo que demuestra que la destrucción de *P. gingivalis* intracelular es específica de la administración de metronidazol. Además, las vesículas solo parecen reducir los niveles de las bacterias intracelulares, lo que sugiere que esto tiene un efecto sobre la viabilidad celular de *P. gingivalis*. Este experimento se repitió dos veces más con resultados similares, excepto porque a concentraciones inferiores (0,01 y 0,1) el metronidazol libre y encapsulado no consiguió una diferencia significativa en comparación con el metronidazol libre solo, aunque se observó cierta inhibición. Sin embargo, por encima de estas concentraciones (1 y 10), la destrucción de *P. gingivalis* intracelular fue significativa.

5 También se determinó la viabilidad de H357 a todas las concentraciones diferentes de metronidazol, vesículas y gentamicina mediante el uso del ensayo de lactato deshidrogenasa (Figura 8). Estos datos demuestran que en todas las condiciones la viabilidad de H357 no fue significativamente diferente. El tratamiento con saponina provocó un 100% de muerte celular y se usó como control positivo. El tratamiento con metronidazol libre o metronidazol libre más encapsulado provocó menos muerte celular que el control de DMEM.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende nanovesículas con un diámetro de 50-1000 nm que tienen un núcleo acuoso y encapsulado con el núcleo acuoso de las nanovesículas, un agente químico, para el uso en un método de tratamiento mediante terapia, en la que el agente químico se administra de manera trans- y/o intra-epitelial a un cuerpo humano o animal a través de la epidermis, mucosa oral, cavidad bucal o mediante administración bronquial, en la que las nanovesículas comprenden un copolímero en bloque anfifílico que tiene un bloque hidrófilo y un bloque hidrófobo, la proporción del grado de polimerización del bloque hidrófilo respecto del bloque hidrófobo está en el intervalo de 1:2,5 a 1:8, y en la que el bloque hidrófilo está formado de monómeros polimerizables radicalmente insaturados etilénicamente que comprenden un monómero dipolar, en la que el monómero dipolar es 2-metacrilatoiloxietilfosforilcolina y el bloque hidrófobo está formado de metacrilato de (diisopropil) aminoetilo (DPA) o metacrilato de (dietil)aminoetilo (DEA).

Figura 1

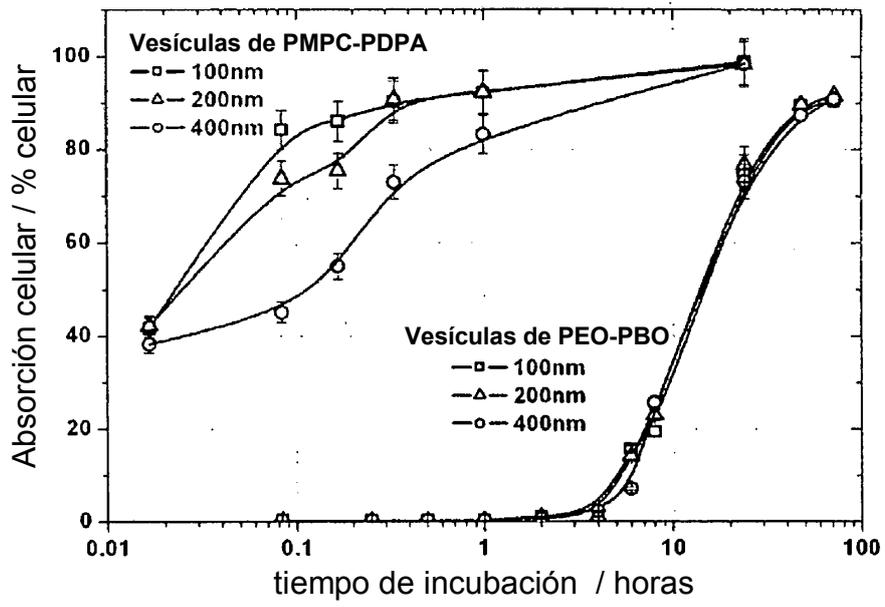


Figura 2

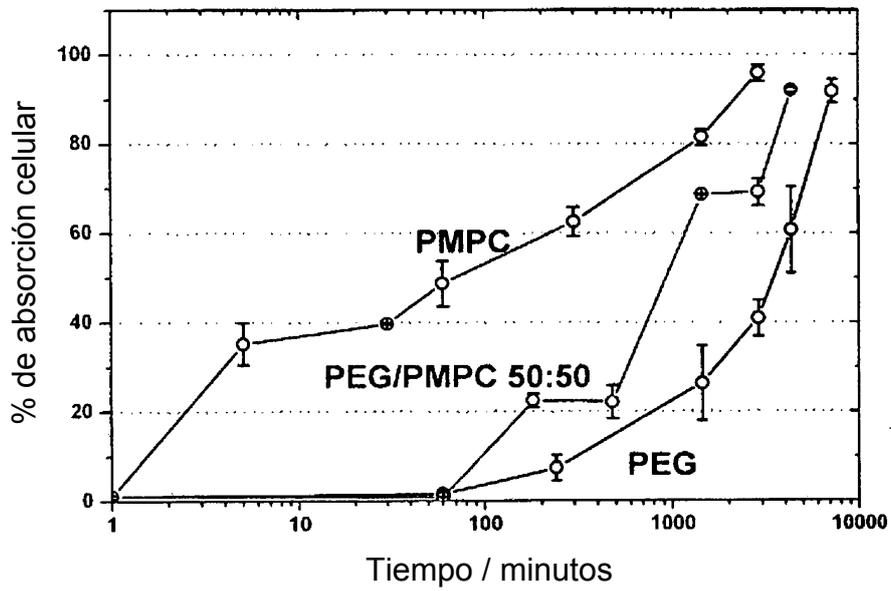


Figura 3

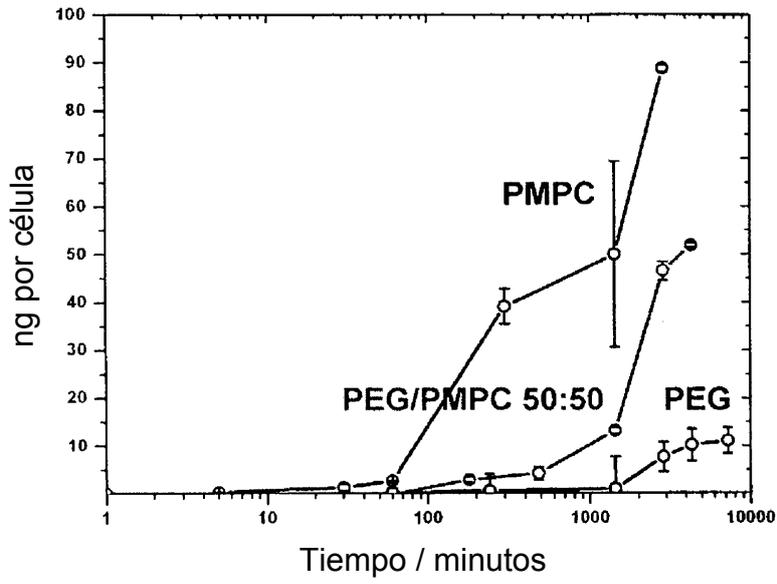


Figura 4

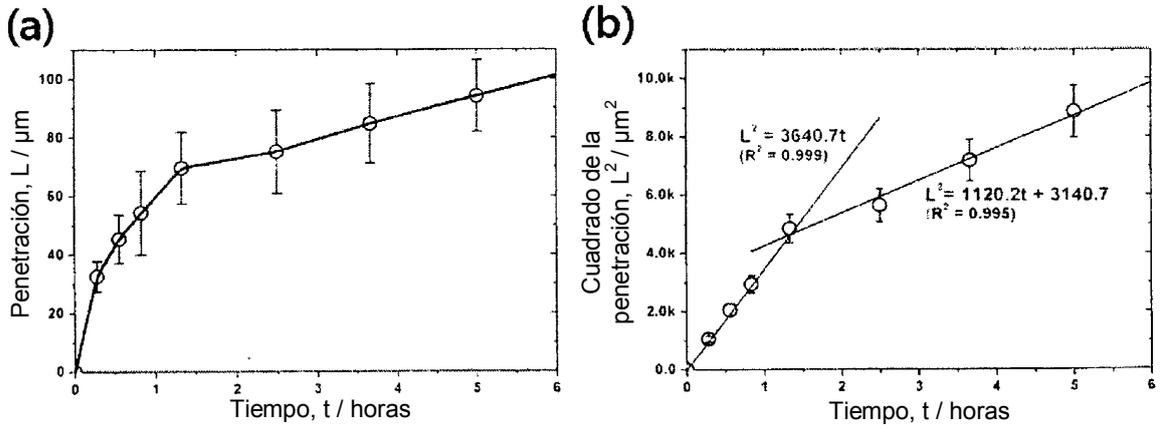


Figura 5

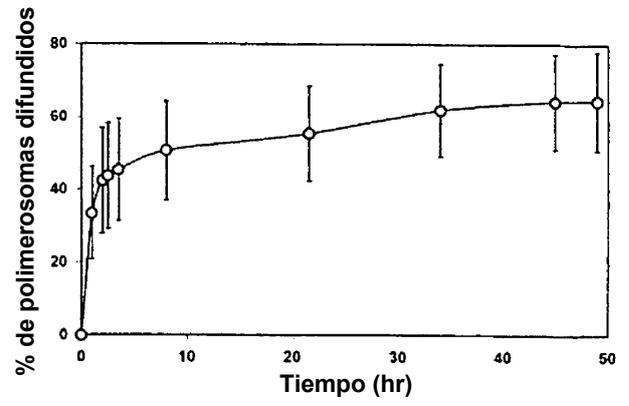
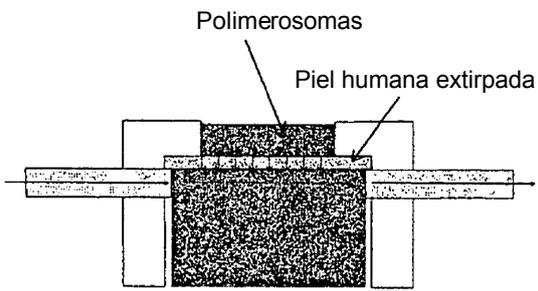


Figura 6

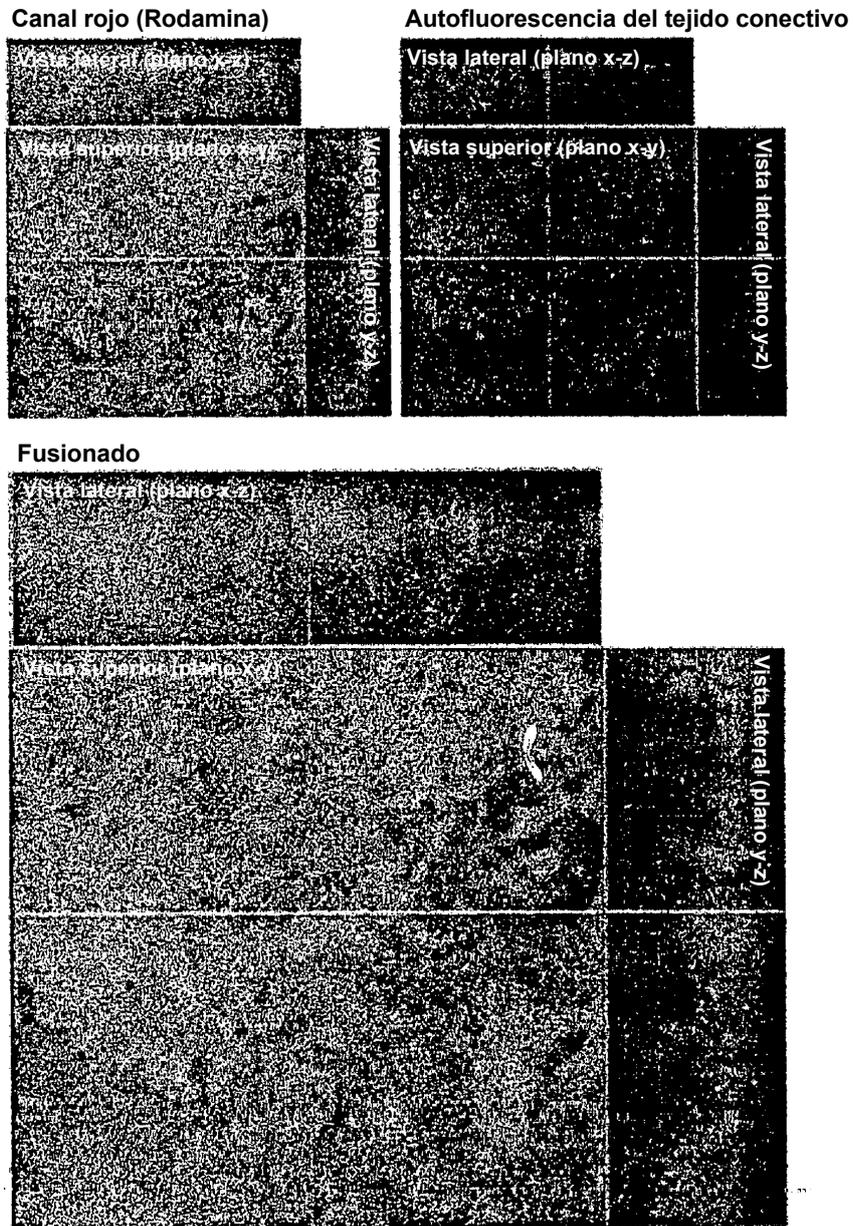


Figura 7

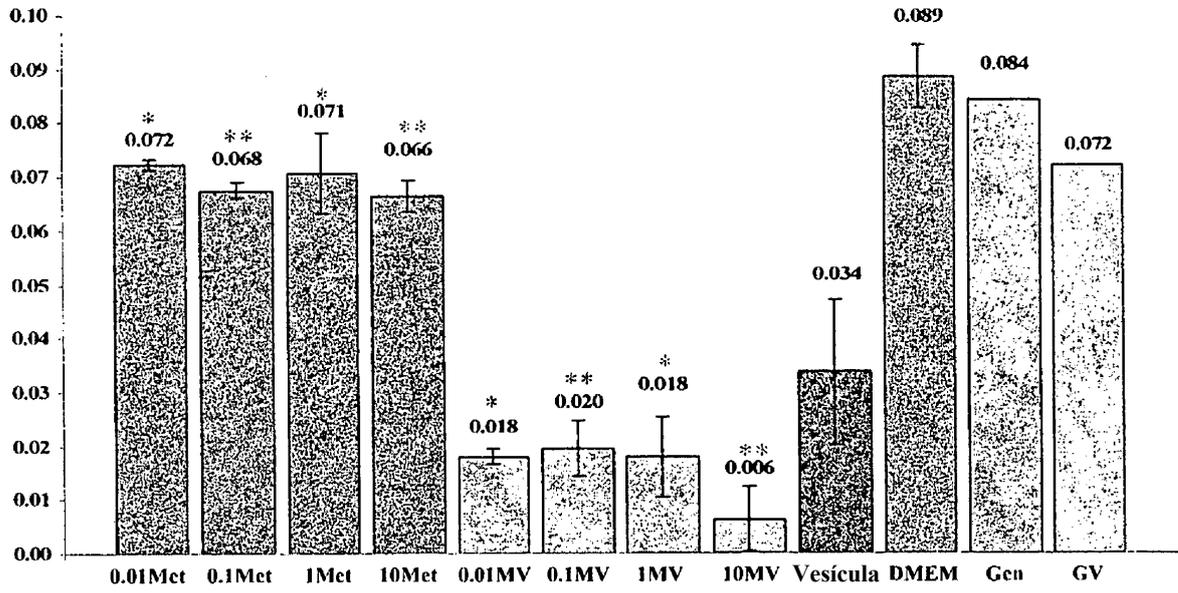


Figura 8

