

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 802**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2002 PCT/US2002/25178**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2003 WO03015755**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2002 E 02761287 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 1423095**

54 Título: **Partículas lipidadas de glicosaminoglicano y su uso en el suministro de fármacos y genes para diagnóstico y terapia**

30 Prioridad:

14.08.2001 US 311849 P

14.05.2002 US 379741 P

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

04.04.2017

73 Titular/es:

**TEL AVIV UNIVERSITY FUTURE TECHNOLOGY
DEVELOPMENT L.P. (100.0%)
c/o The Tel-Aviv University, Economic
Corporation Ltd., P.O. Box 39040
69978 Tel Aviv, IL**

72 Inventor/es:

**MARGALIT, RIMONA y
PEER, DAN**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 607 802 T3

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

DESCRIPCIÓN

Partículas lipidadas de glicosaminoglicano y su uso en el suministro de fármacos y genes para diagnóstico y terapia

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un sistema de administración de fármacos basado en partículas de glicosaminoglicanos lipidados que encapsulan fármacos para su posterior administración para uso en terapia y diagnóstico.

Antecedentes de la invención

Los glicosaminoglicanos, o mucopolisacáridos, junto con el colágeno, son los principales elementos estructurales de todos los tejidos conectivos. Los glicosaminoglicanos, o gags, son complejos grandes de cadenas de polisacáridos asociadas con una pequeña cantidad de proteína. Estos compuestos tienen la capacidad de unir grandes cantidades de agua, produciendo de este modo una matriz tipo gel que forma los tejidos conectivos del cuerpo. Los gags son cadenas largas compuestas de unidades repetitivas de disacáridos (unidades de repetición de azúcares aminoazúcares ácidos). El aminoazúcar es típicamente glucosamina o galactosamina. El aminoazúcar también puede ser sulfatado. El azúcar ácido puede ser ácido D-glucurónico o ácido L-idurónico. In vivo, los gags distintos del ácido hialurónico están unidos covalentemente a una proteína, formando monómeros de proteoglicano. Las cadenas de polisacáridos son alargadas por la adición secuencial de azúcares ácidos y aminoazúcares.

Entre los gags más comunes se encuentran ácido hialurónico, sulfato de queratano, sulfato de condroitina, sulfato de heparina y sulfato de dermatina. Los gags pueden modificarse químicamente para contener más grupos de azufre que en su forma inicialmente extraída. Además, los gags pueden ser parcial o completamente sintetizados y pueden ser de origen vegetal o animal.

El ácido hialurónico es un miembro natural de la familia de los glicosaminoglicanos que está presente en una concentración particularmente alta en el cartílago y el líquido sinovial de las articulaciones articulares, así como en el humor vítreo, en las paredes de los vasos sanguíneos y en el cordón umbilical y otros tejidos conectivos. El ácido hialurónico puede estar en forma libre, tal como en el fluido sinovial, y en una forma unida, tal como un componente de matriz extracelular. Este polisacárido consiste de residuos de N-acetil-D-glucosamina y ácido D-glucurónico alternantes unidos mediante enlaces beta-1,3-glucuronídico y beta-1,4-glucosaminídico alternantes. En agua, el ácido hialurónico se disuelve para formar un líquido altamente viscoso. El peso molecular del ácido hialurónico aislado a partir de fuentes naturales generalmente cae dentro del intervalo de 5×10^4 hasta 10^7 daltons. El ácido hialurónico tiene una alta afinidad por la matriz extracelular y por una variedad de tumores, incluyendo los de mama, cerebro, pulmón, piel y otros órganos y tejidos.

Se utiliza un sistema de suministro de fármacos para mantener un nivel constante en sangre de un fármaco durante un largo período de tiempo mediante la administración de un fármaco al cuerpo o para mantener una concentración óptima de un fármaco en un órgano objetivo específico por medio de administración local o sistémica, y durante un período prolongado de tiempo.

El ácido hialurónico químicamente modificado se puede usar para liberación controlada de fármacos. Balazs y colaboradores, en la patente estadounidense No. 4.582.865, establecieron que "los geles entrecruzados de ácido hialurónico pueden retardar la liberación de una sustancia de bajo peso molecular dispersada en ella pero no unida covalentemente a la matriz macromolecular de gel".

Se utilizan diversas formas de preparaciones farmacéuticas como sistemas de suministro de fármacos, incluyendo el uso de una delgada membrana de un polímero o el uso de un liposoma como portador para un fármaco.

Existen dos clases básicas de portadores de fármacos: sistemas de material formado por partículas, tales como células, microesferas, envolturas virales y liposomas; y sistemas de material no formado por partículas que suelen ser sistemas solubles, que consisten de macromoléculas tales como proteínas o polímeros sintéticos.

Generalmente, los portadores de partículas microscópicas y submicroscópicas tienen varias ventajas distintas. Pueden actuar como depósitos de liberación sostenida o de liberación controlada de fármacos, contribuyendo así a mejorar la eficacia del fármaco y permitir la reducción de la frecuencia de dosificación. Proporcionando protección tanto del fármaco atrapado como del entorno biológico, estos portadores reducen los riesgos de inactivación del fármaco y degradación del mismo. Dado que la farmacocinética de la liberación de fármaco libre de las partículas es diferente del fármaco libre administrado directamente, estos portadores pueden usarse para reducir la toxicidad y los efectos secundarios indeseables.

A pesar de las ventajas ofrecidas, existen algunas dificultades asociadas con el uso de biopolímeros que encapsulan el fármaco. Por ejemplo, biopolímeros estructurados como micropartículas o nanopartículas tienen capacidades de direccionamiento limitadas, retención limitada y estabilidad en circulación, toxicidad potencial tras administración crónica y la incapacidad de extravasar. Se han hecho numerosos intentos de unir diferentes sustancias de reconocimiento, incluyendo anticuerpos, glicoproteínas y lectinas, a sistemas de partículas, tales como liposomas, microesferas y otros, con el fin de conferirles una cierta medida de direccionamiento. Aunque la unión de estos agentes de reconocimiento con el sistema de partículas ha tenido éxito, los sistemas modificados de partículas resultantes no funcionaron como se esperaba, particularmente *in vivo*.

Otras dificultades han surgido también cuando se usan tales sustancias de reconocimiento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser específicos del paciente, y por lo tanto agregar costo a la terapia con fármaco. Además, no todas las uniones entre el sustrato de reconocimiento y el portador son covalentes. La unión covalente es esencial, ya que la unión no covalente puede dar como resultado la disociación de las sustancias de reconocimiento del sistema de partículas en el sitio de administración, debido a la competencia entre el sistema de partículas y las contrapartidas de reconocimiento del sitio objetivo para la sustancia de reconocimiento. Tras dicha disociación, el sistema de partículas modificado administrado puede retornar a un sistema de partículas regulares, con lo que se anula el propósito de administración del sistema de partículas modificado.

El documento WO 01/39815 describe vehículos de suministro de fármacos que tienen un ligando de hialuronano de bajo peso molecular.

Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención es superar las deficiencias de la técnica anterior.

Otro objetivo de la presente invención es formar partículas a base de glicosaminoglicanos para encapsular fármacos.

Otro objetivo de la presente invención es suministrar fármacos encapsulados en una partícula a base de glicosaminoglicano.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar métodos de suministro de fármacos utilizando partículas de glicosaminoglicanos lipidados como vehículos de suministro de fármacos.

Se describe un portador de glicosaminoglicano lipidado de material en partículas en forma de una esfera con la porción de glicosaminoglicano de la partícula que forma una cubierta en el exterior y la porción de lípido del portador que forma el interior, no siendo dicho portador un liposoma, comprendiendo dicho portador el producto de reacción de al menos un glicosaminoglicano con fosfatidiletanolamina, en donde la relación de la fosfatidiletanolamina con respecto al menos un glicosaminoglicano está en el intervalo de 1:1 p/p o en el intervalo de 5: 1 a 20: 1 p/p, y en donde el glicosaminoglicano es ácido hialurónico que tiene un peso molecular de aproximadamente 1×10^5 hasta aproximadamente 1×10^7 daltons.

En una realización preferida, el suministro es mediante administración oral de la formulación en partículas. En otra realización preferida, el suministro es mediante administración intranasal de la formulación en partículas, especialmente para uso en terapia del cerebro y órganos relacionados (por ejemplo, meninges y médula espinal) que pretende evadir la barrera hematoencefálica (BBB). En este sentido, también es posible la administración intraocular. En otra realización preferida, el medio de suministro es por administración intravenosa (i.v.) de la formulación en partícula, lo que es especialmente ventajoso cuando se desea una formulación de administración i.v. de larga duración.

Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar un suministro de genes utilizando partículas de glicosaminoglicanos lipidados como materiales de administración génica.

La presente invención proporciona un nuevo gen de múltiples productos y tecnología de suministro de fármacos así como métodos de preparación y uso de los mismos. El sistema de suministro comprende glicosaminoglicanos lipidados, también conocidos como gagómeros, que son biopolímeros bioadhesivos producidos por entrecruzamiento de un lípido que tiene un grupo amino primario a un glicosaminoglicano que contiene ácido carboxílico. Las micropartículas o nanopartículas se forman de manera controlada, con intervalos de diámetros de partícula dominantes de aproximadamente 2-5 micrómetros para micropartículas y aproximadamente 50-200 nanómetros para nanopartículas. Ya sean fármacos pequeños o grandes, agentes bioactivos o ingredientes activos tales como antibióticos, quimioterapéuticos, proteínas y ácidos nucleicos pueden ser atrapados en estas partículas con una alta eficiencia, usualmente superior al 50%, incluso para macromoléculas grandes. Por ejemplo, para el ADN de plásmido, las nanopartículas proporcionan aproximadamente un 66% de atrapamiento y las micropartículas proporcionan un atrapamiento de aproximadamente 75%.

Para los propósitos de la presente invención, "fármaco" significa cualquier agente que pueda afectar el cuerpo terapéuticamente o que puede usarse *in vivo* para el diagnóstico. Ejemplos de fármacos terapéuticos incluyen

quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer, antibióticos para el tratamiento de infecciones y antifúngicos para el tratamiento de infecciones fúngicas. Ejemplos de fármacos de diagnóstico incluyen isótopos radiactivos tales como ^{99}Tc , ^{127}I , y ^{67}Gd , y moléculas fluorescentes que se usan para visualizar sitios de interés en el cuerpo.

- 5 La preparación de los biopolímeros de la presente invención y el atrapamiento de fármacos son procesos sencillos y rentables. Estos nuevos portadores actúan como depósitos de fármacos de liberación sostenida, con semividas en el intervalo de 19-35 horas para el eflujo de antibióticos y quimioterapéuticos. Estas propiedades, junto con su naturaleza bioadhesiva, proporcionan a estos nuevos portadores de fármacos la capacidad de actuar como depósitos de fármacos de liberación sostenida, adheridos al sitio, retenidos en el sitio, para administraciones sistémicas, que incluyen administración oral, tópica y regional, incluyendo intranasal.
- 10 Adicionalmente, los gagómeros de la presente invención no son tóxicos. Cuando los fármacos quimioterapéuticos fueron atrapados y ensayados en un modelo de cultivo celular, los sistemas mostraron un alto potencial en el tratamiento de tumores, incluso superando el bien conocido impedimento de la resistencia a fármacos. De este modo, los gagómeros pueden utilizarse como sistemas de suministro de fármacos microscópicos y submicroscópicos para una amplia gama de actividades terapéuticas, tales como cáncer, enfermedades infecciosas, cicatrización de heridas,
- 15 terapia enzimática, terapia génica y otros.

Inesperadamente, las partículas vacías (que contienen sólo gagómeros y ningún fármaco u otra formulación terapéutica) también parecen tener importantes efectos inhibidores de tumores. Por lo tanto, tales partículas pueden ser útiles para la terapia del cáncer, especialmente para el cáncer metastásico, ya sea como agente quimioterapéutico principal o adyuvante.

20 Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B son imágenes de microscopía electrónica de barrido de campos de partículas del mismo lote a dos diferentes aumentos. La Figura 1A está a una ampliación de 5000x. La Figura 1B está a una ampliación de 3000x.

- 25 Las Figuras 2A-2C son micrografías confocales que muestran células individuales incubadas con tres formulaciones diferentes. La Figura 2A muestra células de la línea C6 (glioma de rata) que se incubaron con bromuro de etidio libre (EtBr). La Figura 2B muestra células de la línea C6 que se incubaron con gagómeros "vacíos" (es decir, solo atrapando regulador) suspendidos en una solución de EtBr libre. La Figura 2C muestra células de la línea C6 que se incubaron con gagómeros que atrapan EtBr.

La Figura 3A muestra células de la línea celular PANC-1 (de adenocarcinoma pancreático humano) tratadas con EtBr encapsulado en gagómero.

- 30 La Figura 3B, muestra células de la línea celular PANC-1 tratadas con EtBr libre.

La Figura 4A es una micrografía confocal de un sistema similar al de la Figura 3B, pero con un aumento mayor.

La Figura 4B es una micrografía confocal de un sistema similar al de la Figura 3A, pero con un aumento mayor.

- 35 La Figura 5 muestra los resultados de los estudios de turbidez del ácido hialurónico libre y un gagómero basado en ácido hialurónico en función de la concentración macromolecular, después de cambios de absorbencia a 600 nm en forma de gráfico que representa la concentración de ácido hialurónico libre y un gagómero con base en ácido hialurónico.

Las Figuras 6A y 6B muestran microscopía de microgagómeros y nanogagómeros. La Figura 6A muestra microscopía de fluorescencia de microgagómeros que atrapan una proteína modelo, BSA-FITC, factor de aumento: 2000. La Figura 6B muestra microscopía óptica de nanogagómeros que atrapan ADN de plásmido, factor de aumento: 2000.

- 40 La Figura 7 es un gráfico que ilustra el eflujo de doxorrubicina de microgagómeros (círculos) y nanogagómeros (cuadrados) en condiciones de flujo unidireccional. La variable independiente es el tiempo. La variable dependiente (f) es el porcentaje de fármaco liberado en el tiempo = t con respecto al fármaco total en el sistema en el tiempo t = 0. Los símbolos representan los datos experimentales y las curvas de línea continua son las expectativas teóricas de acuerdo con un mecanismo de flujo de combinación múltiple.

- 45 La Figura 8 es un gráfico que muestra la supervivencia de células C6 48 horas después del tratamiento mediante microgagómeros libres (es decir, solo regulador de encapsulación, como en "vacío" definido en la descripción de la Figura 2B), una dosis dada de un fármaco quimioterapéutico libre, y una dosis equivalente del mismo fármaco atrapada en el microgagómero. Los estudios se realizaron con mitomicina c (MMC), doxorrubicina (DOX) y vinblastina (VIN), y los resultados se organizaron en tres conjuntos de datos, uno para cada fármaco. Cada barra es un promedio de tres

experimentos independientes, cada uno de los cuales comprendía 20 mediciones separadas. Las barras de error representan las desviaciones estándar respectivas.

La Figura 9 muestra los potenciales zeta (carga superficial efectiva) de las nanopartículas y micropartículas en función de la concentración. Los potenciales Zeta reflejan las fuerzas de interacción totales entre las partículas de tamaño coloidal en suspensión.

La Figura 10 representa los resultados de las pruebas de toxicidad de las nanopartículas del sistema de suministro de fármaco libre (DDS). La dosis de DDS fue de 1 mg/mL y el tiempo de incubación fue de 24 horas. Cada barra es un promedio de 32-64 determinaciones independientes, y las barras de error representan las desviaciones estándar.

Las Figuras 11A y 11B muestran los efectos citotóxicos de MMC (Figura 11A) y de DOX (Figura 11B), formulados en DDS-(nanopartículas) en células C26 expuestas al medio de tratamiento durante 4 horas, en comparación con el fármaco libre y el sistema de suministro del fármaco libre (DDS). *** indica $p < 0,001$, que compara cada especie de fármaco y dosis del portador versus las formulaciones libres.

La Figura 12 representa las concentraciones de MMC en sangre, en función del tipo de formulación y del tiempo de inyección. Cada símbolo es un promedio de 5 animales y las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Las líneas no son teóricas, dibujadas para enfatizar las tendencias de los datos.

La Figura 13 ilustra el aumento del volumen tumoral con el tiempo. Los puntos son experimentales, cada uno con un promedio de 5 animales; las barras de error son el SEM y las curvas no son teóricas, lo que indica las tendencias de los datos. Las flechas y los números arriba de ellas indican días de tratamiento. Los números junto a los símbolos son días de aparición del tumor.

La Figura 14 ilustra la supervivencia de los animales en la prueba 1. Cada animal recibió 3 inyecciones de la formulación seleccionada. Los datos para los grupos de solución salina y MMC libre son de 10 animales/grupo; los datos para el DDS libre y el MMS/DDS son de 5 animales/grupo.

La Figura 15 ilustra la supervivencia de los animales en la prueba 2. Cada animal recibió 4 inyecciones de la formulación seleccionada. Los datos para el DDS libre son de 3 animales y para el MMC/DDS de 5 animales.

La Figura 16 es un gráfico de barras que muestra la acumulación en el cerebro de MMC, usada como marcador, después de administración intranasal (IN) de MMC libre y MMC atrapada en nanopartículas de DDS. Los datos son de la prueba 1, un experimento con ratas.

La Figura 17 es un gráfico de barras que muestra la acumulación en el cerebro de MMC, usada como marcador, después de la administración intranasal (IN) de MMC libre y MMC atrapada en nanopartículas de DDS. Los datos son de la prueba 2, un experimento con ratones.

La Figura 18 muestra el número de metástasis encontradas en los pulmones de los ratones C57BL/6 inyectados en forma i.v. con células B16F10. El grupo de control representa animales sanos que no fueron inyectados con células tumorales. Cada barra es un promedio de los cinco animales del grupo y la barra de error es la desviación estándar.

La Figura 19 muestra el aumento de peso de los pulmones de ratones inyectados con tumor calculado a partir de los datos no procesados del peso de los pulmones, de acuerdo con la fórmula enumerada en la sección experimental. Cada barra es un promedio para los 5 animales del grupo y las barras de error son la desviación estándar.

La figura 20 representa un nuevo gráfico de los datos de las Figuras 18 y 19 (sólo promedios). Los puntos son los datos experimentales, y las líneas continuas son no teóricas, dibujadas para enfatizar las tendencias.

La Figura 21 representa la captación de gagómeros que atrapan BSA-FITC en células MCF7 usando microscopía de luz y fluorescente. Los dos paneles superiores muestran la captación de proteína libre y unión no específica. Los dos paneles inferiores representan la entrada de proteínas en el citosol y el núcleo.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la preparación y usos de sistemas de suministro microscópicos y submicroscópicos, así como a materiales que pueden usarse para la modificación genética de tejidos y el andamiaje de tejidos. Los sistemas de suministro de fármacos de la presente invención son nuevos biopolímeros adhesivos que toman la forma de un portador en partículas, también denominado gagómero, elaborado a partir de un lípido que contiene al menos una amina primaria y un glicosaminoglicano, es decir, glicosaminoglicanos lipídicos.

Las partículas de la presente invención son particularmente rentables cuando se comparan con otros portadores en partículas, como se muestra en la Tabla 1.

5 Como se usa en la presente solicitud, el término ácido hialurónico, o HA, se refiere al ácido hialurónico y a cualquiera de sus sales hialuronato, incluyendo, por ejemplo, hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, hialuronato de magnesio y hialuronato de calcio. De manera similar, para cualquiera de los glicosaminoglicanos, las sales así como los ácidos libres se incluyen en el término glicosaminoglicano.

10 Los gagómeros de la presente invención son sistemas de administración de fármacos en micropartículas y nanopartículas, también denominados MDDS y NDDS, respectivamente, que utilizan biopolímeros adhesivos que atrapan fármacos. Estos portadores, cuando se cargan con fármacos, mejoran los resultados clínicos en comparación con los mismos fármacos administrados en su forma libre. Los gagómeros están hechos de materiales naturales que son biocompatibles y biodegradables.

Tabla 1

Ventajas de la presente invención: Aspectos de un producción rentable	
Gagómeros	Otros portadores en partículas
Producción rentable: Materias primas	
Estable, disponible, relativamente económica, se ajusta a una amplia población de pacientes	Algunos o todos los componentes tienen limitaciones de estabilidad y disponibilidad, algunos pueden encajar sólo a poblaciones de pacientes estrechas
Producción rentable: Fabricación	
Las metodologías de fabricación utilizadas para R&D son susceptibles de escalado con poca o ninguna modificación	La mayoría de los casos requieren grandes inversiones en el desarrollo de métodos de producción escalados
Gagómeros	Otros portadores en partículas
Producción rentable: Líneas de producción	
Dado que la producción del GAG lipidado y el atrapamiento del fármaco son procesos separados, una sola línea de producción del GAG lipidado se adapta a todos los productos. Dos poblaciones de tamaños de partícula pueden fraccionarse mediante un procedimiento simple, del mismo lote.	La producción de partículas y el atrapamiento de fármacos se realizan, la mayoría de las veces, en el mismo proceso, requiriendo una línea de productos separada para cada formulación final. Igualmente para diferentes tamaños de partícula.
Producción rentable: Preparación de la formulación para uso	
La formulación final es mediante simple rehidratación del polvo seco de GAG lipidado en una solución acuosa del fármaco deseado. Puede hacerse al lado de la cama del paciente, en casa, etc.	La formulación final, incluyendo el fármaco atrapado, tiene que ser proporcionada por el fabricante.
Producción rentable: Estabilidad y vida útil	
El fármaco y el GAG lipidado se pueden almacenar por separado en forma seca, hasta su reconstitución para uso, proporcionando una alta estabilidad y una vida útil a largo plazo.	El almacenamiento es de la formulación final, es decir, del portador cargado con fármaco. La forma seca no está disponible en todos los casos. Como resultado, existen limitaciones tanto en la estabilidad como en la vida útil.

15 Los gagómeros de la presente invención tienen una serie de otras ventajas sobre otros portadores en partículas, incluyendo aspectos de su destino *in vivo*, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Ventajas de la presente invención - Aspectos del destino <i>in vivo</i>	
Gagómeros	Otros portadores en partículas
Destino <i>in vivo</i> : Biodegradabilidad y biocompatibilidad	
Todos los componentes son biomateriales, por lo tanto proporcionan estas propiedades	Algunos portadores tienen componentes no biológicos que desmejoran estas propiedades
Destino <i>in vivo</i> : Toxicidad e inmunogenicidad	
Basándose en la naturaleza de las materias primas, no se esperan toxicidad y baja o ninguna inmunogenicidad. Los estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> no confirman toxicidad.	Varía de un portador a otro. Aceptable en los pocos sistemas aprobados para uso clínico.
Destino <i>in vivo</i> tras administración i.v.: Retención en circulación	
Se confirmó retención buena y suficiente, ya que el componente GAG ya tiene la capa externa hidrófila encontrada para retrasar la opsonización y absorción por el RES.	Retención obtenida pobre e insuficiente, a menos que el portador sea modificado en la superficie para portar un ligando apropiado en su superficie para retrasar tanto la opsonización como la absorción por el RES.

Los gagómeros de la presente invención también proporcionan una actividad biológica y terapéutica superior en comparación con otros portadores en partículas. Algunas de estas ventajas se muestran en la Tabla 3.

5

Tabla 3

Ventajas de la presente invención: Aspectos de actividad biológica/terapéutica	
Gagómeros	Otros portadores en partículas
Actividad biológica/terapéutica: Eficiencia del atrapamiento del fármaco	
Capacidad de atrapamiento de alta eficacia independiente del tamaño del fármaco hasta e incluyendo proteínas y material genético, debido a una naturaleza "envolvente" o de "ajuste inducido".	Las eficiencias de atrapamiento van desde pobres hasta altas, con baja eficiencia de entidades de alto peso molecular.
Actividad biológica/terapéutica: Retención en el sitio y direccionamiento	
La naturaleza bioadhesiva del componente GAG confiere a los sistemas la capacidad de adherirse con alta afinidad a los sitios de reconocimiento <i>in vivo</i> y confiere medidas de direccionamiento activo.	Se requiere una modificación adicional del portador, que no siempre es posible y en algunos casos es contraproducente para la producción y aspectos de destino <i>in vivo</i> para dotar a los sistemas con estas propiedades.

Se pueden sintetizar dos tipos básicos de gagómero: uno con una relación de lípidos a glicosaminoglicanos baja, [1:1, p/p] denominada LLG y uno con una relación alta de lípido a glicosaminoglicano, [5:1 a 20:1, p/p] denominado HLG. Al cambiar los pasos específicos en la preparación, el resultado puede ser dirigido a formar micropartículas o nanopartículas.

10

Los gagómeros de la presente invención, glicosaminoglicanos lipidados, se pueden usar como sistemas de suministro para terapia con fármacos para tratar una afección patológica en un animal que lo necesite. El término "animal" usado en la presente invención incluye seres humanos y otros mamíferos tales como ganado vacuno, perros, gatos, ratas, ratones; así como las aves; reptiles; y pescado.

Para la presente invención, las condiciones patológicas adecuadas para el tratamiento por medio de los gagómeros incluyen, pero no se limitan a, cáncer, infecciones por hongos o bacterias, incluidas las secundarias a traumatismos tales como quemaduras, infecciones causadas por parásitos o virus, infecciones por priones, y similares.

5 Los gagómeros de la presente invención también pueden tener uso en preparaciones de vacunas y terapia génica. La preparación de vacunas que contienen un polipéptido inmunogénico como ingrediente activo es conocida por un experto en la técnica. Del mismo modo, la preparación de vectores para inserción génica es también conocida por un experto en la técnica.

10 Los gagómeros formados por los procedimientos de la presente invención pueden ser liofilizados o deshidratados en diversas etapas de formación. Por ejemplo, la película de lípidos se puede liofilizar después de eliminar el disolvente y antes de añadir el fármaco. Alternativamente, la película de lípido-fármaco se puede liofilizar antes de hidratar los gagómeros. Dicha deshidratación puede llevarse a cabo mediante la exposición del lípido o el gagómero a presión reducida, eliminando de este modo todo el disolvente de la suspensión.

15 Alternativamente o adicionalmente, la preparación de gagómero hidratada también puede deshidratarse colocándola en medio circundante en nitrógeno líquido y congelándola antes de la etapa de deshidratación. La deshidratación con congelación previa puede realizarse en presencia de uno o más agentes protectores, tales como azúcares. Tales técnicas mejoran el almacenamiento a largo plazo y la estabilidad de las preparaciones.

20 Después de la rehidratación, puede calentarse la preparación. Pueden utilizarse otros métodos adecuados en la deshidratación de las preparaciones de gagómeros. Los gagómeros también pueden deshidratarse sin congelación previa. Una vez que se han deshidratado los gagómeros, se pueden almacenar durante largos períodos de tiempo hasta que se van a utilizar. La temperatura apropiada para el almacenamiento dependerá de la formulación de lípidos de los gagómeros y de la sensibilidad a la temperatura de los materiales encapsulados.

25 Cuando se van a utilizar los gagómeros deshidratados, la rehidratación se consigue simplemente añadiendo una solución acuosa, tal como agua destilada o un regulador apropiado, a los gagómeros y permitiéndoles que se rehidraten. Esta rehidratación puede realizarse a temperatura ambiente o a otras temperaturas apropiadas para la composición de los gagómeros y su contenido interno.

Los gagómeros de la presente invención, glicosaminoglicanos lipidados, se preparan preferiblemente mediante unión covalente de un lípido que tiene al menos un grupo amino primario a un glicosaminoglicano que contiene ácido carboxílico mediante el siguiente método:

30 (a) Se proporciona un recipiente de reacción en el que se esparce el lípido en una capa delgada sobre el fondo y las paredes del recipiente. Esto puede efectuarse disolviendo el lípido en un disolvente orgánico y evaporando el lípido a sequedad a baja presión en un evaporador rotatorio.

(b) El glicosaminoglicano se activa por preincubación en pH ácido con un entrecruzador.

(c) El glicosaminoglicano activado se añade al recipiente de reacción.

(d) La mezcla de reacción del lípido y del glicosaminoglicano activado se regula a un pH básico de 8,6.

35 (e) Las mezclas de reacción reguladas se incuban, con agitación continua, durante un período de tiempo suficiente para formar el glicosaminoglicano lipidado, tal como durante la noche a 37°C. Dado que los gags lipidados están diseñados para usarse *in vivo*, deben ser estables a aproximadamente 37°C. Aunque pueden usarse temperaturas más altas para la lipidación, los lípidos experimentan cambios físicos con temperaturas crecientes, generalmente alrededor de 62°C. Por lo tanto, la lipidación se lleva a cabo preferiblemente a temperaturas de aproximadamente 30-40°C.

40 (f) El glicosaminoglicano lipidado se regula a un pH neutro y se añaden otros iones y aditivos solubles en agua de acuerdo con la necesidad para elevar la fuerza iónica hasta niveles fisiológicos con iones o sales presentes en fluidos biológicos (tales como NaCl, KCl, Ca²⁺ y Mg²⁺).

45 (g) Las partículas se fraccionan por centrifugaciones sucesivas, cada una a 4°C, durante 40 minutos a una fuerza g de $1,3 \times 10^5$, de la siguiente manera: El precipitado después de 3 series es la fracción enriquecida con micropartículas, el sobrenadante de la fracción enriquecida en micropartículas sometida a 3 series adicionales es la fracción enriquecida en nanopartículas.

(h) El glicosaminoglicano lipidado resultante se liofiliza.

Para atrapar fármacos u otros ingredientes activos en los gagómeros, se disuelve el material de interés en agua pura libre de iones. El gagómero en polvo seco liofilizado obtenido como se mencionó anteriormente se reconstituye entonces en la solución acuosa del material que se va a atrapar.

Se pueden realizar estudios de turbidez, después de la dispersión de luz en un espectrofotómetro, para concentraciones iguales de ácido hialurónico soluble y de un gagómero preparado a partir de ácido hialurónico y fosfatidiletanolamina para obtener una idea de si la síntesis realmente produce materia en partículas. Los resultados representativos de tales estudios se muestran en la Figura 5. Como era de esperar, en el intervalo de concentración probado el ácido hialurónico libre es soluble, y sus soluciones no dispersan la luz. Por el contrario, las muestras que contienen gagómeros son turbias, aumentando la dispersión de la luz con la concentración de gagómero, dejando claro que el biopolímero es un material insoluble.

Las muestras de los gagómeros que atrapan macromoléculas son visibles tanto por microscopía óptica como de fluorescencia. Un campo típico observado bajo el microscopio fluorescente, de micropartículas de entre 2 y 5 micras de diámetro, preparado a partir de HLG y atrapando una proteína modelo, BSA-FITC, se muestra en la Figura 6, panel superior. Estas micropartículas se preparan como se ha descrito anteriormente. Antes de la observación bajo el microscopio, la proteína no atrapada se elimina de la preparación por ultracentrifugación a 4°C durante 30 minutos y una fuerza g de $1,2 \times 10^5$. El precipitado que contiene las partículas con su proteína atrapada se resuspende en solución salina regulada con fosfato (PBS).

Un campo típico de nanopartículas (entre 50 y 200 nm de diámetro) visto bajo el microscopio óptico preparado a partir de HLG que atrapa un ADN de plásmido se muestra en la Figura 6, panel inferior. Las nanopartículas se preparan como se ha descrito anteriormente para el FITC-BSA.

Las partículas hechas de glicosaminoglicanos tienen una amplia gama de aplicaciones, ya que las mismas partículas pueden usarse solas, o con cualquier tipo de material encapsulado en ellas. Las partículas de glicosaminoglicano se elaboran preferiblemente sin ningún material encapsulado y después se liofilizan para formar un polvo. Las partículas de glicosaminoglicano en polvo se mezclan entonces con un polvo del material a encapsular. Alternativamente, las partículas de glicosaminoglicano en polvo se reconstituyen mezclando con una solución acuosa del material a encapsular. Una vez que se reconstituye la mezcla, las partículas habrán capturado el material con el que fue mezclado. De este modo, las moléculas pequeñas, tales como antibióticos y fármacos quimioterapéuticos, y moléculas grandes, tales como proteínas, pueden encapsularse con esta técnica. Las partículas se pueden utilizar para encapsular ADN, y las partículas más grandes pueden incluso encapsular células enteras y líneas celulares. Por lo tanto, también se pueden utilizar partículas como un andamio para la modificación genética de tejidos.

Las partículas de la presente invención se preparan haciendo reaccionar al menos un glicosaminoglicano en la forma larga, es decir, el gag no se ha cortado en tamaños más pequeños. Todos los glicosaminoglicanos, excepto el ácido hialurónico, están naturalmente en forma de una unidad estructural proteica unida covalentemente a una unidad estructural de polisacárido. Los métodos para hidrolizar el enlace de proteína-azúcar son bien conocidos por los expertos en la técnica, tanto químicamente como enzimáticamente. Además, están disponibles algunos productos comerciales en los que la unidad estructural de proteína ya ha sido removida.

El polímero de glicosaminoglicano se hace reaccionar con un lípido que tiene al menos un grupo amino primario para entrecruzar el residuo carboxílico del glicosaminoglicano con una amina primaria en el lípido. Una vez que se produce esta reacción, la estabilidad termodinámica hace que los lípidos interactúen entre sí para convertir el producto en una esfera que tiene al glicosaminoglicano en el exterior y los lípidos en el interior. Estas partículas se utilizan entonces para encapsular otros materiales, incluyendo fármacos, ADN, células, proteínas, etc.

En una realización de la presente invención, se elimina la parte de proteína del glicosaminoglicano y sólo se hace reaccionar la cadena principal de azúcar con los lípidos.

Se conoce en la técnica cómo unir ácido hialurónico al exterior de liposomas para dirigir o para hacer que los liposomas sean más bioadhesivos. En la presente invención, no hay liposoma, en vez de eso, las moléculas de lípido están unidas covalentemente al ácido hialurónico.

En otra realización de la presente invención, se pueden unir otras moléculas primero al glicosaminoglicano, que después se hace reaccionar con lípidos. Estas partículas tienen las otras moléculas que aparecen en el exterior de las partículas. Estas otras moléculas pueden ser, por ejemplo, anticuerpos, folato, porfirinas o lectinas, y pueden usarse para direccionamiento.

El glicosaminoglicano reivindicado es ácido hialurónico.

Las fuentes naturales de glicosaminoglicanos incluyen tanto fuentes vegetales como animales, incluyendo pero no limitándose a árboles de haya y formas de cartílago animal, incluyendo cartílago de tiburón, tráquea bovina, septo de ballena, narices de porcino y moluscos como *Perna canaliculus* y pepino de mar.

5 Se ha encontrado que los fármacos encapsulados en las partículas de glicosaminoglicano de la presente invención son mucho más eficaces que los fármacos libres, particularmente para las células cancerosas que se han vuelto resistentes a fármacos. Parece que los gagómeros se unen a las células cancerosas y se convierten así en depósitos de fármacos que pueden entrar en las células más rápidamente de lo que son excretados. Estos fármacos tienen por lo tanto un efecto tóxico sobre las células a pesar de los mecanismos resistentes a fármacos que se han desarrollado, abrumando a las células cancerosas.

10 Los gagómeros de la presente invención pueden encapsular casi cualquier tipo de molécula sin ser modificados. Por el contrario, los liposomas, por ejemplo, deben cargarse primero positivamente para formar complejo con el ADN, mientras que los liposomas que encapsulan muchos otros materiales no se cargan positivamente. Es una ventaja de la presente invención que los gagómeros puedan encapsular prácticamente cualquier tipo de molécula.

15 Los glicosaminoglicanos se utilizan en los tamaños obtenidos cuando se purifican a partir de sus fuentes biológicas y que no han sido sometidos a degradación química y/o biológica. Por ejemplo, para el ácido hialurónico, esto corresponde a un intervalo de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^7 daltons.

20 Las composiciones farmacéuticas que utilizan gagómeros de acuerdo con la presente invención pueden administrarse por cualquier vía conveniente, incluyendo parenteral, por ejemplo, subcutánea, intravenosa, tópica, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, rectal, vaginal, intranasal o intraocular. Alternativamente o concomitantemente, la administración puede ser por vía oral.

La administración parenteral puede ser por inyección en bolo o por perfusión gradual a lo largo del tiempo. La administración parenteral se caracteriza generalmente por inyección, más típicamente subcutánea, intramuscular o intravenosa.

25 Las formulaciones tópicas compuestas de los constructos de gagómeros de la presente invención, reforzadores de penetración y otros fármacos o medicamentos biológicamente activos pueden aplicarse de muchas maneras. La solución se puede aplicar gota a gota, desde un dispositivo de administración adecuado, al área apropiada de piel o de piel enferma o membranas mucosas y se frota a mano o simplemente se deja secar al aire. Se puede añadir un agente gelificante adecuado a la solución y se puede aplicar la preparación al área apropiada y se frota. Para administración a heridas o quemaduras, los gagómeros se pueden incorporar en formas de dosificación tales como aceites, emulsiones y similares. Tales preparaciones pueden aplicarse directamente a la zona afectada en forma de lociones, cremas, pastas, ungüentos y similares.

30 Alternativamente, la formulación en solución tópica puede colocarse en un dispositivo de atomización y ser suministrada como un aerosol. Este tipo de dispositivo de administración de fármacos está particularmente adaptado para su aplicación a grandes áreas de piel afectadas por patologías dérmicas, a piel altamente sensible o a cavidades nasales u orales. Opcionalmente, los gagómeros se pueden administrar en forma de un ungüento o parche transdérmico.

Se entiende que las vías orales de administración incluyen vías de administración bucal y sublingual.

40 Los gagómeros de la presente invención también se pueden administrar por otras vías que optimizan la captación por la mucosa. Por ejemplo, vaginal (especialmente en el caso de tratar patologías vaginales), rectal e intranasal son las vías de administración preferidas. Además, los gagómeros son particularmente adecuados para el suministro a través de tejido mucoso o epitelio. Si se administran en forma intranasal, los gagómeros se administrarán típicamente en forma de aerosol, o en forma de gotas. Esto puede ser especialmente útil para tratar patologías pulmonares. Se pueden encontrar formulaciones adecuadas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 y 18 Ed., Mack Publishing, Easton, Pa. (1980 y 1990), e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4ª Edición, Lea & Febiger, Filadelfia (1985), cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia.

45 Dependiendo del modo de administración pretendido, las composiciones utilizadas pueden estar en formas de dosificación sólidas, semisólidas o líquidas, tales como, por ejemplo, tabletas, supositorios, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos, suspensiones, o similares, preferiblemente en formas de dosificación unitarias adecuadas para administración única de dosificaciones precisas. Las composiciones farmacéuticas incluirán el constructo de gagómero tal como se ha descrito y un excipiente farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, vehículos, coadyuvantes, etc. Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno que sea químicamente inerte a los compuestos activos y que no tenga efectos secundarios perjudiciales ni toxicidad bajo las condiciones de uso. La elección del portador se determina en parte por el ingrediente activo particular, así como por el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, hay una amplia variedad de formulaciones adecuadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

- Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como sacáridos, por ejemplo, lactosa o sacarosa, manitol o sorbitol, preparaciones de celulosa y/o fosfatos de calcio, por ejemplo, fosfato tricálcico o fosfato ácido de cálcico, así como aglutinantes tales como pasta de almidón usando, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinil pirrolidina.
- Las formulaciones inyectables para administración parenteral se pueden preparar como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener también cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH y similares, tales como, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.
- Las suspensiones para inyección acuosa también pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes.
- Las formulaciones parenterales pueden estar presentes en recipientes sellados de dosis unitarias o de dosis múltiples, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en una condición de secado por congelación (liofilizada) que requiere solamente la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo anteriormente descrito.
- Para la administración oral, se forma una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable mediante la incorporación de cualquiera de los excipientes normalmente empleados, tales como, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, croscarmelosa sódica, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. Tales composiciones incluyen soluciones, suspensiones, comprimidos, comprimidos dispersables, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden consistir en soluciones líquidas tales como cantidades eficaces del compuesto o compuestos disueltos en diluyentes tales como agua, solución salina o jugo de naranja; bolsitas, grageas y pastillas, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo como sólidos o gránulos; polvos, suspensiones en un líquido apropiado; y emulsiones adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y los alcoholes de polietileno, con o sin la adición de un surfactante farmacéuticamente aceptable, agentes de suspensión o agentes emulsionantes.
- Cuando la composición es una píldora o comprimido, contendrá, junto con el ingrediente activo, un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico o similares; un lubricante tal como estearato de magnesio o similar; y un aglutinante tal como almidón, goma acacia, gelatina, polivinil pirrolidina, celulosa y sus derivados, y similares.
- Las formas de comprimidos pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico, celulosa microcristalina, goma arábica, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, talco, estearato de magnesio, estearato cálcico, estearato de zinc, ácido esteárico y otros conservantes, agentes saborizantes y agentes desintegrantes farmacéuticamente aceptables, agentes humectantes, conservantes, y portadores farmacológicamente compatibles.
- Las formas en cápsula pueden ser del tipo ordinario de gelatina dura o blanda que contiene, por ejemplo, surfactantes, lubricantes y rellenos inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio y almidón de maíz.
- Las formas de grageas pueden comprender el ingrediente activo en un portador, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto, así como pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina o glicerina, o sacarosa y acacia.
- Para determinar las dosificaciones de las partículas de gagómero a administrar, se selecciona la dosificación y frecuencia de administración en relación con las propiedades farmacológicas de los ingredientes activos específicos. Normalmente, deben usarse al menos tres niveles de dosificación. En los estudios de toxicidad en general, la dosis más alta debe alcanzar un nivel tóxico pero no alcanzar a ser letal para la mayoría de los animales del grupo. Si es posible, la dosis más baja debe inducir un efecto biológicamente demostrable. Estos estudios deben realizarse en paralelo para cada compuesto seleccionado.
- Adicionalmente, el nivel de ED50 (dosis efectiva para el 50% de la población de prueba) del ingrediente activo en cuestión debe ser uno de los niveles de dosificación seleccionados y los otros dos seleccionados para alcanzar un nivel tóxico. La dosis más baja es aquella dosis que no presenta un efecto biológicamente demostrable. Las pruebas toxicológicas deben repetirse utilizando nuevas dosis adecuadas calculadas con base en los resultados obtenidos.

- Los ratones jóvenes sanos o las ratas pertenecientes a una cepa bien definida son la primera elección de la especie, y los primeros estudios usan generalmente la vía de administración preferida. Los grupos de control que recibieron placebo o no fueron tratados están incluidos en los ensayos. Los ensayos de toxicidad general, como se ha indicado anteriormente, deberían normalmente repetirse en otras especies no roedoras, por ejemplo, un conejo o un perro. Los estudios también pueden repetirse usando rutas alternativas de administración.
- Los ensayos de toxicidad de una dosis única deben realizarse de tal manera que se revelen signos de toxicidad aguda y se determine el modo de muerte. La dosificación a administrar se calcula con base en los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad antes mencionados. Puede ser deseable no continuar estudiando todos los compuestos inicialmente seleccionados.
- Los datos sobre la toxicidad de una dosis única, por ejemplo LD₅₀, la dosis a la que mueren el 50% de los animales de experimentación, se expresan en unidades de peso o volumen por kg de peso corporal y se deben suministrar generalmente a al menos dos especies con diferentes modos de administración. Además del valor de LD₅₀ en roedores, es deseable determinar la dosis más alta tolerada y/o la dosis letal más baja para otras especies, es decir, perro y conejo.
- Cuando se ha establecido un nivel de dosificación adecuado y presumiblemente seguro como se ha descrito anteriormente, también se pueden requerir estudios sobre la toxicidad crónica del fármaco, su efecto sobre la reproducción y potencial mutagenicidad para asegurar que el intervalo de dosificación apropiado calculado será seguro, también con respecto a estos peligros.
- Se llevan a cabo entonces estudios farmacológicos en animales sobre la farmacocinética que revelan, por ejemplo, la absorción, distribución, biotransformación y excreción del ingrediente activo y metabolitos. Utilizando los resultados obtenidos, se diseñan estudios sobre farmacología humana.
- Los estudios de la farmacodinamia y la farmacocinética de los compuestos en seres humanos deben realizarse en sujetos sanos utilizando las vías de administración destinadas a uso clínico, y pueden repetirse en pacientes. La relación dosis-respuesta cuando se administran diferentes dosis, o cuando se administran varios tipos de conjugados o combinaciones de conjugados y compuestos libres, debe ser estudiada con el fin de dilucidar la relación dosis-respuesta (dosis versus concentración en plasma versus efecto), el intervalo terapéutico y el intervalo óptimo de dosis. También deben realizarse estudios sobre la relación tiempo-efecto, por ejemplo, estudios sobre el curso en el tiempo del efecto y estudios sobre diferentes órganos con el fin de dilucidar los efectos farmacológicos deseados e indeseados del fármaco, en particular sobre otros sistemas de órganos vitales.
- Los compuestos de la presente invención están entonces listos para ensayos clínicos para comparar la eficacia de los compuestos con la terapia existente. Una relación dosis-respuesta con el efecto terapéutico y efectos secundarios puede establecerse más finamente en este punto.
- La cantidad de compuestos de la presente invención que se va a administrar a cualquier paciente dado debe determinarse empíricamente y variará dependiendo de la condición de los pacientes. En primer lugar se pueden administrar cantidades relativamente pequeñas del ingrediente activo, con dosis cada vez mayores si no se observan efectos adversos. Por supuesto, nunca se debe exceder la dosis máxima de toxicidad segura determinada en las pruebas de toxicidad de rutina con animales.
- Las composiciones dentro del alcance de la presente invención incluyen todas las composiciones en las que el ingrediente activo está contenido en una cantidad eficaz para lograr el propósito previsto. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos óptimos de cantidades efectivas de cada compuesto está dentro de la maestría en la técnica. La dosis administrada dependerá de la edad, el estado de salud y el peso del individuo receptor de la misma, así como sobre la naturaleza de cualquier tratamiento concurrente y el efecto deseado. Las dosificaciones típicas comprenden de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal. Las dosis preferidas que comprenden 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal. Las dosificaciones más preferidas comprenden de 1 a 50 mg/kg de peso corporal.
- Los gagómeros pueden formularse para atrapar composiciones terapéuticas para fármacos o terapia génica, o pueden estar vacíos, para uso en el tratamiento de cáncer, especialmente cáncer metastásico.

Ejemplo 1: Estudios estructurales de microgagómeros

- Los datos estructurales proporcionados aquí (Figuras 1A y 1B) se obtuvieron por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM). Ambas partes de la Figura 1 son campos del mismo lote, con dos aumentos diferentes (ver información estampada por el propio dispositivo en la parte inferior de cada figura). Tres características son demostradas por estos resultados: (1) estos datos constituyen una confirmación de la naturaleza en partículas de estos polímeros; (2) estos datos también constituyen una confirmación del intervalo de tamaños (véase una barra de 1 μm en la Figura 1A); y (3) se proporcionan algunos detalles sobre la forma de las partículas.

Se observa que las partículas son heterogéneas con respecto al tamaño. Esto se observa en la Figura 1A y más aún en la Figura 1B. Este es un resultado esperado, ya que la microscopía se realizó en toda la preparación, antes del fraccionamiento en las poblaciones de nano y micropartículas. Los intervalos de ampliación aplicados bajo el microscopio para uso en SEM favorecen el de las micropartículas.

5 Ejemplo 2: Unión química

Puesto que el grupo amino lipídico se entrecruzó con los residuos carboxílicos del ácido hialurónico, debería haber una disminución en el número de ácidos carboxílicos libres del ácido hialurónico libre para el gagómero. Cuanto más ligado a los lípidos, más extensa debe ser la disminución de los grupos de ácido carboxílico libres. Además, a partir del grado de pérdida de ácido carboxílico libre, es posible medir la estequiometría de lípido con respecto a ácido hialurónico. Usando un ensayo de ácido carboxílico, fue posible medir la disminución esperada. También se podría estimar que, en las micropartículas, alrededor del 33% de los residuos de ácido glucurónico están ocupados por moléculas lipídicas, en las que en las nanopartículas sólo aproximadamente el 20% de los residuos de ácido glucurónico están ocupados por moléculas lipídicas.

Ejemplo 3: Detalles fisicoquímicos y propiedades de la formulación de gagómero de EtBr

La eficacia de atrapamiento de fármacos u otros agentes bioactivos en los gagómeros y la cinética de eflujo del fármaco para fármacos de pequeño peso molecular se determinaron usando absorbencia en un lector de placas de ELISA, con longitudes de onda apropiadas para cada entidad atrapada dada.

Los resultados típicos de la eficacia de atrapamiento se muestran en las Tablas 4 y 5 de las micropartículas y nanopartículas, respectivamente.

20

Tabla 4

Microgagómeros: Eficacia del atrapamiento de fármaco y la semivida del eflujo de fármaco			
Entidad atrapada	Eficacia de encapsulación (%)		Semivida del eflujo de fármaco (horas)
	Por termodinámica	Por cinética	
Fluoresceína	49,6 ± 4,8	40,6 ± 5,8	7,9
Cloranfenicol	39,3 ± 3,9	30,5 ± 1,9	28,2
Mitomicina c	49,4 ± 2,5	44,3 ± 2,7	20,1
Doxorubicina	52,4 ± 6,3	50,2 ± 1,2	35,3
BSA	32,0 ± 2,5		
ADN	74,5 ± 2,8		

Tabla 5

Microgagómeros: Eficacia del atrapamiento de fármaco y la semivida del eflujo de fármaco			
Entidad atrapada	Eficacia de encapsulación (%)		Semivida del eflujo de fármaco (horas)
	Por termodinámica	Por cinética	
Fluoresceína	37,4 ± 1,2	29,1 ± 6,1	21,9
Cloranfenicol	47,4 ± 0,3	47,1 ± 1,5	14,8

Mitomicina c	54,8 ± 0,9	41,7 ± 1,6	29,8
Doxorubicina	57,0 ± 3,7	53,6 ± 0,9	22,3
BSA	35,0 ± 1,8		
ADN	65,8 ± 4,8		

La concentración de EtBr atrapado por gagómero fue de 25 µM. La eficacia del atrapamiento fue 49,8 (± 3,1) (%). La semivida del eflujo de EtBr del gagómero fue de 27,7 horas.

Ejemplo 4: Estudios de toxicidad *in vitro*

5 Se ensayaron los gagómeros libres de fármaco de tamaño micro y nano para determinar la toxicidad en cultivos celulares tanto para gagómeros de bajo contenido de lípidos y alto contenido de lípidos. Se ensayaron dos líneas celulares, la línea celular de glioma de rata C6 y la línea de fibroblastos de ratón NIH3T3. En todos los casos se encontró que los gagómeros no tenían toxicidad en el intervalo de concentraciones de 100 veces de 0,02 a 2 mg/mL de polímero.

10 **Ejemplo 5:** Actividad terapéutica ejemplificada por tratamiento de una línea celular de glioma resistente a fármacos (MDR)

Debido a su localización y pobre respuesta a fármacos quimioterapéuticos, los tumores cerebrales, particularmente los gliomas, son muy difíciles de tratar (Wolff y colaboradores, 1999; Nutt y colaboradores, 2000). La pobre respuesta del fármaco se debe en parte a la falta de acceso y en parte a la resistencia inherente a múltiples fármacos (MDR) de estos tumores (Larsen, 2000; Gottesman y colaboradores, 1995).

En tumores cerebrales, la resistencia a múltiples fármacos es un impedimento incluso en los casos en los que se ha proporcionado el acceso al tumor, tal como mediante administración local o dejando un depósito local al final de un procedimiento quirúrgico. En este mecanismo prevalente de resistencia a fármacos, que aparece tanto en un modo adquirido como inherente, los fármacos no pierden su actividad tóxica intrínseca, ni tampoco las células resistentes encontraron una manera de metabolizar los fármacos hasta entidades no tóxicas. Más bien, el fármaco que entra en la célula a través de la difusión pasiva a través de la membrana celular se bombea activamente hacia fuera, reduciendo los niveles intracelulares por debajo de su umbral letal. La línea de glioma C6, que muestra MDR inherente, sirvió como el sistema modelo para probar si el tratamiento con gagómeros que encapsulaba un fármaco quimioterapéutico ofrecería cualquier ventaja sobre un tratamiento similar con el fármaco libre.

25 Metodología

Las células se sembraron en placas de 96 pozos, y se inició el experimento en semiconfluencia, usualmente 24 horas después de la siembra. A las células se les suministró una dosis seleccionada del fármaco de elección, atrapado en una formulación de gagómero a la que se le lavó el exceso de fármaco no atrapado antes del uso. Los sistemas de control eran la misma dosis de fármaco libre y una dosis de gagómero libre de fármaco a una dosis similar a aquella del sistema de ensayo. La supervivencia celular se determinó 48 horas después del tratamiento, utilizando el ensayo MTT (Nutt y colaboradores, 2000, Larsen y colaboradores, 2000).

Resultados

Los resultados para tres fármacos quimioterapéuticos se muestran en la Figura 8 en tres conjuntos de datos. Los datos para el gagómero libre (la barra más a la izquierda en cada uno de los tres conjuntos de datos) es una confirmación adicional de los datos discutidos anteriormente con respecto a los gagómeros que no son tóxicos. Dependiendo del fármaco específico, con cada fármaco operando en su propio intervalo de dosis, puede observarse que incluso dosis relativamente altas de fármaco libre permiten que el 20-60% de las células sobreviva. Tales resultados, mostrados en la barra media de cada conjunto de datos, son típicos para la forma inherente de células resistentes a múltiples fármacos. El reemplazo del fármaco libre con la misma dosis de fármaco atrapado por gagómero generó una diferencia dramática, como puede verse en la barra más a la derecha de cada conjunto de datos. Para cada uno de los tres fármacos, la nueva formulación genera un aumento de 3 a 4 veces de muerte celular en comparación con el fármaco libre correspondiente. Dos hallazgos vinculan estrechamente esta respuesta mejorada en el tratamiento con la novedosa formulación de suministro de fármaco de la presente invención: la naturaleza no tóxica del gagómero libre y el aumento de muerte celular obtenido para tres fármacos diferentes que tienen un mecanismo citotóxico único.

Para superar la resistencia a múltiples fármacos, debe encontrarse un mecanismo para elevar las dosis intracelulares de un fármaco quimioterapéutico por encima del umbral letal. El enfoque tradicional adoptado en el intento de alcanzar esta elevación es reducir el bombeo utilizando agentes de inversión que también se conocen como quimiosensibilizadores. Aunque varios de estos agentes han sido identificados, el más prominente entre ellos verapamilo, ninguno de los quimiosensibilizadores disponibles actualmente puede ser utilizado clínicamente. Además, el tratamiento requiere una orquestación cuidadosa, ya que las dos entidades activas, el fármaco quimioterapéutico y los quimiosensibilizadores, deben alcanzar el objetivo juntos para ser eficaces. Esto no es un asunto sencillo en la práctica clínica.

Otra forma de elevar la dosis de fármaco intracelular es aumentar la afluencia, tanto en magnitud como en duración. Parece que el aumento sobresaliente en la respuesta al fármaco para los gagómeros de atrapamiento de fármacos de la presente invención funciona aumentando la afluencia. La naturaleza bioadhesiva de los gagómeros los posicionó como depósitos de fármacos unidos a la membrana celular. Esto aumentó tanto el gradiente electroquímico del fármaco a través de la membrana celular en comparación con el fármaco libre, así como el intervalo de tiempo durante el cual se produce la entrada del fármaco. Por lo tanto, el tratamiento sólo requiere una entidad, la composición fármaco-gagómero. Estas nuevas formulaciones también beneficiarán a los tumores no resistentes al permitir un tratamiento exitoso con dosis de fármaco significativamente más bajas.

Ejemplo 6: Interacción de microgagómeros con células

Se sabe que las células son impermeables a EtBr (bromuro de etidio), un marcador fluorescente sensible a ácido nucleico. Su emisión de fluorescencia se incrementa significativamente tras la unión a ADN y ARN, lo que permite determinar si un portador ha hecho que las células sean permeables a EtBr y, en particular, si ha alcanzado el núcleo.

Con el fin de examinar las interacciones de estos nuevos polímeros con células, se prepararon gagómeros que encapsulan EtBr, se determinaron las propiedades fisicoquímicas de estos gagómeros y después se incubaron los gagómeros con células. Los resultados fueron escaneados usando microscopía confocal.

Se ensayaron dos líneas celulares, C6, una línea celular de glioblastoma de rata, y PANC-1, una línea celular de adenocarcinoma pancreático humana. Para cada línea celular, se incubaron monocapas de las células con tres formulaciones diferentes: (1) EtBr libre, (2) gagómeros "vacíos" (es decir, solamente regulador de encapsulación) suspendidos en una solución de EtBr libre, y (3) Gagómeros que atrapan EtBr.

En todas las tres formulaciones, se utilizó EtBr a la misma concentración de 25 μ M. Los gagómeros en las formulaciones (2) y (3) estaban en la misma concentración, 0,25 mg/mL. Cada formulación se incubó con las células durante 60 minutos a temperatura ambiente, antes de la realización de la microscopía confocal. Los resultados se muestran en la Figura 2 para la línea celular C6 y en las Figuras 3 y 4 para la línea celular PANC-1.

Los resultados para la línea celular C6 se muestran en la Figura 2A. La sección superior izquierda muestra los resultados de las células incubadas con EtBr libre. Está claro que hay fluorescencia insignificante dentro de las células, como se espera para este marcador cuando está libre en solución. La sección superior derecha de la figura 2A es para las células incubadas con EtBr libre en una solución que tenía gagómeros vacíos suspendidos en él. Aquí se observa una fluorescencia despreciable, y su similitud con EtBr libre es una indicación clara de que las propias partículas no promueven la entrada de EtBr libre (no atrapado) en las células.

En contraste con estos dos controles, cuando el EtBr está atrapado dentro de la partícula, gana entrada en las células y en el nucléolo. Esto es claro a partir de la alta intensidad de fluorescencia de la parte inferior de la figura 2A y de su localización dentro de las células en el nucléolo (que interactúa con el ADN) y también en el citosol (que interactúa con el ARN). Estos hallazgos no se limitan a una línea celular específica, ya que se obtuvieron resultados similares también con la línea PANC-1.

En la Figura 3 se representan los resultados con las formulaciones (2) y (3) solas. Las diferencias importantes entre EtBr libre y atrapado por gagómero se muestran con mayor detalle en la Figura 4. La Figura 4A muestra una única célula incubada con EtBr libre. Sólo una cantidad despreciable del marcador ha entrado en la célula y alcanzado el nucléolo. Además, si hay cualquier EtBr en el citosol está por debajo del límite de detección. Por el contrario, como se muestra en la Figura 4B, cuando se incubó con EtBr atrapado por gagómero, cantidades sustanciales del marcador entran en la célula y se encuentran en el núcleo (unido al ADN) y en el citosol (unido al ARN).

Como todos los datos se obtuvieron usando la misma concentración de EtBr, parece claro que el atrapamiento dentro del polímero hizo la diferencia. En principio, hay tres mecanismos principales que pueden explicar un portador que facilita la entrada de su marcador sensible al ácido nucleico cargado en una célula de tal manera que le permite al marcador intracelular libre interactuar con ARN y también lograr la entrada en el nucléolo para interactuar con el ADN:

(1) Adsorción y difusión. Las partículas cargadas con marcador se adhieren a la membrana celular, creando depósitos locales. El marcador se difunde hacia fuera de las partículas adherentes y parte de este marcador liberado se difunde a través de la membrana celular, dentro de la célula.

(2) Fusión. El portador cargado con marcador se une primero a la membrana celular, después se fusiona con él y en el curso de la fusión, el material atrapado se libera en el citosol.

(3) Endocitosis y liberación. El portador cargado con marcador entra a la célula mediante una vía endocítica. El portador endocitado tiene éxito en la liberación de marcador en el citosol. En los tres mecanismos, una vez que el marcador está libre en el citosol, parte de esta combinación del marcador ahora intracelular encuentra su camino hacia el nucléolo.

El primer mecanismo puede ser eliminado debido a los datos fisicoquímicos que muestran que el flujo de salida del marcador atrapado es bastante lento. Con base en la constante de velocidad de flujo de salida (enumerada anteriormente en forma de semivida), se puede calcular que en el transcurso de los 50 minutos de incubación antes de la microscopía, el flujo de salida sería como máximo el 2% del marcador atrapado, correspondiente a EtBr 0,5 μM que se libera. Incluso si todo esto fuera a través de la membrana celular en la célula, el resultado habría sido aún más despreciable que el observado con la concentración 50 veces mayor (25 μM versus 0,5 μM) de EtBr libre (Figura 2A). Por el contrario, los resultados con el marcador atrapado en el portador muestran una entrada sustancialmente más alta, tal como la que no se podría obtener a través del mecanismo de "adsorción y difusión".

Independientemente de si el mecanismo de fusión o endocítico del tratamiento de las células cancerosas es el medio por el cual el marcador atrapado entra en la célula, está claro que este portador permite que las moléculas impermeables entren en la célula y en el nucléolo. Esta capacidad es un buen augurio para el desempeño de los

Ejemplo 7: Estudios de formulación

Propiedades de las partículas

Calibración de las partículas: Se calibraron las nano y micropartículas de la relación de bajo contenido de lípidos con respecto a los glicosaminoglicanos (LLG) y la relación de alto contenido de lípidos con respecto a los glicosaminoglicanos (HLG) usando un calibrador de partículas ALV-NIBS. Los resultados, enumerados en la Tabla 6, proporcionan datos cuantitativos completos y están de acuerdo con los datos de microscopía obtenidos previamente (EM, fluorescencia). Los dos tamaños se distinguen bien entre sí, y la dispersión relativamente baja dentro de cada sistema indica una buena eficacia del proceso de separación. Los datos también muestran que dentro de cada tipo de partícula, hay cierta flexibilidad en el diseño del tamaño de partícula mediante la manipulación de la relación lípido/HA.

Tabla 6

Distribución de tamaño de los sistemas DDS tau nano y micro		
Especificaciones de partícula		Diámetro de partícula (nm)
Tipo	Relación lípido/HA	
Nano	LLG	227 $\pm$ 37
	HLG	135 $\pm$ 41
Micro	LLG	1330 $\pm$ 225
	HLG	1150 $\pm$ 178

Potenciales Zeta: Se midieron los potenciales zeta de micro y nanopartículas, en función de la concentración de partículas. El potencial zeta o electrocinético representa el potencial a través de la capa difusa de iones que rodean cualquier partícula coloidal cargada, y es en gran parte responsable de la estabilidad coloidal. Los resultados típicos, mostrados en la Figura 9, demuestran que: (a) como se espera con base en la composición química de las partículas y las características estructurales de las partículas, los potenciales zeta son negativos; y (b) los patrones observados para la dependencia del potencial zeta en la concentración encajan con el patrón general observado en el campo para partículas cargadas negativamente.

Eficiencias de atrapamiento

Se investigaron dos formulaciones: insulina e interferón α , cada uno atrapado en formulaciones separadas en las micropartículas. Las eficiencias de atrapamiento obtenidas se muestran en la Tabla 7. Claramente, ambas proteínas nuevas son atrapadas con alta eficiencia, como se mostró anteriormente para otras macromoléculas (Tablas 4 y 5). La concentración de insulina fue de 10 mg/mL. En este intervalo esta proteína ya está agregada en dímeros y hexámeros, lo que significa que las entidades atrapadas eran mayores de 6000 Da. No se informaron niveles de encapsulación tan altos, a este nivel de dosis de insulina, para otros portadores en partículas.

Tabla 7

Eficiencias de encapsulación de proteínas terapéuticas en las nuevas DDS (micropartículas)		
Materia Encapsulada	Intervalo de PM (Da)	Eficiencia de Encapsulación (%)
Insulina (Recombinante humana)	6.000	86,9 $\pm$ 4,7
Interferón α (Recombinante humana)	19.000	72,5 $\pm$ 3,7

10 **Ejemplo 8:** Estudios *in vitro*

Ensayos de toxicidad en cultivos celulares

El ensayo de toxicidad del DDS libre se realizó de la siguiente manera: se incubaron células de una línea dada con concentraciones crecientes del DDS, que abarcan el intervalo de 0,01-5 mg/mL, durante 24 o 48 horas. Las células de control no fueron expuestas al DDS. Estos ensayos se realizaron con 8 líneas celulares diferentes, procedentes de humanos, ratas y ratones. La característica común de las ocho líneas celulares fue que tienen receptores para el ácido hialurónico. Los resultados similares a los de la dosis de DDS de 1 mg/mL, como se muestra en la Figura 10, se encontraban en todo el intervalo de concentración del DDS ensayado (es decir, 0,01-5 mg/mL). Los datos en la Figura 10 demuestran que sobre todas las dosis de DDS, períodos de incubación y líneas celulares este DDS no es tóxico para las células.

20 Transfección de genes

La capacidad del DDS para atrapar plásmidos con una afinidad excepcionalmente alta se reportó en las Tablas 4 y 5. El potencial de dicha formulación para transfectar células con un plásmido deseado que daría como resultado la expresión de la proteína codificada se ensayó *in vitro*.

Las líneas celulares ensayadas fueron PANC-1 y C6, ambas líneas celulares con receptores para ácido hialurónico. El gen informador era el que codificaba la proteína fluorescente verde (GFP). El DDS se comparó con dos vectores comercialmente disponibles que sirvieron como "puntos de referencia": Polyplex, un polímero catiónico, y lipofectamina, un liposoma catiónico. Los protocolos utilizados para los vectores comerciales fueron los recomendados por los fabricantes.

El plásmido fue atrapado en el DDS (micropartículas), y se dejó equilibrar durante 24 horas antes del uso. La concentración de ADN fue la misma para los tres vectores, 1,5 μ g/pozo. Las células se incubaron con las formulaciones del ADN del vector seleccionado en DMEM durante 5 horas; los pozos de control se incubaron durante el mismo periodo en DMEM solo. Al cabo de 5 horas, se añadió medio de crecimiento celular suplementado con suero a todos los pozos.

Las células se observaron bajo un microscopio fluorescente invertido a las 12 y 24 horas desde el inicio. Se contó el número total de células y el número de células fluorescentes en la muestra observada. Estos datos se usaron para calcular la eficiencia de la transfección, definida como el % de células fluorescentes de las células totales, en la muestra observada. El número total de células en una muestra observada fue de 200-400 células. La viabilidad celular se probó al final del experimento, 24 horas desde el inicio.

Los resultados obtenidos se enumeran en la Tabla 8. Las dosis utilizadas para los puntos de referencia fueron 2 mg/mL (como se recomienda en sus protocolos establecidos) y para el DDS se usaron 0,2 mg/mL, una dosis diez veces menor. La concentración de ADN fue la misma para los tres. A las 12 horas, el producto génico, GFP, se detectó con los vectores establecidos. Este hallazgo, aunque esperado, fue alentador ya que las líneas celulares ensayadas fueron las de interés terapéutico especial, pero no las líneas celulares clásicas (tales como COS 7) utilizadas en la transfección. Con el DDS, se requirieron 24 horas para la expresión de la proteína. Las eficiencias de transfección para cada uno de

los tres vectores, en ambas líneas celulares, también enumeradas en la tabla, muestran que el rendimiento del vector DDS funciona así como los puntos de referencia, a una décima parte de la dosis (0,2 mg/mL versus 2 mg/mL).

Tabla 8

Transfección génica <i>in vitro</i>					
Vector		Tiempo de detección (horas)	Eficiencia de la transfección a las 24 horas (%)		Viabilidad celular (% a partir del control no tratado)
Especies	mg/mL		PANC-1	C6	
Polyfect	2	12	18	20	<50
Lipofectamina	2	12	12	15	<50
DDS	0.2	24	19	19	100

- 5 Uno de los inconvenientes graves de vectores de transfección génica que son polímeros catiónicos o lípidos catiónicos es la toxicidad. Esto se observó para los dos vectores establecidos aquí, en cada línea celular, el nivel de células viables a las 24 horas era inferior al 50% en comparación con el control no tratado. Por el contrario, no hubo toxicidad con el vector DDS. La viabilidad celular se mantuvo tan alta como la de las células de control. Los datos de toxicidad reportados en la sección anterior sugieren que las dosis de DDS elevadas con respecto a aquellas de los vectores establecidos, 2 mg/mL, tampoco serían tóxicas.

Los datos apoyan claramente la aplicación potencial del nuevo DDS en terapia génica. Parece haber dos ventajas distintas sobre los vectores no virales competidores: (1) en dos líneas celulares diferentes era tan buena como los vectores establecidos a una concentración 10 veces menor para lograr el mismo nivel de expresión de la proteína, lo que sugiere que para concentraciones iguales de vectores el sistema DDS puede ser significativamente superior a sus competidores; y (2) en dos líneas celulares diferentes, no se produjo toxicidad con el sistema vectorial DDS, mientras que los otros dos vectores utilizados fueron bastante tóxicos.

Tratamiento de tumores MDR

En los estudios de cultivos celulares diseñados para evaluar la citotoxicidad de un portador objetivo de atrapamiento de fármacos, en comparación con la misma dosis de fármaco libre, el diseño experimental, y por lo tanto los resultados, suelen estar sesgados a favor del fármaco libre. Esto se debe a las condiciones estáticas versus dinámicas, respectivamente para las situaciones *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, el fármaco libre está en contacto continuo con las células durante la duración del experimento, usualmente 24 horas o más. *In vivo*, la duración del fármaco, administrado en forma libre, al sitio del tumor será mucho más corta, debido al tiempo limitado de administración y los procesos de eliminación naturales. El desempeño *in vitro* de una formulación de fármaco/portador (incluso un portador objetivo) puede no ser muy diferente de aquel del fármaco libre, en períodos de incubación de 24 horas o más. Por el contrario, *in vivo*, si el portador se adhiere al objetivo y permanece allí como un depósito de liberación sostenido, el suministro de fármaco al sitio del tumor puede ser mucho más alto (dosis y duración) que el fármaco libre, dando como resultado una citotoxicidad mejorada.

Con el fin de reducir el sesgo *in vitro* a favor del fármaco libre, se expusieron las células a las siguientes formulaciones de tratamiento: fármaco libre, fármaco atrapado en el DDS y DDS libre durante un período de sólo 4 horas. El medio de tratamiento se reemplazó entonces con medio de cultivo celular suplementado con suero, libre de cualquier fármaco o portador, y se determinó el número de células viables 20 horas más tarde (24 horas desde el inicio). Si una parte de la formulación portadora se adhiere a las células, debe permanecer allí como depósito a pesar del reemplazo del medio y alimentar continuamente las células con fármaco, mientras que las células que recibieron el fármaco libre no estarán expuestas a ningún fármaco más, una vez se reemplazó el medio.

Los resultados típicos que muestran el aumento de la muerte celular (en comparación con el control no tratado) en función de la formulación de tratamiento, se muestran en la Figura 11, para la línea celular C26. Esta es una línea inherente resistente a múltiples fármacos (MDR) procedente del carcinoma de colon de ratón. En la Figura 11A se muestran los resultados con el fármaco mitomicina C (MMC). Como se esperaba a partir de los estudios previos de toxicidad *in vitro* (Figura 2), el DDS libre (probado aquí con la dosis de 1 mg/mL) no era tóxico. Dos dosis de MMC libre, 30 y 50 µg/mL no fueron eficaces, dando como resultado porcentajes de muerte celular inferiores al 15%. Esta baja respuesta a dosis bastante altas es una manifestación de la naturaleza de MDR de estas células. Por el contrario,

- 5 cuando el tratamiento fue con las mismas dosis de fármaco pero atrapado en el DDS, murieron 80-100% de las células. Las diferencias en la respuesta para cada dosis de fármaco, mediadas por portador versus libres, son altamente significativas ($p < 0,001$). Resultados similares se muestran en la Figura 11B para otro fármaco, doxorubicina (DOX). El fármaco libre (cada especie de fármaco tiene un intervalo de dosis diferente) es ineficaz, mientras que las mismas dosis formuladas en el portador fueron altamente efectivas, generando también 80 - 100% de muerte celular. Se obtuvieron resultados comparables con otras dos líneas celulares, C6 y PANC-1. Las tres líneas probadas tienen receptores HA.

Ejemplo 9 Estudios *in vivo*

Estudios *in vivo* I: Quimioterapia tumoral

- 10 Se usaron ratones BALB/c hembra que tenían 8 semanas de edad al inicio del experimento. El modelo de tumor empleado fue células C-26 (originarias de carcinoma de colon de ratón) inyectadas subcutáneamente en la pata trasera derecha. El fármaco quimioterapéutico fue mitomicina C (MMC) libre, o atrapado en DDS, LLG, en forma de nanopartículas. La dosis de MMC fue de 2 mg/Kg de peso corporal, tanto en formulaciones libres como en DDS y la dosis de DDS fue de 1 mg/mL.

Diseño experimental para el ensayo 1

- 15 El experimento se realizó con 20 animales, divididos en 4 grupos, cada grupo de 5 ratones que recibieron un tratamiento específico como se muestra en la Tabla 9, a continuación.

Tabla 9

Grupos de animales	
Grupo #	Tratamiento
1	Solución salina

(continuación)

Grupos de animales	
Grupo #	Tratamiento
2	DDS libre
3	MMC libre
4	MMC/DDS

- 20 Para proporcionar el tumor, se cultivaron células C-26 en matraces de cultivo celular. El día cero, se recogieron las células, se lavaron varias veces, se contaron e inmediatamente se inyectaron. La dosis inyectada fue de 8×10^5 células en 30 μ l.

Los tratamientos se administraron los días 5, 12 y 19. La administración se realizó por inyección en la vena de la cola. Todos los volúmenes inyectados fueron de 0,1 ml.

- 25 Diseño experimental para el ensayo 2

El diseño experimental fue esencialmente similar al del ensayo 1, con los siguientes cambios:

a. Se elevó la dosis de fármaco hasta 5 mg/ml.

b. La dosis de inoculación tumoral fue de 8×10^5 células en 30 μ l.

- 30 c. El experimento se realizó con 2 grupos, uno de los cuales recibió DDS libre y el otro MMC / DDS, con 3 y 5 ratones por grupo, respectivamente.

d. El tratamiento se administró los días 14, 17, 20 y 23.

e. El tamaño del tumor al inicio del tratamiento fue 75 mm³.

Los parámetros medidos para el ensayo 1 fueron la retención en circulación, el inicio del tumor, el volumen tumoral, la supervivencia. Los parámetros medidos para el ensayo 2 fueron supervivencia.

5 Los resultados para el ensayo 1: Retención en circulación

10 El sistema reticuloendotelial (RES) como parte de sus procesos fisiológicos normales, opera para eliminar rápidamente la materia en partículas foránea de la circulación. A menos que el objetivo de un vehículo en partículas administrado en forma intravenosa (i.v.) esté dentro del RES, esta eliminación es un problema importante para todos los vehículos en partículas administrados en forma i.v., ya que reduce la probabilidad de que una dosis suficiente alcance su objetivo pretendido de una manera eficaz. Este problema no es específico para el tratamiento de tumores. Es general para cualquier situación patológica que requiera administración i.v..

15 A través de estudios extensos, de los medios para bloquear este proceso, permitiendo por lo tanto la circulación a largo plazo de material en partículas, se resumen en la siguiente combinación: la partícula debe ser pequeña y debe tener una capa hidrofílica, usualmente debido a una abundancia de residuos de hidroxilo. Los portadores de partículas del tipo esfera, elaborados a escala nanométrica (nanoesferas), están recubiertos generalmente por polímeros tales como poloxomar o poloxamina. Liposomas pequeños usualmente portan polietilenglicol (PEG) en su superficie, y vienen bajo nombres tales como "liposomas ocultos", "liposomas PEGilados" y "liposomas estabilizados estéricamente".

20 Tras comenzar la invención y el desarrollo del presente DDS, se planteó la hipótesis de que debido a que el ácido hialurónico es su componente principal, la superficie de la partícula será rica en residuos de hidroxilo que le proporcionarán una capacidad intrínseca de retención prolongada en circulación y con capacidad de direccionamiento. Éstas serían ventajas distintas sobre los portadoras competitivos, ya que tanto las propiedades de direccionamiento como las "ocultas" ya están incorporadas.

25 En períodos seleccionados después de la inyección, los animales que recibieron las formulaciones que contenían fármacos fueron sangrados y las muestras se trataron de acuerdo con los protocolos establecidos. La concentración de MMC se determinó por ensayo de HPLC. Los resultados típicos de la retención en circulación, comparando MMC libre con MMC atrapado en el portador (MMC/DDS) se muestran en la Figura 12. Los datos muestran que la MMC libre desaparece muy rápidamente de circulación, mientras que la MMC administrada en el portador circula durante un período mucho más largo de tiempo. Este hallazgo se reprodujo de una inyección a otra, y el fármaco se encontró en circulación cuando se administra a través del portador hasta 72 horas después de la inyección. La rápida desaparición del fármaco libre indica que la MMC encontrada en la circulación de los animales que recibieron la formulación MMC/DDS está en el portador. Estos resultados confirman la hipótesis, discutida anteriormente, que estos DDS tienen capacidad intrínseca de "ocultamiento". Como se indicó anteriormente, esto tiene implicaciones positivas más allá de la patología específica probada aquí.

Los resultados para el ensayo 1: Inicio del tumor y volumen tumoral

35 Los resultados del aumento del volumen tumoral, para los 4 grupos, se muestran en la Figura 13, junto con el día normal en el que se detectaron los tumores por primera vez. En todos los animales que recibieron solamente solución salina, se detectó un tumor el día 7 y aumentó rápida y exponencialmente. El tumor se detectó el día 7 en todos los animales que recibieron fármaco libre también. El aumento en el volumen tumoral, a pesar de recibir 3 dosis de un fármaco quimioterapéutico, no fue muy diferente al del grupo con solución salina. Esto indica que la naturaleza de la MDR de esta línea celular previamente observada *in vitro* (Figura 3) también persiste *in vivo*. Sorprendentemente, el tratamiento con DDS libre fue mejor que la solución salina y el fármaco libre. El día normal de aparición del tumor fue el día 9 (versus 7), y la velocidad de crecimiento tumoral fue claramente más lenta. Los tumores también fueron significativamente más pequeños comparados con los grupos de solución salina y fármaco libre.

45 El desempeño del DDS libre *in vivo* es muy diferente del observado *in vitro*. El ácido hialurónico es uno de los componentes clave de la matriz extracelular (ECM) y se sabe que las células tumorales que tienen receptores para HA hacen uso de esto. A través de la interacción de sus receptores de HA con el HA en la ECM, las células tumorales pueden utilizar la ECM como plataforma en el transcurso del avance del tumor. El bloqueo de los receptores puede, por lo tanto, retrasar el avance del tumor. Esto podría ser un importante mecanismo responsable de los resultados obtenidos con DDS libre, donde el portador se une a los receptores de HA y es capaz de bloquearlos. Otros mecanismos potenciales, no mutuamente excluyentes, son el desempeño del DDS libre como un factor antiangiogénico o como un refuerzo general para los mecanismos de defensa del huésped. Se hará seguimiento a los mecanismos responsables de este efecto positivo del DDS mismo con el fin de comprender estos fenómenos y aprender a explotarlos para obtener mejores resultados terapéuticos. Independientemente de sus orígenes, esta es una ventaja adicional positiva de este DDS, que no se anticipó sobre la base de los datos *in vitro*.

- Los mejores resultados se obtuvieron con el fármaco atrapado en el portador. Como se observa en la Figura 13, el tumor se detectó por primera vez alrededor del día 17, mucho más tarde que en los grupos tratados con DDS libre, fármaco libre o solución salina. La tasa de crecimiento tumoral fue más lenta y los tumores fueron más pequeños, de todos los grupos evaluados. Tal vez esto se debe al direccionamiento intrínseco de este DDS en donde la fracción que alcanzó el tumor permaneció allí, actuando como depósito de fármacos y posiblemente combinando el efecto de citotoxicidad del fármaco y el efecto portador observado con el DDS libre. Los resultados *in vitro* que mostraron que esta formulación, a diferencia del fármaco libre, era capaz de matar células MDR, se repitieron y se confirmaron también en el caso *in vivo*.

Resultados del Ensayo 1: Supervivencia

- Se hizo seguimiento a la supervivencia de los animales durante más de 90 días hasta que murió el último animal. Los resultados se muestran en la Figura 14.

Todos los animales de los grupos que recibieron solución salina murieron entre los días 29 y 31 y los que recibieron fármaco libre murieron entre los días 31 y 33. Los animales que recibieron el DDS libre sobrevivieron dos veces más que los grupos de solución salina y fármaco libre, que murieron entre los días 59 y 66.

- Esta larga supervivencia tiene dos implicaciones críticas. La primera es que este DDS no toxicidad *in vivo* como se mostró previamente *in vitro*. El peso de la evidencia *in vivo* es mucho más significativo en sus implicaciones para todas las aplicaciones de esta tecnología. La segunda implicación es que, al mismo tiempo que el efecto sobre el desarrollo y el tamaño del tumor (Figura 13), el portador libre por sí mismo tiene un efecto terapéutico beneficioso en los animales portadores de tumores.
- La supervivencia más larga, 3 veces mas larga que para los grupos con solución salina y fármaco libre, fue observada para los animales que recibieron el tratamiento completo, el fármaco atrapado en el DDS. El último animal murió el día 94. Esta es una supervivencia excepcionalmente larga para ratones con tumores, especialmente en un caso de MDR, e indica la superioridad de esta tecnología de suministro de fármacos en comparación con sus competidores.

Resultados del Ensayo 2: Supervivencia

- Aún se continuo haciendo seguimiento a la supervivencia de los animales el día 91 del experimento, y los resultados se muestran en la Figura 15. Los tres animales portadores de tumores tratados con el DDS libre fueron los de mayor supervivencia, hasta 69 días. Los cinco animales portadores de tumores tratados con la formulación MMC/DDS obtuvieron mejores resultados, ya que a los 91 días después de la inoculación del tumor todos los animales estaban vivos.
- La tendencia de estos datos es similar a la obtenida en el ensayo 1, mostrando que las respuestas excepcionales al nuevo DDS son reproducibles. Hubo dos grandes diferencias entre los dos experimentos. En primer lugar, en el ensayo 2 el tratamiento se inició después de que el tumor se desarrolló (véase el diseño experimental anterior), lo que lo convierte en una situación terapéutica más desafiante en comparación con el ensayo 1. En segundo lugar, en el ensayo 2 los animales recibieron una dosis de fármaco acumulativa más alta. Hubo 4 inyecciones (frente a 3 en el ensayo 1) y la dosis fue 2,5 veces mayor (5 frente a 2 mg/mL).

La tendencia positiva que estas diferencias inducen indica un potencial para generar respuestas aún mejores con el nuevo DDS. Los modelos más desafiantes, pero también más realistas, en los que el tumor crece hasta el intervalo de tamaño de 100-150 mm³, antes de iniciar el tratamiento pueden ser susceptibles al nuevo enfoque DDS.

Ejemplo 10: Estudios *in vivo* II: Suministro intranasal al cerebro

- El tratamiento de enfermedades neurodegenerativas requiere la administración de fármacos al cerebro, ya sea cruzando un BBB intacto u omitiéndolo. Se llevaron a cabo dos experimentos, uno en ratas y el otro en ratones, para evaluar la capacidad del nuevo DDS de la presente invención para administrar fármacos al cerebro, evitando el BBB a través de administración intranasal (IN).

- El experimento 1 comprendía un experimento con ratas. Se utilizaron ratas pigmentadas sanas. El DDS fue LLG, en forma de nano partículas y el marcador fue MMC. El sistema de ensayo fue el marcador formulado en el nuevo DDS. La dosis administrada fue de 5 mg/kg de peso corporal, en formulaciones libres y DDS, 300 µL/animal. La dosis de DDS fue de 1 mg/mL.

- El experimento se llevó a cabo con 4 animales, divididos en dos pares. Un par recibió el marcador libre, en forma intranasal (IN), en la fosa nasal derecha. El otro par recibió la formulación de marcador/DDS, IN, en la fosa nasal derecha. La administración fue lenta, durante varios minutos, utilizando una jeringa adecuada sin aguja.

A las 6 horas después de la administración, se sacrificaron los animales y se retiraron los cerebros. Cada cerebro se embebió en 10 ml de PBS durante una hora, para desorber ligeramente el marcador adherido, después de lo cual se homogenizaron los cerebros. El marcador se ensayó en el lavado y en los homogeneizados de cerebro, usando un ensayo de HPLC.

5 Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16, en donde la acumulación de marcadores se presenta como % de la dosis administrada. Aunque sólo había 2 animales por grupo de tratamiento, el acuerdo dentro de cada grupo era lo suficientemente bueno para permitir el promedio. El promedio y la desviación estándar para cada par, en el lavado y en el homogeneizado de cerebro, se enumeran por encima de las barras pertinentes.

10 Centrándose en el homogeneizado cerebral, la acumulación de marcador en el cerebro cuando se administró en forma libre fue despreciable, en el orden usualmente observado con moléculas pequeñas libres, como era de esperarse. Por el contrario, cuando se administró en la forma de DDS, hubo una acumulación sustancial del marcador en el cerebro, cercana al 10% de la dosis administrada. Este es un valor elevado por sí mismo (80 veces más alto que el fármaco libre), especialmente si esto también se puede lograr con fármacos de interés. Estos resultados indican el alto potencial que esta nuevo DDS tiene para las condiciones patológicas que requieren la administración de fármacos al cerebro.

15 El experimento 2 comprendía un experimento con ratones. Los animales utilizados fueron ratones C57BL/6 sanos. El DDS era LLG en forma de nanopartículas. El marcador era MMC; el sistema de ensayo era el marcador formulado en el nuevo DDS. La dosis administrada fue de 5 mg/kg de peso corporal, tanto en formulaciones libres como en DDS, 150 µL/animal. La dosis de DDS fue de 1 mg/mL.

20 El experimento se llevó a cabo con 4 animales, divididos en dos pares. Un par recibió el marcador libre, IN, en la fosa nasal derecha. El otro par recibió la formulación marcador/DDS, IN, en la fosa nasal derecha. La administración fue lenta, durante varios minutos, usando una jeringa apropiada.

A las 6 horas después de la administración, los animales se perfundieron a través del corazón, después de lo cual fueron sacrificados. Se retiraron los cerebros, se homogeneizaron y se determinó la concentración del marcador, como en el ensayo 1.

25 Los cerebros, después de la perfusión, estaban limpios. Los resultados obtenidos, expresados como % de la dosis administrada, se muestran en la Figura 17. Los datos se reportan por animal debido a la variabilidad de un animal a otro. A pesar de la variabilidad, los resultados son bastante claros: se produjo una acumulación insignificante de marcador cuando se administró en forma libre y una acumulación significativa cuando se administró en la forma de DDS. Como en el caso de las ratas, la acumulación encontrada cuando el marcador se administró en el portador constituye un hallazgo positivo en y por sí mismo y es 600 - 2.500 veces mayor que cuando el marcador se administró en forma libre. Estos resultados muestran que el potencial de esta tecnología de suministro de fármacos para administrar fármacos al cerebro en una forma de administración no invasiva no se limita a una única especie animal.

Ejemplo 11: Estudio en animales que prueba al nuevo DDS en el tratamiento de tumores resistentes a fármacos en ratones: Un modelo de metástasis tumoral

35 El objetivo en el presente estudio fue evaluar el nuevo DDS en un modelo de metástasis tumoral. Similar al estudio anterior usando ratones y la línea celular C-26 MDR inherente, este estudio también implica una línea celular MDR inherente, B16F10, de melanoma de ratón. El protocolo específico implementado se establece en el campo y está diseñado para inducir metástasis en los pulmones.

40 Se usaron ratones hembra C57BL/6, que tenían 12 semanas de edad al inicio del experimento. El modelo de tumor fue B16F10, células inyectadas en forma i.v. El fármaco quimioterapéutico empleado fue mitomicina C (MMC). El sistema DDS era LLG en forma de nanopartículas. El sistema de ensayo se formuló con MMC en el nuevo DDS de la presente invención, denominado MMC/DDS. La dosis de MMC inyectada fue de 5 mg/Kg de peso corporal y la dosis de DDS fue de 1 mg/mL.

45 El experimento se realizó con 25 animales, divididos en 5 grupos, cada grupo de 5 ratones que recibieron un tratamiento específico como se muestra en la Tabla 10. El Grupo 1 es un grupo de control de ratones sanos que no fueron inoculados con células tumorales.

Tabla 10

Grupos de animales					
Grupo #	1		3	4	5

Tratamiento	Ninguno	Solución salina	MMC libre	DDS libre	MMC/DDS
-------------	---------	-----------------	-----------	-----------	---------

Se cultivaron células B16F10 en matraces de cultivo celular. El día cero, se recogieron las células, se lavaron varias veces, se contaron e inmediatamente se inyectaron a los grupos 2 a 5. La dosis inyectada fue de 5×10^5 células en 50 μ l de PBS.

- 5 Los tratamientos se administraron los días 1, 5 y 9. La administración se realizó mediante inyección en la vena de la cola. Todos los volúmenes inyectados fueron de 0,1 mL. El experimento se terminó 21 días después de la inoculación del tumor. Los animales fueron sacrificados y los pulmones fueron extraídos, pesados y fijados en solución de Bouin. Se calculó el aumento de peso de los pulmones usando la siguiente fórmula:

Aumento de peso del pulmón% = $100 \times (\text{peso del pulmón con tumor} - \text{peso del pulmón normal}) / \text{peso del pulmón normal}$

- 10 La metástasis superficial fue contada por un experto utilizando un microscopio de disección. Los códigos de muestra no eran conocidos de tal manera que el experto no conociera el tratamiento recibido por cada animal.

- 15 La evaluación cuantitativa de metástasis en los pulmones puede realizarse mediante dos mediciones independientes: el recuento real de la metástasis en los pulmones extirpados y correctamente fijados; y/o la medición del aumento en el peso de los pulmones debido a la metástasis en los animales inyectados con células tumorales. Ambas técnicas fueron implementadas en el presente estudio.

El número de metástasis encontrado en los grupos 1 a 5 se muestra en la Figura 18.

- 20 Como era de esperar, no hubo metástasis en los pulmones de los animales de control que no recibieron ninguna célula tumoral. Todos los demás grupos que recibieron las células B16F10 inyectadas en forma i.v. desarrollaron metástasis pulmonar. La situación metastásica más agresiva se desarrolló en los animales que recibieron solución salina o fármaco libre. Como puede verse, no existe diferencia estadística entre estos grupos, lo que indica que la naturaleza inherente de MDR de estas células se expresa también *in vivo*.

Se observa que el tratamiento con el DDS libre genera una disminución de 6 veces en el número de metástasis en comparación con la solución salina, y el tratamiento con la formulación de ensayo generó una reducción mucho mayor, del orden de 17 veces.

- 25 En los cuatro grupos inyectados con tumores, el peso de los pulmones aumentó en comparación con el de los animales normales (el grupo de control). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 19.

- 30 El mayor incremento en el peso de los pulmones, cerca del 400%, se observó en los animales que no recibieron ningún tratamiento (el grupo salino), y el grupo que recibió tratamiento con fármaco libre fue casi el mismo. El aumento en el peso del pulmón fue menor que sin tratamiento y con fármaco libre para los animales que recibieron el DDS libre, pero hubo un doble aumento en el peso de los pulmones en comparación con el grupo de control de animales sanos. La mejor respuesta, tanto en términos relativos (en comparación con los otros grupos) como en términos absolutos (en comparación con animales sanos), se observó con la formulación de ensayo de la MMC atrapada en el DDS. El aumento porcentual en comparación con los animales sanos fue del orden del 10%, lo cual no es estadísticamente significativo, lo que indica el potencial de esta formulación para abolir la metástasis pulmonar.

- 35 Debido a que las metástasis pulmonares son responsables del aumento del peso del pulmón, debe haber una correlación razonable entre los dos parámetros medidos independientemente. Este fue el caso, como se observa claramente en la Figura 20, donde los datos (promedios solamente) de las Figuras 18 y 19 fueron graficados nuevamente juntos. La Figura 20 también demuestra el desempeño claramente superior de la formulación de prueba en una de las tareas más desafiantes del tratamiento de tumores, que consiste en suprimir las metástasis de un tumor MDR.

Hasta la fecha, se ha estudiado el comportamiento del nuevo DDS como portador para fármacos quimioterapéuticos en dos modelos animales independientes. Uno es un tumor sólido y el otro es metástasis pulmonar. En ambos modelos, se encontró que las células tumorales inyectadas en los animales, de las líneas celulares C-26 y B16F10, se manifiestan en la naturaleza de la MDR *in vivo* que fue previamente observada *in vitro*.

- 45 En ambos modelos, el tratamiento con el DDS libre mismo muestra una mejor respuesta clínica que el fármaco libre. Sin embargo, en ambos modelos la mejor respuesta clínica se observa con la formulación de ensayo del nuevo DDS que atrapa un fármaco quimioterapéutico. Esto indica el alto potencial para este nuevo sistema en uso clínico.

Ejemplo 12: Entrada de BSA-FITC en células MCF-7

Se utilizó albúmina de suero bovino marcada con el marcador fluorescente FITC (BSA-FITC) en forma libre y atrapada en el DDS para determinar si el DDS también puede inducir la entrada de macromoléculas grandes en las células. Se incubó la BSA-FITC atrapada en DDS y libre a 25°C durante 60 minutos con monocapas confluentes de células MCF7 (originarias de carcinoma de mama humano). Se ha reportado que las células MCF-7 tienen dos receptores conocidos para el ácido hialurónico, ICAM-1 y CD44. Los sistemas de proteína/DDS se limpiaron de la proteína libre. La proteína libre y la proteína atrapada estaban a la misma concentración: 3,3 mg/mL. Al final de la incubación se observaron las células por medio de microscopía confocal.

Los resultados mostrados en los dos paneles superiores de la Figura 21, son para proteína libre. Algunas de las proteínas ganaron entrada en la célula, e incluso puede observarse unidas a la envoltura nuclear, pero no dentro del núcleo. Se sabe que la BSA se une no específicamente a las células y puede haber ganado entrada a través de receptores no específicos o a través de pinocitosis.

Los resultados en los dos paneles inferiores de la Figura 21 son para el BSA-FITC atrapado en DDS. La entrada de proteínas en las células es considerablemente mayor que para la proteína libre, y la proteína también ha ganado la entrada en el núcleo. Como en el caso del EtBr atrapado (Figuras 2-4), el mecanismo exacto por el cual esto ocurrió aún no se entiende completamente. Sin embargo, la probabilidad de que el DDS con proteína sea absorbida por la endocitosis mediada por el receptor es aún mayor para la proteína grande que para el EtBr pequeño.

La descripción anterior de las realizaciones específicas revelará tan completamente la naturaleza general de la invención que otros pueden, mediante la aplicación del conocimiento actual, modificar fácilmente y/o adaptar para diversas aplicaciones tales realizaciones específicas sin apartarse del concepto genérico y, por lo tanto, tales adopciones y modificaciones deben y están destinadas a estar comprendidas dentro del significado e intervalo de equivalentes de las realizaciones divulgadas. Debe entenderse que la fraseología o terminología empleada aquí tiene el propósito de descripción y no de limitación.

Referencias

Balazs y colaboradores, "Cross-linked gels of hyaluronic acid and products containing such gels", patente estadounidense No. 4.582.865, promulgada el 15 de abril de 1986.

Bangham AD, "Liposomes: the Babraham connection", Chem Phys Lipids 64(1-3): 275-285 (1993).

Benita y colaboradores, "Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization", J Pharm Sci 82(11): 1069-1079 (1993).

Gottesman y colaboradores, "Genetic analysis of the multidrug transporter", Annu Rev Genet 29: 607-649 (1995).

Gref y colaboradores, "Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres", Science 263(5153): 1600-1603 (1994).

Larsen y colaboradores, "Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents", Pharmacol Ther 85(3): 217-29 (2000).

Margalit y colaboradores, J Controlled Release 17: 285-296 (1991).

Nutt y colaboradores, "Differential expression of drug resistance genes and chemosensitivity in glial cell lineages correlate with differential response of oligodendrogliomas and astrocytomas to chemotherapy", Cancer Res 60(17): 4812-4818 (2000).

Van den Hoogen y colaboradores, "A microtiter plate assay for the determination of uronic acids", Anal Biochem 257(2): 107-111 (1998).

Wolff y colaboradores, "Chemosensitivity of glioma cells in vitro: a meta analysis", J Cancer Res Clin Oncol 125(8-9): 481-486 (1999).

Wu y colaboradores, "In vivo versus in vitro degradation of controlled release polymers for intracranial surgical therapy" J Biomed Mater Res 28(3): 387-395 (1994).

REIVINDICACIONES

1. Portador de glicosaminoglicano lipidado en partículas en forma de una esfera con la porción de glicosaminoglicano de la partícula formando una cubierta en el exterior y la porción lipídica del portador formando el interior, no siendo dicho portador un liposoma, comprendiendo dicho portador al producto de reacción de al menos un glicosaminoglicano con fosfatidiletanolamina, en donde la relación de la fosfatidiletanolamina con respecto a al menos un glicosaminoglicano está en el intervalo de 1:1 p/p o en el intervalo de 5:1 a 20:1 p/p, y en donde el glicosaminoglicano es ácido hialurónico que tiene un peso molecular de aproximadamente 1×10^5 hasta aproximadamente 1×10^7 daltons.
2. Portador de glicosaminoglicano lipidado en partículas de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tamaño de partícula está en el intervalo de aproximadamente 2-5 micrones o de aproximadamente 50-200 nanómetros.
3. Portador de glicosaminoglicano lipidado en partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde un ingrediente activo está encapsulado dentro del portador, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en agentes antiinfecciosos, agentes quimioterapéuticos, proteínas, hormonas, enzimas, células y ácidos nucleicos, lo más preferiblemente un ácido nucleico o un agente quimioterapéutico para tratamiento de cáncer.
4. Método para preparar al portador de glicosaminoglicano lipidado en partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la reacción de al menos un glicosaminoglicano con fosfatidiletanolamina para entrecruzar un residuo carboxílico del glicosaminoglicano con el grupo amino primario de la fosfatidiletanolamina.
5. Procedimiento para elaborar al portador de glicosaminoglicano lipidado en partículas de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende las etapas de: proporcionar el portador de glicosaminoglicano lipidado en partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, liofilizar el portador de glicosaminoglicano, reconstituir el portador de glicosaminoglicano liofilizado en agua y añadir un ingrediente activo en polvo, por lo que el ingrediente activo queda atrapado dentro del portador de glicosaminoglicano lipidado.
6. Uso de un portador de glicosaminoglicano lipidado en partículas libre de fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 en la preparación de un medicamento contra el cáncer.
7. Uso de un agente bioactivo encapsulado en un portador de glicosaminoglicano lipidado en partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 en la preparación de un medicamento contra una condición patológica, en donde la condición patológica se selecciona del grupo que consiste en cáncer, infecciones bacterianas, Infecciones fúngicas, infecciones virales, infecciones parasitarias e infecciones por priones.
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en donde la condición patológica es cáncer y, si está presente, dicho agente bioactivo es un fármaco contra el cáncer.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde dicho cáncer es un cáncer del sistema nervioso central de un animal, en particular un glioma o un cáncer metastásico.
10. Portador de glicosaminoglicano lipidado en partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que encapsula un marcador utilizado en formación de imágenes, siendo preferiblemente el marcador una molécula fluorescente o un isótopo radiactivo, elegido preferiblemente del grupo que consiste en ^{99}Tc , ^{127}I , y ^{67}Gd .
11. Uso de un portador de glicosaminoglicano lipidado en partículas de acuerdo con la reivindicación 10 para la preparación de un agente de diagnóstico adecuado para ser administrado a un paciente que requiera del mismo.
12. Uso de un portador de glicosaminoglicano lipidado en partículas de acuerdo con la reivindicación 3, en donde los ácidos nucleicos se encapsulan para la preparación de un medicamento para suministro génico y expresión de corto plazo de ácidos nucleicos.
13. Andamiaje para modificación genética de tejidos, que comprende al portador de glicosaminoglicano lipidado en partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que encapsula células enteras y/o líneas celulares.

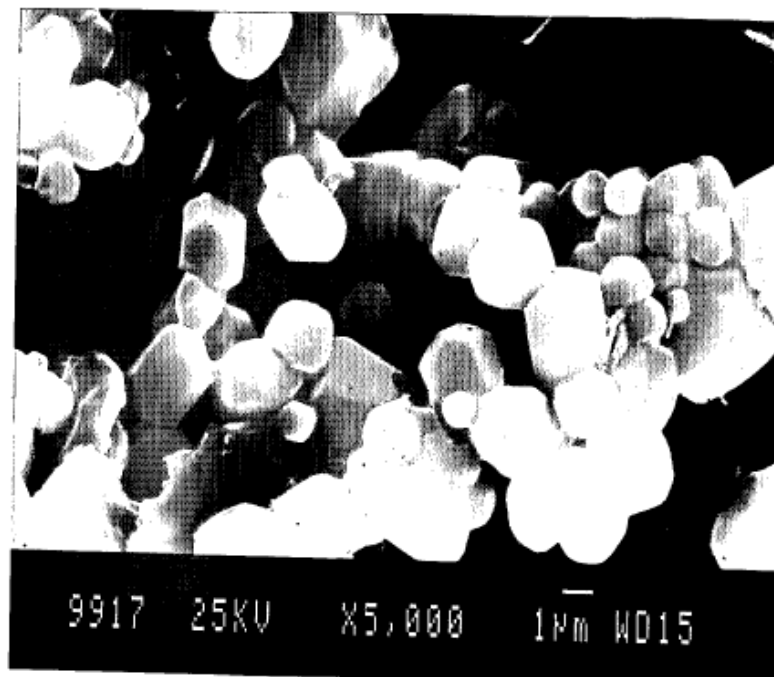


FIG. 1A

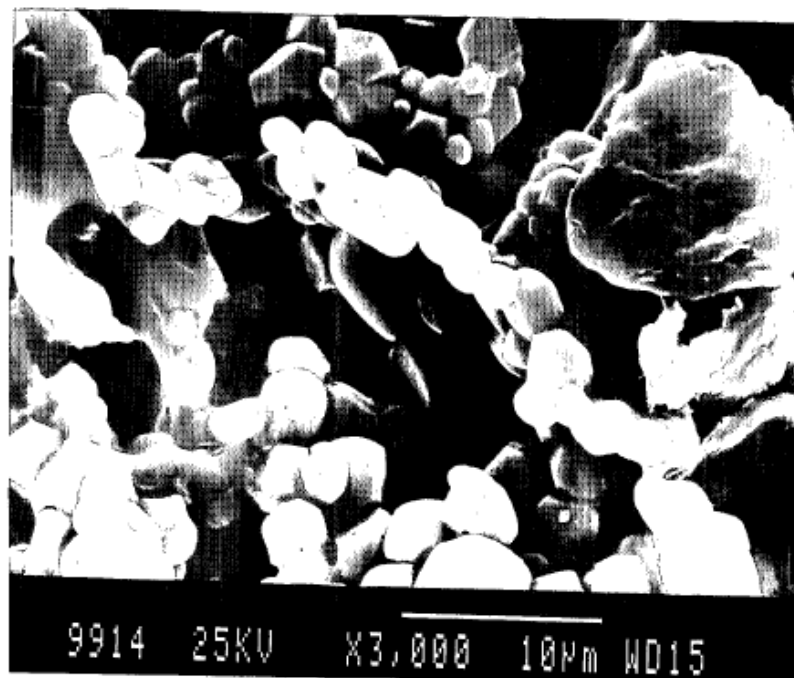


FIG. 1B

FIG.2A

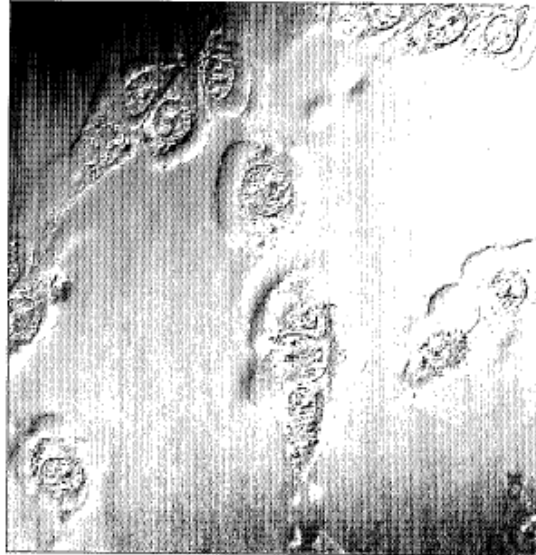
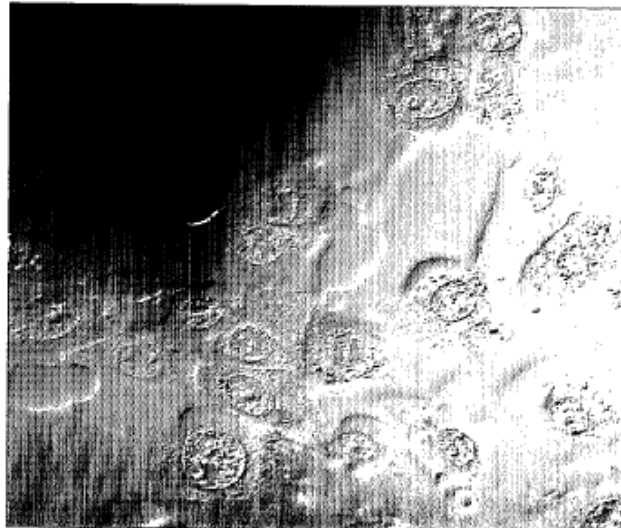


FIG.2B



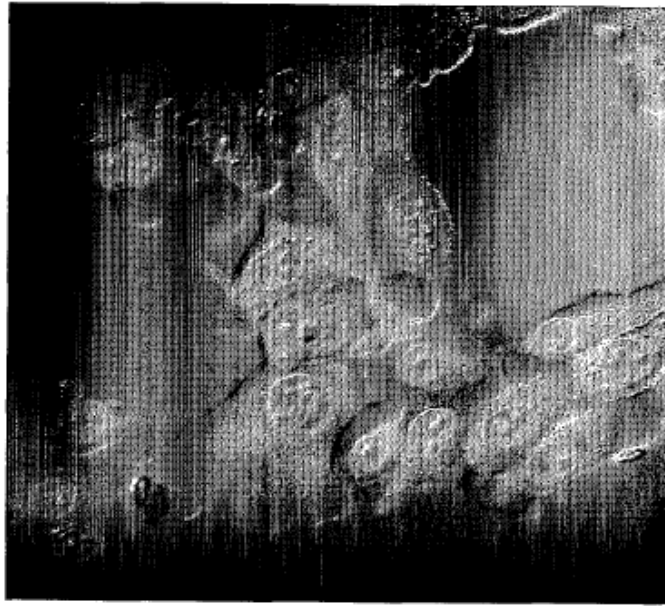


FIG.2C

FIG.3A

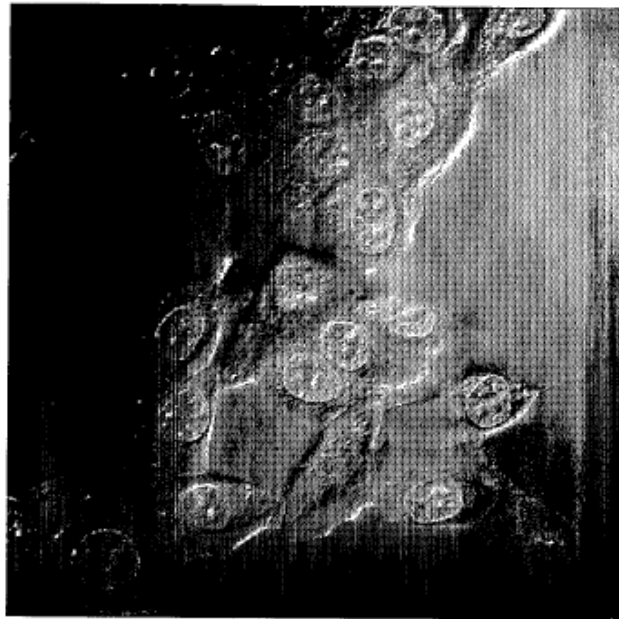


FIG.3B

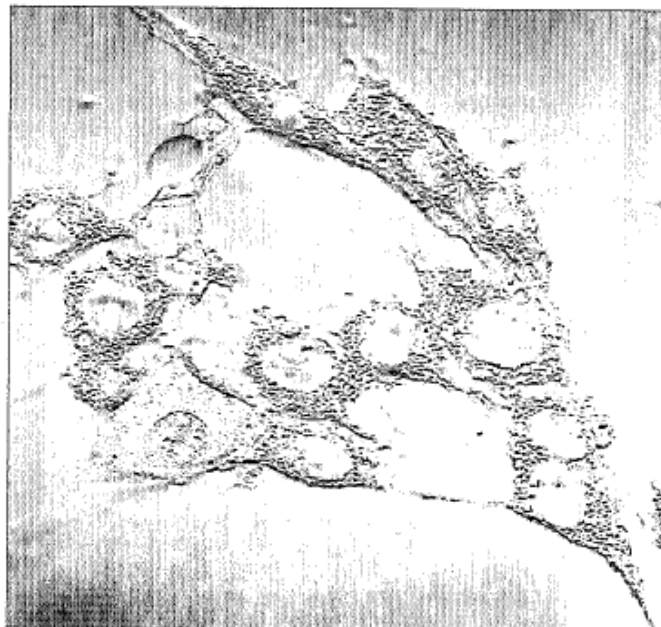


FIG. 4A

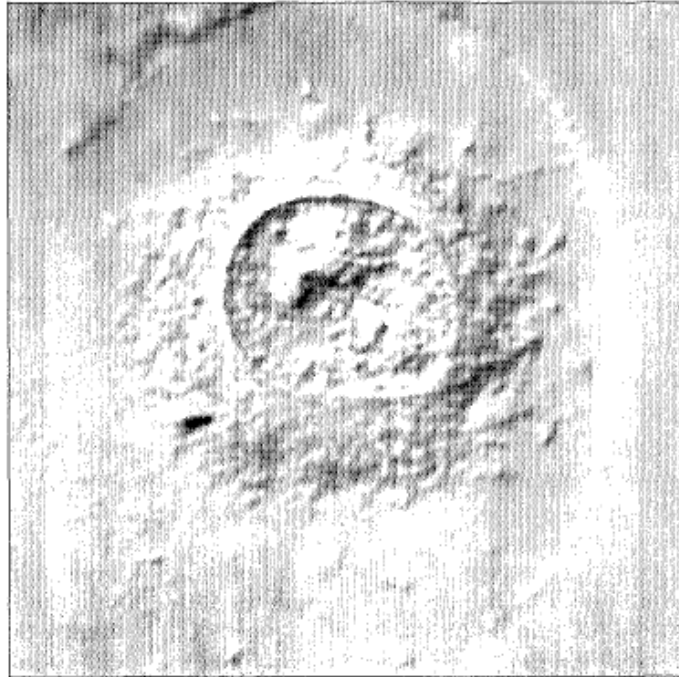


FIG. 4B

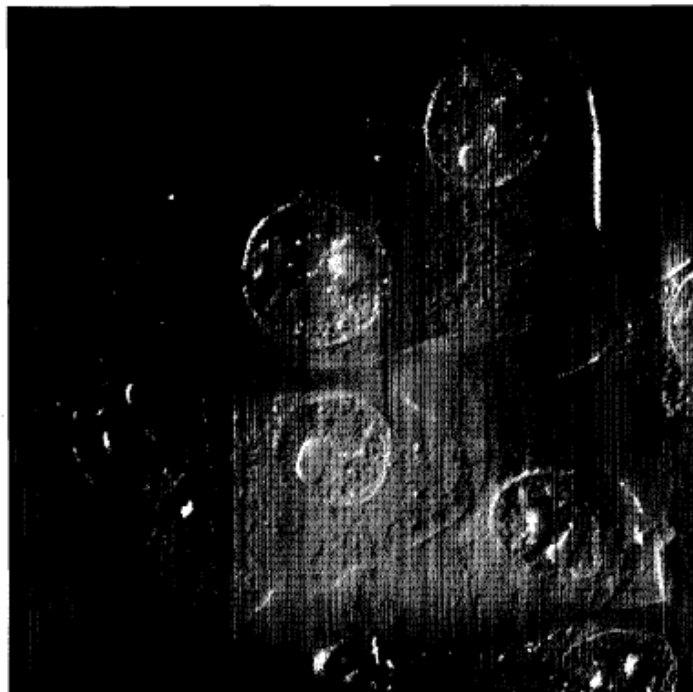


FIG. 5

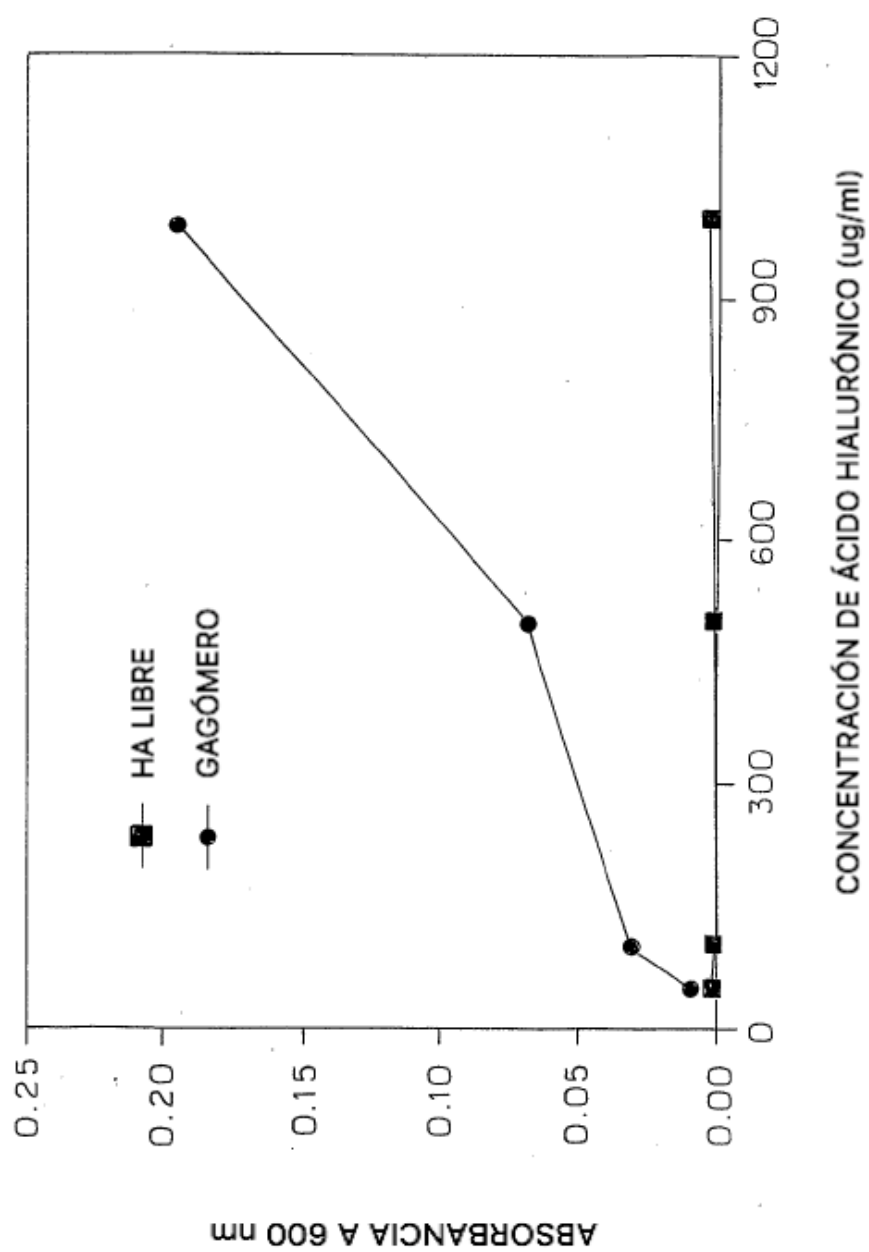


FIG. 6B

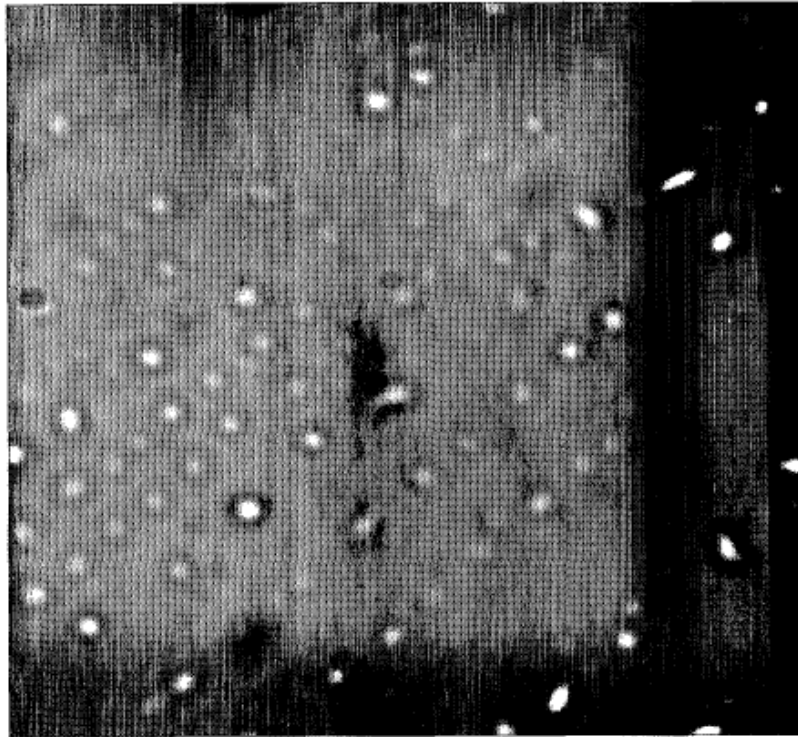


FIG. 6A

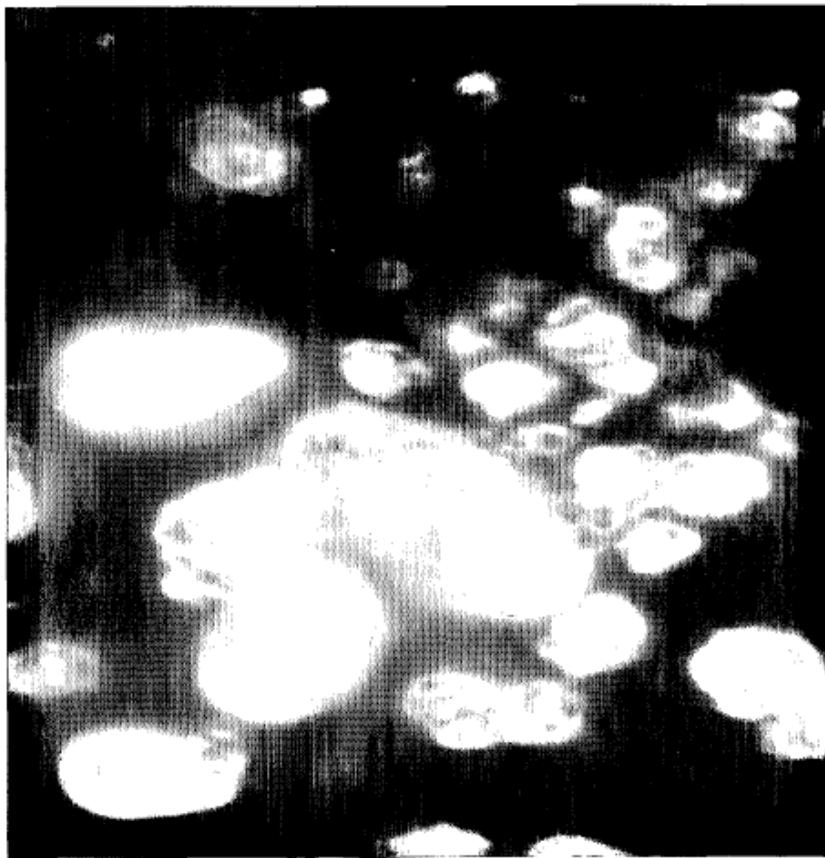


FIG. 7

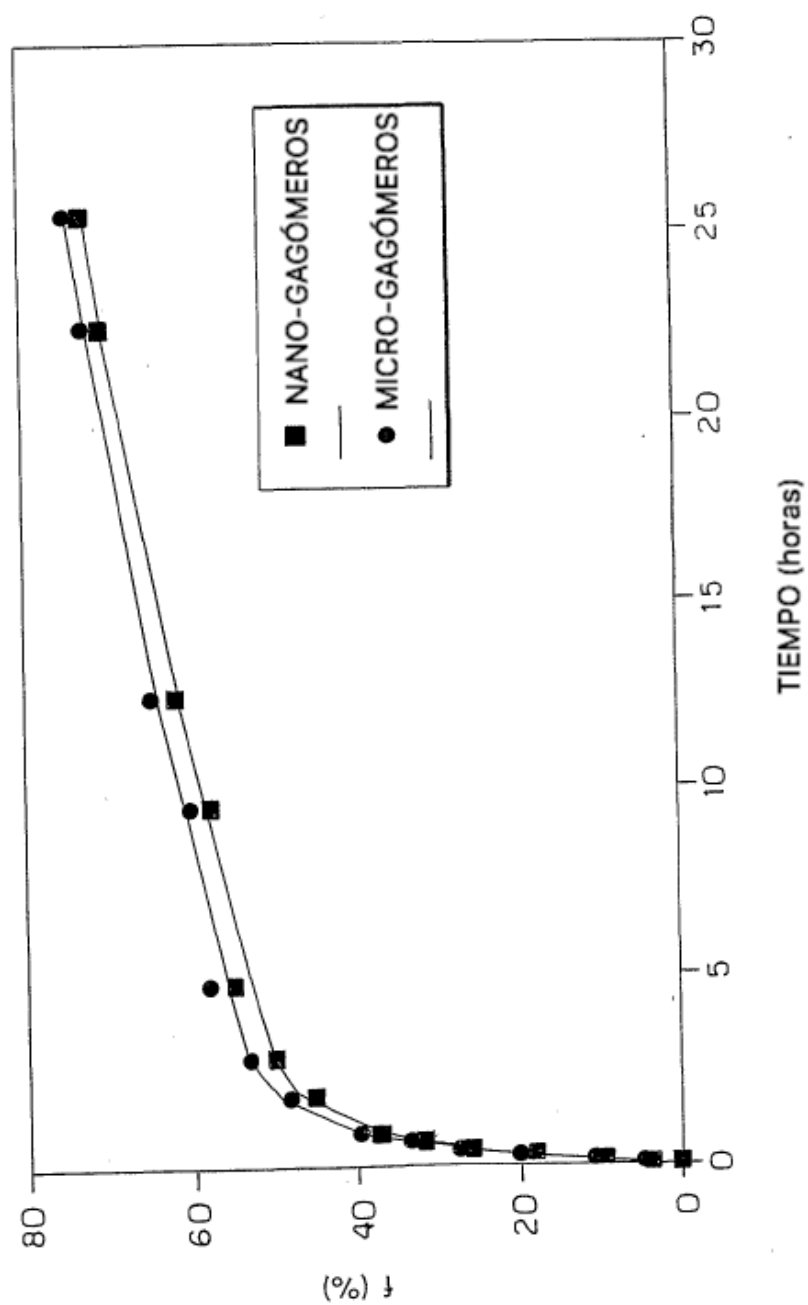
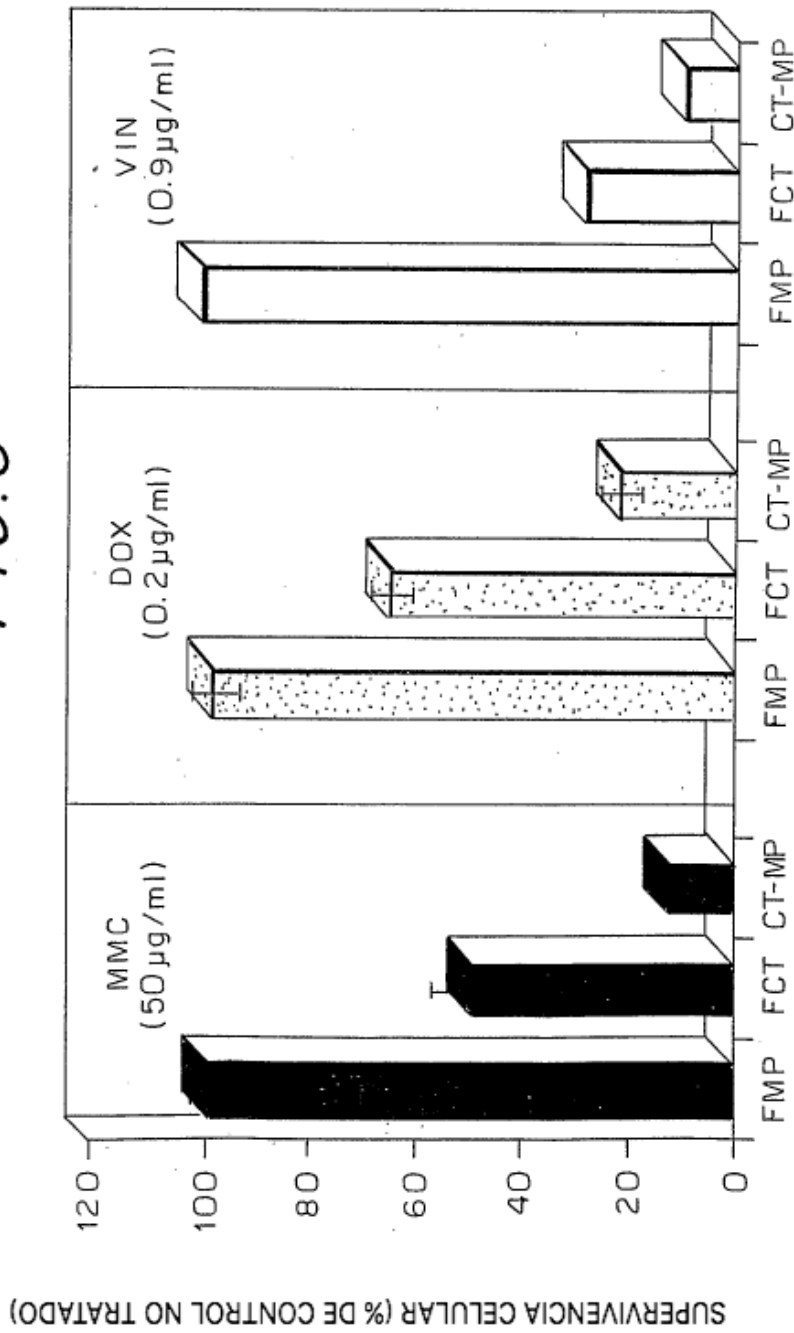


FIG. 8



FM: MICRO-GAGÓMERO LIBRE
 FCT: FÁRMACO LIBRE
 CT-MP: MICRO-GAGÓMERO QUE ATRAPA FÁRMACO

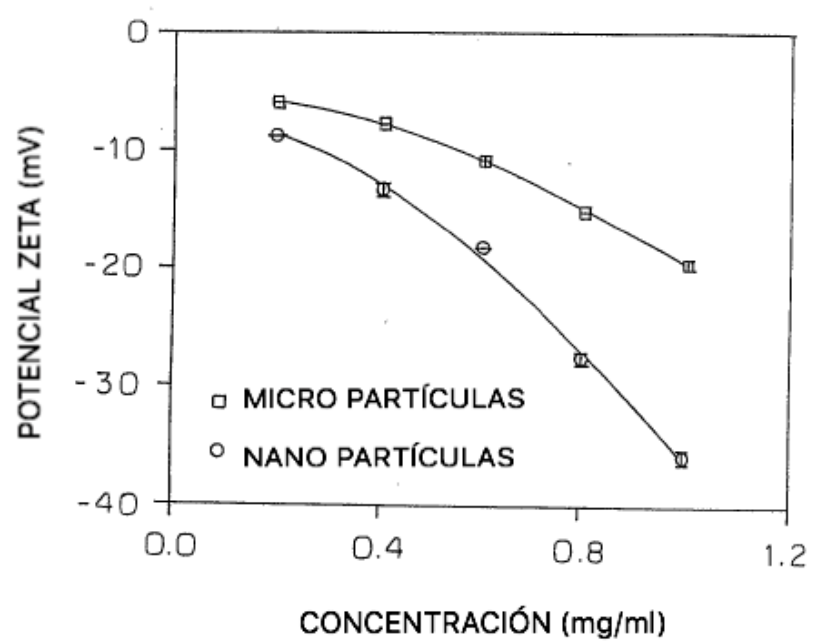
FIG. 9

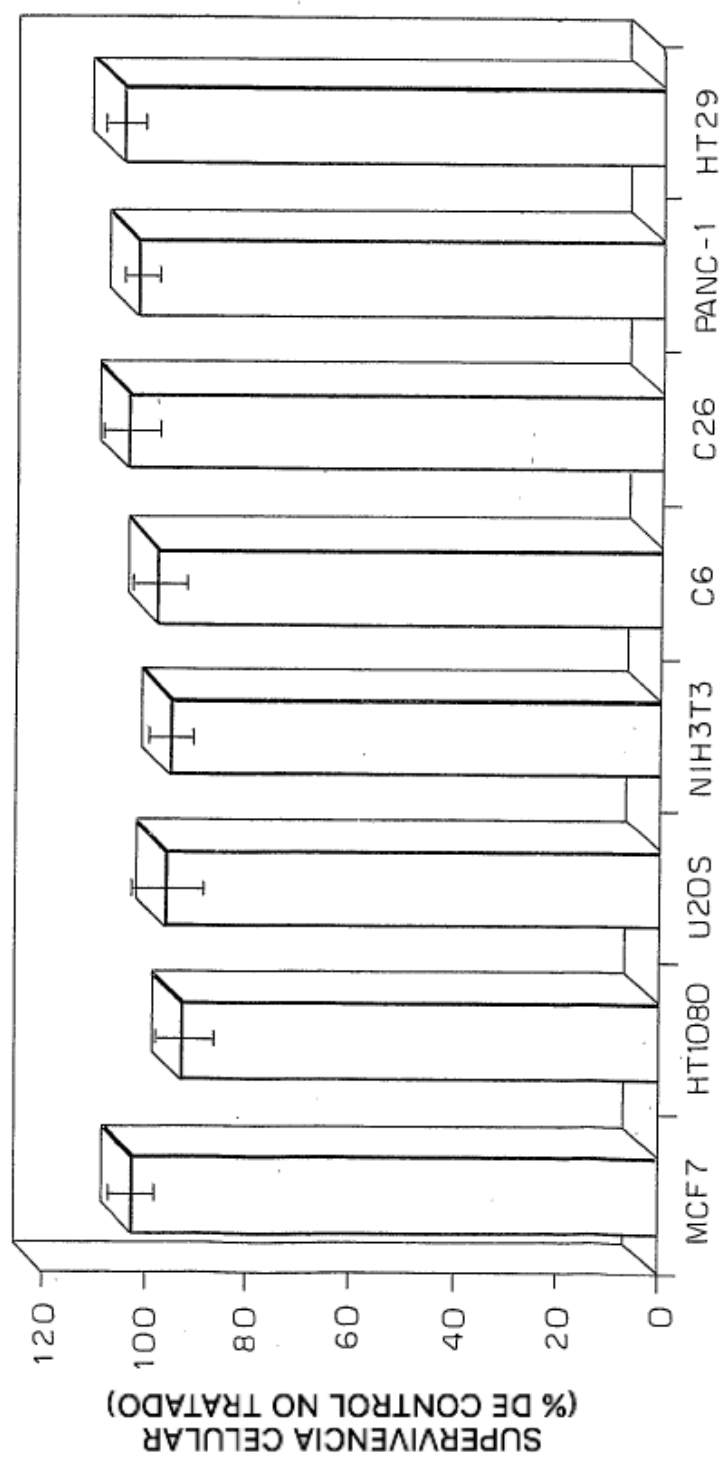
FIG. 10

FIG. 11A

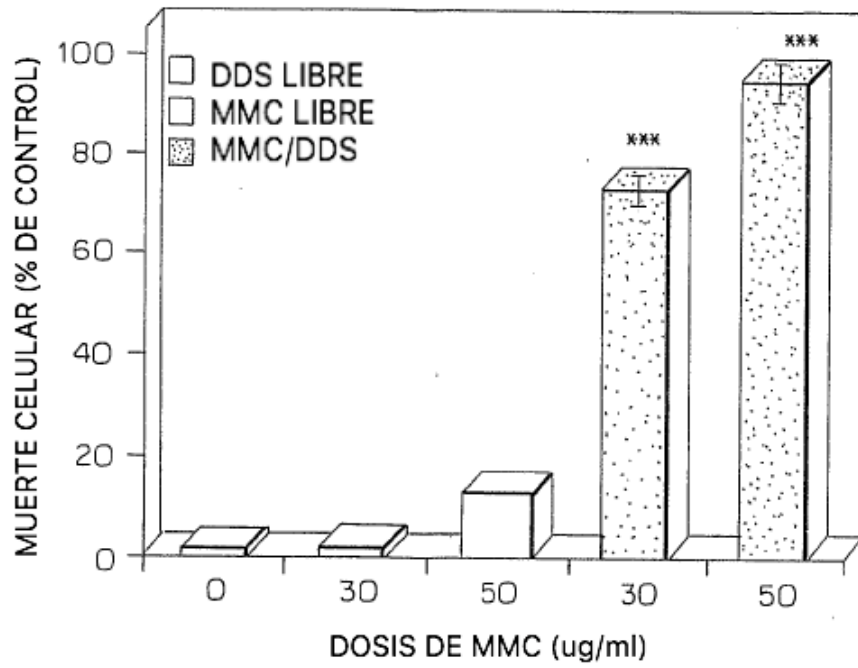


FIG. 11B

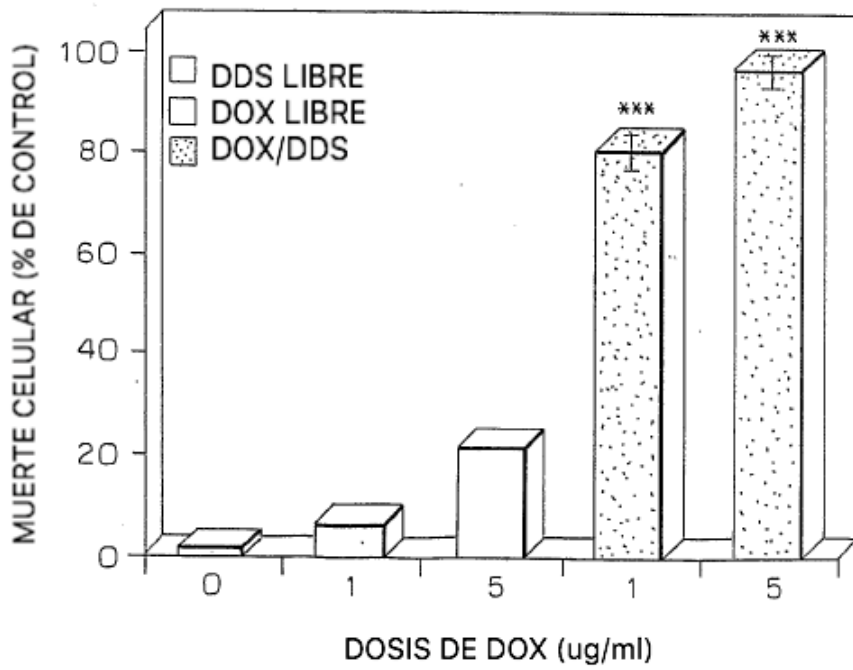


FIG. 12

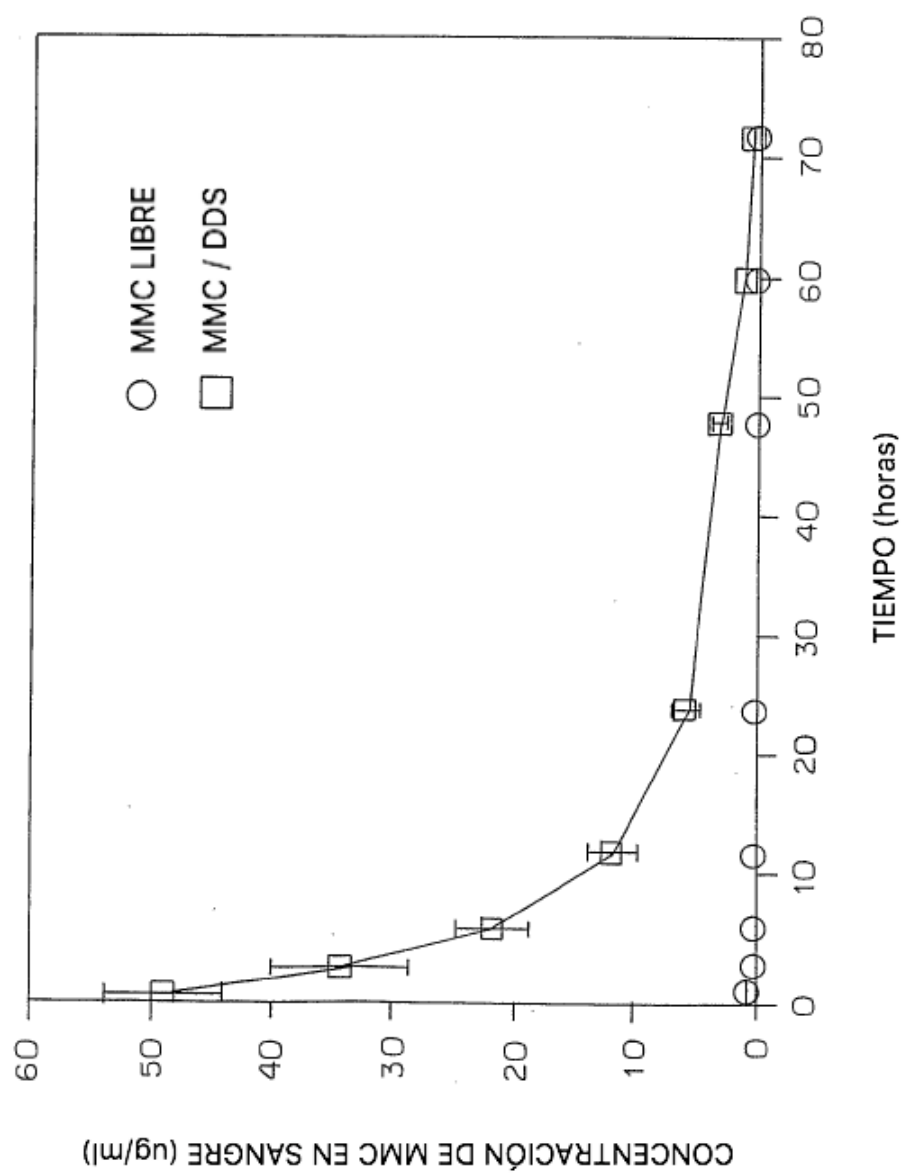


FIG.13

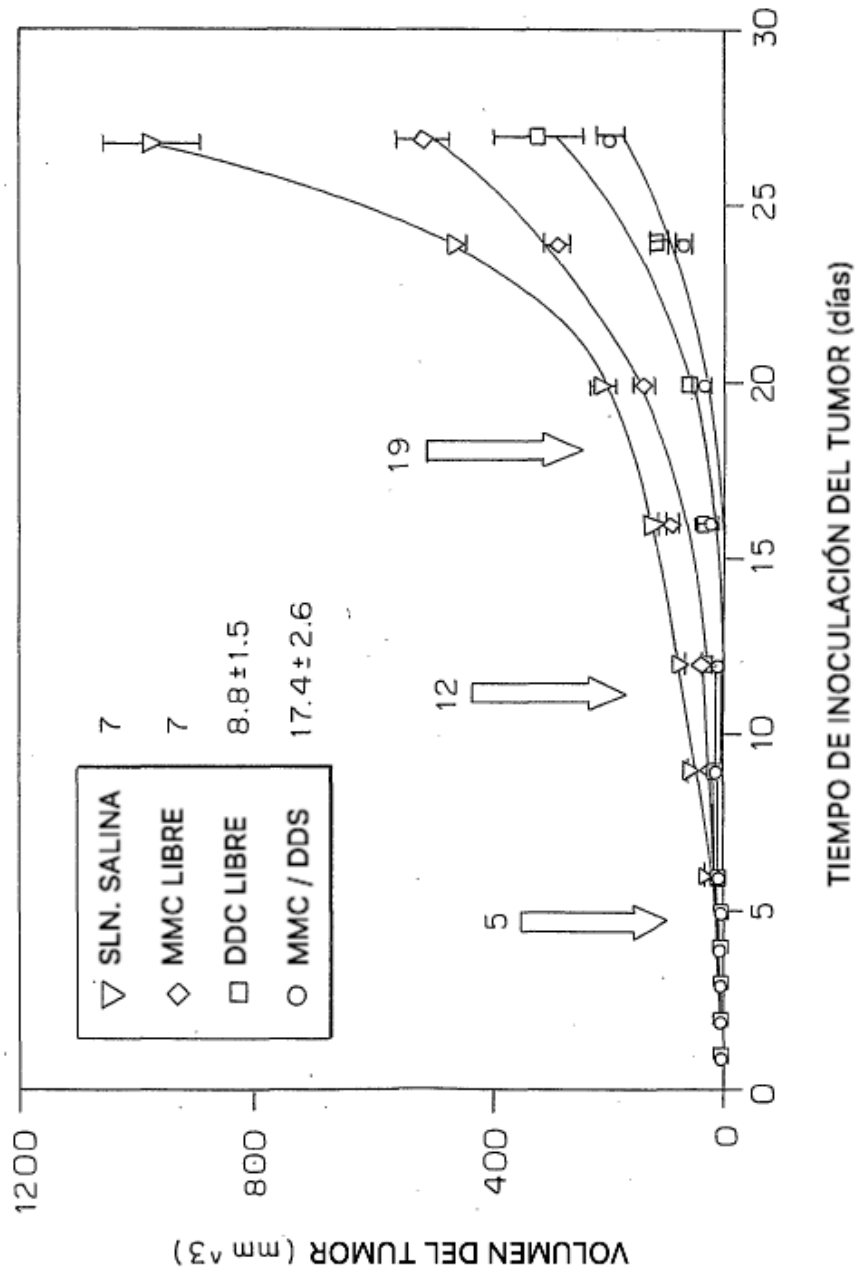


FIG. 14

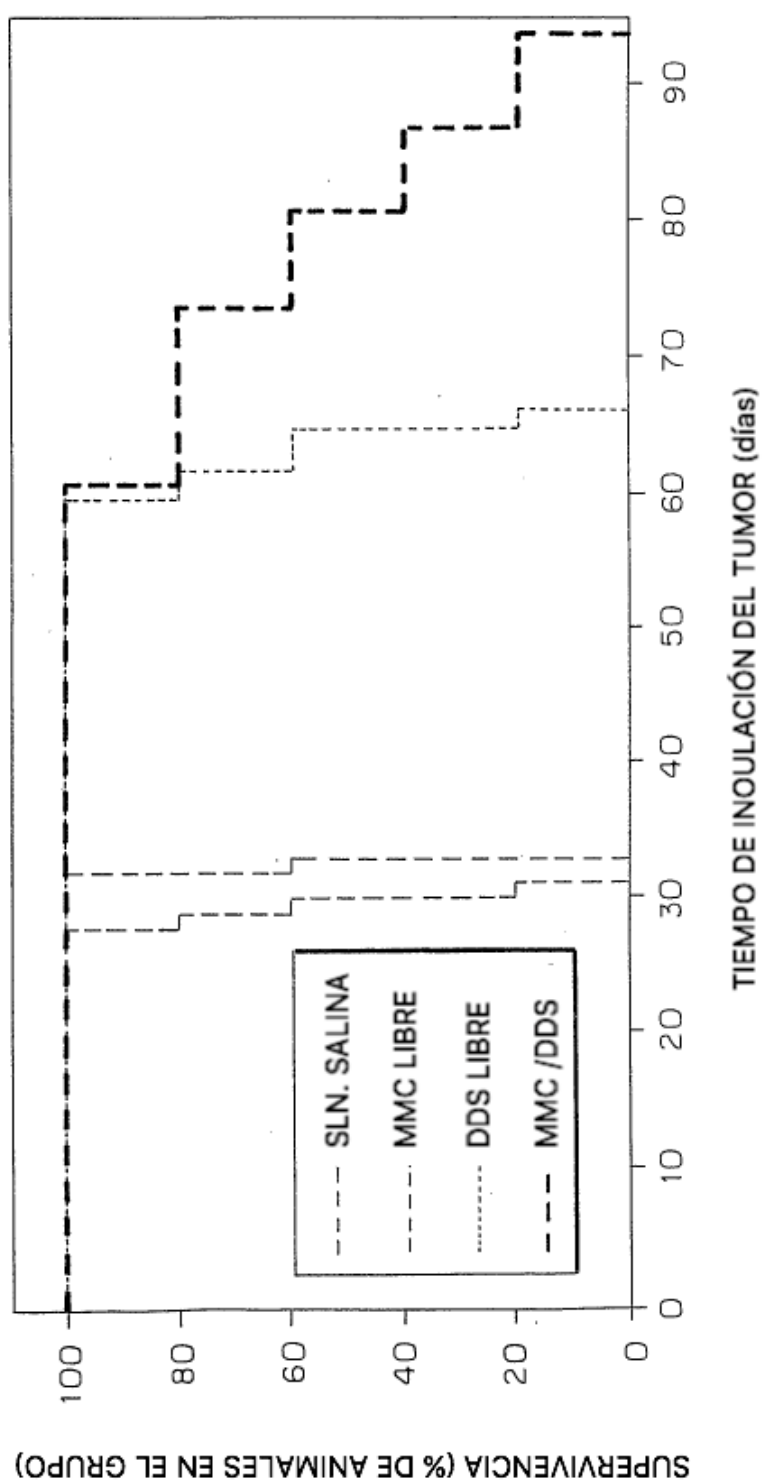


FIG. 15

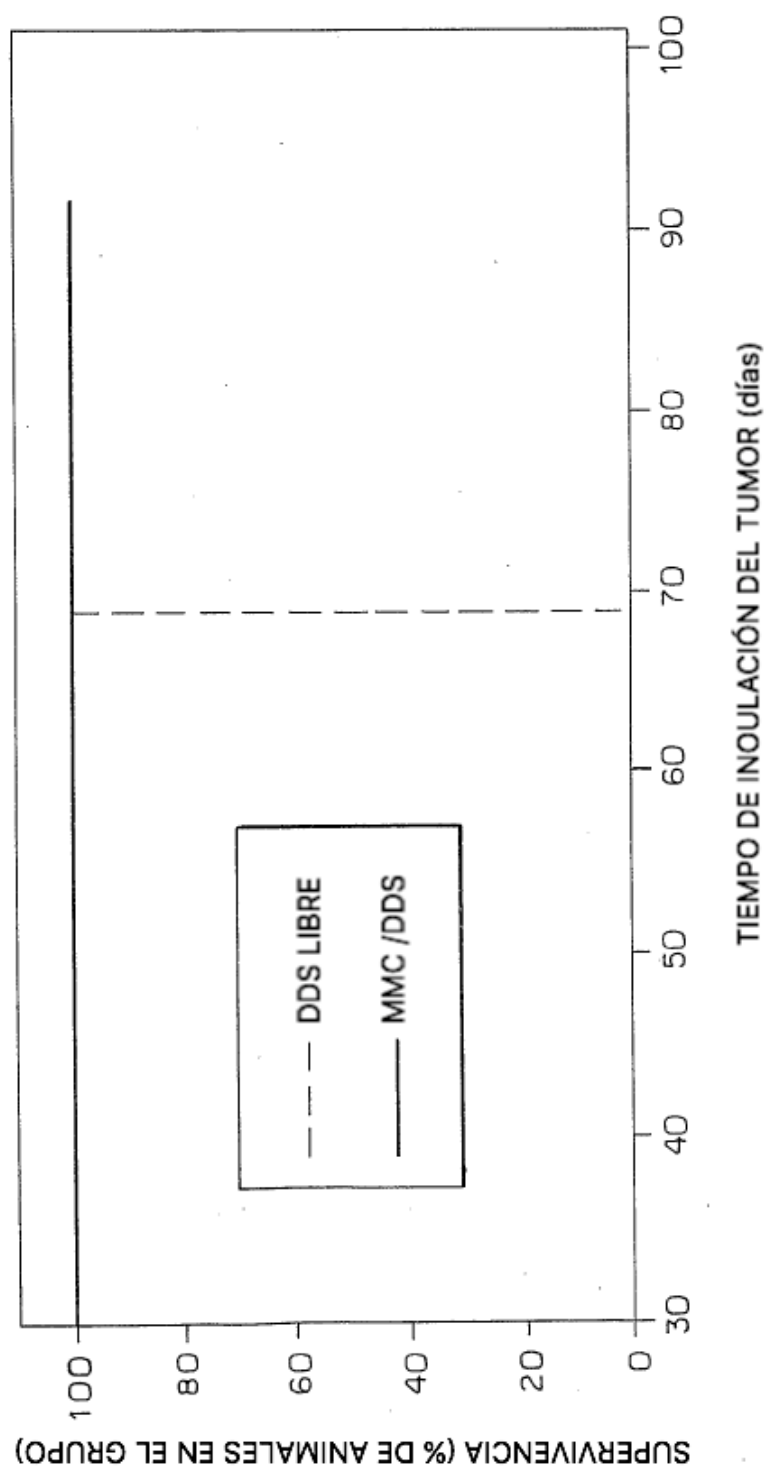


FIG. 16

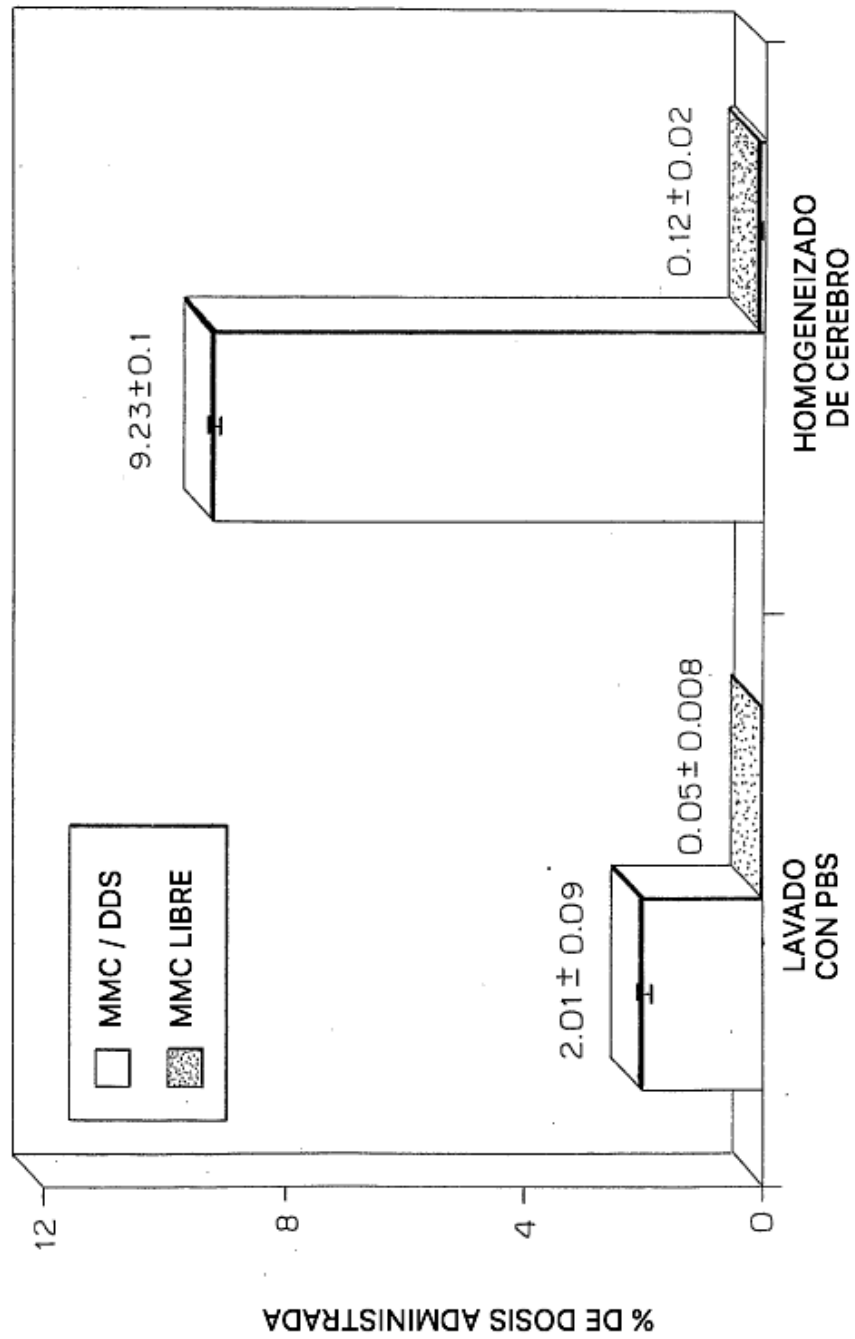


FIG. 17

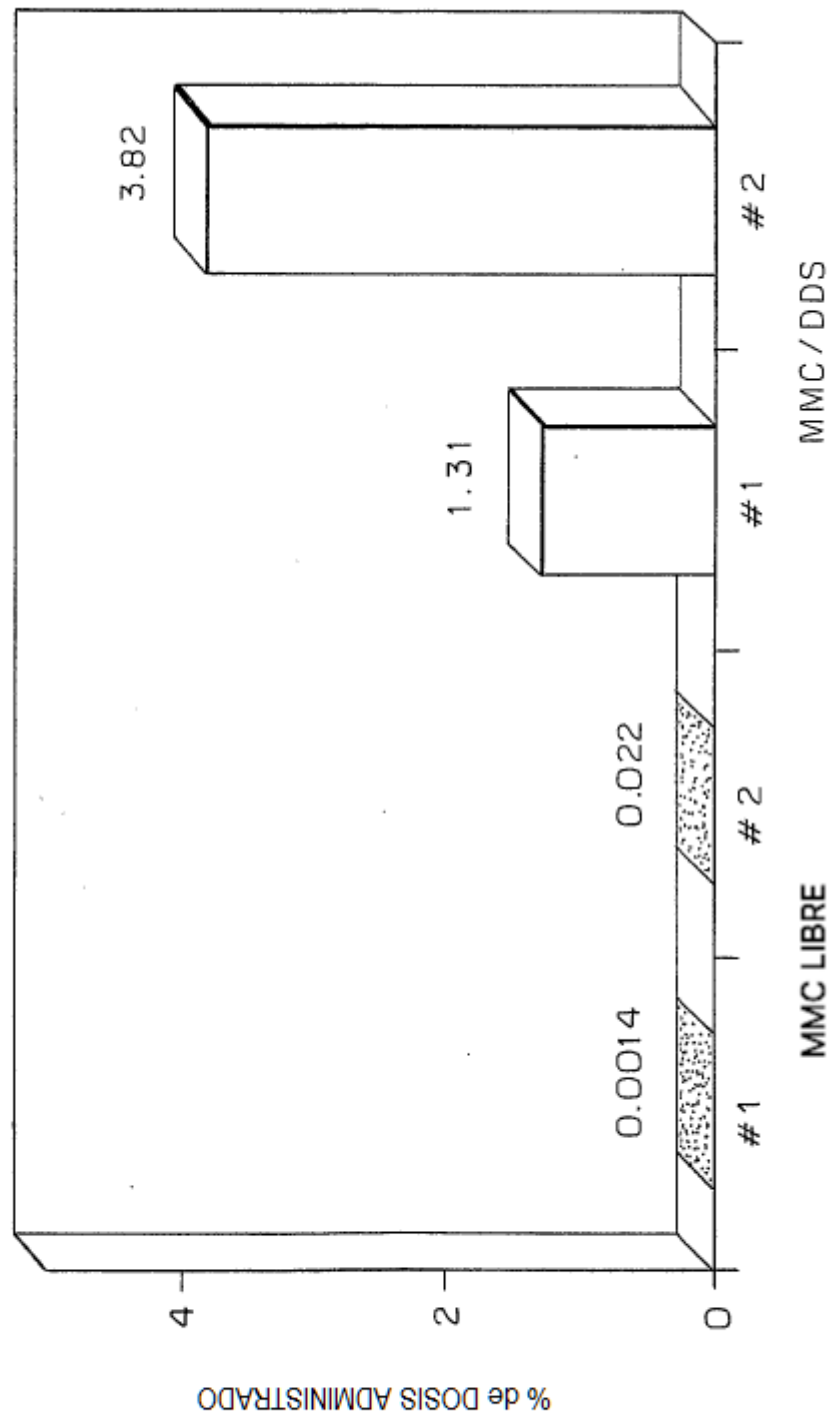


FIG. 18

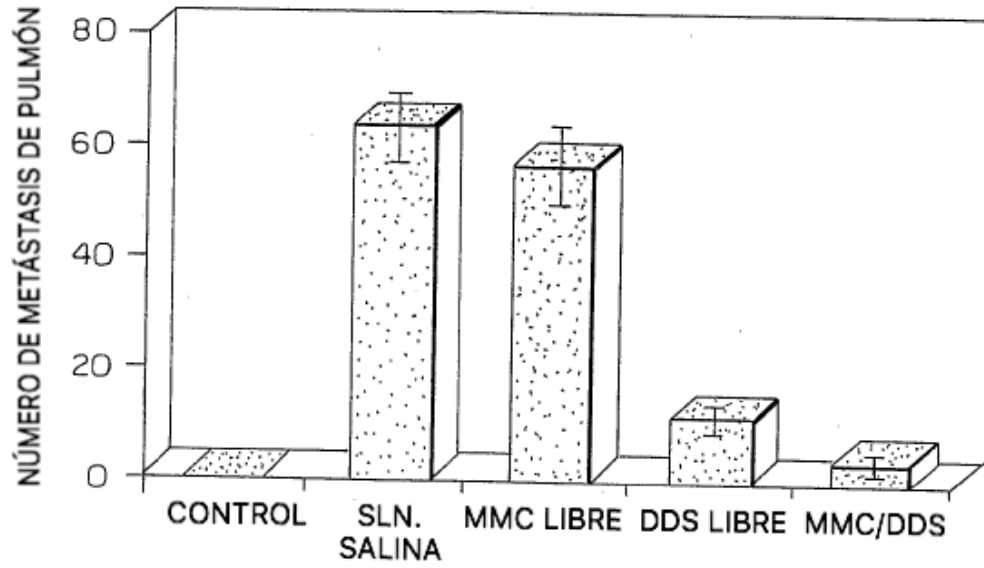


FIG. 19

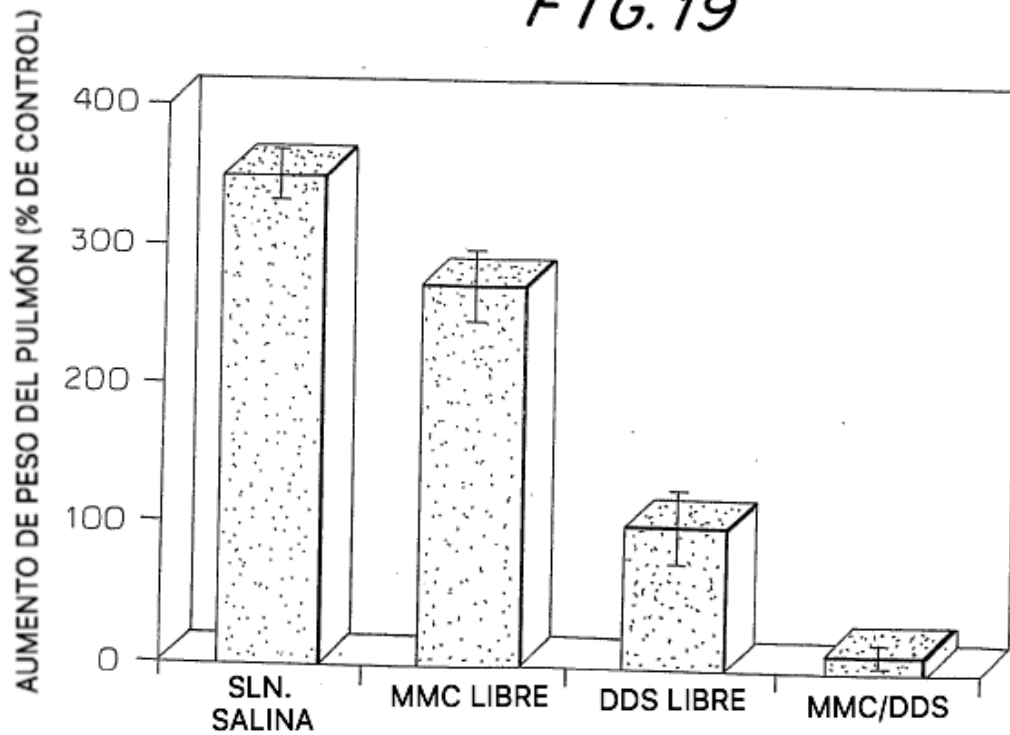
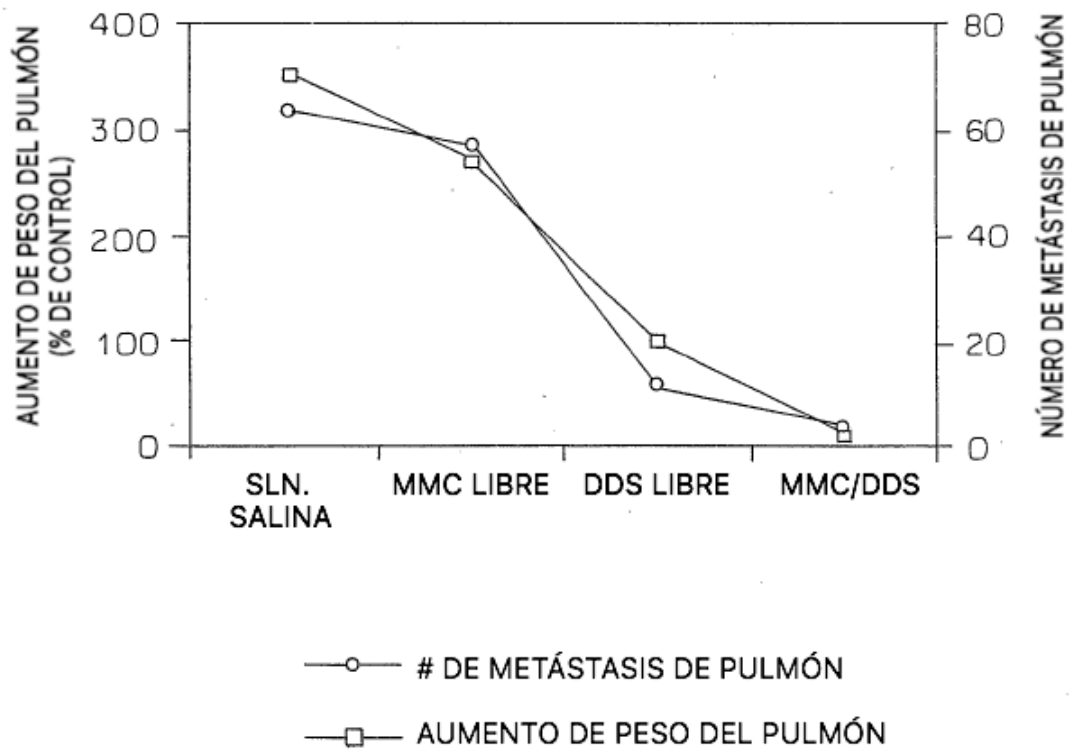


FIG. 20



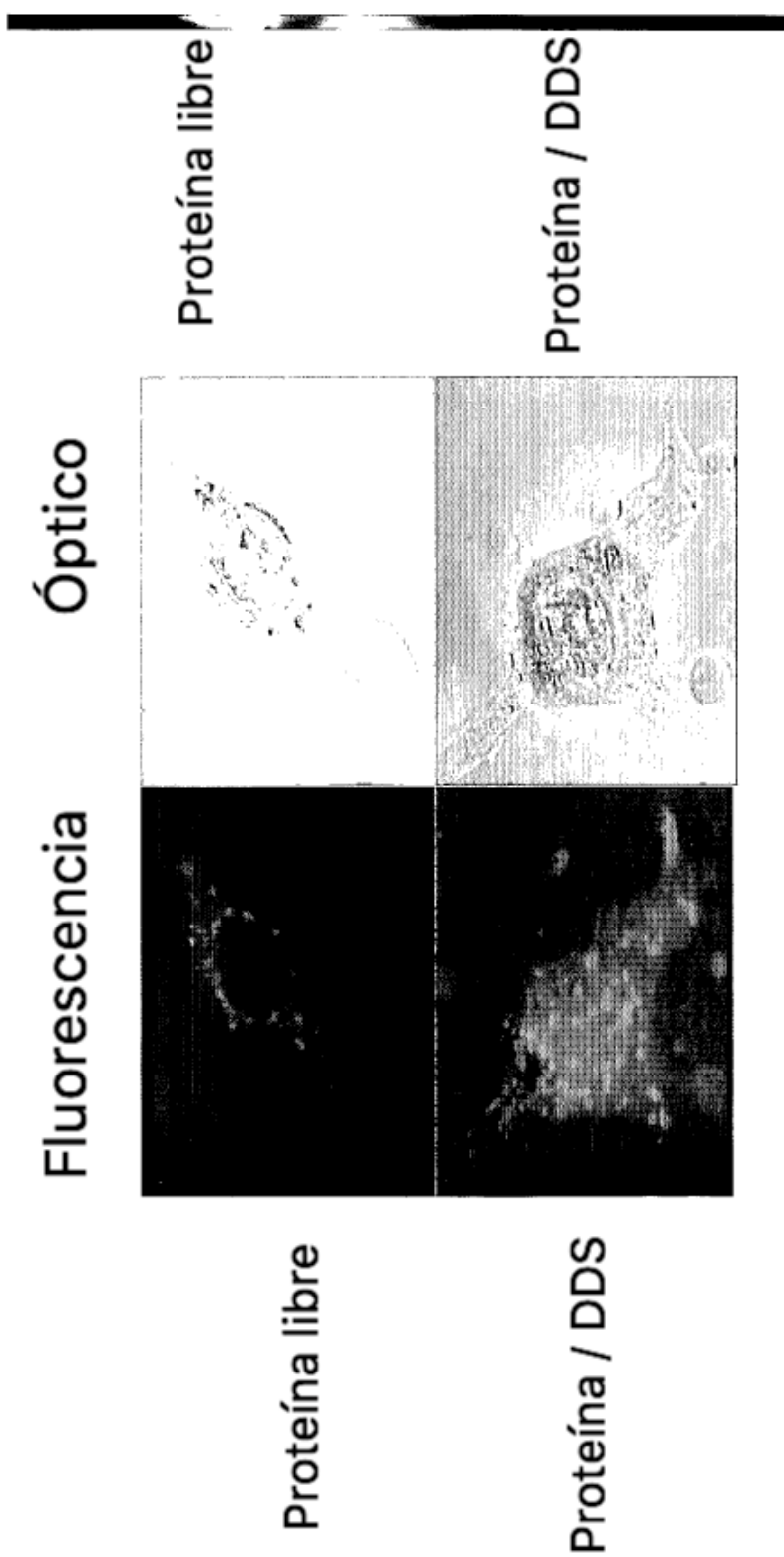


FIG. 21