

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 974**

51 Int. Cl.:

A61L 27/54 (2006.01) **A61L 27/28** (2006.01)
A61L 27/40 (2006.01)
A61L 27/44 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61M 31/00 (2006.01)
A61L 27/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2006 E 06775100 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 1922094**

54 Título: **Dispositivos para la orientación al sistema linfático**

30 Prioridad:

12.08.2005 US 707534 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.01.2016

73 Titular/es:

**LIU, JIANG (33.3%)
Suite 401, Building 146, Swan Lake Garden, Area
B, BinHu District
WuXi City, JiangSu Province 214125, CN;
JOHNSTON, MICHAEL RICHARD (33.3%) y
WU, XIAO YU (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LIU, JIANG;
JOHNSTON, MICHAEL RICHARD y
WU, XIAO YU**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 556 974 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

Dispositivos para la orientación al sistema linfático

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un nuevo sistema dirigido de distribución de fármacos capaz de distribuir y retener agentes terapéuticos en el sistema linfático, una posición anatómica que está afectada frecuentemente por cáncer y otras enfermedades. En particular, esta invención se refiere a la distribución dirigida de agentes terapéuticos formulados en conjunto con vehículos micro y/o nanoparticulados a los vasos linfáticos y nódulos linfáticos y dispositivos implantables que contienen los vehículos particulados.

Antecedentes de la invención

10 El sistema linfático está formado por una extensa red de vasos de pared fina y nódulos linfáticos que permean a casi todos los sitios anatómicos del cuerpo. El papel principal del sistema linfático es transportar proteínas plasmáticas, materia particulada y células desde el fluido intersticial de vuelta a la corriente sanguínea. Además el sistema linfático elimina de forma activa los restos celulares, microorganismos y células tumorales. Muchas enfermedades afectan al sistema linfático, algunas de las cuales podrían controlarse si los compuestos farmacéuticos pudieran
15 distribuirse en el sistema linfático de forma más efectiva.

Las células tumorales pueden entrar en el sistema linfático y transportarse a los nódulos linfáticos donde pueden desarrollarse tumores secundarios (metástasis). Ya que la interconexión entre los sistemas linfático y venoso es extensa, el tumor en el sistema linfático a menudo se extiende a través de la sangre a otros órganos.

20 En la mayoría de los cánceres los sitios iniciales de enfermedad metastásica son los nódulos linfáticos regionales, que es una señal universal de progresión tumoral. La metástasis del nódulo linfático se considera como uno de los factores de pronóstico más importantes en las opciones de acceso al tratamiento en pacientes con cáncer. Una vez que el tumor implica al sistema linfático, los nódulos linfáticos pueden actuar como recipientes de almacenamiento donde las células cancerígenas pueden echar raíces y esparcirse a otras regiones del cuerpoⁱ. Incluso los pacientes que han experimentado cirugía potencialmente curativa aún tienen una incidencia significativa de recurrencia y
25 muerte posterior, que en parte puede atribuirse a micrometástasis en el sistema linfático.

Aproximadamente el veinte por ciento de los americanos mueren de cáncer, la mitad de los cuales son de cáncer de pulmón, colorrectal y mama. El cáncer de pulmón es la causa principal de muertes por cáncer tanto en hombres como en mujeres. A pesar de los recientes avances en el tratamiento del cáncer de pulmón, la tasa de supervivencia a los 5 años es aún de menor del 15%. Su estadificación, pronóstico y tratamiento están todos íntimamente
30 relacionados con el grado de implicación del sistema linfático. Una vez que ha ocurrido la metástasis linfática, la posibilidad de cura cae significativamente. En el cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC) la supervivencia después de la cirugía cae a aproximadamente la mitad si el tumor se encuentra en los nódulos linfáticos en el pulmón, y a otra mitad si los nódulos linfáticos justo fuera del pulmón (mediastino) están implicados. Incluso los pacientes con enfermedad temprana que han experimentado cirugía potencialmente curativa aún tienen una incidencia significativa de recurrencia y muerte posteriorⁱⁱ. Aproximadamente el 30% de pacientes con NSCLC en
35 etapa temprana desarrollan enfermedad recurrente^{iii,iv}. Esto sugiere que células tumorales micrometastáticas ocultas, que no son detectables por las técnicas de estadificación actuales y métodos histopatológicos convencionales, se han extendido ya a los nódulos linfáticos regionales u órganos distantes en el momento de la cirugía.

40 El cáncer colorrectal también provoca morbilidad y mortalidad significativa. La evaluación precisa de la metástasis del nódulo linfático es importante tanto pronóstica como terapéuticamente.^v La cirugía permanece como el pilar del tratamiento para cáncer colorrectal localizado. Pero sin tratamiento adicional casi el 50% de los pacientes tratados quirúrgicamente mueren por recaída y progresión metastásica. La quimioterapia adyuvante sistémica con régimen basado en fluorouracilo solo da una modesta ventaja de 5 años de supervivencia con la enfermedad en Etapa III.

45 De forma similar, la metástasis del nódulo linfático es uno de los factores más importantes en la evaluación del pronóstico de pacientes con cáncer de mama y correlaciona con la supervivencia libre de enfermedad y total mejor que cualquier otro factor pronóstico^{vi}. Tantas como un tercio de las mujeres con cáncer de mama invasivo tendrán implicación del nódulo linfático en el diagnóstico. Las tasas de supervivencia de cinco años caen del 80 por ciento en
50 pacientes sin metástasis del nódulo linfático a 45 a 50 por ciento en pacientes que tienen metástasis en el nódulo linfático.

El linfoma es un tumor primario del sistema linfático que puede implicar nódulos linfáticos en sitios a lo largo del cuerpo. Muchos linfomas se tratan de forma efectiva con quimioterapia sistémica. Sin embargo, algunas de las formas más virulentas se vuelven resistentes a la quimioterapia estándar y recaen a pesar de la respuesta inicial.

55 El control de la metástasis linfática mejora el resultado de muchos cánceres. Actualmente, las terapias locales-regionales, tal como cirugía y radiación, son los medios más efectivos para tratar los vasos linfáticos regionales, aunque a menudo no erradican completamente toda la enfermedad metastásica linfática. La quimioterapia sistémica

está limitada por los efectos secundarios sistémicos y a menudo no puede penetrar de forma efectiva el sistema linfático, presumiblemente por una "barrera sangre-linfa". La distribución de fármaco linfático se vuelve incluso más comprometida después de cirugía extensiva por cáncer debido a la alteración de vasos sanguíneos y linfáticos. Actualmente, hay una carencia de opciones de tratamiento efectivas para dirigirse específicamente a la metástasis linfática. Por lo tanto, las modalidades terapéuticas efectivas basadas en un mejor entendimiento de la patofisiología del sistema linfático se necesitan claramente para mejorar el tratamiento de tumor en el sistema linfático.

La función fisiológica distinta del sistema linfático en el aclaramiento de materias particuladas extrañas ha generado interés en el uso de sistemas microparticulados para la orientación de agentes terapéuticos a los nódulos linfáticos regionales. Las partículas coloidales tienen un papel importante en la caracterización de las propiedades del sistema linfático además de un posible papel en la distribución de fármacos. Un descubrimiento coherente es que las partículas coloidales administradas de forma intersticial se absorben principalmente por el sistema linfático y se acumulan en grados variables en los nódulos linfáticos regionales. El uso de partículas coloidales como agentes radiodiagnósticos se ha revisado por Strand et al.^{vii} Se examinó una amplia gama de materiales incluyendo partículas sólidas, emulsiones y vesículas (liposomas). Su distribución depende fuertemente del tamaño de partícula, con los coloides sugeridos para la linfoscintigrafía por tener un tamaño medio de aproximadamente 40-60 nm. La absorción en los nódulos linfáticos regionales después, por ejemplo, de administración subcutánea es bastante pequeña y los valores de 1-10% son típicos después de 2-5 horas^{viii}. Esta biodistribución selectiva única llevó al desarrollo de materiales coloidales, tales como liposomas^{ix,x,xi}, partículas de carbono activo^{xii,xiii}, emulsiones^{xiv,xv}, lípidos^{xvi} y particulados poliméricos^{xvii,xviii} como vehículos de fármaco.

El peritoneo y la pleura son los revestimientos delgados que cubren la superficie interior de las cavidades peritoneal y pleural y la superficie de muchos órganos y tejidos que contienen. Tanto el peritoneo como la pleura son ricos en vasos linfáticos. En la cavidad pleural, hay muchas conexiones entre el pulmón y el drenaje linfático pleural, especialmente en el mediastino. De forma similar, se encuentran extensas interconexiones entre el drenaje linfático peritoneal y visceral. El drenaje tiende a estar hacia los mismos nódulos linfáticos regionales donde las metástasis linfáticas se dan frecuentemente. Estas conexiones proporcionan una fuerte base fisiológica para el desarrollo de una estrategia de orientación al sistema linfático.

La pleura parietal es rica en capilares linfáticos. Muchos estomas abren directamente al espacio pleural, dejando a la materia particulada fácil acceso a los vasos linfáticos. Shinohara H.^{ix} examinó la topografía pleural en el hámster dorado usando microscopía de barrido electrónico. Aproximadamente 1.000 estomas linfáticos por espacio pleural se identificaron. Los vasos linfáticos pleurales parietales drenaron linfa hacia los nódulos linfáticos torácicos regionales a través de múltiples rutas. Eliminando la contribución de los vasos linfáticos pleurales viscerales en un estudio de pneumonectomía, los actuales inventores mostraron que la absorción dominante de partículas es a través de la pleura parietal^x. El mecanismo exacto de como las partículas viajan en los vasos linfáticos no está claro. Una explicación es que las partículas se fagocitan y se transportan por células mononucleares, especialmente macrófagos, a los nódulos linfáticos regionales.

La distribución de agentes anticancerígenos a nódulos linfáticos regionales se ha intentado en el tratamiento de cáncer de ovario, cáncer de esófago y cáncer de mama. En estos estudios, se usaron partículas de carbono o sílice como vehículos de fármaco y se inyectaron de forma subcutánea (s.c.) o intratumoral. Tanto los ensayos experimentales como los clínicos tempranos revelaron considerable acumulación de fármaco en los nódulos linfáticos y niveles reducidos de fármaco citotóxico en el plasma^{xxi}. Se acepta generalmente que la absorción linfática de partículas coloidales administradas de forma intravenosa (i.v.) es improbable ya que los coloides no pueden experimentar el paso transcápilar por su tamaño. Después de la administración i.v., se absorben principalmente por los macrófagos del hígado y del bazo. Como resultado, es difícil modificar el destino de vehículos de fármaco considerablemente a menos que se elijan diferentes rutas de administración.

La orientación para propósitos de distribución de fármacos a los nódulos linfáticos se ha intentando usando liposomas, emulsiones y varios sistemas de partículas no lipídicas. Los liposomas, que son vesículas lipídicas versátiles, no tóxicas y biocompatibles, han recibido la mayor cantidad de atención como vehículos de varios fármacos. Con los sistemas de liposomas el mejor nivel grabado de absorción en los nódulos linfáticos es de 1-2% a las 48 horas. Esto puede aumentarse a aproximadamente 5% por la unión de anticuerpos.

Hay información limitada en la orientación al sistema linfático usando sistemas de distribución de fármacos poliméricos. Aunque se han desarrollado polilactidas (PLA), poliglicolidas (PGA) y sus copolímeros (PLGA)^{xxii} para distribución local de agentes quimioterapéuticos, su diseño primario fue para el tratamiento de peritonitis cancerosa más que para la orientación a la metástasis linfática^{xxii}. La absorción linfática de microesferas poliméricas fue un descubrimiento incidental durante los experimentos^{xxi xxx}. Un sistema de distribución de fármaco por nanoesfera de PLGA se desarrolló particularmente para la orientación linfática subcutánea (s.c.)^{xxvi}. Los tamaños de partícula eran menores de 100 nm. Las partículas de PLGA se hicieron por ingeniería genética de superficie con PLA:PEG (Polietilenglicol) para aumentar el drenaje de partícula desde el sitio de inyección a los nódulos linfáticos regionales.

La nanopartícula híbrida de polímero-lípido recientemente desarrollada que contiene complejo de doxorubicina (PLN-Dox) se ha mostrado que mejora la citotoxicidad *in vitro* hacia el tipo salvaje y las líneas celulares de tumor de

mama humano MDR *in vitro*. El PLN-Dox mostró citotoxicidad *in vitro* mucho mayor frente a la línea celular que sobreexpresa P-gp^{xxvixxxviii}.

Debido a la anatomía y fisiología única de la pleura, la biodistribución de partículas después de la administración intrapleural no se ha investigado adecuadamente. El descubrimiento incidental de la translocación del polvo de talco a nódulos linfáticos regionales se presentó después de pleurodesis en suspensión de talco^{xxxix xxx}, que es un procedimiento normal en la gestión de la efusión pleural. Los experimentos tanto humanos como animales revelan que los depósitos de talco en la cavidad pleural pueden migrar a los nódulos linfáticos mediastinales presumiblemente a través de los vasos linfáticos pleurales^{xxxi}. Recientemente, se ha intentado la orientación de liposomas a nódulos linfáticos mediastinales por medio de administración intrapleural^{xxxii}. Las farmacocinéticas y absorción del nódulo mediastinal de liposomas de ¹¹¹In-avidina y ^{99m}Tc-biotina se determinaron usando la formación de imágenes escintigráfica. Los resultados de biodistribución de ¹¹¹In-avidina a 44 h mostraron 3,3% de absorción en nódulos mediastinales por inyección pleural.

Como la micrometástasis linfática puede dar por resultado la recurrencia tumoral local y la potencial expansión tumoral sistémica, es imperativo desarrollar una estrategia de orientación del fármaco para eliminar la micrometástasis linfática. Para que la estrategia tenga éxito, los fármacos anticancerígenos deberían distribuirse desde el sitio de aplicación al sitio de acción. La quimioterapia sistémica convencional no puede distribuir de forma efectiva fármacos anticancerígenos a los nódulos linfáticos sin incurrir en considerables efectos secundarios.

El documento US2004/0234597 describe un sistema de distribución controlado dirigido a un sitio específico, desencadenado por pH, que comprende nanoesferas encapsuladas en microesferas sensibles al pH. Pueden incorporarse agentes activos en las nanoesferas y/o microesferas. Como las microesferas se hinchan o disuelven en un intervalo de pH típicamente encontrado en tejido tumoral, los ingredientes activos se liberan de forma selectiva en estos sitios.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a dispositivos implantables que contienen un complejo bioactivo para la distribución dirigida y la retención de agentes terapéuticos al sistema linfático, como se describe en las reivindicaciones 1-41.

En otra realización la invención proporciona un procedimiento de preparación de un dispositivo implantable según la invención, como se describe en la reivindicación 42.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos mientras que indican realizaciones preferidas de la invención se dan por medio solo de ilustración, ya que varios cambios y modificaciones en el alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la biodistribución de ¹¹¹In-aminopoliestireno con diferentes tamaños a las 24 h después de la administración intrapleural en ratas. (n=4); * p<0,01 (ensayo *t* de Student).

La Figura 2 muestra la biodistribución de ¹¹¹In-aminopoliestireno con tamaño de partícula de ~2 µm en ratas como una función del tiempo después de la administración intrapleural; (n=4); * p<0,01 (ensayo *t* de Student).

La Figura 3 muestra el perfil de liberación de fármaco *in vitro* de microesferas de PLGA-PTX.

La liberación de fármaco acumulativa se midió diariamente del día 1 al 21 y se extendió después a cada 5 días hasta el día 51. La liberación *in vitro* de microesferas de PLGA cargadas con paclitaxel se midió en PBS por triplicado a temperatura de 37°C. 15 mg de microesferas cargadas con paclitaxel se suspendieron en 10 ml de PBS que contenía 0,1% (v/v) de Tween 80. Los tubos se giraron de lado a lado a 30 rpm a 37°C en un horno controlado de forma termostática y a intervalos temporales dados, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos y los 8 ml superiores del sobrenadante se guardaron para el análisis. Los gránulos de microesferas precipitados se suspendieron de nuevo en el medio de liberación sustituido. La cantidad de paclitaxel se determinó por extracción de paclitaxel en 3 ml de DCM. Después de sequedad, la muestra se reconstituyó en 2 ml de acetonitrilo en agua al 50:50 (v/v) y se analizó por HPLC.

La Figura 4 muestra varias muestras de esponja de gelatina y gelatina-alginato con diferentes tamaños, geometrías y contenidos.

La Figura 5 muestra perfiles de liberación acumulativos *in vitro* de paclitaxel a partir de microesferas de PLGA-PTX, esponjas de gelatina que contienen PLGA-PTX y PTX. El paclitaxel se midió en unas disoluciones de tampón fosfato que contenían calcio y magnesio y dodecilsulfato sódico al 0,5% (p/v) (SDS) a una concentración de 500 ng/ml para colagenasa bacteriana (tipo IV) por cuadruplicado. Las muestras se incubaron a 37°C y se agitaron horizontalmente a 100 min⁻¹ en una incubadora de agitación. A intervalos de tiempo dados, los tubos se centrifugaron a 5000 rpm

durante 15 min. 200 μ l de sobrenadante se pasaron a través de un filtro conducido por jeringa de 0,22 μ m con membrana PVDF. Una alícuota de 100 μ l de filtrado se mezcló con igual volumen de acetonitrilo. La mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se hizo alícuotas para la detección por HPLC. La cantidad de PTX se calculó a partir de las curvas de calibrado. Spon: Esponja; CL: reticulado.

- 5 La Figura 6 muestra los resultados de un ensayo clonogénico *in vitro* de células de cáncer de pulmón H460. Las células H460 se sembraron a densidad apropiada en platos de cultivo celular de 6 cm toda la noche antes de comenzar el tratamiento. Las células H460 se trataron con o bien paclitaxel libre, placebo de PLGA o PLGA-paclitaxel para evaluar la citotoxicidad. Paclitaxel, compuesto de PLGA-paclitaxel equivalente y vehículo de PLGA se solubilizaron en DMSO, y se diluyeron más con medio RPMI-1640 (DMSO <0,1%). El tratamiento de simulación con esta concentración de DMSO se implementó. A: citotoxicidad *in vitro* de PTX libre en comparación con PTX extraído de PLGA-PTX en el intervalo de concentración de 0,1 -1000 nM; B: comparación entre el tratamiento de PLGA y el control de simulación; C: citotoxicidad de paclitaxel como una función de tiempo de exposición a la concentración de Cl_{50} (5 nM).

Descripción detallada de la invención

- 15 Los presentes inventores han desarrollado un nuevo sistema de distribución de fármaco particulado capaz de distribuir agentes bioactivos tales como agentes antineoplásicos al sistema linfático, que incluye vasos linfáticos y nódulos linfáticos regionales y han desarrollado un dispositivo implantable impregnado con unos nuevos sistemas de distribución de fármacos particulados para el distribución dirigida al sistema linfático. En una realización particular el sistema linfático se dirige a través de administración intrapleural, intraperitoneal o subcutánea a través de
20 intervención quirúrgica.

Por consiguiente, la presente invención incluye un dispositivo implantable que comprende una matriz biocompatible y biodegradable impregnada con un complejo bioactivo adecuado para dirigirse de forma selectiva al sistema linfático, en donde el complejo bioactivo comprende uno o más materiales formadores de partículas y uno o más agentes bioactivos.

- 25 El "sistema linfático" como se usa en esta memoria se refiere tanto al sistema linfático primario, que incluye capilares linfáticos, vasos linfáticos y nódulos linfáticos como a los tejidos linfoides secundarios que son ricos en vasos linfáticos tal como tejido linfóide asociado a los intestinos, mesenterio, placas de Peyer, omento y tejido linfático accesorio tal como tejido paranodal en varios sitios del cuerpo.

- 30 Como se usa en esta memoria, el término "partículas" se refiere a nanopartículas, micropartículas o tanto nanopartículas como micropartículas.

- El término "micropartículas" se reconoce en la técnica, e incluye microesferas y microcápsulas, además de estructuras que pueden no situarse fácilmente en cualquiera de las dos categorías anteriores, todas con dimensiones en promedio de menos de 1000 micras. El término "microesferas" se reconoce en la técnica e incluye
35 estructuras coloidales esencialmente esféricas, por ejemplo, formadas a partir de polímeros biocompatibles tales como composiciones, que tienen un tamaño que oscila de aproximadamente uno o más hasta aproximadamente 1000 micras. En general, "microcápsulas", también un término reconocido en la técnica, pueden distinguirse de microesferas, porque las microcápsulas están generalmente recubiertas por una sustancia de algún tipo, tal como una formulación polimérica. Si las estructuras son menores que aproximadamente una micra de diámetro, entonces los términos reconocidos en la técnica correspondientes "nanoesfera", "nanocápsula" y "nanopartícula" pueden
40 utilizarse. En ciertas realizaciones, las nanoesferas, nanocápsulas y nanopartículas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 500, 200, 100, 50 o 10 nm.

El término "complejo bioactivo" como se usa en esta memoria se refiere a un complejo que comprende uno o más materiales formadores de partículas y uno o más agentes bioactivos.

- 45 El término "material formador de partículas" como se usa en esta memoria se refiere a un material que es adecuado para la administración a un sujeto que puede combinarse con un agente bioactivo y formarse en una partícula adecuada para la distribución del agente bioactivo al sistema linfático.

- En una realización, el complejo bioactivo comprende micropartículas o nanopartículas o una combinación de micro y nanopartículas del material formador de partículas y el agente bioactivo, siendo dicho complejo de tamaño suficiente para entrar en el sistema linfático. El término "tamaño suficiente" como se usa en esta memoria se entendería
50 fácilmente por un experto en la técnica para indicar un tamaño en donde las partículas pueden migrar a través de los vasos linfáticos o retenerse en los nódulos linfáticos. En una realización particular, las partículas oscilan en tamaño de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 100 nm. En otra realización las partículas oscilan en tamaño de aproximadamente 140 nm a aproximadamente 1500 nm. En otra realización las partículas oscilan en tamaño de aproximadamente 0,3 μ m a aproximadamente 11,2 μ m. En otra realización las partículas oscilan en tamaño de
55 aproximadamente 0,7 μ m a aproximadamente 2 μ m.

En una realización adicional el tamaño de partícula puede variarse para dirigirse a diferentes partes del sistema linfático. Por ejemplo, pueden usarse partículas de menor tamaño para dirigirse a los vasos linfáticos mientras que

pueden usarse partículas de mayor tamaño para dirigirse a nódulos linfáticos. En otra realización de la invención el tamaño de partícula puede variarse para mejorar la absorción por el sistema linfático, por ejemplo, vasos o nódulos linfáticos situados en diferentes partes del cuerpo. Por ejemplo, para aplicaciones tales como cáncer de mama o melanoma, las partículas por debajo de 100 nm son adecuadas mientras que partículas de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 5 µm son adecuadas para aplicaciones intrapleurales o intraperitoneales.

En realizaciones de la invención las partículas se forman a partir de uno o más materiales formadores de partículas farmacéuticamente aceptables. Varios materiales formadores de partículas pueden usarse incluyendo polímeros farmacéuticamente aceptables o biocompatibles, lípidos, liposomas, partículas metálicas, partículas magnéticas, biotina, avidina y polisacáridos tales como colágeno, ácido hialurónico, albúmina y gelatina, y derivados de los mismos y combinaciones de los mismos.

Los términos "farmacéuticamente aceptable" o "biocompatible" se reconocen en la técnica. En ciertas realizaciones, el término incluye composiciones, polímeros y otros materiales y/o formas de dosificación que son, en el alcance del juicio médico sonoro, adecuados para el uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional con una relación beneficio/riesgo razonable.

El término "polímero" se refiere a moléculas formadas a partir de la unión química de dos o más unidades de repetición, denominadas monómeros. Por consiguiente, pueden incluirse en el término "polímero", por ejemplo, dímeros, trímeros y oligómeros. El polímero puede ser sintético, darse de forma natural o ser semisintético. En una forma adecuada, el término "polímero" se refiere a moléculas que tienen típicamente un peso molecular (PM) mayor que aproximadamente 3000 y adecuadamente mayor que aproximadamente 10.000 y un PM que es menor que aproximadamente 10 millones, adecuadamente menos que aproximadamente un millón y más adecuadamente menos que aproximadamente 200.000.

Ejemplos de polímeros farmacéuticamente aceptables o biocompatibles incluyen, aunque no están limitados a, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) (PGA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), ácido poli-láctico (PLA), polivinilpirrolidonas (PVP), ácido poliláctico-co-caprolactona, polietilenglicol (PEG), poli(óxido de etileno) (PEO), poliestireno, poli(ácido láctico)-bloque-polietilenglicol, poli(ácido glicólico)-bloque-polietilenglicol, polilactida-co-glicolida-bloque-polietilenglicol, polietilenglicol-bloque-lípido, poli(alcohol de vinilo) (PVA), poliéster, poli(ortoéster), poli(fosfazina), poli(éster de fosfato), policaprolactonas, gelatina, colágeno, un glicosaminoglicano, poliortoésteres, polisacáridos, derivados de polisacárido, poli(ácido hialurónico), poli(ácido algínico), quitina, quitosano, derivados de quitosano, celulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, polipéptidos, polilisina, poli(ácido glutámico) albúmina, polianhídridos, polihidroxialcanoatos, polihidroxivalerato, polihidroxibutirato, proteínas, poli(ésteres de fosfato), poli(acrilamida (PAA), y derivados y mezclas de los mismos.

El término "lípidos" como se usa en esta memoria, se refiere a compuestos orgánicos pequeños no poliméricos, sintéticos o que se dan de forma natural, que son generalmente anfipáticos y biocompatibles. Los lípidos comprenden típicamente un componente hidrófilo y un componente hidrófobo. Lípidos ejemplares incluyen, por ejemplo, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, grasas neutras, fosfolípidos, glucolípidos, alcoholes alifáticos, ceras, terpenos, esteroides y tensioactivos. El término lípidos se refiere también a que incluye derivados de lípidos. Más específicamente el término lípidos incluye aunque no está limitado a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, esfingomielinina además de fosfolípidos sintéticos tales como dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilglicerol, dipalmitoilfosfatidilglicerol, dimiristoilfosfatidilserina, diestearoilfosfatidilserina y dipalmitoilfosfatidilserina.

En una realización de la invención, los derivados del material formador de partículas son derivados modificados en superficie en donde la modificación de superficie altera la hidrofiliidad, hidrofobicidad o altera de otra forma las características del material de manera que es adecuado o está dirigido a áreas específicas en el cuerpo.

Las realizaciones adecuadas de la invención incluyen partículas hechas de polímeros degradables tales como polilactidas (PLA), poliglicolidas (PGA) y sus copolímeros (PLGA). Una ventaja de estos polímeros degradables es que pueden romperse en moléculas biológicamente aceptables por ejemplo ácido láctico o glicólico y agua que se metabolizan y eliminan del cuerpo por medio de rutas metabólicas normales. Por ejemplo, PLA/PLGA degrada por hidrólisis en agua. La velocidad de degradación del polímero normalmente controla la liberación de agente terapéutico encapsulado. Por lo tanto, dependiendo de la terapia necesaria para un fármaco particular, las cinéticas de liberación de ese fármaco de su matriz polimérica pueden controlarse seleccionando un PLA o PLGA con características fisicoquímicas apropiadas tales como peso molecular y composición copolimérica.

Las partículas pueden hacerse también a partir de partículas de poliestireno que se han modificado en superficie para alterar su hidrofiliidad, por ejemplo, por injerto de polímeros hidrófilos tales como N-isopropilacrilamida (NIPAm) y/o ácido metacrílico (MAA).

Como las características anatómicas y fisiológicas del sistema linfático varían entre compartimientos diferentes del cuerpo, existe potencial para mejorar adicionalmente la eficacia de orientación modificando las propiedades fisicoquímicas del polímero. Uno de los factores más importantes que influyen en la distribución de partículas

linfáticas es el tamaño de partícula. Los actuales inventores utilizaron gotas de aminopoliestireno marcado con ¹¹¹Indio (In) en tres tamaños diferentes (~300 nm, ~2 µm, y ~11 µm) para investigar el efecto del tamaño de partícula en la distribución de partículas linfáticas a través de administración intrapleural. El estudio reveló que partículas de ~2 µm tienen absorción linfática significativamente mayor en comparación con las de los otros dos tamaños. Las partículas también mostraron un razonable tiempo de residencia en los nódulos linfáticos regionales. Se han presentado tamaños de partícula mucho menores (<100 nm) para usarse para la distribución linfática s.c. Para la administración subcutánea, el tamaño óptimo está entre 10 nm y 50 nm. Estudios recientes han mostrado que las partículas mayores que unos pocos cientos de nanómetros de diámetro se retienen preferentemente en el sitio de inyección ya que son demasiado grandes para navegar a través del espacio intersticial para unirse al flujo linfático como se necesita^{xxxiii}. Solo cuando las partículas se administran de forma intraperitoneal o intrapleural el tamaño, en el intervalo de nanómetro, pierde importancia ya que el drenaje es sencillo desde una cavidad en los vasos linfáticos superficiales, y por tanto no es necesaria la difusión a través del espacio intersticial^{xxxiv}. Las uniones abiertas en la pared linfática son las únicas barreras de limitación de tamaño a la absorción linfática desde la cavidad peritoneal^{xxxv}. Los presentes inventores han mostrado que los coloides de carbono con intervalos de tamaño de 700 a 1500 nm dados intrapleuralmente proporcionan mejor distribución de nódulos linfáticos que aquellos de dos partículas de tamaño menor distintos. Parece que las partículas de aproximadamente 2 µm son un tamaño apropiado para la orientación linfática intrapleural a nódulos linfáticos regionales. Una posible explicación para la baja absorción de partículas pequeñas en nódulos linfáticos es que, incluso aunque estas partículas puedan tener fácil acceso a vasos linfáticos pleurales, fallan en quedar retenidos en los nódulos linfáticos regionales.

A pesar del efecto del tamaño en la distribución de partículas en el sistema linfático, el tamaño óptimo puede variar entre seres humanos y otros mamíferos o en los animales con diferentes especies.

Las partículas de la invención se usan para dirigir agentes bioactivos al sistema linfático incluyendo nódulos linfáticos. Por consiguiente, en otra realización, las partículas de la invención contienen un agente bioactivo necesario para alcanzar los vasos linfáticos y/o nódulos linfáticos.

El término "agente bioactivo" como se usa en esta memoria se refiere a cualquier sustancia terapéutica o diagnóstica que se distribuye a un conducto corporal de un ser vivo para producir un efecto deseado, normalmente beneficioso.

En una realización adecuada el agente bioactivo es un agente antineoplásico. En una realización, el agente bioactivo es un fármaco anti-proliferativo o anti-metastático. En realizaciones adecuadas, el fármaco anti-proliferativo o anti-metastático incluye, en general, agentes estabilizantes de microtúbulos (tal como paclitaxel, docetaxel o sus derivados o análogos); agentes alquilantes; antimetabolitos; epidofilotoxina; una enzima antineoplásica; un inhibidor de topoisomerasa; procarbazona; mitoxantrona; complejos de coordinación de platino; modificadores de respuesta biológica e inhibidores de crecimiento; y factores de crecimiento hematopoyéticos. Clases ejemplares de agentes antineoplásicos incluyen, por ejemplo, la familia de fármacos de antraciclina, los fármacos de vinca, las mitomicinas, las bleomicinas, los nucleósidos citotóxicos, los taxanos, las epotilonas, discodermolida, la familia de fármacos de pteridina, diinenos y las podofilotoxinas. Miembros de esas clases incluyen, por ejemplo, doxorubicina, carminomicina, daunorubicina, aminopterina, metotrexato, metopterina, dicloro-metotrexato, mitomicina C, porfiromicina, trastuzumab (Herceptina TM), 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, gemcitabina, arabinósido de citosina, podofilotoxina o derivados de podofilotoxina tales como etopósido, fosfato de etopósido o tenipósido, melfalano, vinblastina, vincristina, leurosina, vindesina, leurosina, paclitaxel y similares. Otros agentes antineoplásicos útiles incluyen estramustina, cisplatina, carboplatina, ciclofosfamida, bleomicina, gemcitabina, ifosamida, melfalano, hexametil-melamina, tiotepa, citarabina, idatrexato, trimetrexato, dacarbazina, L-asparaginasa, camptotecina, CPT-11, topotecano, derivados de piridobenzoindol, interferonas e interleuquinas.

Aún otros fármacos anti-proliferativos o anti-metastáticos representativos incluyen: agentes alquilantes tales como mostazas de nitrógeno, por ejemplo mecloretamina, ciclofosfamida, melfatano y clorambucilo, sulptronatos de alquilo tales como busulfano, nitrosoureas tales como carmustina, lomusina, semustina y estreptozocina, triazenos tales como dacarbazina, antimetabolitos tales como análogos de ácido fólico, por ejemplo metotrexato, análogos de pirimidina tales como fluorouracilo y citarabina, análogos de purina tales como mercaptopurina y tioguanina, productos naturales tales como alcaloides de vinca, por ejemplo vinblastina, vincristina y vindesina, epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido, antibióticos tales como dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina y mitomicina, enzimas tales como L-asparaginasa, ureas sustituidas tales como hidroxidurea, derivados de metilhidracina tales como procarbazona, supresores de adrenocorticoides tales como mitotano y aminoglutetimida, hormonas y antagonistas tales como adrenocorticosteroides tales como prednisona, progestinas tales como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de metoxiprogesterona y acetato de megestrol, estrógenos tales como dietilstilbestrol y etinilestradiol, antiestrógenos tales como tamoxifeno, y andrógenos tales como propionato de testosterona y fluoximesterona.

Realizaciones adicionales incluyen restos que suprimen la linfangiogénesis tales como anticuerpo del factor de crecimiento endotelial vascular C, D (VEGF-C, D) o el anticuerpo de su receptor VEGFR-3, y restos para suprimir la angiogénesis, tales como agente anti-receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), varias moléculas pequeñas que funcionan en varias rutas de señalización anticancerígena tal como inhibidor de quinasa unida a integrina (ILK), inhibidor de matriz de metaloproteinas (MMP), macromoléculas, antioxidantes, citoquinas,

quimioquinas, antisentido, oligonucleótidos, qdots recubiertos con péptido LyP-1 para dirigir a los vasos linfáticos, hormonas y antagonistas hormonales.

En realizaciones adecuadas de la invención el agente bioactivo es paclitaxel o un derivado de paclitaxel o doxorubicina.

- 5 En otra realización de la invención más de un agente bioactivo puede incorporarse en las micropartículas. Pueden usarse múltiples agentes bioactivos en combinación para proporcionar efectos sinérgicos o para proporcionar múltiples tipos de tratamiento. Por ejemplo dos o más agentes terapéuticos complementarios pueden incorporarse para proporcionar formas complementarias de tratamiento, o un agente sensibilizante del tejido puede combinarse con un agente terapéutico para proporcionar un efecto sinérgico o un agente terapéutico y un sensibilizador de radiación puede combinarse para tratar una malignidad con una combinación de quimioterapia y radiación. La adecuada combinación de agentes bioactivos se conocerían por un experto en la técnica.

- 10 En otra realización de la invención, uno o más agentes bioactivos que son independientes del complejo bioactivo pueden incorporarse en la matriz biocompatible y biodegradable. Con la combinación de un agente bioactivo libre y el complejo bioactivo que comprende el agente bioactivo, puede alcanzarse un perfil farmacocinético óptimo para el agente bioactivo. La liberación del agente bioactivo libre proporcionará una alta concentración de agente inicial mientras las partículas en el complejo liberarán lentamente el agente para mantener el nivel de agente. Esto permitirá que la concentración de agente se mantenga en la ventana terapéutica para un periodo de tiempo más largo. Por consiguiente, la dosis letal (DL_{50}) y la dosis tolerada máxima (DMT) pueden aumentarse, mejorando el perfil de seguridad del agente bioactivo, mientras se reduce la concentración efectiva en plasma CE_{50} , y se mejora así la eficacia del agente bioactivo. En esta realización, el agente bioactivo libre puede ser también diferente a partir del agente bioactivo en el complejo proporciona un medio alternativo para distribuir terapias sinérgicas o de combinación a diferentes velocidades de liberación.

- 15 La incorporación de los agentes bioactivos en el material formador de partículas y la preparación de nano o micropartículas puede hacerse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Varios métodos de formulación pueden usarse incluyendo secado por pulverizado, emulsión doble, evaporación de disolvente y similares. Por ejemplo, en el secado por pulverización, el agente bioactivo y el material formador de partículas se combinan en un disolvente adecuado. La disolución o suspensión resultante se seca entonces por pulverización para formar micro o nanopartículas. La temperatura de entrada, la temperatura de salida, el control de flujo de pulverización, velocidad de pulverizado de alimentación, nivel aspirador o presión de atomizado pueden ajustarse todas para producir partículas que tienen propiedades físicas específicas tales como tamaño y forma.

- 20 La presente invención incluye un dispositivo implantable para dirigir agentes bioactivos al sistema linfático o nódulos linfáticos. El dispositivo implantable es una matriz biocompatible, biodegradable, impregnada con partículas que contienen un agente terapéutico.

- 25 Cualquier material adecuado puede usarse para formar la matriz biocompatible. En una realización de la invención, el material usado para formar la matriz biocompatible incluye diferentes tipos de polímeros tales como homopolímeros o copolímeros (que incluyen copolímeros alternos, aleatorios y en bloque), pueden ser homopolímeros o copolímeros cíclicos, lineales o ramificados (que incluyen copolímeros alternos, aleatorios y en bloque), pueden ser cíclicos, lineales o ramificados (por ejemplo, polímeros que tienen arquitectura estrellada, en peine o dendrítica), pueden ser naturales o sintéticas, pueden ser termoplásticos o termoestables, y pueden ser hidrófobos, hidrófilos o anfífilos.

- 30 Los polímeros para usar en la matriz biocompatible pueden seleccionarse, por ejemplo, de lo siguiente: polímeros y copolímeros de ácido policarboxílico que incluyen ácidos poliacrílicos; polímeros y copolímeros de acetal; polímeros y copolímeros de acrilato y metacrilato (por ejemplo, metacrilato de n-butilo); polímeros y copolímeros celulósicos, que incluyen acetatos de celulosa, nitratos de celulosa, propionatos de celulosa, butiratos de acetato de celulosa, celofanes, rayones, triacetatos de rayón y éteres de celulosa tales como carboximetilcelulosas e hidroxialquilcelulosas; polímeros y copolímeros de polioximetileno; polímeros y copolímeros de poliimida tales como imidas en bloque de poliéter, poliamidimidas, poliesterimidas y polieterimidas; polímeros y copolímeros de polisulfona que incluyen poliarilsulfonas y poliétersulfonas; polímeros y copolímeros de poliamida que incluyen nailon 6,6, nailon 12, policaprolactamas y poliacrilamidas; resinas que incluyen resinas alquídicas, resinas fenólicas, resinas de urea, resinas de melamina, resinas epoxi, resinas de alilo y resinas de epóxido; policarbonatos; poliacrilonitrilos; polivinilpirrolidonas (reticuladas y diferentes); polímeros y copolímeros de monómeros de vinilo que incluyen poli(alcoholes de vinilo), poli(haluros de vinilo) tales como poli(cloruros de vinilo), copolímeros de etileno-vinilacetato (EVA), poli(cloruros de vinilideno), poliviniléteres tales como polivinilmetiléteres, poliestirenos, copolímeros de estireno-anhídrido maleico, copolímeros de estireno-butadieno, copolímeros de estireno-etileno-butileno (por ejemplo, un copolímero de poliestireno-poli(etileno)/butileno-poliestireno (SEBS), disponibles como polímeros de serie G Kraton®), copolímeros de estireno-isopreno (por ejemplo, poliestireno-poliisopreno-poliestireno), copolímeros de acrilonitrilo-estireno, copolímeros de acrilonitrilo-butadieno-estireno, copolímeros de estireno-butadieno y copolímeros de estireno-isobutileno (por ejemplo, copolímeros de bloque de poliisobutileno-poliestireno tal como SIBS), polivinilcetonas, polivinilcarbazoles y polivinilésteres tales como poli(acetatos de vinilo); polibenzimidazoles; polímeros y copolímeros de poli(óxido de alquilo) que incluyen poli(óxidos de etileno) (PEO);

poliésteres que incluyen poli(tereftalatos de etileno) y poliésteres alifáticos tales como polímeros y copolímeros de lactida (que incluye ácido láctico además de d-, l- y meso lactida), épsilon-caprolactona, glicolida (que incluye ácido glicólico), hidroxibutirato, hidroxivalerato, para-dioxanona, carbonato de trimetileno (y sus derivados de alquilo), 1,4-dioxepan-2-ona, 1,5-dioxepan-2-ona, y 6,6-dimetil-1,4-dioxan-2-ona (un copolímero de ácido poliláctico y policaprolactona es un ejemplo específico); polímeros o copolímeros de poliéter que incluyen poliariéteres tales como polifenilénéteres, poliétercetonas, poliéter-éter-cetona; poli(sulfuros de fenileno); polímeros y copolímeros de poliolefina, que incluyen polialquilenos tales como polipropilenos, polietilenos (baja y alta densidad, bajo y alto peso molecular), polibutilenos (tal como polibut-1-eno y poliisobutileno), copolímeros de EPDM (por ejemplo, santopreno), cauchos de monómero de etilen-propilen-dieno (EPDM), poli-4-metil-pen-1-enos, copolímeros de etileno-alfa-olefina, copolímeros de etileno-metacrilato de metilo y copolímeros de etileno-acetato de vinilo; polímeros y copolímeros fluorados, que incluyen politetrafluoroetilenos (PTFE), poli(tetrafluoroetileno-co-hexafluoropropeno) (FEP), copolímeros de etileno-tetrafluoroetileno (ETFE) modificados, y poli(fluoruros de vinilideno) (PVDF); polímeros y copolímeros de silicona; poliuretanos; polímeros de p-xilileno; poliiminocarbonatos; copoli(éter-ésteres) tal como copolímeros de óxido de polietileno-ácido poliláctico; poliofosfazinas; poli(oxalatos de alquileno); polioxaamidas y polioxaésteres (que incluyen los que contienen aminas y/o grupos amido); poliortoésteres; biopolímeros, tal como polipéptidos, proteínas, polisacáridos y ácidos grasos (y ésteres de los mismos), que incluyen fibrina, fibrinógeno, colágeno, elastina, quitosano, gelatina, almidón, glicosaminoglicanos tales como ácido hialurónico; además de mezclas y copolímeros de lo anterior.

Los polímeros elastoméricos son particularmente beneficiosos en algunas realizaciones. Entre los polímeros elastoméricos se incluyen (a) polímeros de poliolefina, por ejemplo, polímeros que contienen butilo tales como poliisobutileno, (b) copolímeros de poliolefina, por ejemplo, copolímeros de poliolefina-polivinilaromático tal como copolímeros de poliisobutileno-poliestireno, copolímeros de poli(butadieno/butileno)-poliestireno, copolímeros de poli(etileno/butileno)-poliestireno y copolímeros de polibutadieno-poliestireno; y (c) polímeros y copolímeros de silicona; además de mezclas de los mismos. Ejemplos específicos de copolímeros de poliolefina-polivinilaromático incluyen copolímeros dibloque de poliolefina-polivinilaromático y copolímeros tribloque de polivinilaromático-poliolefina-polivinilaromático, tal como un copolímero tribloque de poliestireno-poli(etileno/butileno)-poliestireno (SEB), disponible como Kraton®, y copolímeros tribloque de poliestireno-poliisobutileno-poliestireno (SIBS), que se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. núm. 5.741.331, Patente de EE.UU. núm. 4.946.899 y Patente de EE.UU. núm. 6.545.097.

Copolímeros de poliolefina-polivinilaromático adicionales se presentan en el anterior párrafo.

En algunas realizaciones de la invención la matriz biocompatible contiene un polímero hidrófobo, un polímero hidrófilo, o tanto un polímero hidrófobo como un polímero hidrófilo.

Ejemplos de polímeros hidrófobos a partir de los que los polímeros usados en la presente invención pueden seleccionarse incluyen: polímeros y copolímeros de olefina, tal como polietileno, polipropileno, poli(1-buteno), poli(2-buteno), poli(1-penteno), poli(2-penteno), poli(3-metil-1-penteno), poli(4-metil-1-penteno), poli(isopreno), poli(4-metil-1-penteno), copolímeros de etileno-propileno, copolímeros de etileno, propileno-hexadieno, copolímeros de etileno-acetato de vinilo; polímeros y copolímeros de estireno tales como poli(estireno), poli(2-metilestireno), copolímeros de estireno-acrilonitrilo que tienen menos de aproximadamente 20 por ciento en moles de acrilonitrilo, copolímeros de estireno-metacrilato de 2,2,3,3-tetrafluoropropilo y copolímeros de olefina-estireno; polímeros y copolímeros de hidrocarburo halogenado tal como poli(clorotrifluoroetileno), copolímeros de clorotrifluoroetileno-tetrafluoroetileno, poli(hexafluoropropileno), poli(tetrafluoroetileno), tetrafluoroetileno, copolímeros de tetrafluoroetileno-etileno, poli(trifluoroetileno), poli(fluoruro de vinilo), poli(cloruro de vinilo) y poli(fluoruro de vinilideno); polímeros y copolímeros de vinilo, tal como poli(butirato de vinilo), poli(decanoato de vinilo), poli(dodecanoato de vinilo), poli(hexadecanoato de vinilo), poli(hexanoato de vinilo), poli(propionato de vinilo), poli(octanoato de vinilo), poli(heptafluoroisopropoxietileno), poli(heptafluoroisopropoxipropileno) y poli(metacrilonitrilo); polímeros y copolímeros de ésteres de ácido acrílico, tal como poli(acrilato de n-butilo), poli(acrilato de etilo), acrilato de poli(1-clorodifluorometil)tetrafluoroetilo, poli acrilato de di(clorofluorometil)fluorometilo, poli(acrilato de 1,1-dihidroheptafluorobutilo), poli(acrilato de 1,1-dihidropentafluoroisopropilo), poli(acrilato de 1,1-dihidropentadecafluoroocilo), poli(acrilato de heptafluoroisopropilo), poli(acrilato de 5-(heptafluoroisopropoxi)pentilo), poli(acrilato de 11-(heptafluoroisopropoxi)undecilo), poli(acrilato de 2-(heptafluoropropoxi)etilo) y poli(acrilato de nanofluoroisobutilo); polímeros y copolímeros de ésteres de ácido metacrílico, tal como poli(metacrilato de bencilo), poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de n-butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de t-butilo), poli(metacrilato de t-butilaminoetilo), poli(metacrilato de dodecilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de 2-etilhexilo), poli(metacrilato de n-hexilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(metacrilato de n-propilo), poli(metacrilato de octadecilo), poli(metacrilato de 1,1-dihidropentadecafluoroocilo), poli(metacrilato de heptafluoroisopropilo), poli(metacrilato de heptadecafluoroocilo), poli(metacrilato de 1-hidrotetrafluoroetilo), poli(metacrilato de 1,1-dihidotetrafluoropropilo), poli(metacrilato de 1-hidroxhexafluoroisopropilo) y poli(metacrilato de t-nonafuorobutilo); policarbonatos; poliimidaz; polietertercetonas; poliamidas; polivinilacetatos; polisulfonas, polietersulfonas; poliésteres, tal como un poli(tereftalato de etileno) y poli(tereftalato de butileno); poliuretanos y copolímeros de siloxano-uretano; y poliorganosiloxanos (siliconas).

Ejemplos de polímeros hidrófilos a partir de los que los polímeros usados en la presente invención pueden seleccionarse incluyen: polímeros y copolímeros de ácido acrílico y metacrílico, y sales de metal alcalino y amonio

de los mismos; polímeros y copolímeros de metacrilamida; polímeros y copolímeros de metacrilonitrilo; polímeros y copolímeros de ácidos dibásicos insaturados, tal como ácido maleico y ácido fumárico, y medio ésteres de estos ácidos dibásicos insaturados, además de sales de metal alcalino o amonio de estos ácidos dibásicos o medio ésteres; polímeros y copolímeros de ácidos sulfónicos insaturados, tal como ácido 2-acrilamido-2-
5 metilpropanosulfónico y ácido 2-(met)acriloleitanosulfónico, y sales de metal alcalino y amonio de los mismos; polímeros y copolímeros de ésteres de metacrilato con grupos hidrófilos tal como metacrilato de 2-hidroxietilo y metacrilato de 2-hidroxipropilo, polímeros y copolímeros de poli(alcohol de vinilo), que pueden contener una pluralidad de grupos hidrófilos tal como grupos hidroxilo, amido, carboxilo, amino, amonio y sulfonilo (-SO₃); polímeros y copolímeros de polialquilenglicoles y óxidos tales como polietilenglicol, polipropilenglicol, poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno); polímeros y copolímeros de compuesto de vinilo que tiene grupos colgantes polares tales como N-vinilpirrolidona, N-vinil-butiro lactama, N-vinil-caprolactama; polímeros y copolímeros derivados de acrilamida; poliuretanos hidrófilos; polímeros y copolímeros de hidroxiacrilato; polímeros y copolímeros de vinilpirrolidona que incluyen copolímeros de acetato de vinilo/vinilpirrolidona, almidones, polisacáridos que incluyen gomas y polímeros celulósicos tal como guar, xantano y otras gomas, dextranos, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa,
10 carboximetilcelulosa, colágeno, gelatina, alginato y ácido hialurónico.

Debe notarse que todos los polímeros enumerados anteriormente pueden usarse también como el material formador de partículas.

En una realización adecuada, la matriz biocompatible, biodegradable es un hidrogel. En una realización adicional la matriz biocompatible, biodegradable comprende gelatina o gelatina-alginato. En aún otra realización, la matriz biocompatible, biodegradable comprende colágeno. En aún otra realización de la invención, la matriz biocompatible, biodegradable comprende carboximetilcelulosa. En otra realización de la invención, la matriz biocompatible, biodegradable comprende pectina.
20

En realizaciones particulares de la invención la matriz biocompatible puede estar en forma de una esponja, lámina, película, malla, compresa, tampón o almohadilla. En una realización adecuada, la matriz biocompatible está en forma de una esponja.
25

En aún una realización adicional de la invención la matriz biocompatible puede estar reticulada. La selección de un método de reticulado apropiado debería tomarse en la consideración del efecto reticulante, que mantiene la integridad de los complejos partícula-fármaco, y la toxicidad potencial del reticulador al sujeto. Se conocen varios métodos en la técnica para reticular varios materiales poliméricos que incluyen métodos físicos tales como luz ultravioleta, deshidratación severa, radiación, ciclos de congelación y descongelación y métodos químicos que usan varios reticuladores. Los procedimientos ejemplares para reticular las matrices de la invención incluyen: (1) poner en contacto una lechada de gelatina con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) durante un periodo de tiempo y bajo condiciones suficientes para formar una matriz reticulada; (2) calentar la matriz liofilizada durante un periodo de tiempo y bajo condiciones suficientes para formar una matriz reticulada; (3) exponer la matriz liofilizada a un haz de electrones durante un periodo de tiempo y bajo condiciones suficientes para formar una matriz reticulada; (4) exponer la matriz liofilizada a esterilización con rayos gamma durante un periodo de tiempo y bajo condiciones suficientes para formar una matriz reticulada; y (5) exponer el dispositivo liofilizado a vapor de formaldehído para formar un reticulado. Las características físicas de una matriz polimérica pueden variarse significativamente por el grado de reticulado del polímero. En una realización particular la matriz se reticula de una manera que permitiría liberarse a las partículas de la matriz degradable durante un periodo de tiempo de aproximadamente varios días a aproximadamente varias semanas.
30
35
40

A pesar de su composición, la matriz biocompatible de la presente invención encontrará típicamente todas las necesidades mecánicas, químicas y biológicas del dispositivo implantable.

El término "biodegradable" se reconoce en la técnica, e incluye polímeros, composiciones y formulaciones, tal como los descritos en esta memoria, que se pretende que se degraden durante el uso. Los polímeros biodegradables difieren típicamente de polímeros no biodegradables en que los primeros pueden degradarse durante el uso. En ciertas realizaciones, dicho uso implica uso *in vivo*, tal como terapia *in vivo*, y en otras ciertas realizaciones, dicho uso implica uso *in vitro*. En general, la degradación atribuible a la biodegradabilidad implica la degradación de un polímero biodegradable en sus subunidades de componente, o digestión, por ejemplo, por un procedimiento bioquímico, del polímero en subunidades no poliméricas menores. En ciertas realizaciones, dos tipos diferentes de biodegradación pueden identificarse generalmente. Por ejemplo, un tipo de biodegradación puede implicar escisión de enlaces (tanto covalentes como de otra forma) en el esqueleto polimérico. En dicha biodegradación, típicamente resultan monómeros y oligómeros, e incluso más típicamente, dicha biodegradación se da por escisión de un enlace que conecta una o más de las subunidades de un polímero. En contraste, otro tipo de biodegradación puede implicar la escisión de un enlace (o bien covalente o de otro tipo) interno a una cadena lateral o que conecta una cadena lateral al esqueleto polimérico. Por ejemplo, un taxano antineoplásico u otro resto químico unido como una cadena lateral al esqueleto polimérico pueden liberarse por biodegradación. En ciertas realizaciones, uno o el otro o generalmente ambos tipos de biodegradación pueden darse durante el uso de un polímero. Como se usa en esta memoria, el término "biodegradación" abarca ambos tipos generales de biodegradación.
45
50
55

La velocidad de degradación de un polímero biodegradable a menudo depende en parte de una variedad de factores, que incluyen la identidad química de la unión responsable de cualquier degradación, el peso molecular, cristalinidad, bioestabilidad, y grado de reticulado de dicho polímero, las características físicas del implante, forma y tamaño, y el modo y sitio de administración. Por ejemplo, cuanto mayor es el peso molecular, mayor es el grado de cristalinidad y/o cuanto mayor es la bioestabilidad, la biodegradación de cualquier polímero biodegradable es normalmente más lenta. El término "biodegradable" se pretende que cubra materiales y procedimientos también denominados "bioerosionable".

En ciertas realizaciones, las formulaciones poliméricas de la presente invención biodegradan en un periodo que es aceptable en la aplicación deseada. En ciertas realizaciones, tal como terapia in vivo, dicha degradación se da en un periodo normalmente menor que aproximadamente cinco años, un año, seis meses, tres meses, un mes, quince días, cinco días, tres días, o incluso un día de exposición a una disolución fisiológica con un pH entre 6 y 8 que tiene una temperatura de entre 25 y 37°C. En otras realizaciones, el polímero degrada en un periodo de entre aproximadamente una hora y varios meses, dependiendo de la aplicación deseada.

En realizaciones de la invención la matriz biocompatible degradará durante un periodo de tiempo para liberar el complejo bioactivo durante un periodo de tiempo. En una realización adicional la matriz biocompatible degradará durante un periodo de aproximadamente varias horas a aproximadamente 1 año. En una realización adecuada la matriz degradará durante un periodo de aproximadamente varios días a aproximadamente varias semanas.

En otras realizaciones de la invención la matriz biocompatible moldeable. El término "moldeable" como se usa en esta memoria significa que el material de la matriz puede formarse o moldearse en una forma particular. El término moldeable se considerará sinónimo con conformable, manipulable y moldeable. En las realizaciones de la invención la matriz biocompatible puede moldearse antes de la implantación del dispositivo o puede moldearse para conformar los contornos de un órgano o superficie biológica particular en el momento de la implantación.

La presente invención incluye realizaciones que contienen aditivos, vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichos aditivos, vehículos o excipientes pueden incluir, adyuvantes, recubrimientos colorantes, tampones, aglutinantes, lubricantes, disgregantes, estabilizantes y similares.

El término vehículo farmacéuticamente aceptable se reconoce en la técnica, e incluye, por ejemplo, materiales, composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables, tal como una carga, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, líquido o sólido, implicado en portar o transportar cualquier composición de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de una composición y no perjudicial al paciente. En ciertas realizaciones, un vehículo farmacéuticamente aceptable es no pirogénico. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tal como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tal como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa, y sus derivados, tal como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tal como manteca de cacao y ceras; (9) aceites, tal como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tal como propilenglicol; (11) polioles, tal como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tal como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tal como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) disolución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disoluciones tampón fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Otras sustancias pueden añadirse también a la matriz biocompatible. Plastificadores tal como propilenglicol o glicerina pueden incluirse en la matriz a hasta aproximadamente 30% en peso de la matriz. La adición de un agente plastificante mejorará la flexibilidad y fortaleza del producto final.

Antes de la implantación del dispositivo al sujeto, puede esterilizarse. La esterilización puede alcanzarse mediante, por ejemplo, esterilización por calor o haz de E. Agentes humectantes biocompatibles típicamente se incorporarán o recubrirán en la composición de matriz antes del procedimiento de esterilización. La esterilización por haz de E de una composición de gelatina reticulada se describe en la Serie de Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. núm. 60/275.391, presentada el 12 de marzo de 2001, titulada "Methods for Sterilizing Cross-Linked Gelatin Compositions", cuya aplicación se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad. La esterilización por calor de una composición de gelatina reticulada se describe en la Patente de EE.UU. núm. 2.465.357.

El dispositivo puede tratarse también con una deposición de recubrimiento radiopaco o texturización de superficie por haz de iones antes de la implantación. Los materiales radiopacos paran los rayos x, haciendo un dispositivo tratado visible en una imagen de rayos x o fluoroscópica. Varios materiales radiopacos pueden depositarse como recubrimientos densos, bien adheridos, de película fina, en una variedad de diseños tal como bandas y tiras marcadoras. Tanto la aplicación de recubrimiento radiopaco como la texturización de superficie de haz de iones pueden aplicarse a polímeros. La texturización por haz de iones produce morfologías específicas en las superficies poliméricas, y puede producirse una variedad de tipos de estructura uniformemente o aleatoriamente espaciadas.

Las superficies texturizadas por haz de iones son duraderas y no pueden laminarse porque son una parte intrínseca de la superficie subyacente.

El dispositivo implantable de la invención puede implantarse en un sujeto que lo necesita. El dispositivo puede implantarse usando procedimientos mínimamente invasivos tales como laparoscopia o mediastinoscopia. En otra realización el dispositivo implantable puede implantarse durante un procedimiento diagnóstico tal como durante una biopsia o más específicamente durante una biopsia de nódulo linfático. En dichos casos el tratamiento puede empezarse inmediatamente lo que puede mejorar el pronóstico de los sujetos. En otra realización, el dispositivo implantable puede implantarse durante la cirugía. En una realización particular el dispositivo implantable puede implantarse durante la cirugía para extirpar un tumor.

El dispositivo implantable de la presente invención ofrece el beneficio de liberación controlada de los agentes bioactivos. El dispositivo de la presente invención proporciona múltiples oportunidades para controlar la velocidad de liberación del agente bioactivo. Primero la matriz biocompatible biodegradable puede seleccionarse de manera que la degradación de la matriz proporciona la liberación de las micropartículas durante un periodo de tiempo deseado. Esta velocidad de degradación puede controlarse por la selección de polímeros o co-polímeros particulares, el grado de reticulación además de aditivos que pueden aumentar o disminuir la velocidad de degradación. Segundo las micro o nanopartículas de la invención pueden prepararse de manera que el agente activo se libera un periodo de tiempo prescrito. La velocidad de degradación de las partículas puede controlarse por la selección del material formador de partículas y por la adición de aditivos. En una realización adicional la matriz biodegradable puede contener agente bioactivo en forma de partícula como se describe además de agente bioactivo libre que se libera directamente tras la degradación de la matriz. Esta realización podría proporcionar un bolo de agente bioactivo tras la degradación de la matriz seguido de un periodo de liberación sostenida desde las micropartículas.

En otra realización de la invención el dispositivo implantable puede usarse para mejorar el perfil farmacocinético de un agente bioactivo. En una realización particular el dispositivo implantable de la invención puede usarse para aumentar la dosis letal (DL_{50}) y la dosis máxima tolerada (DMT) mejorando así el perfil de seguridad del agente bioactivo. En una realización adicional el dispositivo implantable de la invención puede usarse para disminuir la dosis efectiva (DE_{50}) de un agente bioactivo aumentando así el índice terapéutico (DL_{50}/DE_{50}) y que mejora la eficacia del agente bioactivo. Por ejemplo, puede prepararse un dispositivo de la presente invención que comprende partículas que son de un tamaño adecuado para la orientación selectiva del sistema linfático. La matriz y el material formador de partícula pueden seleccionarse para proporcionar propiedades de liberación controlada preferidas. El dispositivo puede implantarse a o cerca del sitio de tratamiento deseado donde la matriz se degradará liberando partículas que se dirigen de forma selectiva al sitio deseado. Las partículas que han alcanzado el sitio deseado puede liberar entonces el agente bioactivo de una manera controlada para proporcionar una concentración sostenida del agente bioactivo durante un periodo de tiempo. En esta manera la concentración de complejo bioactivo puede mantenerse en la ventana terapéutica durante periodos más largos de tiempo y el complejo bioactivo puede dirigirse al sitio donde se necesita evitando así los efectos potencialmente tóxicos de la administración sistémica.

El dispositivo de distribución implantable de la presente invención será ventajoso para muchas aplicaciones que incluyen:

(1) Modalidades de formación de imágenes y visualización del sistema linfático tales como Escintigrafía de rayos Gamma, Tomografía de Emisión de Positrones (PET), Tomografía Computerizada de Emisión MonoFotónica (SPECT), Formación de Imágenes por Resonancia Magnética (MRI), rayos X, Tomografía por rayos X Asistida por Ordenador (CT), espectroscopia infrarroja cercana y ultrasonidos. Estas técnicas proporcionan información relacionada con la detección de implicación neoplásica, particularmente de nódulos inaccesibles en sujetos con enfermedades malignas y pueden aplicarse también en otros procesos infecciosos e inflamatorios. El conocimiento del tamaño del nódulo y la carga de los nódulos también puede ser instructivo. Las partículas así dirigidas a los nódulos linfáticos en aplicaciones diagnósticas contendrán agentes de contraste o formación de imágenes adecuados tal como materiales ferromagnéticos tales como óxido de hierro, compuestos perfluoroquímicos tal como perfluorooctilbromuro, tintes, o radiomarcadores emisores de rayos gamma tales como Tecnecio-99m, Indio-111, Galio-67, Talio-201, Yodo-123, 125 o 131, radiomarcadores emisores de positrones tales como Flúor-18. Otros agentes de formación de imágenes incluyen, emisores de fluorescencia, tintes fotoactivados.

(2) Terapia de radiación. Partículas así dirigidas a los nódulos linfáticos en terapia de radiación incluyen coloides marcados por radionucléido tales como Oro-198 e Ytrio-90. Esto incluye coloides con radiosensibilizadores, radioprotectores o agentes fotodinámicos. Véase, por ejemplo, Coleman, *Int J Radiation Onc*, 42(4):781 783, 1998. Estos podrían también incluir agentes que capturan neutrones tal como Boro-10. Estos agentes se activan después de la irradiación con neutrones. Véase Barth et al, *Cancer Res* 50:1061 1071, 1990.

(3) La distribución de agentes terapéuticos a nódulos linfáticos. Véase, por ejemplo, Kohno et al., *J Infect Chemother*, 4:159 173, 1998; Lasic et al., in *Vesicles*, Rosoff (ed), Marcel Dekker, Nueva York, 477 489, 1996; Bookman, *Curr Opin Oncol* 7(5):478 484, 1995; Alving, *J Immuno Methods*, 140:1 13, 1991; Daemen, en *Medical Applications of Liposomes*, Lasic y Papahadjopoulos (eds), Elsevier Science B.V., 117 143, 1998, Gregoriadis et al., en *Medical Applications of Liposomes*, Lasic y Papahadjopoulos (eds), Elsevier Science B.V., 61 73, 1998; y Woodle et al., en *Medical Applications of Liposomes*, Lasic y Papahadjopoulos (eds), Elsevier Science B.V., 429 449, 1998.

El dispositivo implantable de la presente invención puede administrarse por implantación en la cavidad pleural o la cavidad peritoneal o en un compartimiento subcutáneo o de forma vaginal o rectal.

5 El dispositivo implantable puede usarse en el tratamiento de una enfermedad o proceso seleccionado de neoplasia, infección bacteriana, infección microbiana e infección vírica. Ejemplos específicos de dichas enfermedades o procesos incluyen, aunque no están limitados a, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, linfoma, sarcoma, timoma, mesotelioma, metástasis linfática, filariasis, brucelosis, tuberculosis e infección por VIH. La enfermedad o proceso puede ser cáncer de pulmón o metástasis linfática de cáncer de pulmón.

10 En una realización adicional de la invención se proporciona un procedimiento para preparar un dispositivo implantable de la invención que comprende combinar un agente bioactivo y un material formador de partículas en un disolvente adecuado para formar una disolución o suspensión, después secar por pulverizado la disolución y suspensión para formar partículas del complejo bioactivo. Las partículas del complejo bioactivo se combinan entonces con una matriz biocompatible en un disolvente adecuado. El disolvente se elimina entonces dando por
15 resultado un dispositivo implantable de la invención.

El término "neoplasia" como se usa en esta memoria se refiere a un crecimiento anormal, desorganizado en un tejido u órgano, normalmente que forma una masa distinta. Dicho crecimiento se denomina neoplasma. La neoplasia de entiende que incluye términos tales como cáncer, tumor y crecimiento y puede ser benigno o maligno.

20 El término una "cantidad efectiva" o una "cantidad suficiente" de un agente como se usa en esta memoria es esa cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados, que incluyen resultados clínicos, y como tal, una "cantidad efectiva" depende del contexto en que se va a aplicar. Por ejemplo, en el contexto de administración de un agente que trata cáncer, una cantidad efectiva de un agente es, por ejemplo, una cantidad suficiente para alcanzar dicho tratamiento en comparación con la respuesta obtenida sin la administración del agente. La administración de una cantidad efectiva de un agente bioactivo se define como una cantidad efectiva, a
25 dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para alcanzar el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad efectiva de una sustancia puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para obtener una respuesta deseada en el individuo. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

30 Como se usa en esta memoria, y como se entiende bien en la técnica, "tratamiento" es una aproximación para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, aunque no están limitados a, alivio o mejora de uno o más síntomas o procesos, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir sin empeorar) de la enfermedad, prevención de la extensión de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión (parcial o total), sea detectable o indetectable. "Tratamiento" puede significar también prolongar la supervivencia en comparación a la supervivencia esperada si no se recibe
35 tratamiento.

"Paliar" una enfermedad o trastorno significa que la extensión y/o manifestaciones clínicas indeseables de un trastorno o un estado de enfermedad se disminuyen y/o el curso del tiempo de la progresión se ralentiza o alarga, en comparación a no tratar el trastorno.

40 El dispositivo implantable de la presente invención puede usarse además en un método de formación de imágenes o visualización del sistema linfático que usa escintigrafía de rayos gamma, Tomografía de Emisión de Positrones (PET), Tomografía Computerizada de Emisión MonoFotónica (SPECT), Formación de Imágenes por Resonancia Magnética (MRI), rayos X, Tomografía por rayos X Asistida por Ordenador (CT), espectroscopia infrarroja cercana o ultrasonidos, que comprende administrar el dispositivo implantable de la presente invención a un sujeto y realizar
45 escintigrafía de rayos gamma, Tomografía de Emisión de Positrones (PET), Tomografía Computerizada de Emisión MonoFotónica (SPECT), Formación de Imágenes por Resonancia Magnética (MRI), rayos X, Tomografía por rayos X Asistida por Ordenador (CT), espectroscopia infrarroja cercana o ultrasonidos para formar imágenes o visualizar el sistema linfático. En una realización particular las partículas así dirigidas al sistema linfático en aplicaciones diagnósticas contendrán agentes bioactivos que son agentes de contraste o formación de imágenes adecuados tal como materiales ferromagnéticos tales como óxido de hierro, compuestos perfluoroquímicos tal como perfluorooctilbromuro, tintes, o radiomarcadores que emiten rayos gamma tales como Tecnecio-99m, Indio-111, Galio-67, Talio-201, Yodo-123, 125 o 131, radiomarcadores emisores de positrones tal como Flúor-18.
50

El dispositivo implantable de la invención puede ser útil para la visualización o formación de imágenes del nódulo linfático centinela en enfermedades neoplásicas. El nódulo linfático centinela es el primer nódulo linfático encontrado por una célula tumoral que produce metástasis después de que ha entrado en el sistema linfático. La importancia del nódulo linfático centinela estriba en el hecho de que las células tumorales que provocan metástasis se reconocen por el sistema inmune y se paran ahí. Muchas veces, estas células tumorales se destruyen por las células inmunes localizadas en el nódulo linfático centinela. Sin embargo, las células tumorales pueden sobrevivir, creando unos puntos de enfermedad metastásica en el nódulo linfático centinela. Si las células tumorales han provocado
55

5 metástasis a otras posiciones en el cuerpo, las células tumorales malignas se encontrarán en el nódulo linfático centinela el 99% de las veces. Por otro lado, si no se encuentran células tumorales en el nódulo linfático centinela después de un estrecho examen patológico, es muy improbable que el cáncer ocurra de nuevo después de que el tumor primario se haya eliminado por estas razones, es muy importante localizar el nódulo linfático centinela y, si fuera necesario, dirigir el tratamiento específicamente a él. La presente invención proporciona una nueva aproximación para distribuir agentes bioactivos, tal como coloides radiomarcados, u otros coloides detectables a los nódulos linfáticos centinela. El dispositivo implantable de la invención puede introducirse en el sitio o posición específica a través de un procedimiento mínimamente invasivo antes de la cirugía. Entonces el nódulo linfático centinela puede identificarse durante la cirugía, con examen patológico cuidadoso, para determinar la extensión de la disección del nódulo linfático.

La nueva formulación de PLGA-PTX descrita en esta memoria evita el uso de Cremóforo EL que está contenido en la formulación de paclitaxel inyectable actual. El Cremóforo EL puede provocar anafilaxis severa. Por consiguiente, el dispositivo implantable de la presente invención es ventajoso ya que evita usar aditivos necesarios aunque indeseados que se encuentran en las formulaciones i.v.

15 Los artículos "un" y "una" se usan en esta memoria para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo.

Los términos "comprenden" y "que comprenden" se usan en el sentido abierto, inclusivo, indicando que pueden incluirse elementos adicionales.

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente invención:

20 Ejemplos

Abreviaturas

DCM	diclorometano
DMSO	dimetilsulfóxido
DOX	doxorubicina
25 EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
FBS	suero bovino fetal
GFP	proteína de fluorescencia verde
HPESO	polímero hidrolizado de aceite de soja epoxidado
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
30 NHS	N-hidroxisuccinimida
PBS	solución salina tamponada de fosfato
PLGA	poli(D,L-lactida-co-glicolida)
PLM	micropartícula de polímero-lípido
PLN	nanopartícula de polímero-lípido
35 PTX	paclitaxel
PVDF	poli(fluoruro de vinilideno)
PVP	polivinilpirrolidina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	dodecilsulfato sódico
40 SEM	microscopia de barrido electrónico
TEM	microscopia de transmisión de electrones

Compuestos químicos

Poli(DL-lactida-co-glicolida) (PLGA, 75:25, PM 90000-126000), gelatina (tipo A 275 Bloom), alginato sódico, paclitaxel (taxol o PTX), colagenasa, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), rodamina, dodecilsulfato sódico (SDS), azida sódica, Polivinilpirrolidona (PVP, grado K29-32, PM promedio 58.000), Doxorubicina (como una sal de hidrocloreto), ácido esteárico se compraron de sigma Chemical Co., Canadá. El carbón activo (grado USP) se compró de Xenex, USA. El polímero aniónico HPESO (polímero hidrolizado de aceite de soja epoxidado) se proporcionó amablemente por Drs. Z. Liu y S. Erhan (Administración de Alimentación y Fármacos, USA) y el Pluronic F68 (copolímero en bloque no iónico) fue un regalo de BASF Corp. (Florham Park, NJ, U.S.A). Las partículas de aminopoliestireno (0,29 μm , 2,18 μm , 11,2 μm) y látex de poliestireno (partículas sólidas al 2,5% con un diámetro medio de 90 nm) que incorporan isotiocianato de fluoresceína (PSF) se obtuvieron de Polysciences (Wilmington, PA). El disolvente orgánico diclorometano (DCM) fue disolvente de HPLC. El acetonitrilo usado como fase móvil en cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) fue de grado HPLC. El ácido esteárico se recristalizó en etanol al 95% para la purificación. La solución salina tamponada de fosfato con calcio y magnesio que se compró también de Sigma Chemical Co. se usó como solución tampón para la medida de liberación *in vitro*. El agua destilada producida por Millipore (Millipore Corporation, MX, USA) se usó en todas partes. Anticuerpo policlonal de conejo LYVE-1 (ab14917), a dilución 1:500 en diluyente de anticuerpo Dako se obtuvo de abcam.

Líneas celulares y animales

Células de carcinoma de pulmón de células grandes humano NCI-H460 se obtuvieron a partir de la Colección de Cultivos tipo Americano (Rockville, MD). Las células se desarrollaron en matraces T80 en RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10% sin antibióticos en una atmósfera de aire al 95%/CO₂ al 5% a 37°C. Las células se subcultivaron cuando alcanzaron aproximadamente el 80% de confluencia.

La línea celular de cáncer de colon humano DLD-1 transfectada con receptor de factor de crecimiento hepático Met, que expresa proteína de fluorescencia verde (GFP) se proporcionó amablemente por el Dr. MS Tsao (Ontario Cancer Institute, Toronto, Canadá). Las células se cultivaron de forma rutinaria en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) (Gibco-BRL, Grand Island, NY).

Ratas desnudas Rowett macho de 4 semanas de edad (CR:NIH-RNU) y ratas Sprague Dawley hembras que pesaban 200-250 g se obtuvieron de Charles River Laboratories Inc. Tras la llegada los animales se mantuvieron bajo condiciones libres de patógeno específicas en jaulas microaislantes en una colonia aislada bajo luz, temperatura y humedad controladas. Los animales se aclimataron durante 1-2 semanas antes del comienzo de los protocolos de estudio. Los ratones con Deficiencia Inmune Combinada Severa hembras (SCID) se criaron en casa en el Ontario Cancer Institute (Ontario, Canadá). Los animales se usaron para el estudio experimental a la edad de 6-8 semanas. Todos los animales se alimentaron con comida en autoclave y agua *ad libitum*. Todas las manipulaciones se llevaron a cabo bajo condiciones estériles en una campana en flujo laminar. La condición de salud de los animales se evaluó de forma regular. A los animales se les hizo la eutanasia humanamente por asfixia con CO₂ cuando mostraron evidencia de cachexia avanzada o muerte inminente. Antes de los experimentos animales, se obtuvo una aprobación institucional de cuidado animal de la University Health Network/Ontario Cancer Institute, Universidad de Toronto.

Ejemplo 1: Distribución linfática intrapleural de varias especies de partículas

La investigación de distribución linfática intrapleural de varias especies de partículas se ha realizado en modelos de rata (Liu J et al Lung Cancer 2006; 51(3):377-86). Los sistemas de modelo consisten en ratas sanas, ratas después de pneumonectomía, y ratas que portan cáncer de pulmón ortotópico para simular escenarios clínicamente relevantes. La suspensión de partículas se suministró en la cavidad pleural para la investigación. Las partículas de carbón activo (carbón vegetal) se usaron primero como un indicador para demostrar la distribución linfática de partículas después de la administración intrapleural. Los resultados a partir del examen macroscópico, microscopia óptica y microscopia por transmisión de electrones (TEM) mostraron que las partículas de carbón con un amplio intervalo de tamaño se absorbieron por vasos linfáticos regionales y nódulos linfáticos. Para determinar la contribución del pulmón a la absorción linfática de estas partículas, la administración intrapleural de partículas de carbón se llevó a cabo inmediatamente después de la extirpación completa del pulmón izquierdo. Un modelo similar de distribución de partículas se vio con las partículas de carbón ampliamente depositadas en los vasos linfáticos regionales y nódulos linfáticos. Las fotografías TEM revelaron que el tamaño predominante de partículas visto en los nódulos linfáticos fue entre 1-2 μm . Estudios adicionales mostraron que las partículas en este intervalo de tamaño tenían mejor distribución linfática que las partículas con amplio intervalo de tamaño ya que pueden identificarse fácilmente en los nódulos linfáticos contralateral y peritoneal. Además, TEM reveló que algunas partículas de carbón con mucho menor tamaño se fagocitaron por macrófagos y se transportaron en los capilares linfáticos. Posteriormente, varias especies de partículas que incluyen tanto nanopartículas de poliestireno marcadas con fluorescencia no biodegradables con o sin modificación superficial con poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido metacrílico) y micropartículas de PLGA biodegradables marcadas con rodamina se estudiaron en el modelo sano y en uno de cáncer de pulmón ortotópico. Un modelo de distribución similar en los vasos linfáticos regionales y nódulos linfáticos se encontró a pesar de la diferencia en el material que constituye las partículas y la hidrofobicidad superficial de las partículas. En el modelo de cáncer de pulmón ortotópico, las partículas se absorbieron

significativamente por los nódulos linfáticos cancerosos regionales después de la administración intrapleural. Sin embargo, la distribución de las partículas en el pulmón se confinó principalmente a la pleura visceral donde los vasos linfáticos periféricos pulmonares permean. La absorción linfática selectiva de varias partículas en el cáncer de pulmón y modelos animales de pneumonectomía sugiere la aplicación potencial de esta estrategia de orientación en el cáncer de pulmón, quizás como un adyuvante después de la extirpación de cáncer de pulmón. La observación de que las partículas se encontraron en nódulos linfáticos mediastinales contralaterales aumenta la posibilidad de dirigir las áreas de drenaje linfático lejos del sitio de exposición primario.

Ejemplo 2: Impacto del tamaño en la distribución linfática de partículas después de la administración intrapleural

Un factor principal en la distribución de partículas linfáticas es el tamaño de partícula^{xxxvi}. Las partículas de aminopoliestireno se radiomarcaron para evaluar el impacto del tamaño en la absorción de partículas en el sistema linfático torácico. Las partículas de aminopoliestireno de tres tamaños, es decir 0,29 μm (pequeño), 2,18 μm (medio) y 11,2 μm (grande) se radiomarcaron directamente con ¹¹¹In. La eficiencia de marcado fue 68,9 \pm 2,1%, 81,9 \pm 3,2%, 61,2 \pm 4,3% para las partículas pequeña, media y grande respectivamente. La estabilidad de ¹¹¹In-aminopoliestireno se determinó tanto en solución salina como en plasma obtenido de las ratas. Los resultados muestran que el marcado de ¹¹¹In-aminopoliestireno es estable durante al menos 72 h.

El estudio de biodistribución *in vivo* de ¹¹¹In-aminopoliestireno se realizó en ratas con administración intrapleural del lado izquierdo. Cuatro grupos de ratas (4/gp) se usaron para examinar el efecto del tamaño en la absorción linfática. Tres grupos de animales se trataron con 0,29 μm , 2,18 μm , y 11,2 μm de ¹¹¹In-aminopoliestireno respectivamente (4 mg, 200 μCi /cada uno) y un grupo se trató con ¹¹¹In libre (200 μCi /cada uno) como control. 24 h después de la administración, muestras de tejido que incluyen nódulo linfático mediastinal del lado izquierdo (LLN), nódulo linfático mediastinal del lado derecho (RLN), sangre, pulmón y fluido de lavado pleural, se recogieron, se pesaron y se contaron posteriormente para la radioactividad. El porcentaje de dosis inyectada (% de DI) por órgano se calculó por comparación con una alícuota estándar de muestras inyectadas. Los resultados de biodistribución en el tejido se muestran en la Figura 1. 24 h después de la administración intrapleural, las partículas de poliestireno de 2,18 μm tenían absorción linfática significativamente mayor tanto de LLN como RLN en comparación con otros grupos. Para el LLN, el % de DI para los grupos de tamaño pequeño, medio, grande y el grupo de control fue 5,81 \pm 2,93%, 16,64 \pm 4,58%, 3,47 \pm 1,83% y 1,14 \pm 1,32% respectivamente. Para el RLN, el % de DI para los grupos de tamaño pequeño, medio, grande y el grupo de control fue 2,55 \pm 2,28%, 10,98 \pm 3,59%, 3,41 \pm 1,19% y 0,499 \pm 0,468% respectivamente. (Media \pm DE, n=4, P<0,01, ensayo *t* de Student desparejado).

Para examinar adicionalmente el tiempo de retención de la partícula en el tejido linfático regional, las partículas de ¹¹¹In-aminopoliestireno de tamaño medio (2,18 μm) se administraron de forma intrapleural y las biodistribuciones *in vivo* se investigaron durante 6 h, 24 h, 48 y 72 h después de la administración intrapleural. La absorción linfática pico se dio aproximadamente 24 h después de la inyección. La absorción en LLN y RLN a las 24 h fue 14,46 \pm 1,5% y 11,24 \pm 4,35% respectivamente. Después de 72 h, hubo 3,20 \pm 3,24% y 2,13 \pm 1,84% de DI retenida en el LLN y RLN respectivamente. La absorción sistémica en la sangre, pulmón, fue de 0,121 \pm 0,029%, 1,229 \pm 0,678% respectivamente, niveles significativamente menores que los distribuidos al tejido linfático (p <0,01, Figura 2). La formación de imágenes escintigráfica mostró que hubo acumulación significativa de radioactividad de ¹¹¹Indio en el área nodular mediastinal. Esto está bien correlacionado con el descubrimiento en la autopsia de acumulación de partículas en los tejidos linfáticos.

Los resultados indican que el tamaño de partícula tiene impacto significativo en la distribución de partículas en el sistema linfático. Aproximadamente 2 μm parece ser un tamaño adecuado para la orientación linfática torácica a través de la administración intrapleural en un modelo de rata.

Ejemplo 3: Síntesis y caracterización de microesferas de PLGA, PLGA-PTX

Preparación de micropartículas de PLGA cargadas con PLGA y paclitaxel

Las microesferas de PLGA se fabricaron usando la técnica seca por pulverizado según Mu L et al.^{xxxviii} con algunas modificaciones. En breve, un secado por pulverización a escala de laboratorio se llevó a cabo usando el secador por mini pulverizado B-191 de Buchi™ (Buchi™ Laboratory-Techniques, Suiza) con una boquilla estándar (0,7 mm de diámetro) para preparar microesferas de PLGA cargadas con paclitaxel. Las condiciones de operación se ajustaron como sigue: temperatura de entrada de aire 54°C, temperatura de salida 43°C, control de flujo de pulverizado (700 NL/h), ajuste de la bomba a la velocidad de pulverizado de alimentación de 4,0-4,5 ml/min, presión de atomización 6 bar (90 PSI), nivel de ajuste del aspirador (100%). PLGA, PTX, se disolvieron en un volumen apropiado de DCM, (la concentración total de la matriz material y el fármaco en la disolución orgánica fue ~2%; 2,0 g de PLGA / 100 ml de DCM; PLGA: PTX = 1: 0,08 en p/p), después se agitó a temperatura ambiente usando un agitador magnético hasta que todos los componentes se disolvieron de forma homogénea. La disolución se pulverizó entonces en seco hasta que no puede pulverizarse más producción. Para hacer partículas de PLGA-rodamina, los polvos de rodamina se disolvieron en DCM junto con polímero de PLGA (20 mg de rodamina, 4,0 g de PLGA en 200 ml de DCM). El producto seco se recogió. Las microesferas obtenidas se almacenaron en un desecador al vacío a temperatura ambiente. Microesferas de placebo en que PTX y rodamina estaban ausentes se prepararon con el mismo procedimiento.

Caracterización de micropartículas de PLGA cargadas con paclitaxel

Tamaño de partícula y morfología

5 Las distribuciones de tamaño de partícula se determinaron usando un analizador de tamaño de partículas por difracción láser Coulter LS230 (Beckman Coulter, Inc.). Las microesferas se suspendieron en agua con Tween 80 al 0,1% para evitar la agregación antes del análisis del tamaño de partícula. Para cada muestra, se calculó el diámetro medio de tres determinaciones. Los valores presentados son la media±desviación estándar de tres cargas diferentes de las partículas.

La morfología de superficie de las micropartículas de PLGA-PTX, los polvos PTX en bruto se determinaron usando un microscopio de barrido electrónico (SEM) (JEOL JSM-5900LV).

10 Determinación de contenido en fármaco en las partículas de PLGA

La medida del contenido en PTX en las microesferas se llevó a cabo por triplicado usando HPLC (cromatógrafo líquido HP1090). 0,5 mg de microesferas cargadas con paclitaxel se pesaron exactamente y se disolvieron en 0,5 ml de DCM. Una corriente de nitrógeno se introdujo suavemente para evaporar el DCM a temperatura ambiente. Después se añadió 1,0 ml de acetonitrilo-agua (50:50 en v/v) y se mezcló hasta que se obtuvo una disolución clara. 15 La disolución se puso en un vial para detección de HPLC. Los valores medios del contenido total de PTX se calcularon a partir de tres réplicas para cada formulación. Se usó una columna Inertsil ODS-2 en fase inversa (C18) con tamaño de poro de 5 µm. La fase móvil consiste en una mezcla de acetonitrilo-agua (50:50, v/v), y se distribuyó a un caudal de 1,0 ml/min con una bomba. Se inyectó una alícuota de 50 µl de las muestras con un auto-inyector. El efluente de columna se detectó a 227 nm con un detector UV. La carga de fármaco se calculó como la relación en 20 peso del fármaco atrapado en las microesferas al del peso del compuesto de partículas PLGA-PTX.

También se hicieron intentos para determinar el posible PTX libre presente en las microesferas de PLGA-PTX. Las microesferas se recogieron y se lavaron tres veces con agua destilada para eliminar el posible PTX libre. Las microesferas se recogieron por filtración a través de una membrana de nitrato de celulosa con tamaño de poro de 0,45 µm (Cat. Núm. 200-4045, Nalgene™ Labware) y se secaron a temperatura ambiente a presión reducida. La fracción de PTX en el fluido de lavado y la fracción del PTX restante en la microesfera de PLGA se determinó 25 adicionalmente usando HPLC. Las microesferas obtenidas se mantuvieron en el desecador a temperatura ambiente antes de análisis adicional.

Liberación de fármaco *in vitro* de las microesferas de PLGA-PTX

30 La liberación *in vitro* de microesferas de PLGA cargadas con paclitaxel se midió en PBS por triplicado a temperatura de 37°C. Se suspendieron 15 mg de microesferas cargadas con paclitaxel en 10 ml de PBS que contenía Tween™ 80 al 0,1% (v/v) en tubos tapados con tornillo. Los tubos se giraron de un lado a otro a 30 rpm a 37°C en un horno controlado termostáticamente y a intervalos de tiempo dados, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos y los 8 ml superiores de sobrenadante se guardaron para el análisis. Los tubos se rellenaron con 8 ml de PBS fresco. Los gránulos de microesferas precipitados se suspendieron de nuevo en 10 ml de tampón de PBS y se devolvieron 35 al horno. La cantidad de paclitaxel en 8 ml del sobrenadante se determinó por extracción de paclitaxel en 3 ml de DCM seguido por evaporación hasta sequedad a 45°C bajo una corriente de N₂, la reconstitución en 2 ml de acetonitrilo en agua 50:50 (v/v) y el análisis por HPLC como se describe anteriormente. Se generaron perfiles de liberación de fármaco acumulados.

Resultados

40 Eficiencia de preparación y encapsulado de microesferas

Se fabricaron con éxito microesferas de PLGA cargadas con PTX, microesferas de PLGA-rodamina y PLGA placebo usando una técnica de secado por pulverización. La concentración de PLGA en disolvente orgánico fue de 2% (p/v). El rendimiento de producción seca por pulverizado fue 12,3%. La carga de fármaco de la partícula osciló de 6,6%- 7,2% (p/p) que contenía 82,5%-90% de la cantidad esperada de carga de PTX inicial (8%) dependiendo de los 45 productos de diferentes cargas. La fracción libre de PTX lavada de las microesferas de PLGA-PTX fue 0,69% de la carga de fármaco total, una cantidad insignificante. Por consiguiente, las microesferas de PLGA-PTX usadas para el resto del estudio no fueron el sujeto del procedimiento de lavado.

La técnica de secado por pulverizado se usa ampliamente en los campos farmacéutico y bioquímico. Tiene varias ventajas, a pesar de un rendimiento de producción relativamente bajo. El secado por pulverización es un procedimiento continuo de una etapa, que normalmente produce partículas de tamaño uniforme. Es fácil escalar, de forma más sencilla y rápida que otros métodos convencionales usados en la fabricación de microesferas. Se describen varias técnicas distintas para formular micro o nanopartículas de PLGA-PTX^{xxix xli xlii}, de las que la más 50 ampliamente usada es evaporación de disolvente.

PTX es un agente altamente lipófilo y es relativamente resistente al calor con un punto de fusión de 213-220°C. Estas características lo hacen particularmente muy adecuado para los parámetros de fabricación y el disolvente 55

usado en este estudio. Existe potencial para mejorar la eficiencia de encapsulado y la carga de fármaco manipulando los parámetros de secado por pulverización o introduciendo aditivos químicos, tal como colesterol^{xliii}.

Características morfológicas de las microesferas

5 Las fotomicrografías SEM muestran que los tres tipos de las micropartículas tienen una morfología esférica similar con superficies relativamente suaves intactas. Las partículas PTX en bruto muestran una estructura cristalina irregular con gran variación de tamaños de partícula. El examen SEM no encontró evidencia de cristales de PTX incrustados en la superficie de las microesferas.

Tamaño de partícula y distribución de tamaño

10 Los tres tipos de microesferas de PLGA tienen un intervalo de tamaño estrecho de 1-8 μm . Se produjeron tres cargas de partículas de PLGA-PTX. El tamaño medio de las microesferas fue $3,5 \pm 2,1 \mu\text{m}$. Los intervalos de tamaño de partícula se confirmaron adicionalmente por examen SEM. El tamaño de partícula es un factor importante en la determinación de la distribución de partículas linfática^{xliv}. El tamaño óptimo de partícula para la distribución linfática varía con los diferentes compartimientos corporales^{xlv}. Cuando las partículas se administran de forma intraperitoneal o intrapleural, las uniones abiertas en la pared linfática son las únicas barreras de limitación de tamaño^{xlvi}, ya que el drenaje de partículas es simplemente de la cavidad a los vasos linfáticos superficiales sin difusión a través del espacio intersticial. Se sugiere que el tamaño de partícula adecuado para orientar los nódulos linfáticos regionales por medio de administración intraperitoneal o intrapleural es aproximadamente 1-5 μm ^{xlvii xlviii}, mientras puede necesitarse nanotamaño para dirigir a los vasos linfáticos en otra parte^{xlix}. El tamaño de partícula formulado parece adecuado para la orientación linfática a través de administración intraperitoneal e intrapleural. No fue la intención formular partículas de PLGA con varios tamaños en este estudio. Sin embargo, las partículas de PLGA con diferentes intervalos de tamaño pueden hacerse usando diferentes métodos de formulación^{li llii liii}. La aplicación de emulsificantes o aditivos apropiados en la formulación puede controlar el tamaño de partícula y la distribución del tamaño^{liv}.

Liberación *in vitro* de paclitaxel a partir de micropartículas de PLGA

25 El perfil de liberación de paclitaxel *in vitro* a partir de microesferas de PLGA-PTX se muestran en la Figura 3. Las condiciones de hundimiento se mantuvieron después de las primeras 24 h del estudio con la sustitución del medio de liberación durante cada medida. La liberación de fármaco acumulativo se midió diariamente en los primeros 21 días, y se extendió a cada 5 días durante el resto del estudio por la lenta liberación de fármaco. Las microesferas liberan aproximadamente el 37% del paclitaxel encapsulado total que es equivalente a 2,4 mg de paclitaxel/100 mg de microesferas durante el curso del estudio de liberación. Una fase inicial de liberación explosiva se observó en el periodo de las primeras 24 h durante el que se liberó el 6,8% del fármaco cargado. Esto se siguió por una fase más lenta con cinéticas de liberación del orden cercano a cero observado entre los días segundo y catorce. Entre los días 14 y 51, la velocidad de liberación disminuyó gradualmente.

Ejemplo 4: Síntesis y caracterización de la esponja de gelatina que contiene micropartículas

35 Preparación de esponjas de gelatina con partículas PTX y PLGA-PTX

40 Los polvos de gelatina (tipo A 275 bloom) se disolvieron en agua destilada a 50°C durante 2 h para preparar disoluciones de gel al 2% (p/p). 5,0 mg de PLGA-PTX, o su cantidad equivalente de PTX libre (330 μg) se dispersaron en TweenTM 80 dH₂O al 0,1% (p/v). La suspensión de partículas pre-preparada se mezcló después con igual volumen de la disolución de gel al 2% para hacer una disolución de gel mixta al 1% (p/p). La disolución de gel se mezcló completamente mediante pipeteado suave y 2 ml de la disolución se pusieron entonces en los pocillos de plástico de un plato de cultivo celular de 24 pocillos (Corning). Las muestras se congelaron a -30°C durante 2 h y se secaron por congelación usando un secador por congelación en bandeja (Dura-stop μP FTS System). Las condiciones de secado por congelación se ajustaron como sigue. Secado primario, a -30°C, cámara de vacío a 200 mT, durante 72 h. Secado secundario a 20°C, cámara de vacío a ± 20 mT, durante 4 h.

45 Preparación de esponja de gelatina-alginato que contiene varias microesferas

50 Se disolvieron polvos de gelatina y alginato sódico en agua doblemente destilada a 50°C durante 2 h para preparar disoluciones al 1% (p/p) y 2% en peso (p/p). Cada disolución se mezcló con las relaciones de peso de gelatina a alginato sódico para ser 7:3, y 5:5 y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. 5 mg de microesferas de PLGA o PLGA-rodamina o coloides de carbono (con tres diferentes intervalos de tamaño: 700 a 1500 nm, 400 a 600 nm y 140 a 240 nm) se dispersaron entonces en 20 ml de disolución de gel que contenía Tween 80 (v/v) al 0,1%. La disolución de gel se llenó entonces en un plato de cultivo celular de poliestireno de 24 pocillos (Corning) o molde pequeño (353097 Cell culture Insert, Becton Dickinson) y se congeló a -70°C durante toda la noche y se liofilizó a -50°C durante 72 h.

Morfología de la esponja de gelatina que contiene micropartículas

La morfología de la esponja de gelatina impregnada con PLGA, PLGA-PTX, PLGA-rodamina y coloides de carbono se examinó usando microscopía óptica, microscopía de fluorescencia y SEM por consiguiente.

Preparación de esponjas de gelatina reticulada que contienen microesferas de PLGA-PTX

5 Reticulado con sistema EDC/NHS

La selección de un método de reticulado apropiado debería tomar en consideración el efecto reticulante, que mantiene la integridad de las microesferas de PLGA-PTX y la toxicidad potencial del reticulador al tejido humano. En el estudio actual, el reticulado de la esponja de gelatina se llevó a cabo usando el sistema (EDC/NHS)^{iv} con algunas modificaciones. El sistema EDC/NHS se seleccionó porque ha mostrado mejor biocompatibilidad que los demás^{vi}. El reticulado tiene lugar por una reacción entre grupos carboxilo de residuos de ácido glutámico o aspártico y grupos amina para formar enlaces amida^{vii} ^{viii}. La reacción de reticulado da por resultado un derivado de urea soluble en agua como el único subproducto, que puede eliminarse fácilmente del cuerpo humano. Por tanto, la preocupación sobre la liberación de residuos tóxicos, normalmente asociados con otros agentes de reticulado químicos, se reduce.

10 EDC/NHS se introdujo directamente en la disolución de gel de gelatina en dos relaciones molares diferentes de EDC:COOH (1,75:1 y 7:1) para obtener las esponjas con diferente grado de reticulado, mientras la relación molar de NHS o EDC se mantuvo constante a 0,4. Después de añadir los reticuladores, las muestras se mantuvieron a 4°C durante 30 minutos antes del inicio del secado por congelación.

Reticulado con vapor de formaldehído

20 Un método alternativo de reticulado que usa vapor de formaldehído se intentó también después de que se sintetizaran las esponjas. Esto puede ayudar a mantener la forma y textura de la esponja en comparación con la adición de reticulador directamente en la disolución de gel o mojando la esponja en el medio de reticulado. Las esponjas no reticuladas se suspendieron sobre una capa de 1 cm de profundidad de formaldehído acuoso al 37% en un recipiente cerrado a temperatura ambiente para el reticulado. El tiempo de exposición del vapor de formaldehído varió de 15 min a 24 h. Después del reticulado, las esponjas se ventilaron al aire y se colocaron en un desecador a vacío continuo durante 2 h para minimizar el aldehído residual en la esponja.

Ensayo de liberación de fármaco *in vitro*

30 La liberación *in vitro* de PTX desde microesferas de PLGA-PTX y esponjas de gelatina impregnadas con PTX libre o microesferas de PLGA-PTX se midió en unas disoluciones de tampón fosfato (1xPBS pH 7,4) que contenían calcio y magnesio y dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,5% (p/v) a una concentración fisiológica de colagenasa bacteriana (tipo IV) de 500 ng/ml de *Clostridium histolyticum* (EC 3.4.24.3 Sigma Chemical Company, St Louis, MO) por cuadruplicado. Las microesferas o muestra de esponja de gelatina que contenían la cantidad equivalente de 330 µg de PTX se sumergieron en 50 mL de medio de incubación en tubos tapados con tornillo cónico de 50 mL, se conservaron con azida sódica al 0,05% (p/v) para evitar el crecimiento microbiano. Las muestras se incubaron a 37°C y se agitaron horizontalmente a 100 min⁻¹ en una incubadora de agitación (Multitron™ II). A intervalos de tiempo dados, los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min. 200 µl de sobrenadante se pasaron entonces a través de un filtro conducido por jeringa de 0,22 µm con membrana de PVDF (MILLEX®-GV, Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Irlanda). Una alícuota de 100 µl de filtrado se mezcló con igual volumen de acetonitrilo en un tubo Appendorf™ de 1,5 ml. Después de un breve vórtice la mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se hizo alícuotas para la detección por HPLC como se describe anteriormente. La cantidad de PTX se calculó a partir de las curvas de calibrado. Los perfiles de liberación de fármaco acumulativos se obtuvieron con la corrección de la pérdida de volumen. El equilibrio de masas de paclitaxel se determinó al final del estudio de liberación de fármaco (Tabla 1) ilustra las muestras seleccionadas para el estudio de liberación de fármaco *in vitro*.

Degradación *in vitro* de la esponja de gelatina

45 El comportamiento de degradación de la esponja de gelatina no reticulada y reticulada (EDC/NHS) que contiene microesferas placebo de PLGA se examinó en el medio acuoso que contiene colagenasa (500 ng/ml), que fue similar al medio de liberación de fármaco sin añadir SDS. Las muestras de esponja con tamaño y peso similar (40-45 mg) se usaron para el estudio. Las muestras de no reticulado, bajo reticulado (EDC:COOH=1,75:1) y altamente reticulado (EDC:COOH=7,1) (n=3 para cada tipo) se sumergieron en 40 ml del medio de degradación respectivamente. Las muestras se incubaron a 37°C y se agitaron horizontalmente a 100 min⁻¹. El tiempo necesario para completar la degradación de la esponja se grabó. El estudio dura 3 semanas. La liberación de las microesferas de PLGA estuvo también bajo observación.

55 Un ensayo de degradación enzimática modificado se empleó para evaluar la capacidad de degradación de la esponja de gelatina reticulada con vapor de formaldehído. Pedazos de esponjas que pesan 40-45 mg se mojaron a 37°C en una disolución de PBS que contenía CaCl₂ y colagenasa (tipo IV de Sigma Chemical Co.) a una concentración de 200 µg/ml (200 mg por gramo de esponja). El periodo para la completa degradación de las esponjas se grabó.

Hinchado de la esponja de gelatina

Para medir la capacidad de hinchado de la esponja, una muestra de esponja seca pre-pesada se sumergió en agua destilada durante 20 s. Después de que toda el agua se eliminara colocando la esponja húmeda en la placa de Petri durante 1 min, se midió el peso de la muestra húmeda. El procedimiento se repitió con 6 diferentes trozos de esponja. Después, la capacidad de hinchado de la esponja se determinó según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de hinchado} = [(P_h - P_s) \times 100 / P_s]$$

donde P_h y P_s representan el peso de la muestra húmeda y seca, respectivamente.

Resultados

Morfología de la esponja de gelatina impregnada con microesferas de PLGA

Los dispositivos de esponja de gelatina y alginato de gelatina pueden prepararse en diferentes tamaños y con diferentes geometrías y contenido. Muestras representativas de esponja de varios tipos se muestran en la Figura 4. La morfología de las microesferas de PLGA-PTX y las microesferas en las esponjas de gelatina es similar, indicando que el procedimiento de sintetizado de la esponja de gelatina no tiene impacto significativo en la morfología de la partícula. Todas las esponjas preparadas demuestran estructuras de red similares. A máxima ampliación las microesferas dentro de la estructura de la esponja son claramente evidentes, donde las micropartículas se dispersan de forma uniforme en la red de la esponja. En algunas áreas las microesferas aparecen en forma de paquetes tipo racimo entremezclados con la matriz de la esponja. La morfología de la esponja de gelatina reticulada que contiene microesferas de PLGA-PTX también se examinó. El tamaño de poro de la esponja se agrandó cuando el gel de gelatina se trató con EDC/NHS en comparación con el de la esponja de gelatina no reticulada. Sin embargo, la porosidad de la esponja reticulada fue menor que la de la esponja no reticulada. Se obtuvo una micrografía de fluorescencia de una esponja de gelatina que contenía microesferas de PLGA-rodamina, lo que muestra un considerable número de microesferas de PLGA-rodamina en las matrices de esponja.

Reticulado de esponja de gelatina, hinchado y degradación *in vitro*

El reticulado de la esponja se consiguió después de tratar las disoluciones de gel de gelatina con EDC/NHS. La extensión del reticulado se comparó entre dos relaciones molares diferentes de EDC:COOH (1,75:1 y 7:1). La evaluación de las propiedades mecánicas de la esponja no era la pretensión de este estudio ya que la esponja reticulada pareció más viscosa. Los resultados muestran que la extensión del reticulado de la gelatina aumenta con la mayor relación molar de EDC a COOH. Esto dio por resultado una mayor resistencia de la esponja a la degradación en disolución de PBS colagenasa. 40 mg de la esponja de gelatina hecha de disolución de gel al 1% degrada en medio acuoso que contiene colagenasa (500 ng/ml) en 45-60 min. Las microesferas de PLGA impregnadas en la esponja se liberaron rápidamente mientras la esponja se desintegraba. La esponja de gelatina altamente reticulada con relación molar de EDC:COOH = 7:1 permaneció intacta o insoluble en el mismo medio después de 3 semanas de incubación. No hubo liberación obvia de las microesferas de PLGA. La esponja de relativamente bajo reticulado con relación molar de EDC:COOH = 1,75:1 se desintegró completamente después de 10 días de incubación. Se observó la liberación de microesferas de PLGA en el medio. La degradabilidad enzimática de la esponja de gelatina reticulada por vapor de formaldehído se muestra en la Tabla 2. Los resultados muestran que dado el mismo tiempo de exposición de vapor de formaldehído, la biodegradabilidad *in vitro* de la esponja de gelatina es inversamente proporcional a la concentración de la disolución de gel. Introducir alginato de polímero hidrófilo en la matriz de gel tiende a aumentar la biodegradabilidad en la esponja. La tendencia para partículas de PLGA secuestradas de filtrarse de la matriz de gelatina depende de un número de factores: tiempo de degradación, efecto de reticulado, medio de liberación y su composición. Por lo tanto, la degradabilidad *in vitro*, que refleja parcialmente el efecto de reticulado, debería interpretarse según las condiciones del ensayo.

El hinchado de la esponja de gelatina era inversamente proporcional al grado de reticulado. El porcentaje de hinchado era 746±41%, 522±24% y 425±39% para esponjas no reticuladas, de bajo reticulado y altamente reticuladas (EDC/NHS), respectivamente. Esta tendencia podría atribuirse a la porosidad decreciente de las esponjas por adición de un reticulador. Como resultado, las esponjas altamente reticuladas no podrían soportar mucha agua en su estructura de red.

La mayoría de esponjas de gelatina usadas para propósitos médicos se reticulan para prolongar su degradación en el cuerpo humano. Aunque el reticulado químico mediante varios agentes de reticulado, tales como formaldehído y glutaraldehído, se han presentado, la toxicidad de estos compuestos químicos en sistemas biológicos se vuelve una gran preocupación. EDC/NHS es un sistema biológicamente seguro para reticular esponjas de gelatina. El efecto de reticulado puede alterarse ajustando la relación molar de EDC/COOH. Según la bibliografía, la mayor parte del procedimiento de reticulado se lleva a cabo después de que la esponja de gelatina se ha sintetizado. En este caso, la esponja o bien se expone a medio acuoso que contiene EDC/NHS o a disolvente orgánico tal como mezcla de acetona/agua al 90% (v/v) que contiene EDC para reducir la cantidad del EDC usado para el reticulado. Sin embargo, estas aproximaciones no son adecuadas para este estudio ya que pueden o bien desencadenar la

liberación del fármaco o dañar fácilmente la integridad de las microesferas de PLGA-PTX. Otros métodos de reticulado físico, tal como calentamiento térmico e irradiación ultravioleta no son apropiados ya que pueden dañar la integridad de la microesfera de PLGA o degradar el PTX. La esponja de gelatina altamente reticulada que contiene microesferas de PLGA-PTX se seleccionó para el estudio de liberación de fármaco *in vitro*.

5 Liberación *in vitro* de paclitaxel a partir de esponja de gelatina

Los perfiles de liberación de PTX *in vitro* se muestran en la Figura 5. Cuando esponjas de gelatina no reticuladas que contienen partículas de PTX de cristal en bruto se colocaron en el medio de liberación de fármaco, se hincharon y después se disolvieron totalmente en una hora (45-60 min). El fármaco se liberó rápidamente y casi completamente (>90%) poco después de la exposición al medio de liberación (1 h) y permaneció a un nivel similar a lo largo del curso del estudio, indicando que el PTX en sí mismo no tenía propiedad de control de liberación. Como la esponja de gelatina no reticulada desintegró rápidamente en el medio de liberación, la esponja de gelatina soluble en agua no tiene efecto limitante en la liberación de PTX en el medio. En general, la velocidad de liberación de PTX de todas las esponjas de gelatina que contienen microesferas de PLGA-PTX fue lenta. Los perfiles de liberación de fármaco de microesferas de PLGA-PTX y la esponja de gelatina que contiene microesferas de PLGA-PTX fueron muy similares durante un periodo de 19 días. Los resultados mostraron que entre 7,4-8,5% de la cantidad total cargada se liberó en este periodo de tiempo. Hubo una pequeña explosión en la 1ª h (aproximadamente 2% del PTX cargado total) se liberó seguido por una liberación más lenta y continua. No se observó diferencia significativa en la cantidad de PTX liberado de PLGA y el compuesto de gelatina-PLGA (no reticulado) al final del estudio (Día 19) ($P > 0,05$, ensayo *t* bilateral). Sin embargo, la esponja de gelatina reticulada que contenía microesferas de PLGA-PTX ralentizó la velocidad de liberación de fármaco durante los primeros tres días del estudio de liberación de fármaco. Esta fase de retraso en la liberación inicial de fármaco fue distinta en comparación con otras muestras (Figura 5). Después de una liberación de fármaco más lenta pero constante durante aproximadamente el 4 día, pareció que la liberación de PTX alcanzó un estancamiento durante otros 3 días. Una liberación de fármaco continua siguió. El día 19, había 7,1% del PTX cargado total liberado.

Después de completar el estudio de liberación *in vitro*, se hizo un intento de equilibrio de masas del PTX. La recuperación total de PTX calculada como la cantidad acumulada liberada *in vitro* y la cantidad recuperada de las microesferas fue 57,7%, 66,9% y 63,3% de la carga inicial para el PLGA-PTX, la esponja de gelatina no reticulada que contenía el PLGA-PTX y la esponja de gelatina reticulada que contenía el PLGA-PTX respectivamente. El porcentaje de liberación de PTX acumulado se calculó con la consideración del equilibrio de masa final. Los resultados totales indican que tanto PLGA-PTX como los compuestos de PLGA-PTX de esponja tienen propiedades de control de liberación. Sin embargo, la liberación controlada de PTX está gobernada principalmente por la degradación de microesferas de polímero de PLGA. El reticulado de esponja de gelatina puede ejercer un efecto limitante adicional en la liberación de PTX reteniendo las microesferas de PLGA-PTX en su matriz hinchada, que puede reducir la exposición del polímero al medio acuoso. La liberación de PTX acumulado total obtenido de este estudio fue menor que la presentada en la bibliografía^{lix lx lxi} principalmente porque se usó un sistema de liberación de fármaco distinto y un único método de muestreo. Con este método un pequeño volumen del medio de liberación se eliminó para el ensayo de HPLC en distinción a otros métodos que sustituyen el medio muestreado con medio de liberación fresco que puede alterar el medio de liberación de fármaco. Además, las muestras se pasaron a través de un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0,22 μm (membrana PVDF con baja absorción de PTX) para eliminar posible contaminación de microesferas para la detección de PTX.

La liberación controlada de PTX tiene fuerte implicación clínica para tratar cáncer ya que proporciona una posibilidad de mantener una concentración de fármaco terapéutico durante un extenso periodo de tiempo. El PTX actúa estabilizando microtúbulos para promover el montaje de microtúbulos en células, que bloquea en la fase G_2/M del ciclo celular^{lxii}. Este efecto específico del ciclo celular puede dar por resultado un efecto dependiente del calendario en citotoxicidad. En particular, duraciones más largas de exposición a PTX puede permitir que una gran proporción de células entren en la fase G_2/M , que puede aumentar la citotoxicidad^{lxii} demostrado que por encima de una concentración de PTX de 0,05 μM , la citotoxicidad era más dependiente de las duraciones crecientes de exposición que concentraciones crecientes de PTX^{lxiii}. Además, la resistencia a PTX *in vitro* puede vencerse por exposición prolongada al fármaco^{lxiv}.

El compuesto de gelatina y microesferas de PLGA-PTX desarrollado en este estudio proporciona oportunidades para optimizar adicionalmente la liberación controlada de PTX. Puede inferirse de los resultados preliminares que manipulando adicionalmente el efecto de reticulado, incorporando microesferas de PLGA-PTX junto con PTX libre en composición apropiada, existe potencial para alcanzar una liberación controlada deseada de PTX para orientación linfática.

55 Ejemplo 5: Orientación al sistema linfático regional por implantación de esponja de gelatina que contiene micro y nanopartículas

Capacidad de orientación linfática *in vivo*

La capacidad de orientación y biocompatibilidad linfática se investigó adicionalmente a través de implantación tanto intraperitoneal como intrapleurales de los dispositivos de esponja en ratas sanas y ratas desnudas que portan cáncer

de pulmón ortotópico. Se aplicaron las esponjas de gelatina no reticulada que contenía microesferas de PLGA-rodamina y coloides de carbono. Las esponjas se introdujeron quirúrgicamente en la cavidad peritoneal y el espacio pleural de las ratas. Para el procedimiento de implantación intraperitoneal, los animales se anestesiaron por inhalación de isoflurano al 3%. Se hizo una incisión de 1,0 cm en el área gástrica superior del abdomen bajo condiciones estériles. Una esponja de gelatina que pesaba 40 mg, que contenía microesferas de PLGA-rodamina se insertó en la cavidad peritoneal en el sitio menos curvatura del estómago que es rico en tejido linfoide. La incisión abdominal se cerró con grapas quirúrgicas.

Para el procedimiento de implantación intrapleural, los animales se anestesiaron inicialmente usando una cámara de inducción de isoflurano con isoflurano al ~5% y después se intubaron a través de las bocas con angiocatéteres de calibre 16 (Becton Dickinson, Infusion therapy systems Inc. Sandy, Utah 84070). Los animales se colocaron en una posición de decúbito lateral derecho con control de las patas. El catéter se conectó a un ventilador de roedor con volumen ciclado que repartía un volumen de ventilación pulmonar de 10 ml/kg a una velocidad de 80-100 respiraciones/min y manteniendo el isoflurano al 3%. El lado izquierdo de la pared del pecho se limpió, se afeitó y se esterilizó con betadine. Una incisión en la piel anterolateral de 1,5 cm se hizo sobre el quinto espacio intercostal y que se extendía en la cavidad pleural. Las costillas se apartaron mediante un dilatador de auto-retención estéril. La esponja de gelatina pre-preparada que contenía PLGA-rodamina o coloides de carbono se introdujo en el lado medio del espacio pleural. Después de la inserción de la esponja, las costillas se reaproximaron con sutura de seda 4-0 y la incisión de la piel se cerró con grapas quirúrgicas. La implantación intrapleural similar se llevó a cabo en un modelo de cáncer de pulmón ortotópico H460 bien establecido^{ix}. La esponja que contenía 5 mg de PLGA-rodamina se introdujo en la cavidad pleural a través de toracotomía izquierda a los 21 días después de la implantación endobronquial del tumor de pulmón H460.

Se hizo la eutanasia a los animales a los 3 o 7 días después de la implantación (n=3 para cada grupo). El tejido interesado especialmente nódulos linfáticos regionales (mediastinal, celíaco), otros tejidos linfoides, omento, mesenterio se cosecharon para el examen microscópico. Las muestras de tejido se colocaron en pocillos de tejido llenos con medio incrustado de LAMB ornitina carbamil transferasa (OCT) y se congelaron rápidamente en hielo seco. Se hicieron criosecciones de tejido en serie de 3 µm tanto para detección de fluorescencia como microscópica visible. Después de la identificación de las partículas marcadas con fluorescencia, las láminas de tejido pareado sufrieron tinción H&E para la confirmación de la histología por microscopía visible. Las áreas quirúrgicas se examinaron para evidencia del grado de integridad y trozos residuales de las esponjas.

Resultados

Evaluación *in vivo* de orientabilidad linfática de compuestos de PLGA de gelatina

No hubo complicaciones resultantes de la implantación de la esponja en los animales. Tres días después de la implantación, todas las esponjas se desintegraron parcialmente. Siete días después de la implantación, las esponjas estaban casi completamente desintegradas. La microscopía de fluorescencia reveló que las microesferas de PLGA-rodamina se absorbieron de forma espontánea por los nódulos linfáticos regionales a través de la implantación tanto intraperitoneal como intrapleural. La implantación intraperitoneal de la esponja de PLGA de gelatina también dio por resultado la absorción de partículas linfáticas por el mesenterio, y posterior tejido linfoide peritoneal, sitios donde la extensión del cáncer a menudo implica. Las partículas de PLGA-rodamina se distribuyeron también con éxito al nódulo linfático mediastinal canceroso a través de la implantación intrapleural. La implantación intrapleural de esponja de gelatina de carbono definió la distribución linfática de coloides de carbono al tejido linfático regional torácico que incluye nódulos linfáticos mediastinales ipsilaterales y contralaterales, nódulo linfático hiliar, nódulo linfático subcarinal, nódulo linfático de la arteria mamaria interna y tejido linfoide mediastinal posterior. El nódulo linfático celíaco teñido de carbono se recuperó también a través de esta aproximación. Las partículas de carbono en el intervalo de tamaño menor (140-240 nm o menor) tiende a absorberse por los vasos linfáticos determinados por SEM. Aunque la esponja de gelatina no reticulada se desintegró rápidamente *in vitro* (en 1 h), un procedimiento más lento de biodegradación se observó *in vivo*. Los interesantes resultados del estudio *in vivo* preliminar es alentador ya que prueba el principio de que los vehículos de fármaco particulado tanto biodegradables como no biodegradables pueden distribuirse de forma efectiva a los vasos linfáticos y nódulos linfáticos diana (local, regional y remoto) a través de la implantación de nuestro dispositivo de distribución de fármaco linfático recientemente desarrollado.

Ejemplo 6: Eficacia *in vitro* de PLGA-paclitaxel

Las células de cáncer de pulmón H460 se cultivaron a densidad apropiada en platos de 6 cm en medio RPMI-1640 con suero bovino fetal al 10%, y se dejaron fijar toda la noche. Las células H460 se trataron con uno de paclitaxel libre, placebo de PLGA o PLGA-paclitaxel a diferentes concentraciones para evaluar la citotoxicidad. Paclitaxel, compuesto de PLGA-paclitaxel equivalente y vehículo de PLGA se solubilizaron en DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma), y se diluyeron más con medio RPMI-1640. Las células en los platos se trataron con el fármaco a concentración de 0,1-1000 nM. La concentración final de DMSO en el medio de fármaco fue < 0,1%. El tratamiento de simulación con esta concentración de DMSO se implementó para las células de control H460. Las células se incubaron a 37°C durante 48 h después de la adición de fármaco. El medio de fármaco se aspiró después, y las células se enjuagaron una vez con PBS. Un volumen de 5 ml de medio libre de fármaco se añadió entonces. Los cultivos celulares se incubaron durante 14 días a 37°C en una incubadora humidificada con una mezcla de 95% de aire y 5% de CO₂,

5 permitiendo a las células viables crecer en colonias macroscópicas. Después se eliminó el medio y las colonias se fijaron y se tiñeron con una disolución al 0,5% de azul de metileno en etanol al 70%. Las colonias se examinaron usando el estereomicroscopio (Leica MZ FLIII). El conteo de la colonia se analizó usando un software de análisis de imagen Image pro-plus (versión 6.0), a partir del cual se calcularon las eficiencias de cultivo en base al número de células cultivadas en los platos de cultivo de 6 cm. Las colonias en cada plato se contaron y el resultado se expresó como un porcentaje de las colonias formadas en los platos de control no expuestos a paclitaxel. El porcentaje de valores de muerte celular para los tratamientos de paclitaxel se representaron como una función de la concentración de fármaco usada. La fracción superviviente se determinó dividiendo la eficiencia de cultivo de las células tratadas con fármaco por la de las células sin exposición al fármaco (es decir, el control).

10 Resultados

15 Las células de cáncer de pulmón H460 parecieron ser susceptibles al tratamiento con paclitaxel *in vitro*. Las respuestas de la célula H460 al paclitaxel y PLGA-paclitaxel fueron dependientes de la concentración. En el intervalo de concentración de 1,0-1000 nM, paclitaxel y PLGA-paclitaxel mostraron similar efecto citotóxico en la formación de la colonia de células H460 (Figura 6A). PLGA no tuvo efecto adicional en la formación de la colonia en comparación con el control de simulación (Figura 6B). La duración de la exposición al fármaco afectó significativamente la potencia de taxol *in vitro*. Cuando las células H460 se trataron con concentración de taxol de CI_{50} (5 nM)^{lxvi}, la citotoxicidad fue más dependiente de las duraciones crecientes de exposición al fármaco (Figura 6C).

Se había mostrado anteriormente que el paclitaxel es estable en medio de cultivo celular, por Ringel, et al.^{lxvii}. La potencia de las disoluciones de paclitaxel no habría disminuido por lo tanto durante el curso de la incubación celular.

20 El paclitaxel extraído del compuesto de PLGA-PTX es tan efectivo como el paclitaxel original, indicando que la formulación de PLGA-PTX no tiene impacto adverso en la eficacia del paclitaxel. Aumentar la duración de la exposición a paclitaxel permite que más células en una muestra dada entren en las fases del ciclo celular durante el que el paclitaxel es activo. Con periodos más cortos de exposición al fármaco, una mayor proporción de células pueden existir enteramente fuera de las fases G₂ y M sensibles al paclitaxel durante el intervalo del tratamiento. Se encuentra también que el paclitaxel es un sensibilizador de radiación efectivo cuando se da en combinación con radioterapia secuencial o concurrente porque sincroniza las células tumorales en la fase G₂/M, la parte más radiosensible del ciclo celular. Estudios tanto preclínicos como clínicos han mostrado el efecto radiosensibilizador del paclitaxel^{lxviii}. Por lo tanto, la distribución orientada de paclitaxel al sistema linfático regional puede mejorar el efecto tanto quimio como radioterapéutico en la metástasis linfática.

30 Ejemplo 7: Síntesis de esponja de gelatina que contiene micro (PLM) o nanopartículas (PLN) híbridas polímero-lípido encapsuladas con doxorubicina.

Preparación de sistema PLM-Dox y PLN-Dox

35 Se prepararon partículas de lípido de dos diferentes tamaños (tamaño micrómetro PLM; tamaño nanómetro PLN) con la misma composición siguiendo los procedimientos adoptados del estudio de Wong et al.^{lxix}. Una mezcla de 100 mg de ácido esteárico y 0,9 ml de disolución acuosa que contenía 4,2 mg de doxorubicina y Pluronic-F68 (2,5% en p/v) se calentó a 72-75°C, seguido por la adición de 2,1 mg de polímero HPESO, un polímero aniónico mostrado anteriormente capaz de mejorar la distribución de doxorubicina en la fase lipídica^{lxx}. PLN se prepararon sometiendo la mezcla a cinco ciclos de ultrasonificación, durando cada ciclo 2 minutos, y dispersando la emulsión de tamaño submicra resultante en agua a 4°C (1 parte de emulsión a 4 partes de agua). PLM se prepararon sustituyendo la etapa de ultrasonificación con agitación magnética con barra magnética. Se muestrearon alícuotas de partículas para la medida de carga Dox por espectrometría vis/UV y determinación del tamaño de partícula por espectroscopia de correlación de fotones como se describe anteriormente^{lxxi}. La doxorubicina libre, no cargada, en las suspensiones de partículas se eliminó por Sephadex™ C-25, un intercambiador de iones catiónicos que enlaza de forma efectiva con doxorubicina^{lxxii}, antes de que las partículas se usaran para la preparación de implante.

45 La suspensión de partículas pre-preparada se mezcló entonces con igual volumen de la disolución de gel al 2% para hacer una disolución de gel mixta al 1% (p/p). La disolución de gel se mezcló completamente por pipeteado suave y 1 ml de la disolución se colocó entonces en los pocillos de plástico de un plato de cultivo celular de 24 pocillos (Corning). Las muestras de gel se congelaron a -70°C durante toda la noche y se liofilizó a -50°C durante 72 h.

50 La esponja de gelatina que contenía PLM-Dox o PLN-Dox se examinó adicionalmente por microscopia de fluorescencia confocal y SEM.

Resultados

55 La carga de doxorubicina de PLM y PLN fue $3,0 \pm 0,5\%$ y $3,2 \pm 0,4\%$, respectivamente (n = 3). La distribución de tamaño de las partículas se midió por espectroscopia correlacional de fotones. El tamaño de partícula promedio de PLM y PLN fue 1750 ± 45 nm y 68 ± 12 nm, respectivamente. Las suspensiones de partícula usadas para la preparación del implante contenían 2% (p/v) de contenido lipídico. Las concentraciones de doxorubicina para ambos tipos de partículas se ajustaron a 0,6 mg/mL para la preparación del implante.

También se obtuvo una micrografía SEM de la esponja que contenía PLM-Dox. PLM-Dox y PLN-Dox se integraron en la matriz de gelatina como se detectó por la microscopia de fluorescencia confocal. El sistema PLN-Dox solo ha mostrado propiedades de liberación de fármaco extendidas como se presentó en el estudio anterior^{lxxiii}. Aproximadamente el 50% del Dox cargado se liberó en 4 h, otro 20-30% se liberó en 72 h adicionales. El fármaco probablemente libera más lentamente en las partículas de tamaño grande por la menor área superficial efectiva. Dada la naturaleza fluorescente de la doxorubicina, el sistema implantable como un todo puede aplicarse para investigar la orientabilidad linfática *in vivo* en varias circunstancias.

Ejemplo 8: Demostración del efecto terapéutico de la esponja de gelatina de PLGA-PTX en el control de tumor linfático en un modelo de cáncer de pulmón adyuvante ortotópico

10 Modelo de cáncer de pulmón ortotópico y pneumonectomía izquierda

La eficacia terapéutica de la esponja de gelatina impregnada con microesferas de PLGA-PTX se examinó en un modelo de cáncer de pulmón ortotópico que muestra recaída tumoral significativa en el nódulo linfático regional después de la extirpación quirúrgica inicial del tumor primario de pulmón^{lxxiv}. Es concebible que con la extirpación de los tumores primarios, podría haberse visto un patrón metastático diferente, como se ha observado en otros sistemas tumorales experimentales^{lxxv}. Dichos modelos podrían proporcionar también un sistema relevante para estudiar micrometástasis y eficacia de la terapia anticancerígena en la configuración adyuvante.

El modelo de cáncer de pulmón ortotópico H460 que muestra potencial metastático extensivo que simula cáncer de pulmón no pequeño humano se describió anteriormente en detalle^{lxxvi}. Brevemente, las células H460 (1×10^6) se implantaron endobronquialmente en los pulmones de ratas desnudas pre-irradiadas (5 Gy) por medio de una pequeña incisión de traqueotomía. Tres semanas después de la implantación celular, se cosechó tejido tumoral fresco de la periferia de la masa tumoral y se cortó mecánicamente en trozos de 0,5 mm de diámetro bajo condiciones estériles. Una parte de 50 mg de fragmentos tumorales se implantó entonces en el bronquio del lado izquierdo de las ratas desnudas usando las técnicas similares. Se encontró de forma uniforme que los animales tienen metástasis del nódulo linfático regional junto con metástasis sistémicas sustanciales.

14 días después de la inoculación del tumor endobronquial, los animales sufrieron una pneumonectomía izquierda para eliminar completamente los tumores primarios, en cuyo momento la metástasis del nódulo linfático regional no había desarrollado bien aún, para simular el tratamiento quirúrgico de pacientes con cáncer de pulmón en etapa temprana. Los procedimientos de anestesia y toracotomía son iguales a los descritos anteriormente. Después de la exitosa toracotomía, el hilio izquierdo se identificó y se ligó con una sutura de seda 4-0. Incluido en la ligadura estuvo el bronquio principal izquierdo y los vasos sanguíneos principales que suministran al pulmón izquierdo. El pulmón izquierdo se escindió justo distal a la ligadura. El borde de extirpación se esterilizó con electrocauterización. Los animales se agruparon al azar adicionalmente en dos grupos (n=8 por grupo). Grupo I: sin tratamiento adicional; Grupo II: implantación intrapleural de esponja de gelatina que contiene PLGA-PTX (100 mg/kg). Después del tratamiento, las costillas se reaproximaron con sutura de seda 4-0 y la incisión de la piel se cerró con grapas quirúrgicas. Un grupo de animales que portaba cáncer de pulmón (n=3) se trató con esponja de gelatina blanco con el mismo procedimiento de implantación intrapleural como controles de simulación para distinguir el efecto de la matriz de gelatina en la recurrencia del cáncer. Los animales se siguieron hasta 40 días (26 días después de la extirpación del tumor pulmonar) después de la implantación tumoral para examinar la incidencia de la recurrencia tumoral, especialmente la recaída tumoral en el sistema linfático.

40 Evaluación de la recurrencia tumoral

Se realizaron necropsias cuidadosas después de la muerte de los animales. Los animales se evaluaron para la presentación total de tumor en varios sitios que incluyen nódulo linfático, pulmón contralateral, hueso, riñón, cerebro, tejido blando (goma) etc. Los órganos internos, incluyendo pulmón, riñón, cerebro, pared del pecho, hueso, además de nódulos linfáticos se eliminaron, se fijaron en formalina tamponada al 10% y se incrustaron en parafina. Todos los tejidos se cortaron en serie y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para el examen microscópico. Cualquier depósito tumoral macroscópico o microscópico descubierto, distinto del tumor primario, se consideró una metástasis. Los órganos o el tejido se contaron como positivo o negativo para la metástasis. Los puntos finales primarios fueron la incidencia de metástasis del nódulo linfático y carga tumoral (peso y volumen) de nódulos linfáticos cancerígenos recurrentes si hubo alguno. El volumen tumoral se calculó por la fórmula $0,52 \times \text{longitud} \times \text{anchura}^2$. El punto final secundario fue la incidencia de metástasis sistémica.

Análisis estadístico

El peso y volumen del nódulo linfático se realizaron usando análisis de varianza (ANOVA) o ensayo de *t* de Student desparejado. El ensayo exacto de Fisher se usó para comparar la incidencia de metástasis entre el grupo de tratamiento y el grupo de control de no tratamiento.

55 Resultados

La implantación intraoperativa de la esponja de gelatina que contenía PLGA-PTX redujo significativamente la metástasis tumoral linfática. La incidencia de metástasis linfática fue significativamente menor en el grupo de

tratamiento 25% (2/8) comparado con los controles 100% (8/8) ($p < 0,01$). Una de las metástasis recurrentes del nódulo linfático del grupo de tratamiento fue solo identificable microscópicamente. Sin embargo, no hubo diferencias en el control de metástasis sistémicas entre tratamiento y control. La carga tumoral de nódulos linfáticos recurrentes reflejados por el peso y volumen de nódulo linfático en el grupo de tratamiento fue significativamente menor en comparación con el de los controles de no tratamiento. La cantidad significativa de microesferas de PLGA-PTX se identificaron microscópicamente en el tejido linfático recuperado del animal con la implantación de la esponja. No hubo diferencias en el patrón de recurrencia tumoral entre el control tratado de simulación (tratado con esponja de gelatina blanco) frente al control de no tratamiento.

La supresión específica de metástasis tumoral linfática en este modelo de cáncer de pulmón ortotópico agresivo indica un importante suceso en el desarrollo de una estrategia de orientación linfática. Equipado con matriz de gelatina, un vehículo secundario que transporta fármaco, las microesferas de PLGA-PTX puede distribuirse eficiente y específicamente al sistema linfático regional.

Ejemplo 9: Demostración del efecto terapéutico en el control de metástasis de tumor linfático y capacidad de orientación en cáncer de colon

Construcción del modelo de cáncer de colon ortotópico DLD1

Se establecieron xenoinjertos subcutáneos antes de la implantación del tumor de colon ortotópico por inyección de 1×10^6 células tumorales DLD1 (Met) en ambos flancos de 2-3 animales para generar el tumor donante. Antes de la implantación ortotópica, los tumores subcutáneos se cosecharon y se lavaron con medio de cultivo que contiene antibiótico. Después se eliminaron el tejido necrótico y el tejido no cancerígeno de la muestra, los tumores se cortaron para implantación ortotópica a un tamaño promedio de 1 cm^3 . Las regiones superficiales de los tumores que contienen tejido tumoral viable se usaron para la implantación. Los ratones SCID se anestesiaron usando una cámara de inducción de isoflurano con isoflurano al ~5%, seguido por mantenimiento a 1,5 a 3,0% de isoflurano distribuido por medio de una unidad de exposición solo en la nariz. Los ratones anestesiados se fijaron en un tablero quirúrgico de animal pequeño con sus espaldas en el tablero atando sus patas. La implantación se realizó según el método descrito por Pocard y colegas^{lxvii} con algunas modificaciones. En breve, el ciego se exteriorizó a través de una laparotomía de línea media pequeña y un trozo de tejido tumoral suturado a la superficie del ciego con una sutura de ploreon 6/0 sencillo, dejando el tejido tumoral enterrado en una "bolsa" que consiste en una pared de ciego doble en cada lado. Después de la implantación, la pared abdominal se cerró con grapas inoxidables. Este sistema de modelo muestra potencial predominante de metástasis de tumor linfático. Cinco semanas después de la implantación del tumor, puede identificarse la metástasis linfática extensa, que incluye nódulos linfáticos de hilio hepático o portal, nódulos linfáticos celiacos, nódulo linfático de mesenterio, además de a través la ruta cefálica a los nódulos linfáticos mediastinales. En promedio, los animales sucumben a la enfermedad 70-80 días después de la implantación tumoral.

Tratamiento de metástasis linfática en el modelo de cáncer de colon ortotópico con implantación intraperitoneal de esponja de gelatina que contiene PLM-Dox

Siete días después de la inoculación del tumor cecal, 20 animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos denominados tratamiento y control de no tratamiento ($n=10$ por grupo). El grupo de tratamiento recibió intervención adicional por implantación de forma intraperitoneal de una esponja de gelatina que contenía PLM-Dox (0,3 mg/animal o esponja), mientras que el grupo de control no recibió tratamiento adicional. Para la implantación de la esponja, después de la exitosa laparotomía a través de la incisión inicial, la esponja se fragmentó en varios trozos pequeños a colocar en el sitio de implantación tumoral, regiones hiliares subdiafragmática y hepática.

Formación de imágenes *in vivo*

La señal de fluorescencia de GFP y doxorubicina se detectó inmediatamente después de que los animales se sacrificaran usando el sistema de formación de imágenes *in vivo* Maestro™ (CRi Inc. Pixel MEDIA, Inc.). Un número pequeño adicional de animales ($n=2$ por cada grupo) se sacrificó 35 días después de la implantación tumoral para evaluar la capacidad de orientación linfática. El sistema está equipado con tecnología de formación de imágenes multiespectral único para ser capaz de diferenciar la señal de fluorescencia de doxorubicina de GFP y otras fuentes.

Examen macro y microscópico

Los animales experimentales se sacrificaron 47 días después de la implantación tumoral (40 días después de la implantación de la esponja) para evaluar la efectividad de la distribución de orientación linfática. El peso corporal se grabó. La autopsia se realizó y la evaluación macroscópica se hizo por la presencia de tumor primario, nódulo linfático o metástasis distantes. Todas las lesiones macroscópicas detectadas se pesaron y se muestrearon para examen histológico. El volumen del nódulo linfático se calculó por la fórmula $0,52 \times \text{longitud} \times \text{anchura}^2$. Para la detección de fluorescencia, las muestras de tejido se incrustaron en compuesto de ornitina carbamil transferasa (OCT) (Miles, Elkhart, IN), se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -70°C . Las criosecciones en serie de $3 \mu\text{m}$ se hicieron entonces por examen microscópico de fluorescencia (microscopio confocal espectral y multifotónico Leica TCS SP2-X1). La detección de longitud de onda de emisión para doxorubicina y GFP fue 540-650 nm y 460-500 nm respectivamente. Después de la identificación de las partículas marcadas con fluorescencia, la lámina de

tejido paralelo experimentó tinción H&E para la confirmación de la histología por microscopía óptica. Para ganar un conocimiento de la distribución de partícula con respecto a la distribución de los vasos linfáticos, se llevó a cabo la inmunotinción del nódulo linfático regional y tejido de mesenterio con anticuerpos al LYVE-1, un marcador linfático específico y un receptor para hialuronano expresado en endotelio linfático^{lxxviii} (Prevo R et al. J. Biol. Chem. 2001; 276:19420-19430). Láminas de tejido congelado se fijaron en formaldehído al 2%/PBS durante 20 min y se bloquearon por actividades de peroxidasa endógena (0,3% de H₂O₂) y biotina (kit de bloqueo de biotina Vector lab). Todas las reacciones posteriores se llevaron a cabo a temperatura ambiente y se lavaron en tampón PBS. La láminas se incubaron en anticuerpo primario a LYVE-1 (Abcam ab14917 de conejo policlonal, a dilución 1:500 en diluyente de anticuerpo Dako) durante 1 hora. Se llevaron a cabo los secundarios con reactivo de unión conjugado con IgG-biotina anti-conejo (Vector Lab) seguido por reactivo de marcado de Estreptavidina HRP (sistema de detección Idetect Ultra HRP, ID Labs inc) y NovaRed (Vector Lab) como sustrato. Las láminas se tiñeron por contador en Hematoxilina modificada de Gill (Harleco) y montar en Permount (Fisher Scientific).

Análisis estadístico

El peso del nódulo linfático, volumen y peso de tumor primario se realizaron usando ANOVA o ensayo de *t* de Student desparejado. El ensayo exacto de Fisher se usó para comparar la incidencia de metástasis de nódulo linfático.

Resultados

La implantación ortotópica del fragmento de tumor DLD1 (Met) en la pared cecal dio por resultado la toma tumoral del 100% en ratones SCID. Todos los animales de control (10/10) desarrollaron metástasis linfática con un promedio de 3 nódulos linfáticos metastáticos (oscilando de 1-4) identificables en cada animal durante la autopsia. Los nódulos linfáticos de mesenterio, hilio hepático, subdiafragma y mediastino estaban implicados frecuentemente con metástasis tumorales. Mientras, la metástasis linfática se redujo significativamente en el grupo de tratamiento ya que 2 de 10 (20%) de los animales desarrollaron metástasis linfática ($P < 0,01$). Un total de 3 nódulos linfáticos metastáticos se identificaron en estos dos animales. Además, la carga tumoral de los nódulos linfáticos metastáticos medida por volumen tumoral fue significativamente menor en el grupo de tratamiento en comparación al del grupo de control ($P < 0,01$). La administración regional local de PLM-Dox a través de implantación intraperitoneal del dispositivo de esponja también suprimió de forma moderada el crecimiento del tumor primario ($P = 0,062$). De forma microscópica, numerosas señales de fluorescencia de doxorubicina se identificaron en los vasos linfáticos y nódulos linfáticos regionales y remotos de los animales tratados significativamente diferentes de lo que se observó en los controles negativos. La formación de imágenes por fluorescencia *in vivo* identificó una cantidad significativa de señales de doxorubicina en el mediastino posterior y superior donde se encontraba el nódulo linfático metastático. El examen microscópico de fluorescencia reveló que abundantes señales de fluorescencia de PLM-Dox aparecieron en el nódulo linfático canceroso que porta GFP. Se detectaron vasos linfáticos grandes, reactivos a LYVE-1, de forma irregular, de pared fina, en la región del hilio de los nódulos linfáticos regionales mientras PLM-Dox apareció principalmente en las partes del córtex y medular de los nódulos linfáticos. La inmunotinción del mesenterio con anticuerpo LYVE-1 reveló muchos vasos linfáticos teñidos en positivo rodeados por nódulos linfáticos de mesenterio. Las señales de fluorescencia se encontraron en los nódulos linfáticos del mesenterio y en la vecindad de los vasos linfáticos.

Ejemplo 10: Demostración de la distribución dirigida linfática en linfoma

Como la mayoría de quimioterapias para cáncer, los agentes quimioterapéuticos que tratan el linfoma se dan principalmente de forma intravenosa a la circulación sistémica. Sin embargo, la eficacia terapéutica está dramáticamente limitada por el efecto de la toxicidad que limita la dosis de los quimioagentes. Este estudio exploró una ruta alternativa para la distribución del agente anticancerígeno al linfoma.

Se ha mostrado que las micro o nanopartículas lipídicas distribuyen a los nódulos linfáticos regionales locales a través de la administración local^{lxxix}. Las formulaciones de fármaco encapsulado en lípido pueden proporcionar además ventajas sobre los métodos de distribución de fármacos tradicionales. Por ejemplo, algunas formulaciones basadas en lípidos proporcionan vidas medias *in vivo* más largas, orientación superior al tejido y toxicidad disminuida. Se han descrito numerosos métodos para la formulación de vehículos de distribución de fármaco basados en lípido (véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. núm. 5.741.516, incorporada en esta memoria). La incorporación de vehículo de fármaco de micro o nanopartículas en una esponja de gelatina implantable en este estudio puede proporcionar una nueva dirección o modalidad para el control local de esta enfermedad.

Los linfomas están entre los tumores más comunes en muchas cepas y existencias de ratones. El modelo animal empleado en este estudio fue ratones B6 con mutación PTEN. El ratón B6 es uno de esos con altas incidencias (10-50%) de linfomas en animales ancianos. La mayoría de los tumores son linfomas de células B del tipo folicular, que surgen en el bazo, nódulo linfático mesentérico y/o placas de Peyer. El tumor también implica frecuentemente el mediastino y los nódulos linfáticos superficiales en el cuello y áreas de la ingle.

Los linfomas desarrollados en ratones B6 manifestados por nódulos linfáticos cervicales agrandados se seleccionaron para el estudio *in vivo* para evaluar la capacidad de orientación linfática con la implantación de

esponja de gelatina PLM-Dox. La esponja se introdujo en la cavidad peritoneal para examinar la distribución linfática de PLM-Dox. Los animales de control recibieron la esponja de gelatina blanco usando la misma aproximación.

5 Dos ratones B6 que portaban linfomas se eligieron por cada grupo. Los procedimientos de anestesia y laparotomía fueron iguales a los descritos anteriormente. La esponja de gelatina que pesaba 40 mg, que contenía PLM-Dox (0,3 mg/esponja o animal) se implantó en la cavidad peritoneal. La herida se cerró con grapas inoxidable. Los animales se siguieron durante 7 días antes de sacrificarse para la evaluación de la distribución de partículas linfáticas.

10 Tras el sacrificio del animal, los nódulos linfáticos cervical agrandado, celiaco y mediastinal se cosecharon. Las muestras de tejido se colocaron en pocillos de tejido llenos con medio incrustado de LAMB ornitina carbamil transferasa (OCT) y se congelaron rápidamente en hielo seco antes de almacenarse a -70°C. Se obtuvieron criosecciones en serie de 3 µm para examen de fluorescencia y microscopía visible (tinción H&E).

Resultados

15 La implantación intraperitoneal de la esponja de PLM-Dox dio por resultado la absorción espontánea de microesferas de PLM-Dox a los nódulos linfáticos celiaco y mediastinal regionales que se presentan con linfomas. Una cantidad significativa de señales de PLM-Dox se identificaron en los nódulos linfáticos implicados con la enfermedad de linfoma.

Ejemplo 11: Orientación del nódulo linfático que drena la mama

20 La nanopartícula híbrida de polímero-lípido recientemente desarrollada que contiene complejo de doxorubicina (PLN-Dox) se ha mostrado que mejora la citotoxicidad *in vitro* hacia el tipo salvaje y las líneas celulares de tumor de mama humano MDR *in vitro*. El PLN-Dox mostró citotoxicidad *in vitro* mucho mayor frente a la línea celular que sobreexpresa P-gp^{lxix lxxxi}. Integrar el sistema PLN-Dox en una matriz implantable biodegradable, por ejemplo, esponja de gelatina, puede ofrecer gran potencial para distribuir específicamente PLN-Dox de forma efectiva a los vasos linfáticos y los nódulos linfáticos relacionados con el cáncer de mama.

Animales y procedimientos quirúrgicos

25 La eficiencia de la distribución de PLN-Dox al sistema linfático regional se examinó en ratas Sprague Dawley hembras sanas por implantación subcutánea de esponja de gelatina que contenía PLN-Dox. Los animales de control recibieron esponjas de gelatina blanco a través del mismo procedimiento de implantación. La distribución de partículas linfáticas se examinó adicionalmente mediante el sistema de formación de imágenes *in vivo* Maestro™ y microscopía de fluorescencia.

30 Las ratas se anestesiaron usando una cámara de inducción de isoflurano con isoflurano al ~5%, seguido por mantenimiento a 1,5 a 3,0% de isoflurano distribuido por medio de una unidad de exposición solo a la nariz. Se hizo una incisión de 1,5 cm en el pecho ligeramente a la izquierda del esternón y la piel se separó del pecho por disección roma suave. Se creó un bolsillo subcutáneo. La esponja de gelatina que pesaba 40 mg, que contenía PLN-Dox (0,3 mg/esponja o animal) (tamaño: 50-100 nm) se implantó en el bolsillo subcutáneo con contacto directo con la bolsa de grasa mamaria. La herida se cerró con suturas de seda interrumpidas. La fluorescencia base de la doxorubicina se obtuvo justo después del procedimiento de implantación por sistema de formación de imágenes *in vivo* Maestro. El animal se reexaminó 24 h y 3 días después para detectar la absorción linfática de lípido-dox en la región de la axila. Tras el sacrificio del animal, se cosecharon los nódulos linfáticos de la región de la axila. Las muestras de tejido se colocaron en pocillos de tejido llenos con medio incrustado de LAMB ornitina carbamil transferasa (OCT) y se congelaron rápidamente en hielo seco antes de almacenarse a -70°C. Se hicieron criosecciones en serie de 3 µm para el examen microscópico por fluorescencia. Después de la identificación de las partículas marcadas con fluorescencia, las láminas de tejido pareado experimentaron tinción H&E para la confirmación de la histología por microscopía visible.

Resultados

45 No hubo efecto secundario resultante de la implantación de la esponja. La esponja casi se desintegró 3 días después de la implantación subcutánea a la bolsa de grasa mamaria. La formación de imágenes *in vivo* base detectó la señal de fluorescencia distinguible de doxorubicina solo en el sitio de implantación. Sin embargo, la formación de imágenes *in vivo* a las 24 h, y 3 días del mismo animal reveló que la señal de fluorescencia de doxorubicina se identificó en ambas axilas con intensidad relativamente alta en el lado izquierdo. Los nódulos linfáticos de la axila obtenidos de los animales tratados contenían una cantidad significativa de señal de PLN-Dox examinados bajo microscopio de fluorescencia. No hubo señal de fluorescencia distinguible detectada en los nódulos linfáticos del animal de control.

55 Los resultados indicaron que la esponja de gelatina implantable que contenía PLN-Dox es una aproximación terapéutica prácticamente aceptable para la orientación linfática a través de la intervención quirúrgica. Este dispositivo puede emplearse en tratamiento tanto neoadyuvante como adyuvante de cáncer de mama. Un estudio futuro usando el modelo animal de cáncer de mama está garantizado.

Mientras la presente invención se ha descrito con referencia a lo que se considera actualmente que son los ejemplos preferidos, se va a entender que la invención no está limitada a los ejemplos descritos. Por el contrario, se pretende que la invención cubra varias modificaciones y disposiciones equivalentes incluidas en el espíritu y el alcance de las reivindicaciones anexas.

- 5 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente se incorporan en esta memoria por referencia a su totalidad en el mismo grado que si cada publicación, patente o solicitud de patente individual se indicara específica e individualmente que se incorpora por referencia en su totalidad.

TABLA 1

Muestras	Tipo de esponja		Agente bioactivo
	Disolución de gelatina	Reticulado	
Microesferas de PLGA-taxol	-	-	Taxol en microesferas de PLGA
Esponja de gelatina (PTX)	1,0%	-	Taxol (forma libre)
Esponja de gelatina (PLGA-PTX)	1,0%	-	Taxol en microesferas de PLGA
Esponja de gelatina (PLGA-PTX)	1,0%	+ EDC:COOH=	Taxol en microesferas de PLGA

10 TABLA 2

Tipo de esponja	Tiempo de exposición de FV	Tiempo de degradación	Liberación de partículas
1% de gelatina	15 min	20 min	+
	30 min	120 min	+
	2 h	Insoluble (2 sem)	-
	4 h	Insoluble (2 sem)	-
2% de gelatina	15 min	30 min	+
	30 min	150 min	+
	2 h	Insoluble (2 sem)	-
	4 h	Insoluble (2 sem)	-
1% de gelatina-alginato (7:3)	15 min	10 min	+
	30 min	30 min	+
	2 h	1 sem	+
	4 h	Insoluble (2 sem)	-

FV = Formaldehído

Citas completas para documentos consultados en la memoria:

- ⁱ. Weiss, L. et al. Int J Cancer. 1987; 40(4):570-4.
- ⁱⁱ. Mountain CF Chest 1977; 111:1718-23.
- 15 ⁱⁱⁱ. Kuo TH Anticancer Res 1993; 13:293-7.
- ^{iv}. Martini N J Thorac Cardiovas Surg 1995; 109:120-9.
- ^v. Martínez SR et al. Clin Colorectal Cancer 2005; 4:320-4.

- vi . McGuire WL Breast Cancer Res. 1987; 10:5-9.
- vii . Bergquist et al. Seminars in Nuclear Med. 1983; 12:9-10.
- viii . Strand, S. E. CRC Crit. Rev. Drug Carrier System 1989; 6:211-237.
- ix . Kaledin, V. I. et al. J Natl Cancer Inst. 1981; 66:881-7)
- 5 x . Khato, J et al. Cancer Treat Rep. 1982; 66:517-27.
- xi . Konno, H et al. Jpn J Surg. 1990; 20:424-8.
- xii . Hagiwara, A et al. Anticancer Drug Des. 1987; 1:313-21.
- xiii . Hagiwara, A et al. Anticancer Drugs. 1997; 8:666-70.
- xiv . Karajgi, J. S. et al. J Microencapsul. 1994; 11:539-45.
- 10 xv . Yoshimura, K et al. Gan To Kagaku Ryoho. 1996; 23:1519-22.
- xvi . Porter, C. J et al. J Pharm Sci. 1996; 85:351-6.
- xvii . Yoshikawa, H et al. Biol Pharm Bull. 1996; 19:1527-9.
- xviii . Nakamura, Y et al. Surg Today. 2002; 32:335-42.
- xix . Shinohara H. Anat Rec 1997; 249(1):16-23.
- 15 xx . Liu J et al. Lung Cancer 2006; 51(3): 377-86.
- xxi . Shimada M Anticancer Drug Des 1993; 8:249-55.
- xxii . Hawley AE, Illum L, Davis SS. Preparation of biodegradable, surface engineered PLGA nanospheres with enhanced lymphatic drainage and lymph node uptake. Pharm Res. 1997; 14:657-61.
- xxiii . Maincent P, Thouvenot P, Amicabile C et al. Lymphatic targeting of polymeric nanoparticles after intraperitoneal administration in rats. Pharm Res. 1992; 9:1534-9
- 20 xxiv . Tokuda K, Natsugoe S, Shimada M et al. Design and testing of a new cisplatin form using a base material by combining poly-D,L-lactic acid and polyethylene glycol acid against peritoneal metastasis. Int J Cancer 1998; 76:709-12.
- xxv . Liggins TR, D'Amours S, Demetrick JS et al. Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres for the prevention of intraperitoneal carcinomatosis after a surgical repair and tumor cell spill. Biomaterials 2002; 21: 1959-69.
- 25 xxvi . Hawley AE, Illum L, Davis SS: Preparation of biodegradable, surface engineered PLGA nanospheres with enhanced lymphatic drainage and lymph node uptake. Pharm Res 1997; 14:657-61.
- xxvii . Wong HL et al. J Pharmacol Exp Ther. 2006; 317: 1372-1381.
- xxviii . Wong HL et al. Pharm Res. 2006; 23:1574-85.
- 30 xxix . Kennedy L, Harley RA, Sahn SA, Strange C. Talc slurry pleurodesis. Pleural fluid and histologic analysis. Chest 1995;107:1707-12.
- xxx . Singer JJ, J.J.T. Leal. Aseptic pleuritis experimentally produced. J Thorac Surg 1941; 10:251-83.
- xxxi . Karsner HT SC. The removal of particulate matter from the pleura. J Med Res 1920; 42:91-8.
- xxxi . Medina LA, Klipper R, Phillips WT, Goins B. Pharmacokinetics and biodistribution of [111In]-avidin and [99mTc]-biotin-liposomes injected in the pleural space for the targeting of mediastinal nodes. Nucl Med Biol. 2004; 31:41-51.
- 35 xxxiii . Hawley AE, Illum L, Davis SS. Preparation of biodegradable, surface engineered PLGA nanospheres with enhanced lymphatic drainage and lymph node uptake. Pharm Res 1997; 14(5):657-61.
- xxxiv . Charman, William N. Lymphatic Transport of Drugs, CRC Press. Boca Ratón FL, 1992; 279-315
- 40 xxxv . Bettendorf U. Electronmicroscopic studies on the peritoneal resorption of intraperitoneally injected latex particles via the diaphragmatic lymphatics. Lymphology 1979; 12(2):66-70.

- xxxvi . Hawley A.E., Davis S.S., Illum L. Targeting of colloids to lymph nodes: influence of lymphatic physiology ad colloidal characteristics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1995; 129-48
- xxxviii . *J Control Release* 2001; 76:239-54
- xxxix . (onseca C *J Control Release*. 2002; 83:273-286
- 5 x^{xl} . Liggins R *Inflamm Res*. 2004; 53:363-72
- x^{xli} . Mo Y. *J Control Release*. 28 de Nov de 2005; 108:244-62
- x^{liii} . Gupte A *Int J Pharm*. 2004; 276:93-106
- x^{liiii} . Mu L et al. *J Control Release* 2001; 76:239-54
- x^{liv} . Hawley AE et al. *Pharm Res*. Mayo de 1997; 14(5):657-61
- 10 x^{lv} . Liu J et al. *Lung Cancer* 2006; 51:377-86
- x^{lvi} . Bettendorf U *Lymphology*. 1979; 12:66-70
- x^{lvii} . Hawley A.E et al. *Pharm Res*. 1997; 14:657-61) (Liu J et al. *Lung Cancer*. 2006; 51:377-86
- x^{lviii} . Liggins RT et al. *Biomaterials*. 2000; 21:1959-69.
- x^{lix} . Liu J et al. *Lung Cancer* 2006; 51:377-86
- 15 ⁱ . Fonseca C *J Control Release*. 2002; 83:273-286
- ⁱⁱ . Mu L et al. *J Control Release*. 2003; 86:33-48
- ⁱⁱⁱ . Mu L et al. *J Control Release* 2001; 76:239-54
- ^{liii} . Mo Y et al. *J Control Release*. 2005; 108:244-62
- ^{liv} . Mu, L et al. *J Control Release* 2001; 76:239-54
- 20 ^{lv} . Gilbert DL et al. *J Biomed Mater Res*. 1990; 24:1221-39
- ^{lvi} . Kuijpers A.J et al. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2000; 11:225-43
- ^{lvii} . Olde Damink LH et al. *Biomaterials*. 1996; 17:765-73
- ^{lviii} . Pieper JS et al. *Biomaterials*. 2000; 21:581-93
- ^{lix} . Liggins RT et al. *Inflamm Res*. Agosto de 2004; 53(8):363-72
- 25 ^{lx} . Mu L et al. *J Control Release* 2001; 76:239-54
- ^{lxi} . Liggins RT et al. *Int J Pharm*. 2001; 222:19-33
- ^{lxii} . Liebmann J et al. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1994; 33:331-9
- ^{lxiii} . Liebmann JE et al *Br J Cancer*. 1993; 68:1104-9
- ^{lxiv} . Lopes NM et al. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1993; 32:235-42
- 30 ^{lxv} . Howard et al. *Clin Exp Metastasis*. 1999; 17:157-62
- ^{lxvi} . Yamori T et al. *Jpn. J. Cancer Res*. 88, 1997; 1205-10
- ^{lxvii} . *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 1987; 242:692-698
- ^{lxviii} . Hennequin C. *Cancer Radiother*. 2004; 8 Supl 1:S95-105 ^{lxix} . *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 317: 1372-1381
- ^{lxx} . *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 317: 1372-1381
- 35 ^{lxxi} . *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 317: 1372-1381
- ^{lxxii} . Liu Z et al. *J Control Rel*. 2001 b; 77: 213-224
- ^{lxxiii} . Wong H et al. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 317: 1372-1381

- ^{lxxiv}. Liu J et al. 94^a AACR, 2003, Toronto, Canadá
- ^{lxxv}. Flatmark K European J Cancer 2004; 40:10 1593-98
- ^{lxxvi}. Howard RB Clin Exp Metastasis 1999; 17:157-62
- ^{lxxvii}. European J Cancer 2004 40; 10 1593-98
- 5 ^{lxxviii}. (Prevo R et al. J. Biol. Chem. 2001; 276:19420-19430)
- ^{lxxix}. Bin Lu et al. European J Pharm Sci 2006; 28:86-95
- ^{lxxx}. Wong HL et al. J Pharmacol Exp Ther. 2006; 317: 1372-1381
- ^{lxxxi}. Wong HL et al. Pharm Res. 2006; 23: 1574-85

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo implantable que es una matriz reticulada biocompatible y biodegradable impregnada con un complejo bioactivo adecuado para orientación de forma selectiva al sistema linfático,

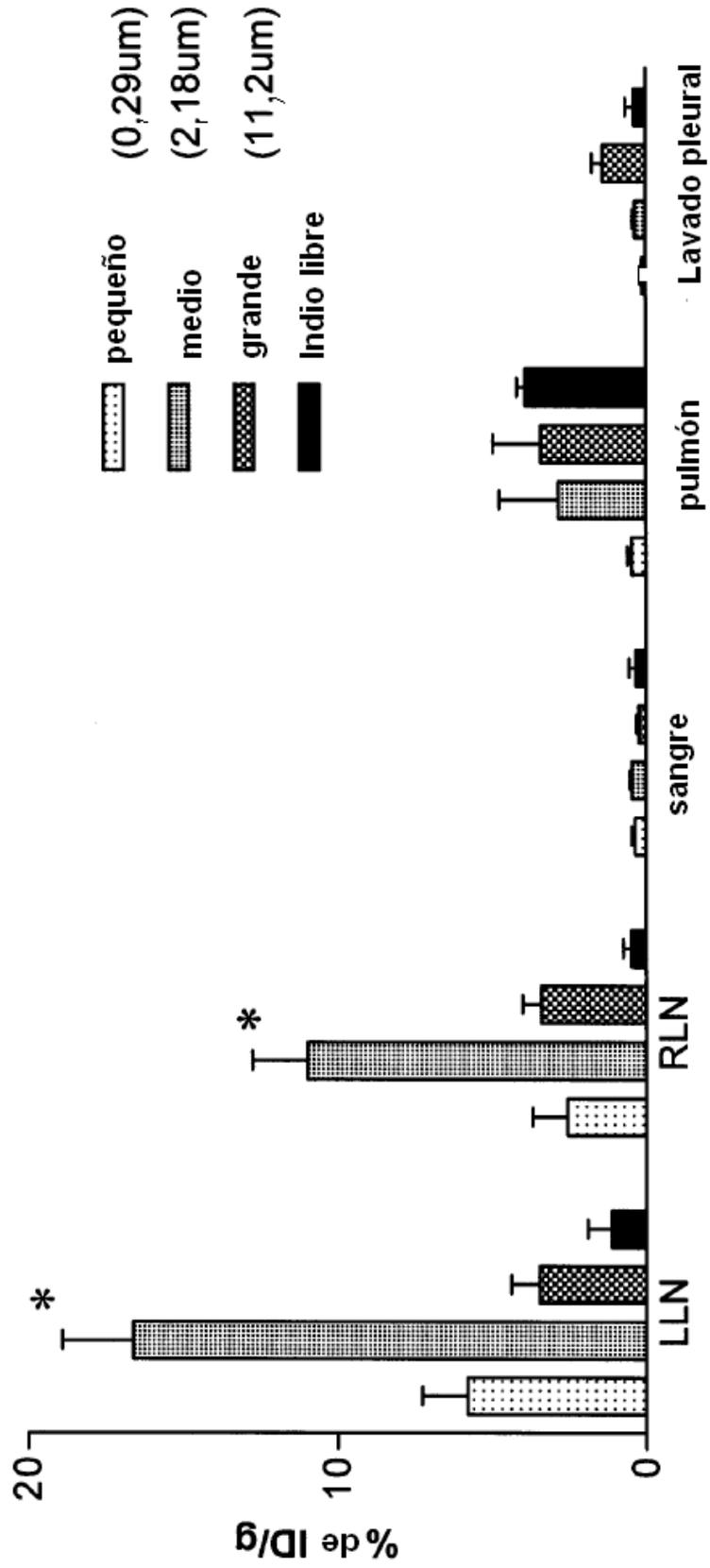
en donde

- 5 el complejo bioactivo está en forma de micro o nanopartículas o una combinación de micro o nanopartículas que tienen un tamaño de partícula de 10 nm a 11,2 µm que comprenden uno o más materiales formadores de partículas y uno o más agentes bioactivos, y que son adecuados para distribuir los agentes bioactivos al sistema linfático que son de un tamaño suficiente para entrar y dirigirse de forma selectiva al sistema linfático y que son capaces de migrar a través de los vasos linfáticos o retenerse en los nódulos linfáticos;
- 10 la matriz reticulada biocompatible biodegradable se selecciona de manera que la degradación de la matriz proporciona la liberación del complejo bioactivo durante un primer periodo de tiempo; y
- las micro o nanopartículas del complejo bioactivo se preparan de manera que el agente bioactivo se libera en el sistema linfático durante un segundo periodo de tiempo.
- 15 2. El dispositivo implantable según la reivindicación 1, que es adecuado para la implantación en la cavidad pleural, la cavidad peritoneal, un compartimiento subcutáneo, vaginal o rectalmente.
3. El dispositivo implantable según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el tamaño de partícula es de 10 nm a 50 nm, de 50 nm a 100 nm, de 140 nm a 1500 nm, de 1 µm a 5 µm, o de 0,3 µm a 11,2 µm.
4. El dispositivo implantable según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el tamaño de partícula es de 50 nm a 11,2 µm.
- 20 5. El dispositivo implantable según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el tamaño de partícula es de 0,7 µm a 2 µm.
6. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el uno o más agentes bioactivos es un agente terapéutico.
- 25 7. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el uno o más agentes bioactivos se selecciona del grupo que consiste en radioisótopos, fotosensibilizadores, radiosensibilizadores, radioprotectores, agentes fotodinámicos, agentes de captura de neutrones, antígenos, vacunas, ADN ARN, péptidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes antimicrobianos y agentes anti-proliferativos.
8. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el uno o más agentes bioactivos se selecciona del grupo que consisten en agentes anti-proliferativos y agentes anti-metastáticos.
- 30 9. El dispositivo implantable según la reivindicación 8, en donde los agentes anti-proliferativos y agentes anti-metastáticos se seleccionan del grupo que consiste en agentes estabilizadores del microtúbulo, agentes alquilantes, anti-metabolitos, epidofilotoxina, enzimas antineoplásicas, inhibidores de topoisomerasa, procarbazona, mitoxantrona, complejos de coordinación de platino, modificadores de la respuesta biológica e inhibidores del crecimiento y factores del crecimiento hematopoyético.
- 35 10. El dispositivo implantable según la reivindicación 9, en donde el agente antineoplásico se selecciona de un fármaco de antraciclina, fármaco de vinca, fármaco de mitomicina, fármaco de bleomicina, nucleósido citotóxico, taxanos, epotilonas, discodermolida, fármacos de pteridina, diinenos y podofilotoxinas.
- 40 11. El dispositivo implantable según la reivindicación 9, en donde el agente bioactivo se selecciona de doxorubicina, carminomicina, daunorubicina, aminopterina, metotrexato, metopterina, dicloro-metotrexato, mitomicina C, porfiromicina, trastuzumab, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, gemcitabina, arabinósido de citosina, podofilotoxina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, melfalano, vinblastina, vincristina, leurosina, vindesina, leurosina, paclitaxel, estramustina, cisplatina, carboplatina, ciclofosfamida, bleomicina, gemcitabina, ifosamida, melfalano, hexametilmelamina, tiotepa, citarabina, idatrexato, trimetrexato, dacarbazina, L-asparaginasa, camptotecina, CPT-11, topotecano, piridobenzoindoles, interferonas e interleuquinas.
- 45 12. El dispositivo implantable según la reivindicación 11, en donde el agente bioactivo se selecciona de paclitaxel y doxorubicina.
13. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el agente bioactivo se selecciona de mostazas de nitrógeno, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, triazenos, antimetabolitos, pirimidinas, purinas, productos naturales, epipodofilotoxinas, antibióticos, enzimas, ureas sustituidas, metilhidrazinas, supresores de adrenocorticoides, hormonas y antagonistas, adrenocorticosteroides, progestinas, estrógenos, antiestrógenos y andrógenos.
- 50

14. El dispositivo implantable según la reivindicación 13, en donde el agente bioactivo se selecciona de mecloretamina, ciclofosfamida, melfatano, clorambucilo, busulfano, carmustina, lomusina, semustina, estreptozocina, dacarbazina, ácido fólico, metotrexato, fluorouracilo citarabina, mercaptopurina, tioguanina, alcaloides de vinca, vinblastina, vincristina, vendesina, etopósido, tenipósido, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, L-asparaginasa, hidroxiourea, procarbazona, mitotano, aminoglutetimida, adrenocorticosteroides, prednisona, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de metoxiprogesterona, acetato de megestrol, dietiletilbestrol, etinilestradiol, tamoxifeno, propionato de testosterona y fluoximesterona.
15. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el agente bioactivo se selecciona de un supresor de linfangiogénesis, un supresor de angiogénesis, un agente citoestático, macromoléculas, antioxidantes, citoquinas, quimioquinas, oligonucleótidos antisentido, qdots recubiertos de péptido LyP-1 para dirigir a vasos linfáticos, hormonas y antagonistas de hormona.
16. El dispositivo implantable según la reivindicación 15, en donde el agente bioactivo se selecciona de anticuerpo de factor de crecimiento endotelial vascular C, D (VEGF-C,D), el anticuerpo al receptor de VEGF-C,D (VEGFR-3) y anticuerpo del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).
17. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el material formador de partículas se selecciona del grupo que consiste en polímeros biocompatibles, lípidos, liposomas, partículas metálicas, partículas magnéticas, biotina, avidina y polisacáridos.
18. El dispositivo implantable según la reivindicación 17, en donde el material formador de partículas se selecciona del grupo que consiste en poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico)-co-glicólico (PLGA), poli(ácido láctico) (PLA), polivinilpirrolidona (PVP), poli(ácido láctico)-co-caprolactona, polietilenglicol (PEG), poli(óxido de etileno) (PEO), poliestireno, poli(ácido láctico)-bloque-poli(etilenglicol), poli(ácido glicólico)-bloque-poli(etilenglicol), polilactida-co-glicolida-bloque-poli(etilenglicol), polietilenglicol-bloque-lípido, poli(alcohol de vinilo) (PVA), poliéster, poli(ortoéster), poli(fosfazina), poli(éster de fosfato), policaprolactonas, gelatina, colágeno, un glicosaminoglicano, poliortoésteres, polisacáridos, poli(ácido hialurónico), poli(ácido algínico), quitina, quitosano, celulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, polipéptidos, polilisina, poli(ácido glutámico), albúmina, polianhídridos, polihidroxialcanoatos, polihidroxivalerato, polihidroxibutirato, proteínas, poli(ésteres de fosfato), poli(acrilamida) (PAA) y mezclas de los mismos.
19. El dispositivo implantable según la reivindicación 18, en donde el material formador de partículas es PLGA.
20. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde el complejo bioactivo incluye aditivos.
21. El dispositivo implantable según la reivindicación 20, en donde los aditivos se seleccionan de adyuvantes, recubrimientos, colorantes, aglutinantes, tampones, lubricantes, disgregantes, plastificadores y estabilizantes.
22. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde el complejo bioactivo comprende micropartículas de PLGA y paclitaxel o lípido y doxorubicina.
23. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en donde la matriz degrada durante un periodo de varias horas a aproximadamente 1 año, especialmente de varios días a varias semanas.
24. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde la matriz es moldeable.
25. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde la matriz está en una forma seleccionada del grupo que consiste en una esponja, lámina, película, malla, compresa, tampón y almohadilla.
26. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en donde la matriz biocompatible es una película de hidrogel.
27. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en donde la matriz se selecciona del grupo que consiste en gelatina, colágeno, gelatina-alginato.
28. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, en donde la matriz contiene aditivos.
29. El dispositivo implantable según la reivindicación 28, en donde el aditivo es material radio-opaco detectable por rayos x.
30. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en donde uno o más agentes bioactivos libres se incorporan en la matriz biocompatible y bioactiva.
31. Un dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad o proceso, comprendiendo dicho implante una cantidad efectiva de un agente bioactivo para tratar dicha enfermedad o proceso.

32. El dispositivo implantable para usar en el tratamiento de una enfermedad o proceso según la reivindicación 31, en donde la enfermedad o proceso se selecciona de neoplasia, infección bacteriana, infección microbiana e infección viral.
- 5 33. El dispositivo implantable para usar en el tratamiento de una enfermedad o proceso según la reivindicación 32, en donde la enfermedad o proceso es neoplasia.
34. El dispositivo implantable para usar en el tratamiento de una enfermedad o proceso según la reivindicación 33, en donde la enfermedad o proceso se selecciona de cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, linfoma, sarcoma, timoma, mesotelioma, metástasis linfática, cáncer de próstata, filariasis, brucelosis, tuberculosis e infección por VIH.
- 10 35. El dispositivo implantable para usar en el tratamiento de una enfermedad o proceso según la reivindicación 34, en donde la enfermedad o proceso se selecciona de cáncer de pulmón y metástasis linfática de cáncer de pulmón.
36. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en donde el agente bioactivo es para el tratamiento o prevención de neoplasia.
- 15 37. El dispositivo implantable según la reivindicación 36, en donde la neoplasia es cáncer.
38. El dispositivo implantable según la reivindicación 37, en donde el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de cabeza o cuello, cáncer de piel, linfoma, sarcoma, timoma, mesotelioma y cáncer de próstata.
- 20 39. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en donde el agente bioactivo es para el tratamiento o prevención de metástasis al sistema linfático.
40. El dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 para usar en un método de formación de imágenes o visualización del sistema linfático que usa escintigrafía de rayos gamma, Tomografía de Emisión de Positrones (PET), Tomografía Computerizada de Emisión MonoFotónica (SPECT), Formación de Imágenes por Resonancia Magnética (MRI), rayos X, Tomografía por rayos X Asistida por Ordenador (CT), espectroscopia infrarroja cercana o ultrasonidos, que comprende administrar un dispositivo implantable según la reivindicación 1 a un sujeto y realizar escintigrafía por rayos gamma, Tomografía de Emisión de Positrones (PET), Tomografía Computerizada de Emisión MonoFotónica (SPECT), Formación de Imágenes por Resonancia Magnética (MRI), rayos X, Tomografía por rayos X Asistida por Ordenador (CT), espectroscopia infrarroja cercana, o ultrasonidos para formar imágenes o visualizar el sistema linfático, en donde el dispositivo implantable comprende agentes bioactivos que son agentes de contraste o formación de imágenes adecuados.
- 25 30 41. El dispositivo implantable según la reivindicación 40, en donde el agente de contraste o formación de imágenes se selecciona de materiales ferromagnéticos, compuestos perfluoroquímicos, tintes, radiomarcadores que emiten rayos gamma y radiomarcadores que emiten positrones.
- 35 42. Un procedimiento para preparar un dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 que comprende:
- a. combinar el agente bioactivo y el material formador de partículas en un disolvente adecuado para formar una disolución o suspensión;
- b. secar por pulverizado la disolución o suspensión para formar las micro o nanopartículas del complejo bioactivo;
- 40 c. combinar las partículas formadas en b) con un polímero biocompatible adecuado para formar la matriz reticulada biocompatible y biodegradable en disolventes adecuados;
- d. eliminar el disolvente de c) para formar el dispositivo implantable.

Biodistribución de ¹¹¹In-aminopoliestireno por medio de administración intrapleurales



Sitio de la muestra

FIGURA 1

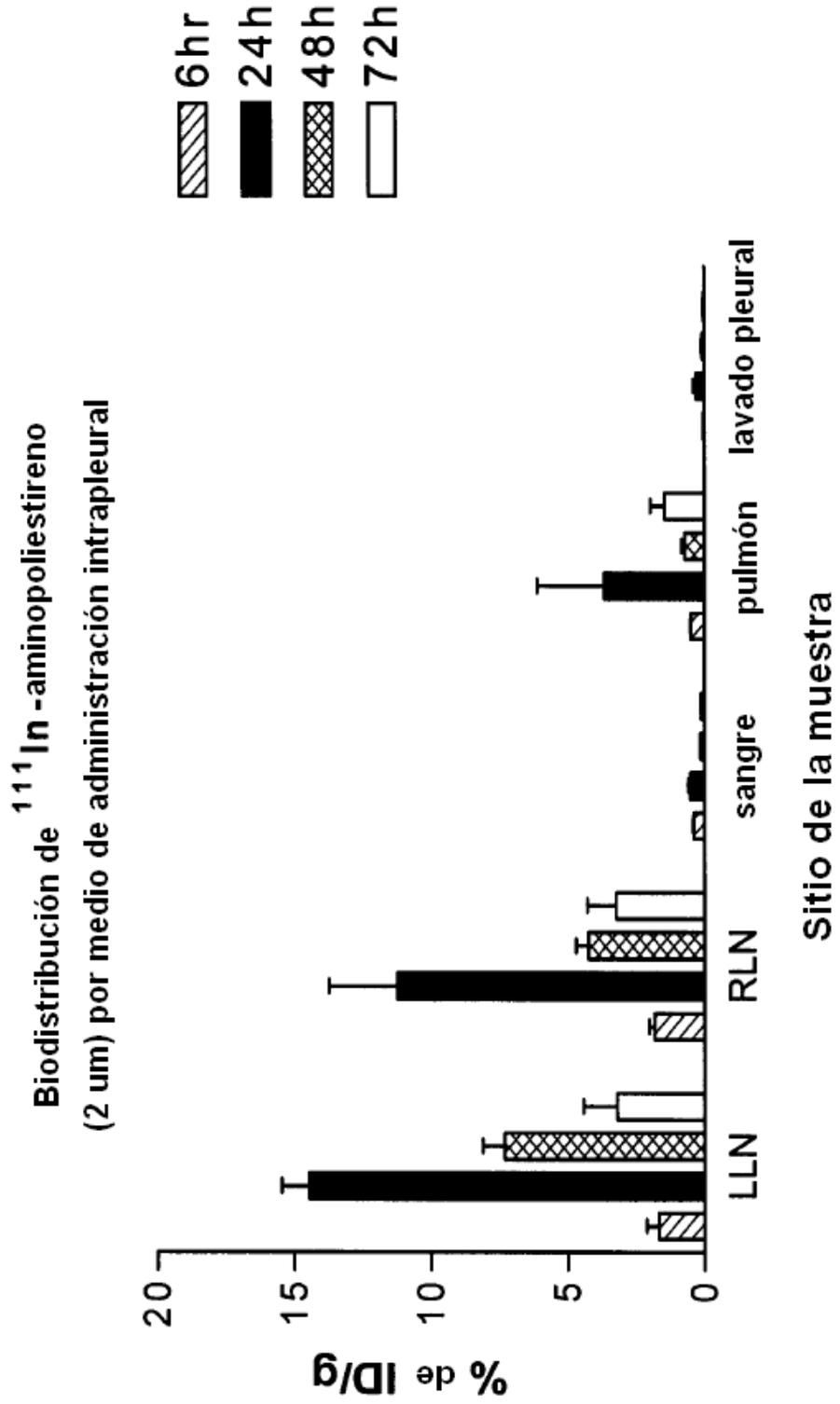


FIGURA 2

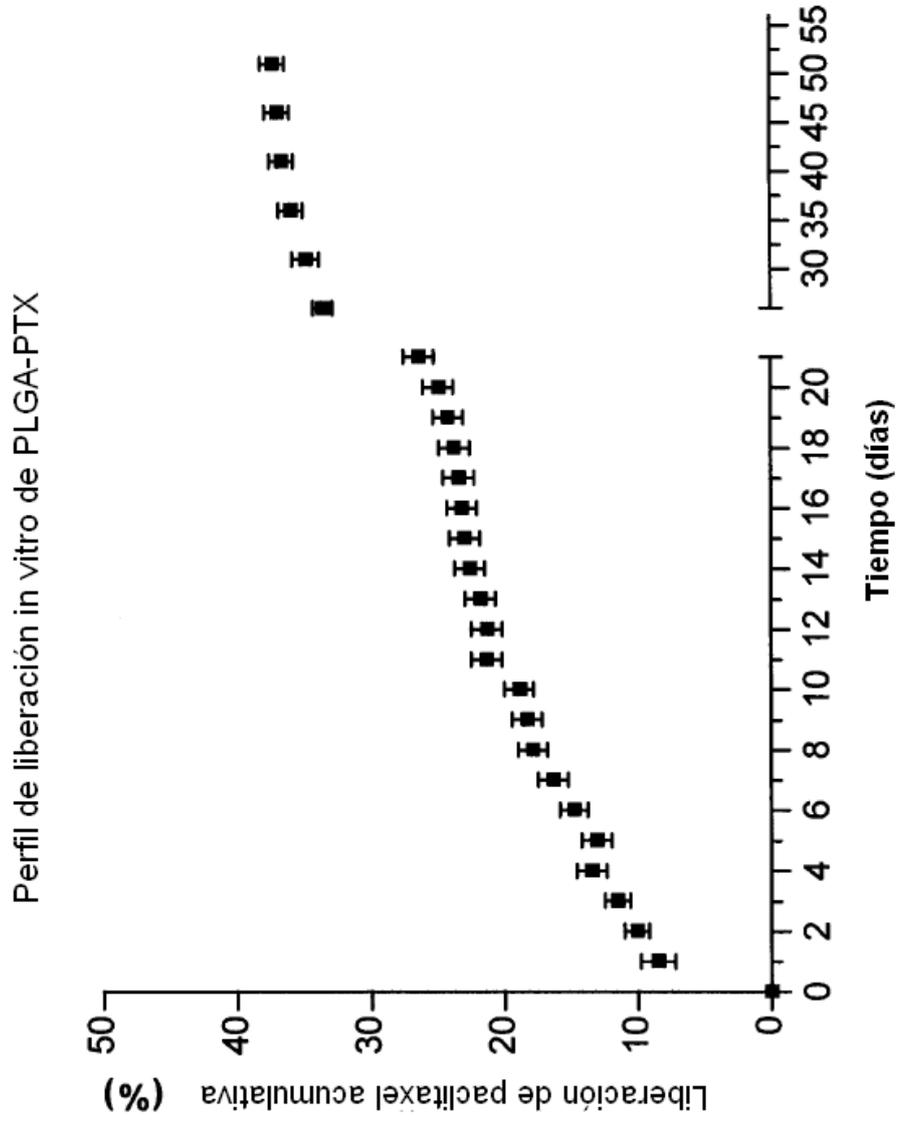


FIGURA 3

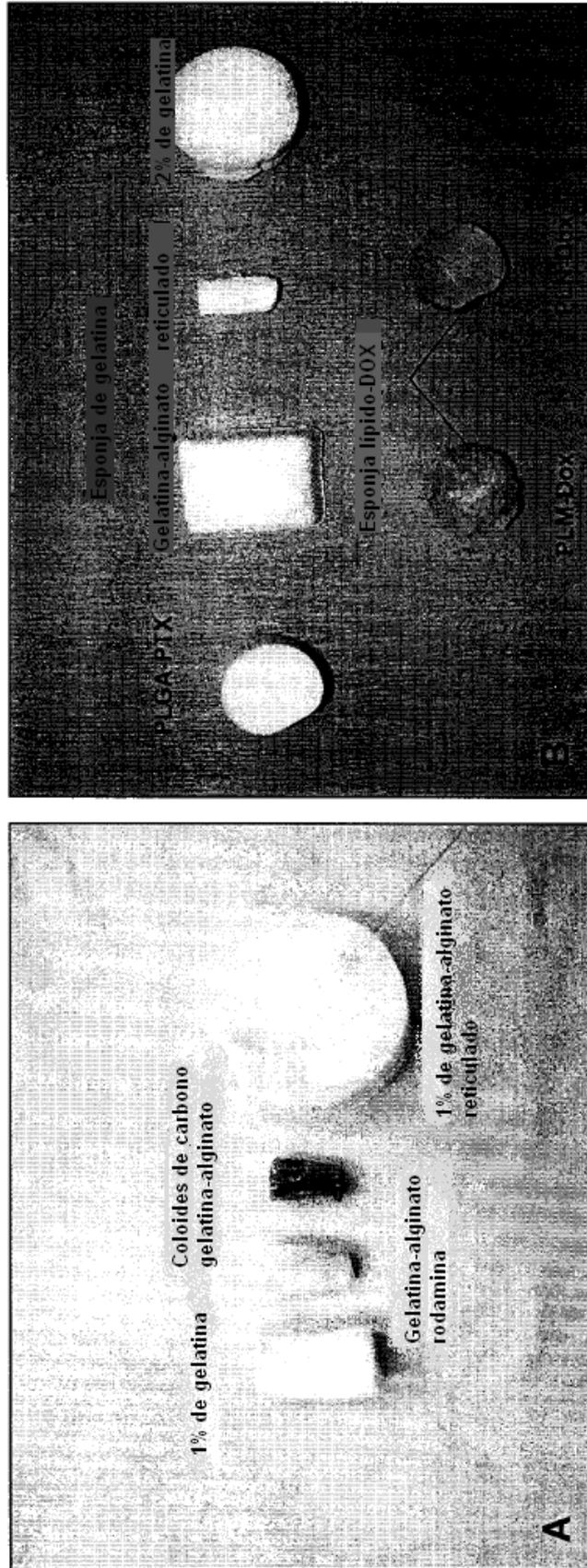


FIGURA 4

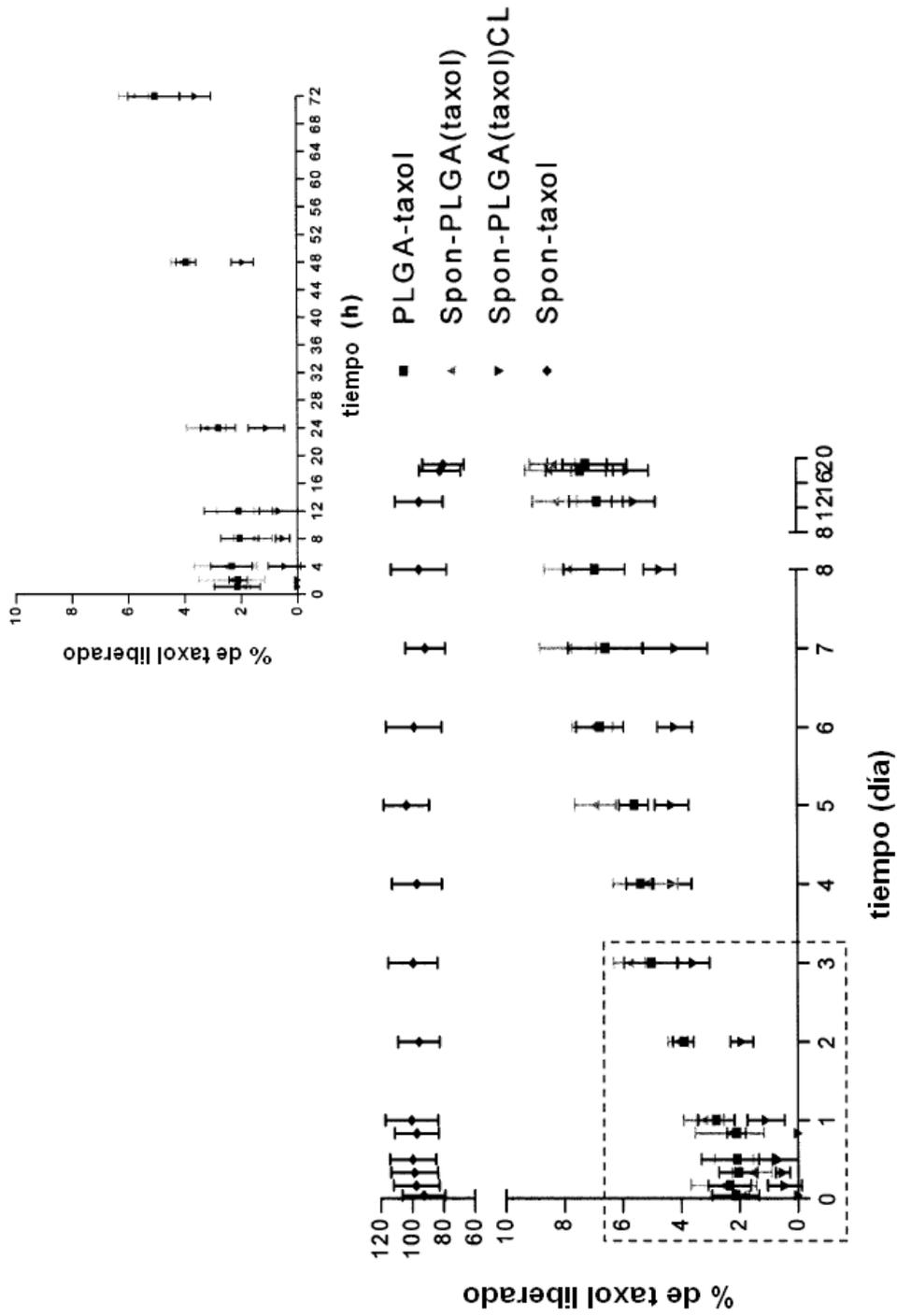


FIGURA 5

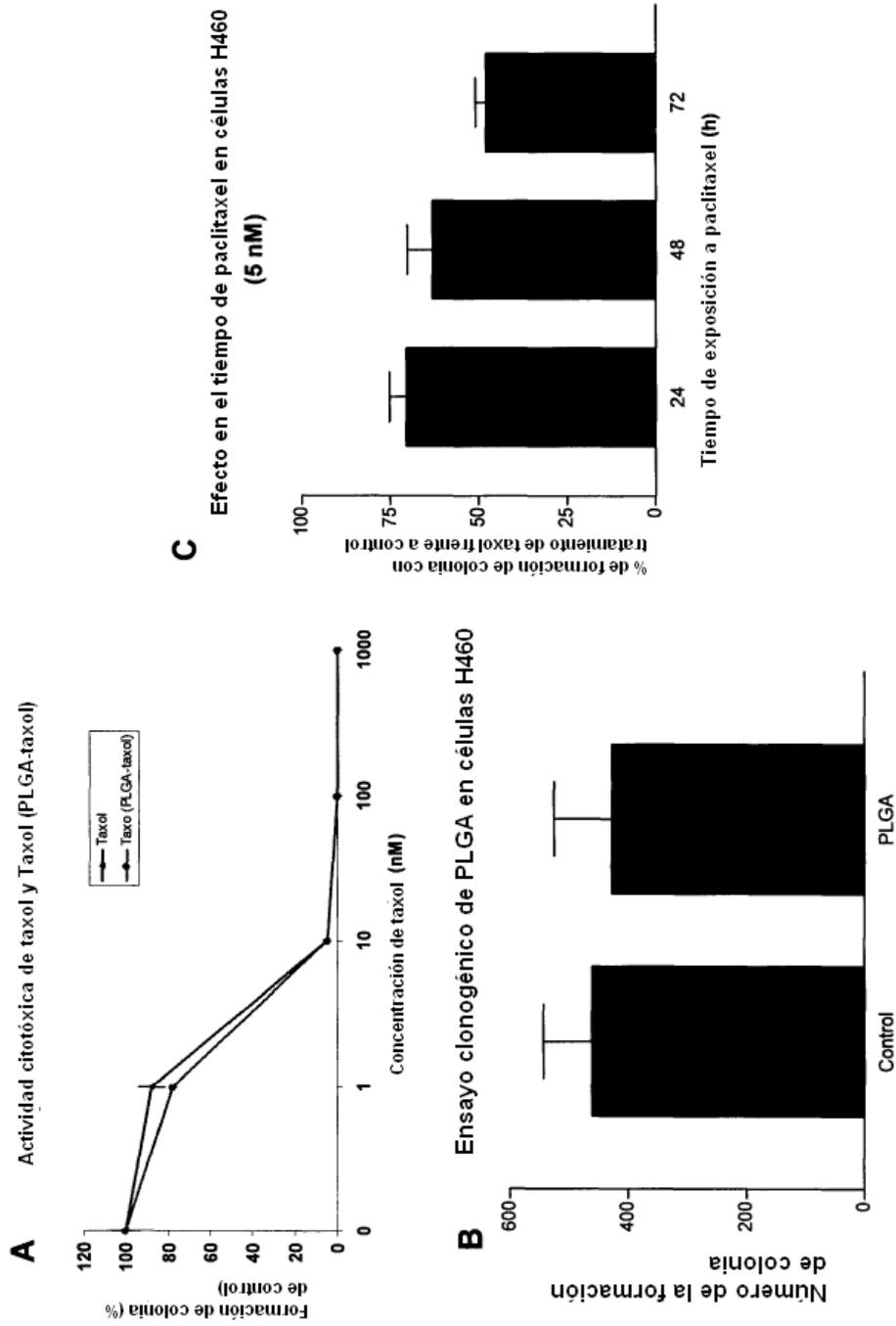


FIGURA 6