

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 286**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2012 PCT/GB2012/050179**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2012 WO12101455**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2012 E 12701773 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2667855**

54 Título: **Sistemas de liberación de fármacos**

30 Prioridad:

27.01.2011 GB 201101429

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

04.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ASHRAFI, KOOROSH;
LEWIS, ANDREW LENNARD;
HEAYSMAN, CLARE;
LLOYD, ANDREW y
PHILIPS, GARY**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 645 286 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

Sistemas de liberación de fármacos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a novedosos sistemas de liberación de fármacos con capacidad de respuesta a condiciones hipóxicas.

10 Antecedentes de la invención

Un adecuado suministro de oxígeno es esencial para el funcionamiento normal de todos los organismos multicelulares/las especies de metazoos. La principal fuente de energía para la mayoría de los procesos celulares es el trifosfato de adenosina (ATP). La fosforilación oxidativa es el proceso mediante el cual las células generan ATP a
15 partir del catabolismo de la glucosa y los ácidos grasos, y la molécula de oxígeno es el sustrato metabólico para esta respiración celular que actúa como el aceptor terminal de electrones.

Una baja concentración de oxígeno en las células, conocida como hipoxia, puede comprometer la función celular y llevar a la muerte celular y a daños tisulares. Sin embargo, las moléculas de oxígeno son potencialmente tóxicas, ya
20 que pueden provocar daños oxidativos a las macromoléculas del interior de la célula. Por tanto, el control de la homeostasis del oxígeno es esencial para el mantenimiento de la viabilidad celular y, por tanto, la de todo el organismo.

La tensión de oxígeno fisiológica en tejidos humanos sanos varía en función del órgano, pero generalmente se
25 encuentra dentro del intervalo de 20-120 mmHg. Las células de tejidos diferentes experimentan tensiones de oxígeno diferentes. Las células de un tejido experimentan un intervalo de tensiones de oxígeno dependiendo tanto de la distancia desde la irrigación sanguínea más cercana (la distancia de difusión del oxígeno a través del tejido se estima que es de aproximadamente 150 μ m) como del estado de oxigenación de esa irrigación sanguínea. Por ejemplo, la presión de O₂ de la irrigación sanguínea al hígado varía de 95-105 mmHg en la arteria hepática, 50-65
30 mmHg en la vena porta, 35-45 mmHg en los sinusoides y 30- 40 mmHg en la vena central. Las diferentes tensiones de oxígeno que experimenta cada célula en un hígado sano se perciben todas como normales. De hecho, el gradiente de oxígeno a lo largo del sinusoides es el factor regulador que crea la zonación del funcionamiento metabólico en el sinusoides. Los mecanismos sensitivos y adaptativos de detección de concentraciones de oxígeno intracelular y respuesta al cambio son vitales para mantener la homeostasis del oxígeno. La adaptación a niveles de
35 oxígeno fluctuantes necesita ser flexible y capaz de responder a cambios sutiles.

La hipoxia se produce cuando las tensiones de oxígeno son ≤ 7 mmHg, normalmente como resultado de una disminución de la presión parcial de oxígeno en la sangre (hipoxemia) o una disminución de la capacidad de la sangre para transportar el oxígeno (anemia). Las respuestas moleculares a la hipoxia tienen como resultado el
40 aumento de la expresión de los genes implicados en las adaptaciones a la hipoxia y el fomento de un intervalo de

respuestas y adaptaciones fisiológicas que permiten que las células sobrevivan en un ambiente hipóxico. Estos genes diana juegan papeles críticos en la angiogénesis, el metabolismo, la proliferación celular y la supervivencia de las células. El maestro regulador de las adaptaciones a la hipoxia es el factor de transcripción hipoxia inducible (HIF). La Fig. 1 es un esquema que muestra que, a medida que disminuyen los niveles de oxígeno que alimenta al tumor, como consecuencia, aumenta la presencia de factores de crecimiento, ya que el tumor se vuelve hipóxico y, por consiguiente, aumenta de tamaño.

Dada la adversidad de los cambios metabólicos que se producen en el interior de los tejidos cuando sufren hipoxia, hay una oportunidad de desarrollar sistemas inteligentes de liberación de fármacos que modulen la liberación de compuestos activos en respuesta al ambiente hipóxico y puedan combatir estos cambios. Ha habido un interés creciente en los polímeros con capacidad de respuesta a estímulos, especialmente en los campos de la liberación controlada y autorregulada de fármacos. Los sistemas de liberación basados en estos polímeros se han desarrollado para que se asemejen estrechamente a los procesos biológicos normales del estado patológico, garantizando una óptima liberación del fármaco en función de la necesidad fisiológica. Se han desarrollado arquitecturas poliméricas que exhiben un gran cambio en sus comportamientos físico-químicos en respuesta a señales menores procedentes del ambiente y se han usado en la fabricación de materiales potencialmente útiles para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas. Los sistemas más avanzados de liberación de fármacos con capacidad de respuesta a estímulos también han explorado una nueva estrategia para el diseño de sistemas de liberación dirigida para tratar enfermedades complejas como el cáncer y tumores relacionados.

20

La interconversión de tioles y disulfuros es un proceso biológico importante en lo que respecta a la integridad conformacional de muchas proteínas. Los polímeros que contienen funcionalidad disulfuro se puede considerar que tienen capacidad de respuesta a redox y tioles, ya que experimentarán una conversión reversible mediante ambos mecanismos (véase Meng, F. y col., Reduction-sensitive polymers and bioconjugates for biomedical applications, *Biomaterials*, 30, (2009), 2180-2198). El glutatión (GSH) es un agente reductor presente de forma natural que se encuentra en abundancia en la mayoría de las células en una concentración de 10mM, unas 5000 veces más alta que sus niveles extracelulares, y proporciona un mecanismo para desencadenar una respuesta en el interior del ambiente celular. Asimismo, se sabe que los tumores hipóxicos poseen un ambiente reductor en el que, en condiciones hipóxicas, el citocromo P450s dependiente del NAD(P)H y otras hemoproteínas median la reducción de dos electrones de una amplia gama de sustratos. Esta es la base de algunos fármacos bioreductores, tales como los que contienen N-óxidos de baja toxicidad que se pueden convertir en las correspondientes aminos terciarias que poseen actividad antitumoral, tales como la banoxantrona (AQ4 → AQ4N conversion under hypoxia, Patterson L.H., *Cancer Metastasis Rev.* 12, (1993), 119-34).

Oupicky ha descrito sistemas de poli-L-lisina que contienen puentes disulfuro que se pueden reducir en el ambiente intracelular, proporcionando así un mecanismo para facilitar la liberación de ADN y aumentando 60 veces la eficiencia de transfección (Oupicky, D., Design and development strategies of polymer materials for drug and gene delivery applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, (2008) 957).

Se han descrito composiciones a base de microesferas con enlaces cruzados disulfuro en las que las microesferas

están compuestas por proteínas. Por ejemplo, Mak y col. informan de un método de entrecruzamiento no químico usado para producir micropartículas de proteína pura con un enfoque innovador, denominado activación de proteínas y autoensamblaje espontáneo (PASS). La fabricación de micropartículas de proteínas se basa en la idea de usar los puentes disulfuro internos de las moléculas de proteínas como conectores para ensamblar las moléculas de proteína en forma de micropartícula. El proceso de ensamblaje lo desencadena un reactivo de ditioneitol (DTT) activador, que solo está implicado en la etapa intermedia y no se incorpora a las micropartículas de proteína resultantes (Mak W.C. y col., Protein particles formed by protein activation and spontaneous self-assembly, Advanced Functional Materials, 20, (2010), 4139-4144). La solicitud de patente US20070231400 (Quirk, S.) proporciona microesferas proteínicas compuestas por una mezcla de aminoácidos condensados térmicamente que están entrecruzados con un reactivo de entrecruzamiento. Las microesferas proteínicas se pueden usar para encapsular un material o un compuesto y para permitir una liberación lenta, sostenida o programada del material o compuesto.

Se han descrito microcápsulas poliméricas biodegradables basadas en la química tiol-disulfuro. Zelikin y col. prepararon poli(ácido metacrílico) (PMA) entrecruzado con disulfuros mediante deposición capa por capa de PMA tiolado (PMASH) y polivinilpirrolidona (PVP) sobre partículas de sílice, seguida de oxidación de los tioles para entrecruzar el PMA y eliminación de la sílice y la PVP mediante cambio del pH para alterar la formación de puentes de hidrógeno y formar una estructura capsular. (Zelikin, A.N., y col., Disulfide cross-linked polymer capsules: en route to biodeconstructible systems, Biomacromolecules, 7, (2006), 27-30).

Otros han descrito el desarrollo de sistemas orales de liberación de micropartículas de tioro para la insulina mediante gelación iónica (Greimel A., y col., Oral peptide delivery: in vitro evaluation of thiolated alginate/poly(acrylic acid) microparticles, J. Pharm. Pharmacol., 59, (2007), 1191-8). La matriz microparticulada consistía en poli(ácido acrílico)-cisteína (PAA-Cys) y alginato-cisteína (Alg-Cys) o en los correspondientes polímeros sin modificar (PAA, Alg). El tamaño medio de partícula de todas las formulaciones variaba desde 400 a 600 micras.

De forma similar, se ha informado de un novedoso sistema de liberación de fármacos microparticulados mucoadhesivos (Bernkop-Schnurch A., y col. Preparation and in vitro characterization of poly(acrylic acid)-cysteine microparticles, J. Controlled Release, 18, (2003), 29-38). Las micropartículas se prepararon mediante la técnica de emulsión-evaporación del solvente usando un conjugado de poli(ácido acrílico)-cisteína con una masa molecular promedio de 450 kDa y una cantidad de 308 micromoles de grupos tiol por gramo de polímero.

Yan y col. describen el uso de las *microcápsulas* de PMASH de 3 micras de diámetro descritas anteriormente [0008] para la carga de doxorubicina y la liberación del fármaco en células del cáncer de colon *in vitro* (Yan, Y., y col., Uptake and Intracellular fate of disulfide-bonded polymer hy36drogel capsules for doxorubicin delivery to colorectal cancer cells, ACS Nano, 4, (2010), 2928-). Sin embargo, en el documento no se presenta ninguna demostración de la liberación del fármaco desencadenada por redox.

En el documento EP1007101A2 se desvela que las microesferas de polímero pueden ser útiles en el tratamiento de la embolización. La embolización implica la introducción de agentes embólicos en las arterias que alimentan un

tumor para dejarlo sin sus nutrientes y su oxígeno. Se han desarrollado perlas de elución de fármacos que, además de la isquemia inducida por el dispositivo, administran localmente una dosis concomitante de un fármaco quimioterapéutico al tumor de forma sostenida, reduciendo la exposición sistémica y maximizando los niveles de fármaco en el tumor (véase, por ejemplo, el documento WO 04/071495). Hay pruebas procedentes de modelos
5 preclínicos de tumor de que la embolización por sí sola puede inducir hipoxia en el tumor, el cual a su vez puede iniciar varias rutas prosupervivencia mediante la activación del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α), llevando a un fenotipo más maligno con una mayor resistencia al fármaco y respuestas proangiogénicas (Liang, B., y col., Correlation of hypoxia-inducible factor 1 alpha with angiogenesis in liver tumors after transcatheter arterial embolisation in an animal model, CVIR, 33, (2010) 806-812). Adicionalmente, en la técnica anterior se incluye
10 también el documento WO 01/68720 A1 que desvela composiciones embólicas que comprenden macromonómeros que forman hidrogeles útiles en la embolización. Esta técnica anterior ha fracasado a la hora de desvelar el uso de micropartículas o microesferas de hidrogel que contienen grupos disulfuro para la liberación controlada de fármacos en ambientes hipóxicos.

15 **Resumen de la invención**

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporcionan micropartículas que comprenden un cuerpo de gel, donde el cuerpo de gel comprende un polímero sintético y un fármaco, donde las micropartículas tienen un diámetro promedio en el intervalo de 40 a 1500 μm , donde el polímero está entrecruzado mediante grupos que
20 comprenden enlaces disulfuro y está en forma de hidrogel.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporcionan micropartículas para uso en un método de tratamiento mediante embolización, donde las micropartículas comprenden un polímero y un fármaco, donde el polímero está entrecruzado mediante grupos que comprenden enlaces disulfuro y el fármaco se libera en el
25 tratamiento.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporcionan micropartículas que tienen un diámetro promedio en el intervalo de 40-1200 μm que comprenden un polímero y un fármaco, donde el polímero está entrecruzado mediante grupos que comprenden enlaces disulfuro y el polímero es un polímero de alcohol vinílico.
30

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporcionan micropartículas que tienen un diámetro promedio en el intervalo de 40-1200 μm que comprenden un polímero y un fármaco cargado catiónicamente, donde el polímero está entrecruzado mediante grupos que comprenden enlaces disulfuro, donde cada grupo de entrecruzamiento comprende 2 grupos cargados aniónicamente dispuestos simétricamente con respecto a la unidad
35 disulfuro, donde dichos grupos cargados aniónicamente están asociados electrostáticamente con el fármaco.

De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporcionan micropartículas que tienen un diámetro promedio en el intervalo de 40-1200 μm que comprenden un polímero y un fármaco, donde el polímero está entrecruzado mediante grupos que comprenden enlaces disulfuro, para uso en un método de tratamiento de un tumor.
40

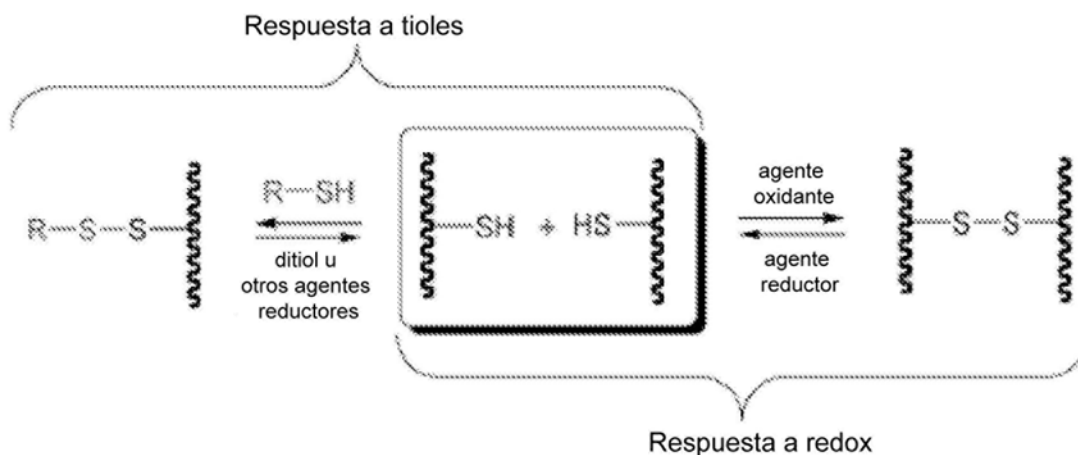
La presente invención proporciona un novedoso sistema de liberación de fármacos útil en la quimioemboloterapia de tumores sólidos. El sistema está compuesto por micropartículas de polímero que contienen enlaces cruzados disulfuro en su estructura. La velocidad de liberación del fármaco desde las micropartículas se altera cuando el tumor se vuelve hipóxico, lo que lleva a un aumento de la liberación del fármaco a medida que los enlaces cruzados disulfuro se escinden en el interior del ambiente reductor del tumor. La presente invención se puede usar para el tratamiento local de tumores mediante administración intratumoral directa o liberación en la vasculatura tumoral a través de una vía intraarterial.

Descripción detallada de la invención

10

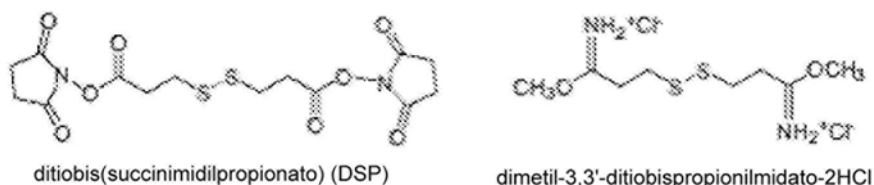
La presente invención se refiere a una clase de polímeros con capacidad de respuesta que son sensibles al ambiente redox o a la presencia de tioles, es decir, con capacidad de respuesta a redox/tioles. Los polímeros están entrecruzados covalentemente mediante enlaces disulfuro, aunque también pueden estar presentes otros enlaces cruzados. El esquema siguiente muestra la respuesta a redox y tioles.

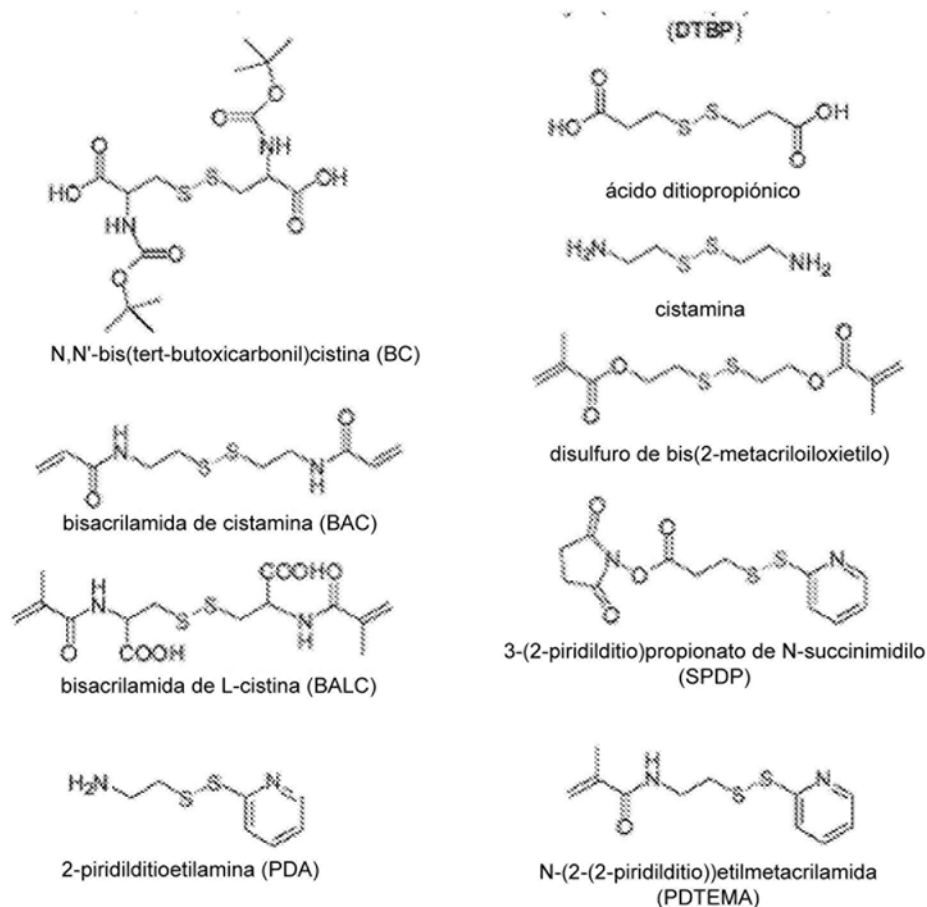
15



A continuación, se muestran las estructuras químicas de algunos de los entrecruzadores que contienen disulfuro más comunes.

20





Habitualmente, el agente de entrecruzamiento tiene la fórmula general:

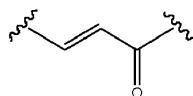


donde A y A' se seleccionan independientemente de grupos que pueden formar una unión covalente con el polímero; n y n' son números enteros que varían desde 1 hasta 10 y, preferentemente, se encuentran en el intervalo 2-4. Más preferentemente, tanto n como n' son 2.

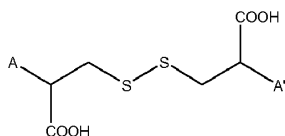
10

Los grupos $-(CH_2)_n-$ y $-(CH_2)_{n'}$ pueden estar sustituidos por otros grupos que, por ejemplo, se puedan asociar electrostáticamente con el fármaco. Son preferibles las interacciones iónicas. Los sustituyentes especialmente preferidos son los grupos carboxilo que pueden formar uniones iónicas con un fármaco catiónico.

15 Los grupos A y A' pueden ser grupos susceptibles a un ataque nucleofílico del polímero. Habitualmente, los grupos susceptibles a un ataque nucleofílico comprenden un grupo $-C(=O)LG$, donde LG es el grupo saliente y sale en la reacción con el polímero. Alternativamente, el grupo experimenta polimerización con el polímero. Para hacer esto, puede comprender, por ejemplo, un grupo etilénicamente insaturado.



Preferentemente, el agente de entrecruzamiento es simétrico con respecto a la unidad disulfuro. Un agente de entrecruzamiento especialmente preferido tiene la fórmula:



donde los grupos A y A' son los que se han mencionado antes.

10

Habitualmente, el entrecruzador se incorpora al polímero mediante reacción del agente de entrecruzamiento con grupos etilénicamente insaturados colgantes del polímero.

Entre los polímeros útiles en esta invención se incluyen los polímeros acrílicos, los polímeros de alcohol vinílico y los polímeros de acrilato. Preferentemente, el polímero es un copolímero, por ejemplo, de la familia acrílica, tal como las poliacrilamidas y sus derivados, los poliacrilatos y sus derivados, así como los compuestos polialílicos y polivinílicos. El polímero puede ser sintético, es decir, de origen no natural (tal como una proteína).

Las micropartículas pueden tener cualquier forma. Es probable que el diámetro de las micropartículas adopte una denominada "distribución normal", con muy pocas partículas de diámetros extremos y la mayoría de diámetros promedio. Preferentemente, las micropartículas de la invención son microesferas. En esta invención, las microesferas son perlas esféricas, o sustancialmente esféricas, formadas a partir de un polímero. Sustancialmente esféricas significa que cerca de aproximadamente el 95 %, dentro de un intervalo de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 100 %, de las mediciones de esfericidad de una población de microesferas están centradas. La población puede incluir algunas microesferas individuales que tienen una medición de esfericidad más baja, pero la medición de esfericidad de la población en su conjunto se mantiene alta. Las mediciones de esfericidad de las microesferas se pueden hacer a gran escala usando el sistema de análisis de partículas Beckman-Coulter(TM) RapidVUE(R) (Hialeah, Fla.).

30 Generalmente, las micropartículas se forman a partir de una matriz polimérica que es sustancialmente continua en todo el cuerpo de la micropartícula, es decir, un cuerpo de gel, es decir, no hay espacio interior como el que se encuentra en el cuerpo de una microcápsula.

Preferentemente, las micropartículas se forman a partir de una matriz de polímero insoluble en agua e hinchable en agua. Hay un agente terapéutico (fármaco) absorbido en la matriz. Preferentemente, el polímero tiene una carga aniónica global a un pH en el intervalo de 6 a 8. Habitualmente, cuando las micropartículas se hinchan en agua

hasta el equilibrio, tienen tamaños de partícula (diámetros promedio) en el intervalo de 40-1500 μm , preferentemente de 40-1200 μm , de 40-1000 μm , aún más preferentemente de 40-500 μm o de 40-300 μm . Preferentemente, al menos el 50 % de las partículas están en el intervalo, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 % y aún más preferentemente al menos el 95 %. Preferentemente, la distribución del tamaño de
5 partícula es monomodal.

El diámetro promedio de las micropartículas se puede determinar mediante métodos tales como la separación en lecho fluidizado y el tamizado, también denominado filtrado. Es especialmente útil el tamizado a través de series de tamices apropiados para la recuperación de muestras que contengan micropartículas de los tamaños deseados. A
10 continuación, se puede determinar el diámetro promedio mediante técnicas tales como la obtención de imágenes por microscopía óptica usando un ocular reticulado. De este modo, se puede determinar el diámetro promedio de una micropartícula, por ejemplo, mediante la aplicación del diámetro circular equivalente. Para las microesferas que son sustancialmente esféricas, el diámetro promedio hace referencia al diámetro real de la microesfera.

15 Preferentemente, las micropartículas son biodegradables. La biodegradación es la descomposición química de los materiales por acción de organismos vivos que conlleva cambios en las propiedades físicas. Una micropartícula es biodegradable si, en presencia de un ambiente reductor, los enlaces disulfuro del interior de las micropartículas se escinden para dar sus grupos tiol y, a continuación, se escinden posteriormente, por ejemplo, para formar aminoácidos que están solubilizados y causan la degradación de la micropartícula.

20

Los tumores en un estado de hipoxia proporcionan un ambiente muy reductor, que se puede usar como una diana para los sistemas inteligentes de liberación de fármacos. En un ejemplo específico, en presencia del ambiente reductor, los enlaces disulfuro del interior de las micropartículas de BALC se escinden para dar sus grupos tiol. La BALC reducida se escinde para dar su componente de partida, el aminoácido L-cisteína, pero queda retenida en el
25 interior de la micropartícula por la estructura del copolímero, por lo tanto, el sistema de liberación retiene su función de embolización permanente. Sin embargo, a medida que la concentración de BALC aumenta y la del polímero disminuye dentro de la micropartícula, más BALC polimeriza consigo misma. Cuando las micropartículas se exponen a los agentes biológicos que se encuentran en los tumores hipóxicos, a niveles altos de entrecruzamiento, la BALC se escindiré otra vez para formar aminoácidos, pero puede estar fijada a una o más moléculas adicionales de L-
30 cisteína en forma de oligómeros. Los oligómeros de aminoácidos se pueden solubilizar una vez que se desconectan de la estructura del copolímero, llevando a la degradación de la micropartícula.

Preferentemente, el polímero de la invención es hinchable en agua pero insoluble en agua. Por lo tanto, en presencia de líquido acuoso, el polímero formará un hidrogel. El polímero está entrecruzado covalentemente,
35 aunque puede ser apropiado para el polímero que esté entrecruzado iónicamente, al menos en parte. El polímero se puede formar mediante polimerización de monómeros etilénicamente insaturados en presencia de monómeros de entrecruzamiento difuncionales o de funcionalidad más alta, monómeros etilénicamente insaturados que incluyen un monómero aniónico. Se pueden usar copolímeros de metacrilato de hidroxietilo, ácido acrílico y monómero de entrecruzamiento, tales como el dimetacrilato de etilenglicol o la metilénbisacrilamida, tal y como se usa para las
40 lentes de contacto a base de etafilcon A. Además de los agentes de entrecruzamiento que comprenden un enlace

disulfuro, los cuales pueden participar en reacciones de polimerización, pueden estar presentes estos monómeros de entrecruzamiento.

Otro tipo de polímero que se puede usar para formar la matriz hinchable en agua e insoluble en agua es el alcohol polivinílico entrecruzado usando agentes de entrecruzamiento de tipo aldehído tales como el glutaraldehído. Para tales productos, el alcohol polivinílico se debe volver aniónico, por ejemplo, mediante aporte de grupos aniónicos colgantes mediante reacción de un grupo funcional ácido que contenga un monómero con los grupos hidroxilo. Ejemplos de reactivos adecuados son los diácidos, por ejemplo, los ácidos dicarboxílicos.

10 La invención resulta de especial valor cuando la matriz polimérica está formada por un macrómero de alcohol polivinílico, que tiene más de un grupo etilénicamente insaturado colgante por molécula, mediante copolimerización con monómeros etilénicamente insaturados que comprendan un monómero ácido. El macrómero de PVA se puede formar, por ejemplo, aportando un polímero de PVA, de un peso molecular adecuado, tal como en el rango de 1000 a 500 000 D, preferentemente de 10 000 a 100 000 D, con grupos acrílicos o vinílicos colgantes. Los grupos acrílicos
15 colgantes se pueden aportar, por ejemplo, mediante reacción del ácido acrílico o metacrílico con PVA para formar enlaces éster a través de alguno de los grupos hidroxilo. Métodos de fijación de grupos vinílicos capaces de polimerizar para dar un alcohol polivinílico se describen en, por ejemplo, el documento US4978713 y, preferentemente, en los documentos US5508317y 5583163. Por tanto, el macrómero preferido comprende una cadena principal de alcohol polivinílico a la que se conecta, a través de un enlace acetal cíclico, un resto
20 (alqu)acrilaminoalquilo. El Ejemplo 1 del documento WO2004/071495 describe la síntesis de un ejemplo de tal macrómero, conocido por el nombre de nelficon B, que es útil en esta invención. Preferentemente, los macrómeros de PVA tienen aproximadamente de 2 a 20 grupos etilénicos colgantes por molécula, por ejemplo de 5 a 10.

Cuando los macrómeros de PVA copolimerizan con monómeros etilénicamente insaturados que incluyen un
25 monómero ácido, los monómeros ácidos preferidos vienen dados por la fórmula general I del documento WO 04/071495.

Un tipo de monómero especialmente preferido es un ácido (alqu)acrilamidoalcanosulfónico, tal como el ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico (AMPS).

30

En el monómero etilénicamente insaturado puede haber incluido un monómero diluyente, por ejemplo, un monómero no iónico. Tal monómero puede ser útil para controlar el pK_a de los grupos ácidos, para controlar la hidrofiliidad o hidrofobicidad del producto, para aportar regiones hidrofóbicas al polímero o, simplemente, para actuar como diluyente inerte. Ejemplos de monómeros diluyentes no iónicos son, por ejemplo, los (alqu)acrilatos y las
35 (alqu)acrilamidas, especialmente compuestos tales que tengan grupos alquilo con 1 a 12 átomos de carbono, los alquil(alqu)acrilatos y -(alqu)acrilamidas hidroxiladas y dihidroxiladas sustituidas, las lactamas vinílicas, el estireno y otros monómeros aromáticos.

El monómero etilénicamente insaturado también puede incluir un monómero zwitteriónico, por ejemplo para
40 aumentar la hidrofiliidad, lubricidad, biocompatibilidad y/o hemocompatibilidad de las partículas. Monómeros zwitteriónicos adecuados se describen en nuestras publicaciones anteriores WO-A-9207885, WO-A-9416748, WO-A-9416749 y WO-A-9520407. Preferentemente, un monómero zwitteriónico es la 2-(metacrililoiloxietilfosforilcolina)

(MPC).

En la matriz polimérica, la concentración de anión se encuentra preferentemente en el intervalo de 0,1 a 10 meq g⁻¹, preferentemente al menos 1,0 meq g⁻¹.

5

Cuando el macrómero de PVA copolimeriza con otros monómeros etilénicamente insaturados, la proporción en peso de macrómero de PVA a otro monómero se encuentra preferentemente en el intervalo de 50:1 a 1:5, más preferentemente en el rango de 20:1 a 1:2. En el monómero etilénicamente insaturado, el monómero aniónico está presente preferentemente en una cantidad en el intervalo del 10 al 100 % molar, preferentemente al menos el 25 %

10 molar.

Preferentemente, el polímero hinchable en agua e insoluble en agua tiene un contenido de agua en equilibrio, medido mediante análisis gravimétrico, del 40 al 99 % en peso, preferentemente del 75 al 95 %.

15 El polímero se puede transformar en partículas de varias formas. Por ejemplo, el polímero entrecruzado se puede fabricar como un material a granel, por ejemplo en forma de una lámina o un bloque, y, a continuación, se puede conminuir posteriormente hasta el tamaño deseado. Alternativamente, el polímero entrecruzado se puede formar como tal en forma particulada, por ejemplo mediante polimerización de gotas de monómero en una fase dispersa de un vehículo inmiscible continuo. Se conocen ejemplos de polimerizaciones agua en aceite para producir partículas
20 que tengan el tamaño deseado cuando hinchen. Por ejemplo, el documento US4224427 describe procedimientos de formación de perlas esféricas uniformes de hasta 5 mm de diámetro mediante dispersión de monómeros hidrosolubles en una fase solvente continua, en presencia de agentes de suspensión. Pueden estar presentes estabilizantes y tensioactivos para permitir controlar el tamaño de las partículas de la fase dispersa. Después de la polimerización, las micropartículas entrecruzadas se recuperan mediante medios conocidos, se lavan y,
25 opcionalmente, se esterilizan. Preferentemente, las partículas, por ejemplo, micropartículas, se hinchan en un líquido acuoso y se clasifican en función de su tamaño.

El agente de entrecruzamiento que comprende un enlace disulfuro se incorpora en el polímero tal y como se ilustra en los ejemplos. Habitualmente, cuando se usa polimerización por suspensión inversa, el agente se incorpora en la
30 fase acuosa. Si el agente de entrecruzamiento comprende grupos etilénicamente insaturados, puede participar en una reacción de polimerización con el polímero. Preferentemente, la formulación de micropartículas contiene del 0,5-100 % en peso, más habitualmente del 0,5-80 % en peso del entrecruzador.

Cualquier fármaco que se pueda incorporar a las micropartículas de la invención puede encontrar utilidad en esta
35 invención. El fármaco se puede, por ejemplo, seleccionar de entre el grupo que consiste en fármacos antitumorales, fármacos antiangiogénesis, fármacos antifúngicos, fármacos antivirales, fármacos antiinflamatorios, fármacos antibacterianos, fármacos antihistamínicos, fármacos antineoplásicos, enzimas y agente antialérgicos. Los fármacos preferidos son los fármacos antineoplásicos y tienen propiedades quimioterapéuticas. Estos se pueden usar en terapia antitumoral.

40

El fármaco puede ser un agente citotóxico. Un agente citotóxico es uno que es tóxico directamente para las células, impidiendo su reproducción o crecimiento. Agentes citotóxicos adecuados son, por ejemplo, los compuestos de antraciclina tales como la doxorubicina y otros compuestos desvelados en el documento WO04071495, los derivados de la camptotecina, tal y como se describe en el documento WO2006027567, los taxanos, los 5 antimetabolitos neoplásicos a base de platino tales como el 5-FU, el FUDR, la mercaptopurina, la capecitabina, otros antibióticos citotóxicos tales como la actinomicina D y los alcaloides de la vinca, entre los que se incluyen la vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina. Entre los ejemplos también se incluyen la citarabina, la gemcitabina, la ciclofosfamida, la fludaribina, el clorambucilo, el busulfán, la mitoxantrona, los retinoides, la anagrelida, etc. Los compuestos de camptotecina tales como el topotecán y el irinotecán son particularmente preferidos porque están 10 cargados.

Entre otros fármacos útiles se incluyen los platinos (cisplatino, oxaliplatino, carboplatino), los taxanos (paclitaxel, docetaxel) y la bleomicina.

15 Una clase de compuestos citotóxicos o citostáticos que se pueden usar comprende la rapamicina y los análogos a la rapamicina que se dirigen a la mTOR. Entre tales compuestos se incluyen el sirolimus, temsirolimus, everolimus, tacrolimus, pimecrolimus, zotarolimus, biolimus, y AP23573. Se puede usar como análogo de la rapamicina cualquiera de los compuestos abarcados dentro del alcance de los análogos de la rapamicina descritos en el documento WO-A-2003022807, el contenido del cual se incorpora en el presente documento por referencia.

20

Entre otros fármacos adecuados se incluyen los inhibidores multiquinasa tales como, pero no limitados a, sorafenib, sunitinib, bosutinib, brivanib, axitinib, bortezumib, imantinib, canertinib, dasatinib, dovitinib, gefitinib, lapatinib, lestaurtinib, masitinib, mubritinib, nilotinib, pazopanib, saracatinib, tacocitinib, tozasertib, vandetanib y vatalanib.

25 Entre otros fármacos adecuados se incluyen el etinostat, la enzastaurina e inhibidores de la PARP tales como el olaparib.

Alternativamente, el fármaco puede ser un inhibidor de la COX. Los inhibidores de la COX, por ejemplo, los AINE, podrían actuar como agentes antiinflamatorios y analgésicos, dirigiéndose a la inflamación y el dolor asociados al 30 procedimiento de quimioembolización. Un ejemplo es el ibuprofeno.

Preferentemente, el activo terapéutico (fármaco) usado en la presente invención es un compuesto de antraciclina, que comprende un grupo antraquinona al que se fija un aminoazúcar. Se cree que el grupo amino del azúcar se asocia con cualquiera de los grupos aniónicos de la matriz polimérica para permitir niveles altos de carga y la 35 liberación controlada después de la administración.

Los fármacos preferidos son las antraciclinas, por ejemplo, la doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, idarubicina y la antracenediona mitoxantrona.

40 En la invención, generalmente, el fármaco está fijado de forma no covalente a la matriz polimérica.

El fármaco puede ser iónico o no iónico. Cuando el fármaco es catiónico, es preferible que el entrecruzador tenga grupos aniónicos que puedan ayudar a unir el fármaco.

5 Preferentemente, hay dos grupos aniónicos y estos se distribuyen simétricamente respecto al enlace disulfuro. A este respecto, se prefiere especialmente el agente de entrecruzamiento bisacrilamida-L-cistina. Los dos grupos se unen a la molécula catiónica del fármaco. Sin estar limitados por la teoría, se cree que cuando el enlace disulfuro se escinde en un ambiente hipóxico, los dos grupos aniónicos se ven forzados a separarse, lo que facilita la liberación del fármaco.

10

Cuando el polímero es catiónico, el fármaco es preferentemente aniónico y está asociado electrostáticamente con el polímero.

También es posible que el polímero o el fármaco no estén cargados.

15

El activo terapéutico (fármaco) se puede incorporar a la matriz polimérica mediante una variedad de técnicas. En un método, el activo terapéutico se puede mezclar con un precursor del polímero, por ejemplo, una mezcla de monómero o macrómero o un polímero entrecruzable y una mezcla de entrecruzamiento, antes de la polimerización o el entrecruzamiento. Alternativamente, el activo se puede cargar en el polímero después de haber sido entrecruzado. Por ejemplo, el polímero sólido particulado puede estar hinchado en una solución del activo terapéutico, preferentemente en agua. Opcionalmente, se puede eliminar posteriormente el agente no absorbido y/o evaporar el solvente. Se puede pulverizar una solución del activo, en un solvente orgánico tal como un alcohol, o, más preferentemente, en agua, sobre un lecho móvil de partículas, en el que el fármaco se absorbe en el cuerpo de las partículas a la vez que se elimina el solvente. Más convenientemente, hemos encontrado que es posible simplemente poner en contacto las partículas hinchadas suspendidas en un vehículo líquido continuo, tal como el agua, con una solución de fármaco, durante un periodo de tiempo prolongado, en el que el fármaco se absorbe en el cuerpo de las partículas. Se cree que es análogo a un proceso de tipo intercambio catiónico. El vehículo de hinchamiento se puede retirar posteriormente o, convenientemente, puede quedar retenido en las partículas como parte del producto para su uso posterior como agente embólico.

25
30

A continuación, se separan las micropartículas del vehículo de hinchamiento, se filtran y se secan. Se dan detalles de procedimientos adecuados en el documento WO 04/071495.

La composición que se administra a un paciente, que tiene un tumor sólido, por ejemplo un carcinoma hepatocelular, con necesidad de emboloterapia es una suspensión acuosa de partículas hinchadas que contienen el fármaco absorbido. Con frecuencia, es deseable que la suspensión esté mezclada con un agente de diagnóstico por imagen, tal como un agente radiopaco convencional, antes de su liberación, tal y como se usa para composiciones embólicas de tipo gel. Por ejemplo, antes de la administración, se puede mezclar una suspensión acuosa de partículas hinchadas que contienen el fármaco absorbido con un agente radiopaco líquido usado convencionalmente con agentes embólicos, por ejemplo, lipiodol, en cantidades en el intervalo de 2:1 a 1:2, preferentemente

40

aproximadamente 1:1 en volumen.

Se dan detalles adicionales de esto en el documento WO 04/071495.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un esquema que muestra que, a medida que disminuyen los niveles del oxígeno que alimenta al tumor, como consecuencia, aumenta la presencia de factores de crecimiento, ya que el tumor se vuelve hipóxico y, por consiguiente, aumenta de tamaño.

- 10 La Figura 2A muestra la distribución del tamaño de las microesferas de macrómero de PVA solo.
La Figura 2B muestra la distribución del tamaño de las microesferas de macrómero de PVA con un 1,7 % de BAC.
La Figura 3 muestra la distribución del tamaño de las microesferas de macrómero de PVA con un 4 % de BAC.
La Figura 4 muestra la distribución del tamaño de las microesferas de macrómero de PVA con un 8 % de BAC.
La Figura 5 muestra la distribución del tamaño de las microesferas de macrómero de PVA con un 2 % de BALC.
- 15 La Figura 6 muestra la distribución del tamaño de las microesferas de macrómero de PVA con un 4 % de BALC.
La Figura 7 muestra la distribución del tamaño de las microesferas de macrómero de PVA con un 8 % de BALC.
La Figura 8 muestra la distribución del tamaño de las microesferas de macrómero de PVA con un 15 % de BALC.
La Figura 9 muestra el porcentaje de microesferas de BALC entrecruzadas frente a la carga de doxorubicina.
La Figura 10 muestra un imagen de microesferas cargadas después del lavado de la doxorubicina.
- 20 La Figura 11 muestra un barrido del efecto del DTT sobre la doxorubicina a lo largo del tiempo.
La Figura 12A muestra un perfil de elución de la doxorubicina desde microesferas de BALC al 31 %.
La Figura 12B muestra el porcentaje de liberación de un perfil de elución: BALC reducida frente a BALC no reducida.
La Figura 13 muestra la diferencia porcentual de microesferas de BALC reducidas y no reducidas.
La Figura 14A muestra una imagen de microscopía óptica de micropartículas de BALC al 100%.
- 25 La Figura 14B muestra una imagen de micropartículas de BALC al 100 % decantando en agua.
La Figura 15 muestra el tamaño de las microesferas de BALC al 45 % antes y después de la reducción.
La Figura 16 muestra un perfil de elución del irinotecán desde microesferas de BALC al 31 % (N=3).
La Figura 17 muestra microesferas de BALC cargadas con rapamicina.
La Figura 18 muestra microesferas de BALC cargadas con diclofenaco.
- 30 La Figura 19 muestra la elución de doxorubicina desde micropartículas de BALC-HEMA.
La Figura 20A muestra micropartículas de BALC-HEMA cargadas con fármaco antes de la elución.
La Figura 20B muestra micropartículas de BALC-HEMA durante la elución en un ambiente normal.
La Figura 20C muestra micropartículas de BALC-HEMA durante la elución en un ambiente reductor.
La Figura 21 muestra la elución de doxorubicina desde micropartículas de BALC-AA.
- 35 La Figura 22 A muestra micropartículas de BALC-ácido acrílico cargadas con fármaco antes de la elución.
La Figura 22 B muestra micropartículas de BALC-ácido acrílico durante la elución en un ambiente normal.
La Figura 22 C muestra micropartículas de BALC-ácido acrílico durante la elución en un ambiente reductor.

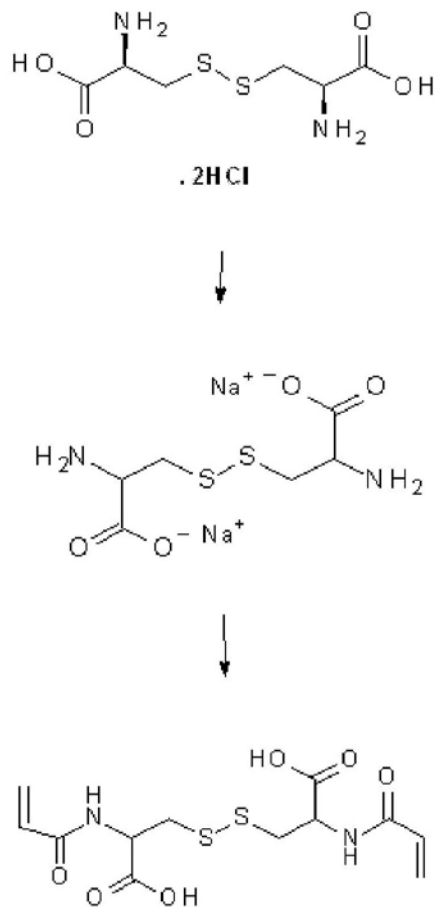
EJEMPLOS

40

Ejemplo 1: Descripción en líneas generales del método de síntesis del entrecruzador por puentes disulfuro *N,N'*-bis acrililoil-(L)-cistina (BALC)

Se preparó el entrecruzador por puentes disulfuro denominado BALC (fórmula química: $C_{12}H_{16}O_6N_2S_2$) usando un ejemplo modificado presentado en el documento "New poly(amido amine)s containing disulfide linkages in their main chain." (2005). Journal of polymer science Part A: polymer chemistry. Vol 43, Issue 7. Pages 1404-1416.

El procedimiento incluyó la amidación y diacrililación de diclorhidrato de cistina (esquema 1).



Esquema 1: síntesis de bisacrililoil-L-cistina

10

En un matraz de 500 mL de 3 bocas, que estaba equipado con un agitador superior a través de la salida media, se disolvieron 12,1 g de diclorhidrato de cistina y 15 mg de radicales libres 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo, (TEMPO) en 50 mL de agua. El matraz se colocó en un baño maría, la mezcla se enfrió hasta 0-5 °C con hielo y se observó la temperatura con un termómetro de vidrio. Se ajustó el agitador superior a 150 rpm y se mantuvo la temperatura a 0-5 °C durante toda la adición de los materiales.

Se colocaron dos embudos de adición, uno a cada lado del agitador. Uno de los embudos de adición contenía una combinación de 10 mL de diclorometano y cloruro de acrililoilo 10 M. El otro embudo de adición contenía NaOH 6 M. En primer lugar, se añadió NaOH 6 M, gota a gota, hasta que el pH cayó a 8-10 y se mantuvo ese pH durante toda la adición, en la cual se acumularon aproximadamente 50 mL de NaOH. Una vez que el pH era correcto, se añadió
5 manualmente la solución de cloruro de acrililoilo, gota a gota, durante un periodo de 1 hora y 30 minutos. Una vez que terminó la adición, se dejó agitando la mezcla a temperatura ambiente durante 3 horas más. Una vez que se completó la agitación, se ajustó el pH a 1-2.

La mezcla se congeló toda la noche y, a continuación, se liofilizó. Una vez que la liofilización había terminado, se
10 añadió acetona al polvo blanco y se filtró todo el NaCl. Se eliminó toda la acetona, se secó la muestra y, a continuación, se añadió metanol. Una vez añadido el metanol, se sometió la solución a evaporación rotativa y, finalmente, en este método, se obtuvo una gran cantidad de polvo blanco.

En este procedimiento se obtuvieron 10,15 g de entrecruzador, con un rendimiento del 58 %.

15

Se llevó a cabo un análisis de la estructura de la BALC usando RMN ¹H, que mostró picos de protón a 6,3 ppm para H2, 6,24 ppm para H3, 5,8 ppm para H1, 4,7 ppm para H5, 3,3 ppm para H6 y 3,0 ppm para H7.

Se llevó a cabo un análisis de la estructura de la BALC usando RMN ¹³C, que mostró picos de carbono a 175 ppm
20 para C6, 168 ppm para C3, 129 ppm para C2, 128 ppm para C1, 53 ppm para C4 y 39 ppm para C5.

Se llevó a cabo un análisis de la estructura de la BALC usando espectroscopía de masas con ionización por electronebulización, el cual confirmó el peso molecular de 348.

25 **Ejemplo 2: Síntesis de microesferas entrecruzadas con *N,N'*-bis(acrililoil)cistamina (BAC)**

Las microesferas de la invención se fabricaron mediante polimerización por suspensión inversa en un vaso encamisado de 2 litros con un agitador superior.

30 La fase orgánica estaba compuesta por 600 g de acetato de n-butilo y 11,5 g de acetato-butilato de celulosa. Se purgó el vaso con nitrógeno y se utilizó una velocidad de agitación de aproximadamente 400 rpm.

La fase acuosa consistió en un macrómero de Nelfilcon B, un macrómero polimerizable del ampliamente usado polímero de PVA hidrosoluble, que se modifica con N-acriloilaminoacetaldehído. Es este macrómero de PVA
35 funcionalizado, que está fuertemente entrecruzado con un entrecruzador por puentes disulfuro, el que produce una microesfera que contiene enlaces cruzados disulfuro reducibles. El contenido de agua de la fase acuosa se completó hasta 130 g.

El agente de entrecruzamiento por puentes disulfuro de este ejemplo se adquirió en Sigma Aldrich Inc. La cantidad
40 de entrecruzador se predeterminó mediante cálculo de un porcentaje en base al contenido en peso seco de la fase

acuosa. Se produjeron series de microesferas entrecruzadas al 1,7 %, 4 % y 8 %.

En el caso de la bis(acriloil)cistamina, debido a su naturaleza hidrofóbica, el entrecruzador se disolvió en la cantidad de agua que se iba a añadir para formar la fase acuosa. El entrecruzador se disolvió mediante calentamiento, 5 asegurándose de no superar el punto de fusión del entrecruzador. A continuación, se permitió que enfriara el agua y se disolvió la solución en el macrómero.

La incorporación del entrecruzador al macrómero de PVA se realizó usando un iniciador térmico. Después de 2 horas, la síntesis de las perlas con capacidad de respuesta a estímulos se había completado y se retiraron del vaso 10 mediante un procedimiento de limpieza con acetato de etilo y acetona. El tamaño de las microesferas se pudo calibrar hasta un tamaño deseado mediante alteración de la velocidad del agitador.

Después de retirarlas del vaso, se lavaron las perlas y se limpiaron para eliminar cualquier posible residuo de acetona. Después de hidratarlas, se secaron las microesferas usando un horno y se trituraron. Se usó análisis 15 elemental para confirmar la incorporación del entrecruzador en base al contenido de azufre.

Análisis elemental de microesferas solo a base de macrómero de PVA (sin entrecruzador)

| ELEMENTO | C | H | N | S |
|----------------|-------|------|------|-------|
| % teórico | 53,64 | 9,04 | 1,53 | 0 |
| % encontrado 1 | 52,17 | 9,04 | 0,30 | <0,10 |
| % encontrado 2 | 52,36 | 9,03 | 0,29 | <0,10 |

20 Microesferas de BAC al 1,7 %

| ELEMENTO | C | H | N | S |
|----------------|-------|------|------|------|
| % teórico | 53,74 | 9,03 | 1,69 | 0,42 |
| % encontrado 1 | 53,22 | 9,10 | 0,51 | 0,85 |
| % encontrado 2 | 53,15 | 9,15 | 0,51 | 0,92 |

Microesferas de BAC al 4 %

| ELEMENTO | C | H | N | S |
|----------------|-------|------|------|------|
| % teórico | 53,87 | 9,02 | 1,92 | 0,99 |
| % encontrado 1 | 53,24 | 8,84 | 0,83 | 1,35 |
| % encontrado 2 | 53,13 | 8,93 | 0,84 | 1,42 |

25

Microesferas de BAC al 8 %

| ELEMENTO | C | H | N | S |
|----------------|-------|------|------|------|
| % teórico | 54,10 | 8,99 | 2,3 | 1,98 |
| % encontrado 1 | 52,54 | 8,86 | 1,37 | 2,32 |
| % encontrado 2 | 52,62 | 8,99 | 1,42 | 2,33 |

Ejemplo 3: Síntesis de microesferas entrecruzadas con N,N'-bis(acriloil)-(L)-cistina

Se fabricaron microesferas de la invención mediante polimerización por suspensión inversa, de prácticamente la misma forma que en el Ejemplo 2.

En este ejemplo se sintetizó la BALC de forma interna. El entrecruzador era hidrofílico y muy soluble en agua, a diferencia de la BAC; por lo tanto, en la síntesis de microesferas de BALC no se necesitó calentamiento para disolver el entrecruzador en agua. Debido a la naturaleza hidrofílica del entrecruzador, se pudo aumentar drásticamente el porcentaje de incorporación a las microesferas desde el 0 % hasta esencialmente el 100 % de microesferas de BALC entrecruzadas.

Después de fabricar las microesferas del Ejemplo 3, se lavaron y limpiaron tal y como se describe en el Ejemplo 2. De nuevo, para confirmar la incorporación del entrecruzador por puentes disulfuro en la microesfera, se llevó a cabo análisis elemental de las diferentes formulaciones de microesferas de BALC. Sin embargo, en lugar de secar las microesferas en un horno y triturarlas, lo cual se realizó con las microesferas de BAC, se empleó un liofilizador en su lugar.

Análisis elemental de microesferas solo a base de macrómero de PVA - sin entrecruzador

20

| ELEMENTO | C | H | N | S |
|----------------|-------|------|------|-------|
| % teórico | 53,6 | 9,04 | 1,53 | 0 |
| % encontrado 1 | 52,52 | 9,26 | 0,60 | <0,10 |
| % encontrado 2 | 52,83 | 9,42 | 0,61 | <0,10 |

Microesferas de BALC al 4 %

| ELEMENTO | C | H | N | S |
|----------------|-------|------|------|------|
| % teórico | 53,1 | 8,8 | 1,7 | 0,9 |
| % encontrado 1 | 51,99 | 8,48 | 1,16 | 1,36 |
| % encontrado 2 | 51,90 | 8,68 | 1,14 | 1,29 |

25 Microesferas de BALC al 15 %

| ELEMENTO | C | H | N | S |
|----------|---|---|---|---|
|----------|---|---|---|---|

| | | | | |
|-----------------------|-------|------|------|------|
| % teórico | 51,8 | 8,4 | 2,4 | 2,7 |
| % encontrado 1 | 50,67 | 8,38 | 2,04 | 2,82 |
| % encontrado 2 | 50,50 | 8,33 | 2,17 | 2,74 |

Microesferas de BALC al 31 %

| ELEMENTO | C | H | N | S |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|
| % teórico | 49,8 | 7,8 | 3,5 | 5,6 |
| % encontrado 1 | 48,66 | 7,81 | 3,14 | 5,31 |
| % encontrado 2 | 48,36 | 7,73 | 3,13 | 5,35 |

5 Ejemplo 4: Reducción y dimensionamiento de microesferas de BAC.

Después de la síntesis de las microesferas de BAC, se llevaron a cabo estudios adicionales de caracterización enfocados al tamaño de las microesferas y su potencial para expandir en un ambiente reductor.

- 10 Debido a la incorporación de enlaces disulfuro cruzados en toda la estructura de la microesfera, en un ambiente reductor, los enlaces disulfuro se deberían escindir llevando a un aumento del diámetro de la microesfera. En teoría, este aumento de diámetro debería llevar a una embolización mucho más eficiente del vaso diana.

Las nuevas microesferas deberían actuar como un embólico permanente y no deberían degradarse en la reducción del entrecruzador por puentes disulfuro. Las microesferas son mantenidas en su lugar por la cadena principal de PVA.

Las microesferas se redujeron usando un ejemplo modificado presentado en el documento "Redox-Cleavable star cationic PDMAEMA by arm-first approach of ATRP as a nonviral vector for gene delivery," (2010) Biomaterials, Volume 3, Pages 559-569

De cada formulación de microesfera, se colocó 1 mL de microesferas en un vial de 10 mL con 1 mL de agua destilada.

- 25 A continuación, se transfirieron las microesferas a un plato de vidrio para su dimensionamiento manual bajo un microscopio óptico.

A continuación, se transfirieron las mismas microesferas de vuelta al vial de vidrio y se añadieron 1,5 mL de NaBH₄ al 4 % a las perlas para escindir los puentes disulfuro.

30

A continuación, se dejaron las perlas en un baño maría a 37 °C durante 1 hora.

Después de transcurrida 1 hora, se retiraron los viales del baño maría y se realizó un procedimiento constante de

lavado con agua destilada hasta que se eliminó todo el NaBH_4 .

Una vez que se había lavado todo el agente reductor, las microesferas se volvieron a colocar en platos de vidrio y se volvieron a analizar al microscopio óptico usando el mismo método que antes.

5

Una vez que se dimensionaron todas las microesferas, se recogieron los datos en dos grupos de perlas, antes de la reducción y después de la reducción (Figuras 2A-4). Las microesferas de macrómero de solo PVA se usaron como grupo de control en el que no se esperaba cambio de tamaño alguno.

10 **Ejemplo 5: Reducción y dimensionamiento de microesferas de BALC**

La reducción y el dimensionamiento de las microesferas de BALC se llevó a cabo usando exactamente el mismo método que el usado para las microesferas de BAC. Los resultados se muestran en las Figuras 5-8.

15 **Ejemplo 6: Máxima capacidad de carga de fármaco de microesferas de BALC con doxorubicina**

Debido al uso del entrecruzador por puentes disulfuro BALC, hay dos grupos ácido carboxílico fijados al monómero. A pH neutro, los grupos carboxílicos se desprotonan dejando grupos carboxilato cargados negativamente que se unen a fármacos cargados positivamente.

20

Se llevaron a cabo experimentos para confirmar la capacidad de unión y la máxima capacidad de unión de fármaco a las microesferas de BALC.

Debido a los dos grupos carboxilato, se asumió una capacidad de unión teórica en base a una relación 2:1 de fármaco a monómero.

25

Se colocó 1 mL de microesferas de cada formulación de microesferas de BALC en respectivos viales de vidrio de 10 mL. También se colocó 1 mL de microesferas de solo PVA en un vial de vidrio para ser usado como control.

30 En base a la capacidad de unión teórica, se añadió un exceso de clorhidrato de doxorubicina a cada vial con un valor constante de $60 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ por vial.

A continuación, se dejaron a cargar las microesferas durante la noche, con agitación constante sobre un agitador.

35 A continuación, se detuvo el agitador y se retiró todo el fármaco restante de los viales usando una pipeta de vidrio y se colocó en un vial independiente para su análisis. Entonces, las microesferas tenían 10 mL de agua destilada añadida y se dejaron sometidas a agitación. Posteriormente, se retiraron los 10 mL de agua contaminada con fármaco y se colocaron en un vial, para su análisis, y se volvieron a añadir 10 mL de agua destilada fresca a las microesferas.

40

Este proceso, conocido como lavado de la doxorubicina, se realizó múltiples veces hasta que fue evidente que las microesferas no estaban liberando más fármaco y que el agua había perdido el obvio color rojo del fármaco doxorubicina.

5 A continuación, se analizaron las muestras de fármaco recogidas del lavado de la doxorubicina usando espectroscopía UV-Vis para determinar la cantidad exacta de fármaco retirada de los viales, la cual a su vez revela la capacidad de unión de las microesferas de BALC.

Se usó una solución estándar de concentración de doxorubicina conocida para confirmar la cantidad exacta de doxorubicina añadida a los viales y se usaron los mismos estándares para determinar la cantidad exacta de fármaco retirado de los viales. El valor de la última fue restado de la cantidad inicial de fármaco añadido para determinar la cantidad de fármaco unido a las microesferas de BALC (Figura 9).

Tabla 1: Cantidades de doxorubicina cargadas

| % de microesferas de BALC entrecruzadas | mg.mL ⁻¹ teóricos | mg.mL ⁻¹ reales |
|---|------------------------------|----------------------------|
| 0 | 0 | 2,1 |
| 2 | 2,5 | 5,44 |
| 4 | 5,2 | 8,57 |
| 8 | 10,4 | 11,25 |
| 15 | 19,5 | 14,69 |

15

Las microesferas de control no absorbieron activamente fármaco alguno; sin embargo, la doxorubicina tiñó las perlas y los objetos de vidrio. (Véase la Figura 10)

Después del análisis de los resultados de carga, para aumentar aún más la cantidad de fármaco cargado, se llevó a cabo un experimento de carga n=4 usando una formulación con un contenido de BALC más elevado (microesferas de BALC al 31 %).

De nuevo, el mismo método que se usó para determinar la capacidad de carga de las otras formulaciones de microesferas de BALC, se usó para determinar la capacidad de carga de las microesferas de BALC al 31 %.

25

Tabla 2: Microesferas de BALC cargadas con doxorubicina

| Reproducción de BALC al 31 % | Doxorubicina cargada (mg.mL ⁻¹) |
|------------------------------|---|
| 1 | 34,2 |
| 2 | 39,7 |
| 3 | 41,6 |
| 4 | 37,8 |

Máxima capacidad de carga media de las microesferas de BALC al 31 % = 38,3 mg.mL⁻¹

Ejemplo 7: Elución del fármaco desde microesferas de BALC

Después de cargar las microesferas de BALC de acuerdo con el Ejemplo 6, se determinó la cinética de liberación del fármaco de las perlas.

5

La hipótesis nula presentada antes del ensayo fue que en un ambiente hipóxico (reductor), el disulfuro experimenta una escisión rápida, con una escala temporal de minutos a horas, en la que la degradación química de respuesta rápida lleva a una mejora significativa de la liberación del fármaco desde las microesferas en comparación con aquellas en un ambiente no reductor.

10

El experimento *in vitro* se presentó para reproducir la posible acción de las microesferas de BALC cargadas con fármaco en un ambiente de hipoxia *in vivo*.

En primer lugar, se llenaron seis viales de vidrio de 10 mL con 1 mL de microesferas de BALC al 31 % sin cargar. A continuación, se cargaron estas microesferas hasta su máxima capacidad de carga, con una media de $38,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, y se cargaron usando el método del Ejemplo 6. Una vez que se había lavado toda la doxorubicina, se mantuvieron las microesferas en sus viales independientes en agua destilada hasta el inicio de la elución.

A continuación, se tomaron seis jarras marrones de 220 mL y se llenaron con 200 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBSS). Estas jarras se colocaron en un plato agitador magnético con un agitador magnético en cada jarra.

El ditioneitol (DTT) es un agente reductor de puentes disulfuro suave y se usa para mantener los grupos disulfuro en su estado reducido de tiol. Este fue el agente reductor seleccionado, ya que los barridos por espectroscopía UV-Vis mostraron que el DTT no altera la estructura de la doxorubicina con el tiempo. Se añadió una alta concentración de DTT a la doxorubicina y se realizó un barrido a intervalos de tiempo de 1 hora usando un espectrofotómetro UV-Vis. Después de 17 horas de exposición al DTT, había muy poco cambio en la absorbancia de la doxorubicina desde el principio hasta el final (Figura 11).

Para producir un ambiente reductor para las microesferas de BALC, se añadió DTT 50-60 mM a tres de las jarras marrones. El DTT se calculó para que estuviera en un exceso 10 molar con respecto al entrecruzador por puentes disulfuro. Las tres jarras marrones restantes se dejaron como PBS y actuaron como control, mostrando la elución de las microesferas de BALC en un ambiente no reductor.

A las 0 horas, se usaron 5 mL del medio de elución para retirar las microesferas de BALC de los viales y se añadieron a las jarras marrones. En este momento, empezó la elución.

Durante la liberación, a ciertos intervalos de tiempo, se tomaron muestras de 5 mL del medio de elución que contenía doxorubicina procedente de las microesferas de BALC para su análisis mediante espectroscopía UV-Vis. Inmediatamente después de la retirada del medio de elución de la jarra, se añadieron 5 mL de medio de elución de

PBS fresco a las tres jarras marrones que contenían el ambiente no reductor. También se añadieron 5 mL de PBS con DTT a las tres jarras marrones que contenían el ambiente reductor. Esto ayudó a preservar el ambiente reductor y a mantener los tioles en estado reducido.

- 5 Se calculó la cantidad exacta de fármaco liberado desde las perlas en los dos ambientes usando soluciones estándar de concentración de doxorubicina conocida. Los resultados se muestran en las Figuras 12A y 12B.

Después de la elución n=3 usando DTT, se usó un enfoque modelo-independiente usando un factor de similitud para determinar si las eluciones eran significativamente diferentes.

10

Las ecuaciones para determinar si la elución es significativamente diferente o no se encuentran en el documento *Guidance for Industry Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*. Entre los diversos métodos investigados para la comparación de perfiles de disolución, f_2 es el más sencillo. Moore y Flanner propusieron un enfoque matemático modelo-independiente para comparar el perfil de disolución usando dos factores, f_1 y f_2 (1).

$$f_1 = \{[\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|] / [\sum_{t=1}^n R_t]\} \cdot 100$$

$$f_2 = 50 \cdot \log\{[1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0.5} \cdot 100\}$$

donde R_t y T_t son los porcentajes acumulativos disueltos, en cada uno de los n intervalos de tiempo, del producto de referencia y el producto de ensayo, respectivamente. El factor f_1 es proporcional a la diferencia media entre los dos perfiles, donde como el factor f_2 es inversamente proporcional a la diferencia cuadrática media entre los dos perfiles, con énfasis en la mayor diferencia entre todos los intervalos de tiempo. El factor f_2 mide la cercanía entre los dos perfiles. Debido a la naturaleza de la medición, f_1 se describió como factor de diferencia y f_2 como factor de similitud (2). En comparaciones de perfiles de disolución, especialmente para garantizar la similitud de comportamiento del producto, el interés regulador se centra en conocer cómo de similares son las curvas y en tener una medida que sea más sensible a diferencias grandes en cualquier intervalo de tiempo concreto. Por este motivo, la comparación de f_2 ha sido la prioridad de las directrices de la agencia.

Las directrices establecen que para curvas que se consideren similares, los valores de f_1 deberían ser próximos a 0 y los valores de f_2 deberían ser próximos a 100. Generalmente, los valores de f_1 de hasta 15 (0-15) y los valores de f_2 superiores a 50 (50-100) garantizan similitud o equivalencia de las dos curvas y, por tanto, del resultado de los productos de ensayo (poscambio) y de referencia (precambio).

Si los valores de f_1 no están por debajo de 15 y los valores de f_2 no están por encima de 50, entonces, se puede aceptar que la elución es significativamente diferente.

Tabla 3: Datos de similaridad de elución

| | | Comparación del eluido total promedio | Comparación del porcentaje eluido promedio |
|---------|--------|--|---|
| > 50 | F 2 | 94,2 | 81,0 |
| < 15 | F 1 | 37,21 | 36,69 |

El ensayo de disolución muestra que aunque f_2 es superior a 50, f_1 no es inferior a 15 y, por lo tanto, las dos eluciones son significativamente diferentes.

5

Se llevó a cabo el mismo experimento de elución del fármaco usando 2-mercaptoetanol como agente reductor en lugar de DTT, y se llevó a cabo con cada formulación de microesferas de BALC. De nuevo, los resultados mostraron que había una diferencia de elución entre las microesferas de BALC que estaban reducidas y las que no estaban reducidas. Se seleccionó un intervalo de tiempo de 360 minutos para comparar la diferencia porcentual entre las eluciones con cada formulación de BALC, para ver el porcentaje eluido a partir de cada formulación comparado con los demás (Figura 13).

De nuevo, los resultados muestran una diferencia porcentual considerable entre la elución reducida y sin reducir, lo que corrobora los resultados anteriores. La gráfica también indica una posible tendencia de la cinética de disolución a la carga de más doxorubicina.

Las microesferas se pueden separar del vehículo de hinchamiento, filtrar y secar. Se dan detalles de procedimientos adecuados en el documento WO 04/071495.

La composición que se administra a un paciente, que tiene un tumor sólido, por ejemplo un carcinoma hepatocelular, con necesidad de emboloterapia es una suspensión acuosa de partículas hinchadas que contienen el fármaco absorbido. Con frecuencia, es deseable que la suspensión esté mezclada con un agente de diagnóstico por imagen, tal como un agente radiopaco convencional, antes de su liberación, tal y como se usa para composiciones embólicas de tipo gel. Por ejemplo, inmediatamente antes de la administración, se puede mezclar una suspensión acuosa de partículas hinchadas que contienen el fármaco absorbido con un agente radiopaco líquido usado convencionalmente con agentes embólicos, por ejemplo, lipiodol, en cantidades en el intervalo de 2:1 a 1:2, preferentemente aproximadamente 1:1 en volumen.

Se dan detalles adicionales de esto en el documento WO 04/071495.

30

Ejemplo 8: Síntesis de micropartículas de BALC con porcentajes de entrecruzamiento altos

La BALC es muy reactiva debido a sus grupos acrilato y, aunque es soluble en agua, a medida que la concentración

de BALC aumenta, su adición al agua se puede ver comprometida si se añade demasiado rápidamente. Se ha observado que la BALC puede gelificar cuando se añaden cantidades grandes al agua. En este momento, se asume que la BALC ha polimerizado y ya no es soluble en agua. Por lo tanto, la BALC se debe añadir en cantidades muy pequeñas al volumen predeterminado de agua. Solo se puede añadir más BALC a la solución una vez que se ha disuelto completamente la BALC. Una vez disuelta completamente, la BALC se dispersa en el macrómero de PVA y se coloca en una mezcladora de rodillos durante 10 minutos. Para incorporar correctamente la BALC, es necesario reducir la cantidad de iniciador térmico añadida a la reacción, según lo indicado en anteriores formulaciones de BALC más bajas. Reduciendo la cantidad de iniciador térmico en la etapa de síntesis hasta un décimo de su valor original es posible aumentar con éxito la cantidad de BALC en el interior de las microesferas.

10

Usando la técnica existente, y un mayor tiempo de reacción debido a la cantidad más baja de iniciador, se han producido perlas de BALC del 0,5-100 %. Debido a la insolubilidad de la BALC en la fase orgánica, es posible producir estas microesferas con una pérdida mínima de producto, ya que el entrecruzador no se parte en la fase orgánica a medida que polimeriza. Prácticamente toda la BALC introducida en el sistema se incorpora a las perlas.

15 El análisis elemental que se muestra a continuación se encuentra dentro del ± 10 % de la formulación teórica, que es típica de sistemas poliméricos e ilustra la síntesis con éxito de una microesfera de BALC al 45 %.

Tabla 4: Análisis elemental de microesferas de BALC al 45 %

| ELEMENTO | C | H | N | S |
|----------------|-------|------|------|------|
| % teórico | 48,4 | 7,2 | 3,7 | 8,1 |
| % encontrado 1 | 45,83 | 7,30 | 3,62 | 7,96 |
| % encontrado 2 | 45,65 | 7,19 | 3,67 | 7,97 |

20 Se llevó a cabo un ejemplo adicional retirando todo el macrómero de PVA de la mezcla de reacción, produciendo una microesfera unida únicamente mediante BALC. La Figura 14A muestra una imagen de microscopía óptica de micropartículas de BALC al 100%: La Figura 14B muestra una imagen de perlas de BALC al 100 % decantando en agua. Estas micropartículas son más difíciles de comprimir que las formulaciones anteriores que contenían PVA, pero la formulación es más friable, aunque aún capaz de cargar el fármaco cargado mediante intercambio iónico.

25

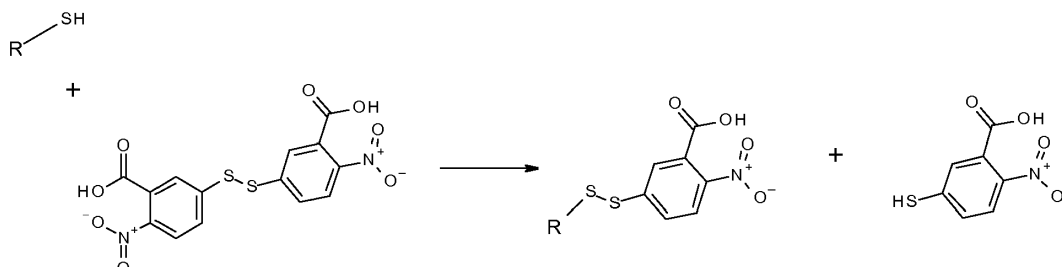
Ejemplo 9: Reducción y dimensionamiento de microesferas de BALC al 45 %

A pesar de que el análisis elemental del ejemplo 8 indicaba que la BALC se había incorporado con éxito a la estructura de la perla, se buscaron más pruebas para apoyar esta suposición y, también, para determinar si el entrecruzador había permanecido intacto en el interior de la estructura de la perla. Esto se llevó a cabo usando un método visual con el uso de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico.

El DTNB (reactivo de Ellman) es un producto químico que se puede usar para cuantificar la cantidad de grupos tiol en una muestra. En este caso, se usó para calificar la presencia de los grupos disulfuro en el interior de la estructura de las micropartículas. Cuando las micropartículas no están en estado reducido, los grupos disulfuro no deberían reaccionar con el reactivo de Ellman, pero cuando las micropartículas están reducidas, los grupos tiol escindirán el

35

puente disulfuro del DTNB para dar 2-nitro-5-tiobenzoato (NTB⁻), el cual se ioniza en agua, a pH neutro y alcalino, para dar el dianión NTB²⁻. El mecanismo de escisión del DTNB a su dianión NTB²⁻ mediante el grupo tiol presente en las micropartículas se puede ver a continuación (esquema 2).



El NTB²⁻ produce un color amarillo que se puede usar para confirmar la incorporación de la BALC. Por lo tanto, el DTNB se añadió a las micropartículas que no estaban reducidas para ver si se observaba un cambio de color. Como no se observó cambio de color, esto implicaría que el BALC estaba en su forma disulfuro o que no se había incorporado la BALC. Por consiguiente, se tomó otro lote de la misma formulación de perla y se redujo con NaBH₄. Después de la reducción, al agente reductor se lavó minuciosamente, asegurándose de que no quedaba nada en las micropartículas, ya que el agente reductor puede provocar un resultado falso por reducción directa del DTNB. Una vez retirado, se añadió el DTNB a las micropartículas reducidas. Se observó un cambio de color inmediato a amarillo para todas las formulaciones. El cambio de color que solo se produce después de la reducción demuestra que la BALC se ha incorporado a la micropartícula en su forma disulfuro. Esto muestra que las micropartículas tienen potencial para responder al ambiente de un tumor hipóxico. Esta respuesta de las formulaciones anteriores a un ambiente reductor se presenta en forma de un aumento de diámetro. Se ensayaron las formulaciones con grado de entrecruzamiento más elevado para determinar si tenían una alteración similar de sus propiedades físicas.

20 Se midió 1 mL de microesferas de BALC al 45 % bajo un microscopio óptico. A continuación, se colocaron las microesferas en un vial con 1 mL de NaBH₄ al 4 %. Se incubó la muestra en un baño maría durante 1 hora a 37 °C. Se retiró el agente reductor tal y como se ha descrito anteriormente y se volvieron a dimensionar las perlas.

Los resultados que se ven en la Fig. 15 demuestran que las formulaciones de microesferas de BALC con mayor grado de entrecruzamiento se comportan exactamente de la misma forma que las formulaciones con menor grado de entrecruzamiento anteriores. Los resultados del dimensionamiento indican que las perlas podían responder a un ambiente hipóxico. Todas las formulaciones anteriores con menor grado de entrecruzamiento tenían un aumento medio de 200 µm, pero las microesferas de BALC al 45 % tuvieron un aumento medio de 300 µm. Esto representa una tendencia potencial a que, a medida que aumenta la cantidad de BALC en una formulación, también lo hace el diámetro de las microesferas, ya que se rompen más enlaces cruzados y aumenta la hinchabilidad de las micropartículas.

Ejemplo 10: Biodegradabilidad de las micropartículas de BALC

Se sintetizaron micropartículas de BALC con la intención de usarlas como un embólico, ocluyendo el vaso diana y dejando al tumor sin suministro de nutrientes. Se cree que, a medida que aumenta el número de enlaces cruzados disulfuro en una formulación, junto con una disminución del contenido de macrómero de PVA, entonces, en algún momento, la formulación se puede biodegradar/reabsorber, ya que la red polimérica se rompe en fragmentos más pequeños tras la reducción de los enlaces cruzados. Se llevaron a cabo análisis de formulaciones de BALC desde el 0-45 % mediante colocación de 1 mL en 200 mL de PBS con un agente reductor inducido por DTT y agitación constante de las perlas con un agitador magnético. El experimento se realizó durante más de 72 horas y, en ese momento, se examinó visualmente la integridad estructural de las microesferas. La mayoría de las perlas de cada formulación parecían intactas en ese momento, excepto un pequeño número de microesferas de la formulación de BALC al 45 %, que parecían haberse partido. Una micropartícula de BALC al 100 % puede ser completamente biodegradable. Puesto que la BALC es el único componente de esta micropartícula, cuando se reduce podría escindirse a su aminoácido cisteína. A tales pesos moleculares bajos, la perla debería desintegrarse y ser absorbida por el cuerpo.

15 **Ejemplo 11: Carga y elución de clorhidrato de irinotecán**

Se cargó 1 mL de microesferas de BALC al 31 % con 38 mg.mL⁻¹ de clorhidrato de irinotecán. Al igual que antes, se colocaron las microesferas cargadas en 200 mL de PBS y se colocó otro 1 mL en PBS con un ambiente reductor proporcionado por el DTT. Se siguió el mismo método que para las eluciones de doxorubicina del ejemplo 7. Los resultados se pueden ver en la Fig.16. Los resultados confirman que, en presencia de un ambiente reductor, los puentes disulfuro se escindirán llevando a un aumento de la velocidad de liberación del irinotecán.

Ejemplo 12: Carga de fármacos cargados no catiónicamente

Hay muchos otros fármacos que pueden ofrecer beneficios clínicos en el tratamiento del cáncer mediante embolización; sin embargo, estos fármacos puede que no posean un grupo cargado positivamente y, por lo tanto, no se cargarán en estas perlas cargadas anióticamente mediante un mecanismo de intercambio iónico. Se llevó a cabo un estudio con el fin de cargar rapamicina en la formulación de microesferas de BALC usando un método alternativo.

Se lavaron las microesferas de BALC en dimetilsulfóxido (DMSO) con una alícuota de 1 mL de microesferas de BALC lavada 5 veces con 1 mL de DMSO. El DMSO provoca que las microesferas hinchen, pero la BALC de la formulación no se escinde. Una vez que habían hinchado, se añadió una solución de 60 mg.mL⁻¹ de rapamicina, disuelta en DMSO, a un volumen de 1 mL de perlas. Se permitió que el fármaco difundiera al interior de la microesfera y, después de 10 minutos, se drenó el exceso de solución y se lavó el sedimento de perla con agua desionizada. Las perlas de BALC tomaban un aspecto blanco a medida que el fármaco precipitaba en el interior de la perla. Las perlas estaban cargadas con 10 mg.mL⁻¹ y el fármaco quedó retenido dentro de la perla en el agua, pero cuando se colocó en una elución de PBS, el fármaco se liberó de las microesferas. La Figura 17 muestra microesferas de BALC cargadas con rapamicina.

También se han cargado las microesferas de BALC con otros fármacos cargados no catiónicamente, tales como la

dexametasona y el diclofenaco usando un procedimiento similar al descrito para la rapamicina. La Figura 18 muestra microesferas de BALC cargadas con diclofenaco.

Ejemplo 13: Síntesis de micropartículas de BALC usando comonómeros distintos del macrómero de PVA

5

También se ha usado la BALC para crear micropartículas de copolímero con el uso de monómeros alternativos. Las micropartículas se fabricaron usando métodos análogos al descrito para las formulaciones de macrómero de PVA + BALC, con el PVA sustituido, en un estudio, por metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) (21 g de HEMA + 2,5 g de BALC) y, en otro estudio, usando ácido acrílico (AA) (21g de AA + 2,5 g de BALC). En ambos ejemplos, se pudieron

10 aislar los productos particulados o similares a perlas.

Ejemplo 14: Carga y elución de doxorubicina desde una formulación de BALC-HEMA

Se colocó una formulación de BALC-HEMA en una solución de baja concentración de doxorubicina para investigar si
15 las micropartículas serían capaces de cargar un fármaco cargado positivamente. 1 mL de BALC-HEMA cargó 8,8 mg.mL⁻¹ de doxorubicina. A continuación, las micropartículas cargadas se usaron para estudiar el perfil de liberación de las micropartículas. Se aplicó el mismo método usado para las formulaciones de BALC-PVA del ejemplo 7. Los resultados se pueden ver en la Fig.19.

20 De nuevo, el perfil de liberación muestra un aumento de la liberación en un ambiente reductor, tal y como se esperaba. Sin embargo, la liberación fue 2,6 veces superior que en el ambiente no reductor. Se tomaron imágenes de las micropartículas antes de la elución (Fig. 20A), durante la elución en un ambiente normal (Fig. 20B) y durante la elución en un ambiente reductor (Fig. 20C). Las fig. 20B y 20C se tomaron a las 6 horas.

25 La Fig. 20 muestra claramente que las partículas permanecen completamente intactas en el ambiente normóxico; sin embargo, las partículas cargadas con fármaco se han degradado completamente en el ambiente reductor liberando toda la carga útil. Esto demuestra que las formulaciones del copolímero de BALC con componentes de menor peso molecular se pueden degradar más rápidamente en un ambiente reductor.

30 Ejemplo 15: Carga y elución de doxorubicina desde una formulación de BALC-AA

Se realizó el mismo experimento que el del ejemplo 14 con la formulación de BALC-ácido acrílico. 1 mL de micropartículas cargaron los 11,6 mg.mL⁻¹ de doxorubicina añadidos. El perfil de elución se puede ver en la Fig. 21.

35 En las primeras 6 horas, solo se observó un ligero aumento de la liberación en un ambiente reductor, y parece que esta formulación tiene una liberación muy lenta. Esto podría ser debido a los sitios de unión extra añadidos por el ácido acrílico y esto se muestra mediante las perlas en un ambiente reductor completamente normal. Sin embargo, en el intervalo de 24 horas del perfil de elución, hay de nuevo un aumento exponencial de la liberación del fármaco en el ambiente reductor. Las observaciones visuales mostraron nuevamente que había claras diferencias de aspecto
40 de las micropartículas en los diferentes ambientes. Se tomaron imágenes de las perlas antes de la elución (Fig.

22 A), durante la elución en un ambiente normal (Fig. 22 B) y durante la elución en un ambiente reductor (Fig. 22C). Las fig. 22 B y 22C se tomaron a las 45 horas.

De nuevo, las perlas permanecieron intactas en un ambiente no reductor, pero nuevamente, las micropartículas se
5 habían degradado en un ambiente reductor llevando a un aumento de la liberación. De nuevo, esto demuestra que las micropartículas con copolímeros con BALC se pueden degradar en un ambiente reductor liberando toda la carga útil.

Ejemplo 16: Biocompatibilidad de micropartículas de BALC no cargadas con fármaco con células del hígado
10 **humano**

Se llevó a cabo un experimento para investigar si las micropartículas provocarían la muerte celular mediante extracción de los materiales fuera de la micropartícula y, por lo tanto, demostración de que no son compatibles con el cuerpo. Se realizó un cultivo de la línea celular HEP G2 y se sembró en una placa de 24 pocillos, con 20 000
15 células/pocillo, con 1 mL de medio de cultivo celular MEM (n=6). Una vez sembrado, se añadieron 10 de las microesferas de BALC al 45 % a cada pocillo y se dejaron a incubar durante un periodo de 24-72 horas. El experimento mostró que las células sobrevivían y se replicaban durante el periodo de incubación en presencia de las microesferas no cargadas con fármaco. Esto muestra que las microesferas son biocompatibles y no tienen efecto citotóxico.

REIVINDICACIONES

1. Micropartículas embólicas para uso en un método de tratamiento mediante embolización donde el fármaco del tratamiento se libera en un ambiente hipóxico, las micropartículas comprenden un cuerpo de gel, donde el cuerpo de gel comprende un polímero sintético y un fármaco, donde las micropartículas tienen un diámetro promedio en el intervalo de 40 a 1500 μm , donde el polímero está entrecruzado mediante grupos que comprenden enlaces disulfuro y está en forma de un hidrogel, donde cada grupo de entrecruzamiento comprende dos grupos cargados catiónicamente o aniónicamente a pH fisiológico, dispuestos simétricamente a cada lado del enlace disulfuro, donde los dos grupos cargados catiónicamente o aniónicamente están asociados electrostáticamente con el fármaco.

2. Micropartículas embólicas para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polímero está entrecruzado mediante un entrecruzador derivado de un agente de entrecruzamiento que tiene la fórmula



donde A y A' se seleccionan independientemente de grupos que pueden formar una unión covalente con el polímero; n y n' son números enteros que varían desde 1 hasta 10; y donde los grupos $-(\text{CH}_2)_n-$ and $-(\text{CH}_2)_{n'}$ están opcionalmente sustituidos por grupos que son capaces de asociarse electrostáticamente con un fármaco catiónico o aniónico.

3. Micropartículas embólicas para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, donde en el método de tratamiento mediante embolización, las micropartículas están expuestas a un ambiente hipóxico, en el que los enlaces disulfuro están escindidos, facilitando la liberación del fármaco.

4. Micropartículas embólicas para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el método de tratamiento mediante embolización es el tratamiento de un tumor.

5. Micropartículas embólicas para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el fármaco se selecciona de entre el grupo que consiste en fármacos antitumorales, fármacos antiangiogénesis, fármacos antifúngicos, fármacos antivirales, fármacos antiinflamatorios, fármacos antibacterianos, fármacos antihistamínicos, fármacos antineoplásicos, enzimas y fármacos antialérgicos y, preferentemente, es un compuesto de antraciclina o camptotecina.

6. Micropartículas embólicas para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las micropartículas son microesferas.

7. Micropartículas embólicas para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polímero es un polímero de base acrílica.

8. Micropartículas embólicas para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el polímero es un polímero de alcohol vinílico.
9. Micropartículas embólicas para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que
5 tienen un diámetro promedio en el intervalo de 40-300 μm .
10. Micropartículas embólicas para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polímero es aniónico y el fármaco es catiónico y está asociado electrostáticamente con el polímero.
- 10 11. Micropartículas embólicas para uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde los grupos que entrecruzan el polímero contribuyen a la carga aniónica sobre el polímero.
12. Micropartículas embólicas para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polímero se forma a partir de un macrómero de PVA.
15
13. Micropartículas embólicas para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las micropartículas son biodegradables.
14. Composición farmacéutica que comprende micropartículas embólicas de acuerdo con cualquiera de
20 las reivindicaciones anteriores.
15. Composición de acuerdo con la reivindicación 14 que comprende además un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable, que comprende preferentemente solución salina fisiológica y/o un agente de contraste visible mediante dispositivos de diagnóstico por imagen, por ejemplo rayos X.
25
16. Uso de micropartículas embólicas como las definidas en cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la fabricación de una composición embólica para uso en un método de tratamiento mediante embolización donde el fármaco se libera desde la micropartícula.
- 30 17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16 donde el método de tratamiento es de un tumor, preferentemente donde el fármaco se libera desde la micropartícula en un ambiente hipóxico.

Figura 1

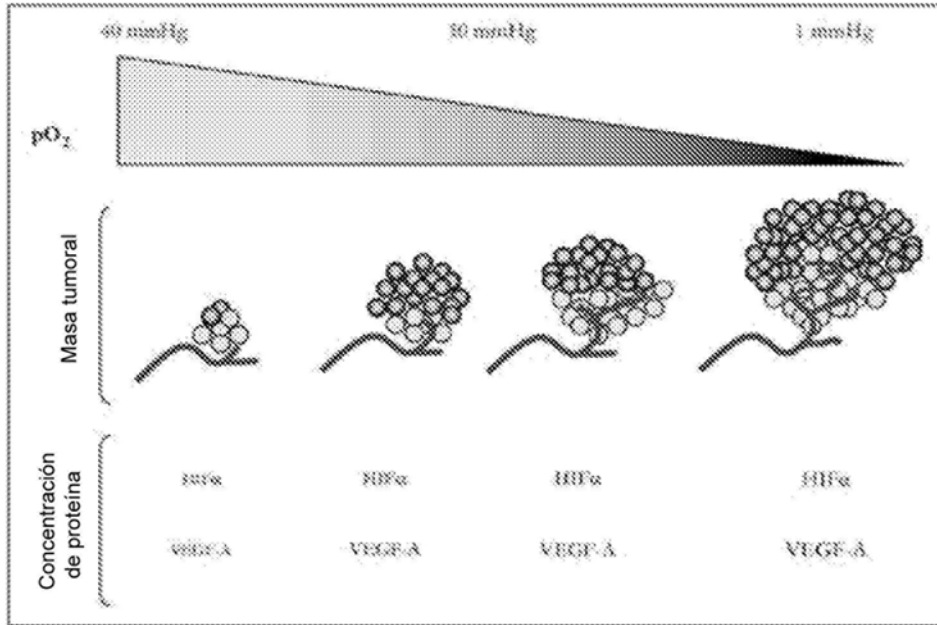


Figura 2A

Solo macrómero de PVA: reducido frente a no reducido (N=200)

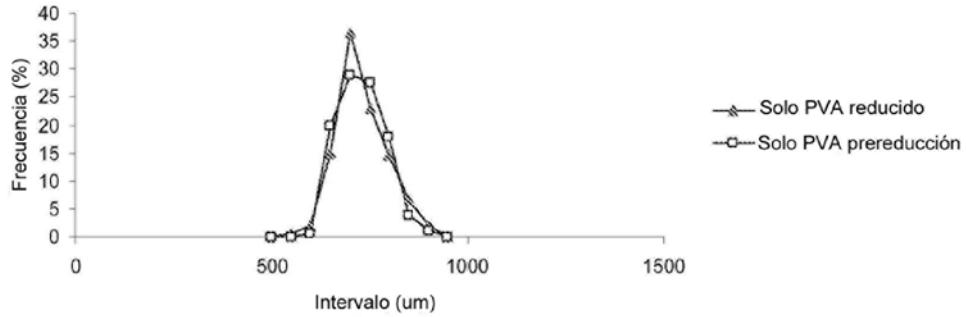


Figura 2B

PVA + BAC al 1,7 %: reducido frente a no reducido (N=200)

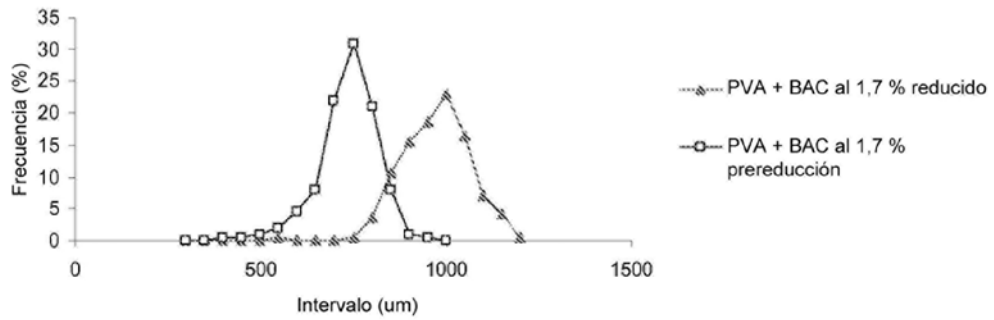


Figura 3

PVA + BAC al 4 %: reducido frente a no reducido (N=200)

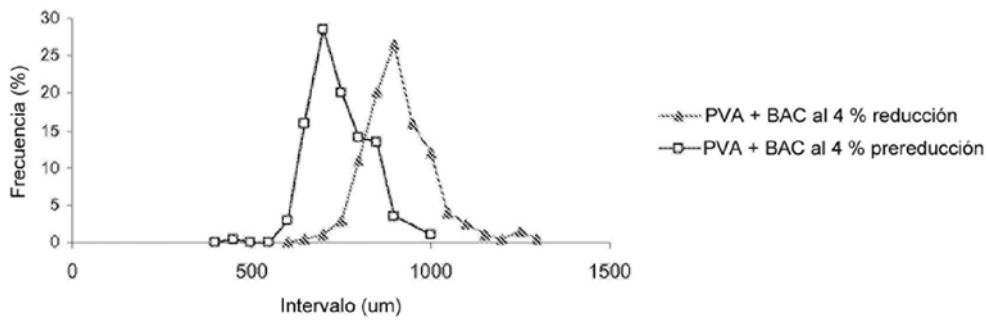


Figura 4

PVA + BAC al 8 %: reducido frente a no reducido (N=200)

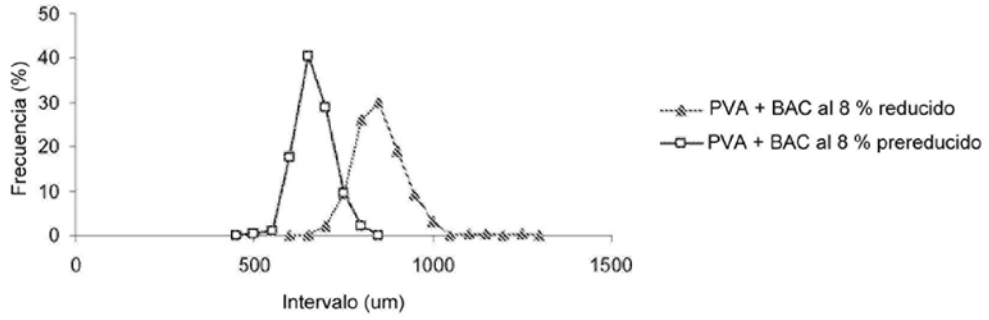


Figura 5

PVA + BALC al 2 %: reducido frente a no reducido (N=200)

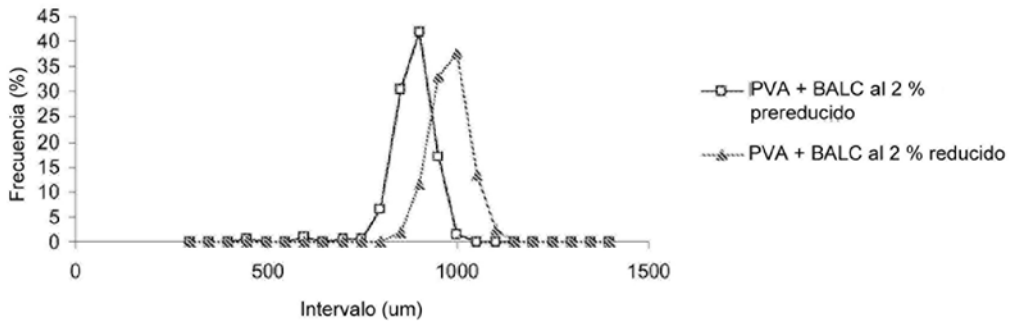


Figura 6

PVA + BALC al 4 %: reducido frente a no reducido (N=200)

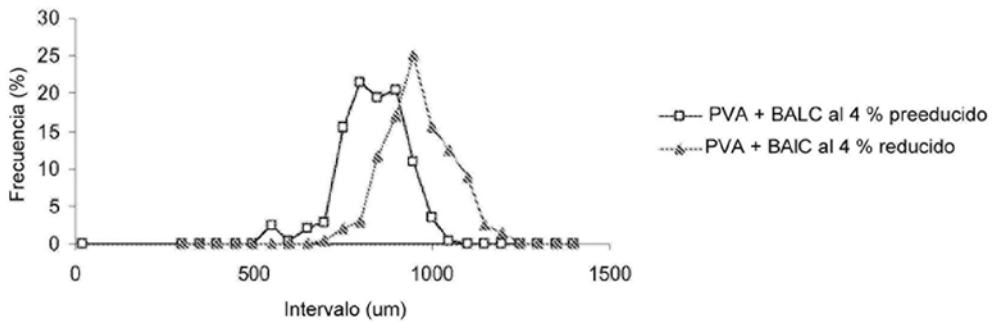


Figura 7

PVA + BALC al 8 %: reducido frente a no reducido (N=200)

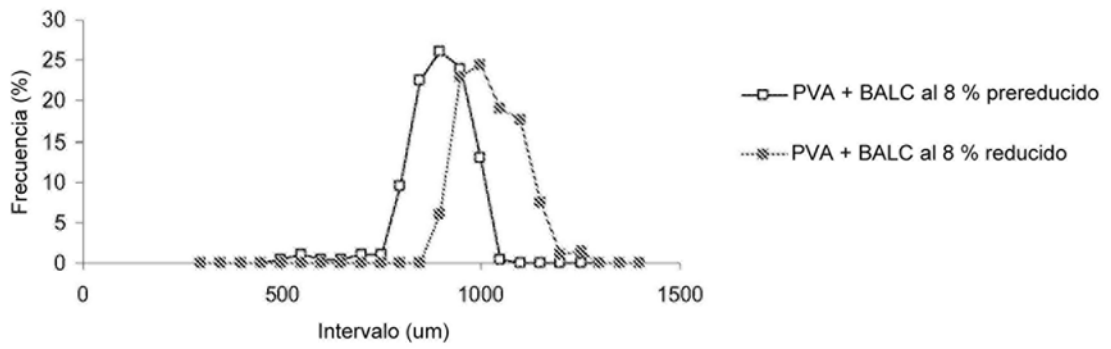


Figura 8

PVA + BALC al 15 %: reducido frente a no reducido (N=200)

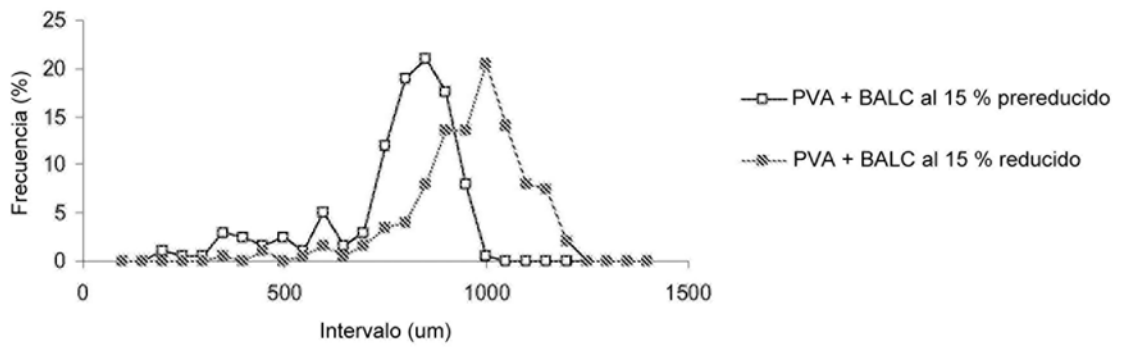


Figura 9

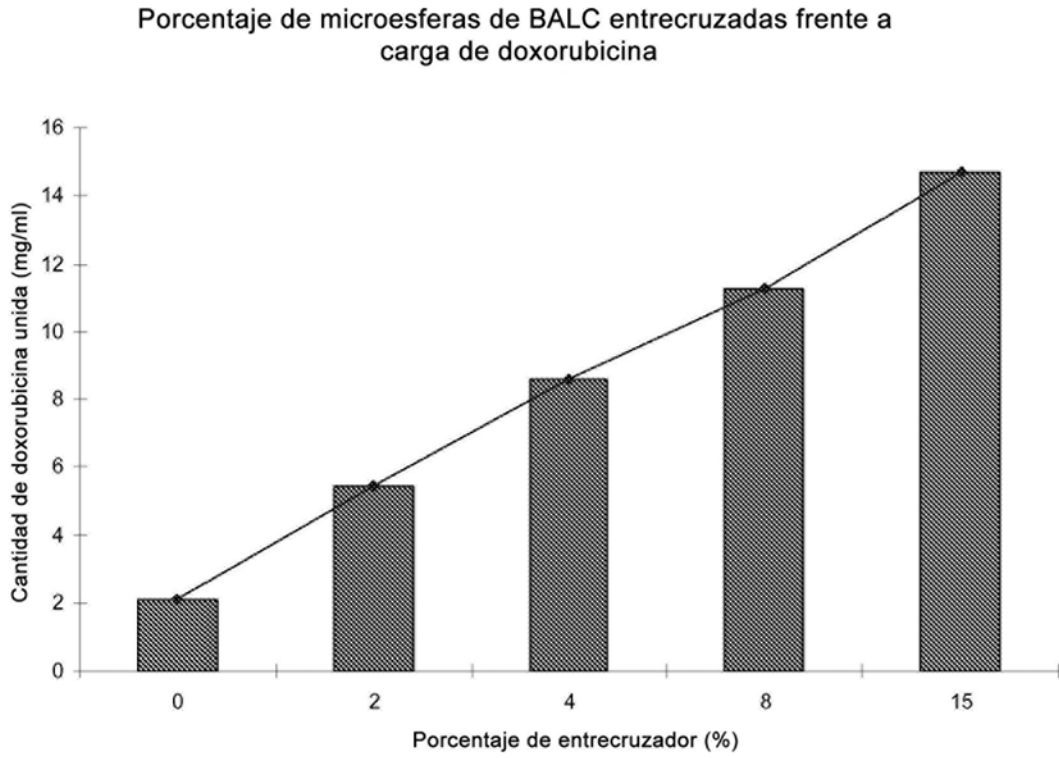


Figura 10: Imagen de perlas cargadas tras lavado de la doxorubicina. De izquierda a derecha: microesferas de BALC al 0 %, 2 %, 4 %, 8 % y 15 %



Figura 11

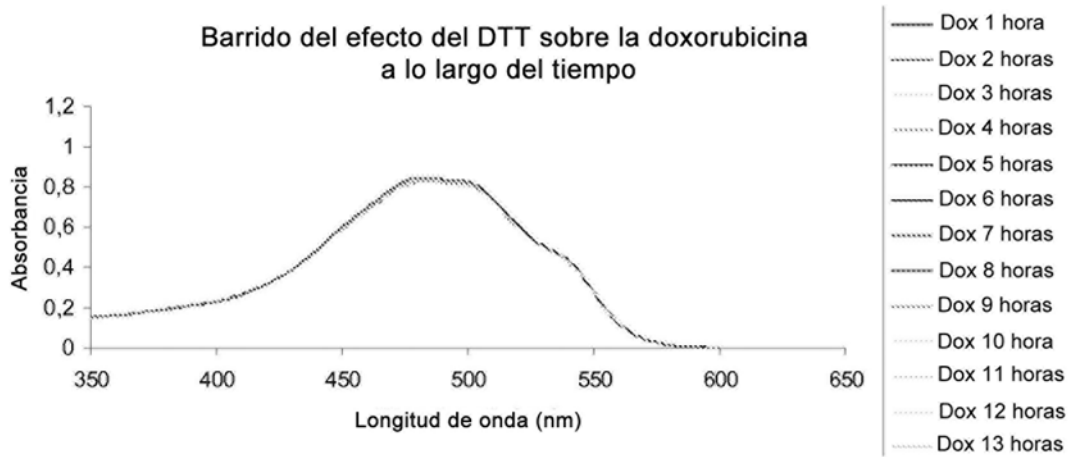


Figura 12A: perfil de elución de la doxorubicina a partir de microesferas de BALC al 31 %

Perlas al 31 %: reducidas frente a no reducidas

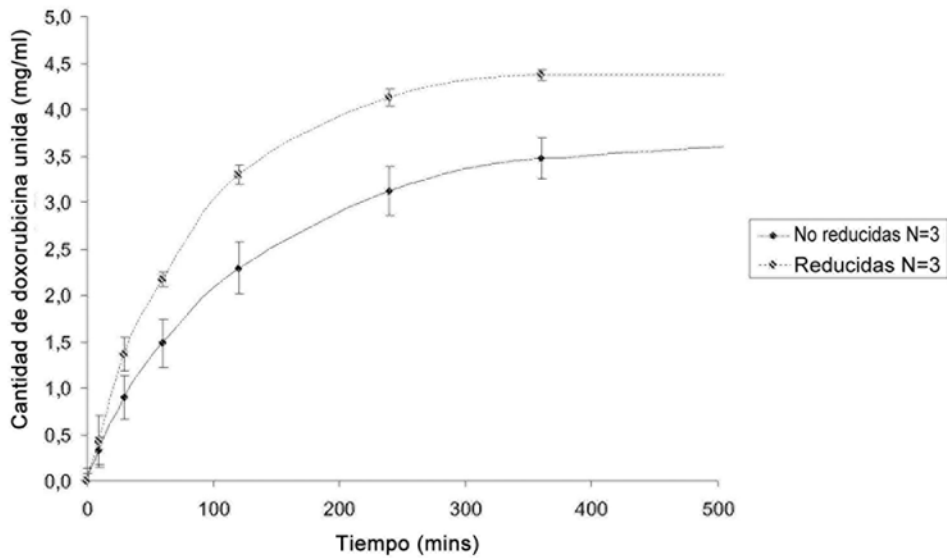


Figura 12B: porcentaje de liberación de un perfil de elución: BALC reducida frente a no reducida

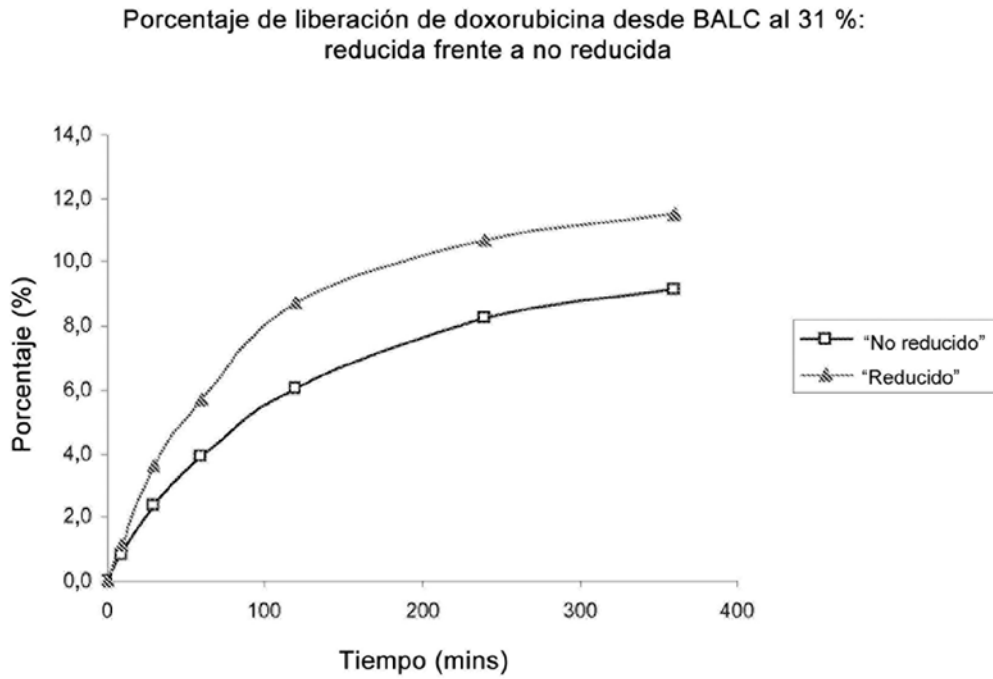


Figura 13

Diferencia porcentual de microesferas de BALC reducidas y no reducidas

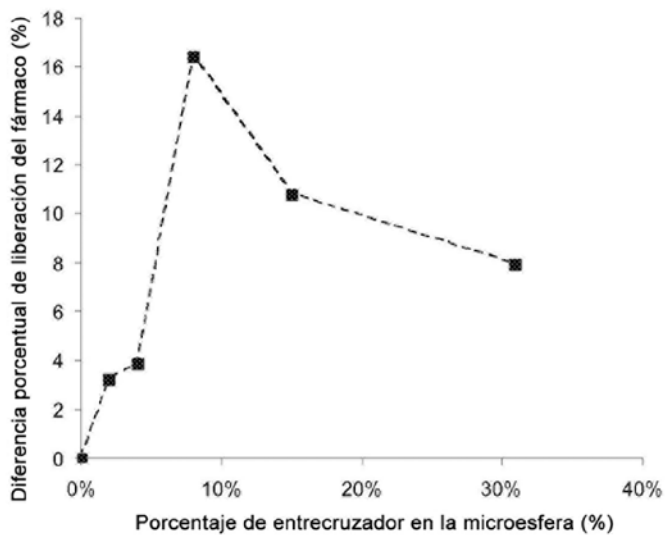


Figura 14A: imagen al microscopio óptico de micropartículas de BALC al 100 %

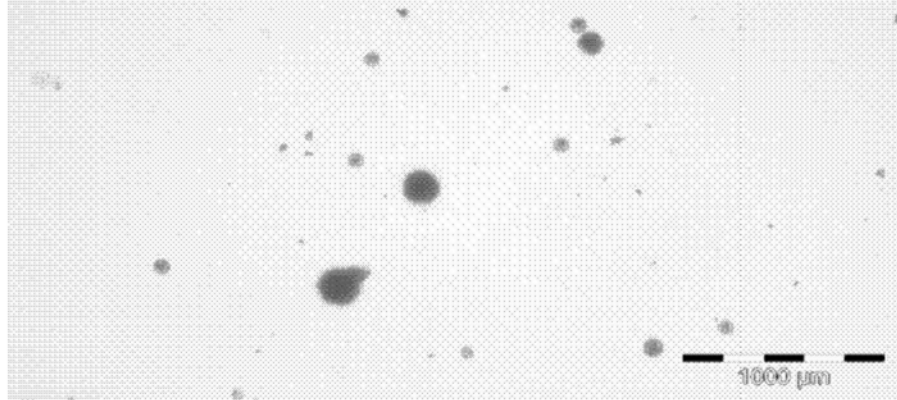


Figura 14B: imagen de micropartículas de BALC al 100 % decantando en agua

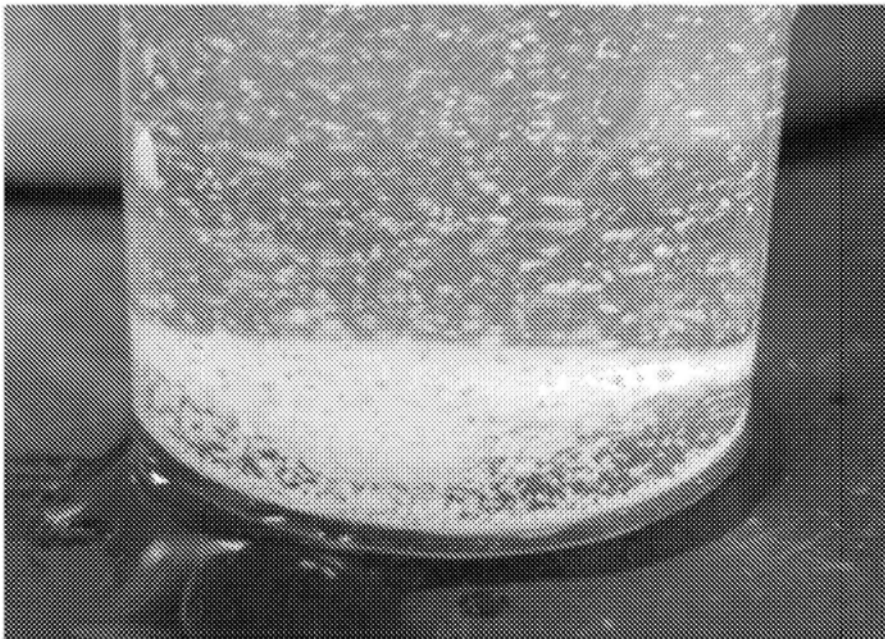


Figura 15: tamaño de las microesferas de BALC antes y después de la reducción

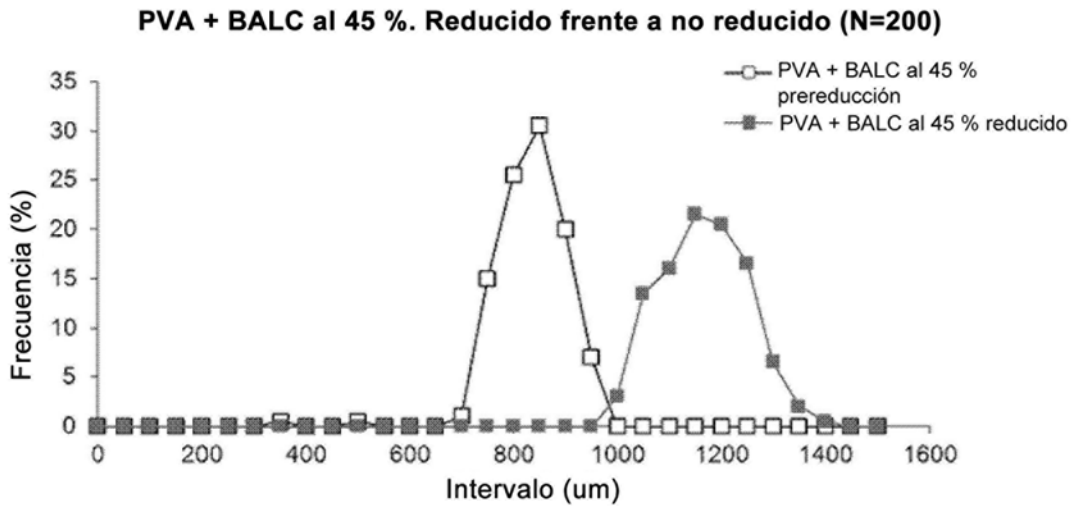


Figura 16: perfil de elución del irinotecan desde microesferas de BALC al 31 % (N=3)

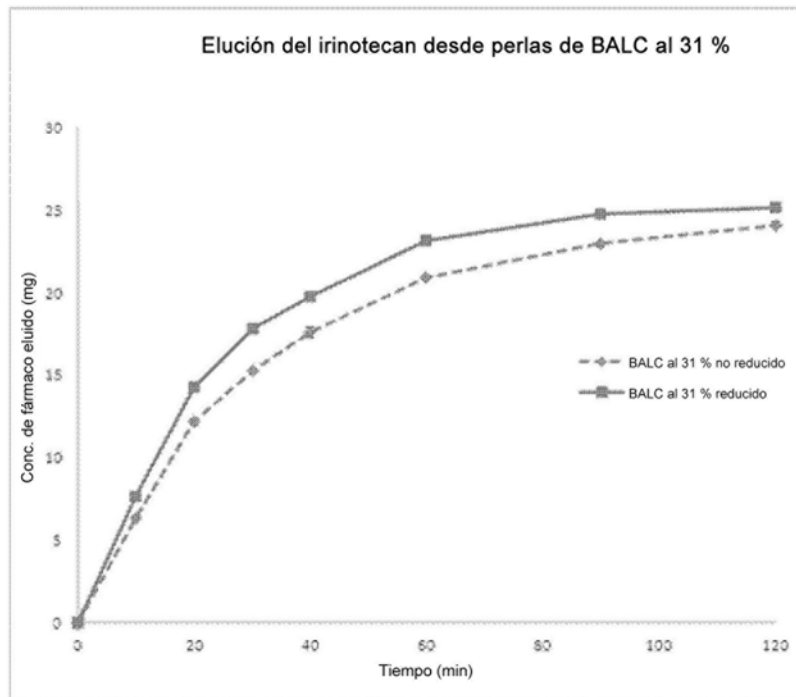


Figura 17: microesferas de BALC cargadas con rapamicina

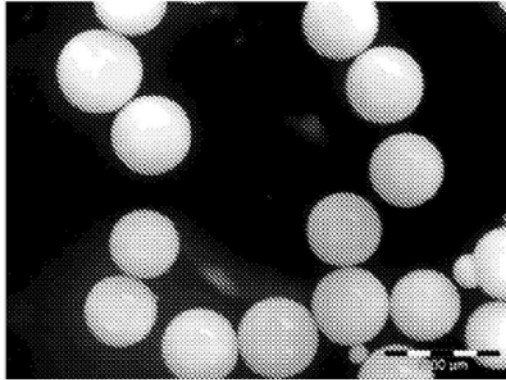


Figura 18: microesferas de BALC cargadas con diclofenaco

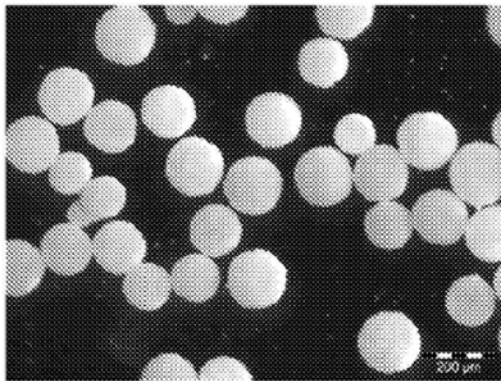


Figura 19: elución de doxorubicina desde una micropartícula de BALC-HEMA

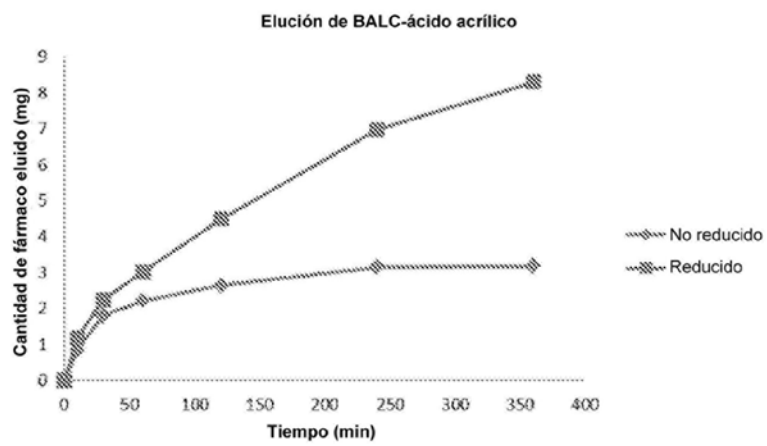


Figura 20A: micropartículas de BALC-HEMA cargadas con fármaco antes de la elución

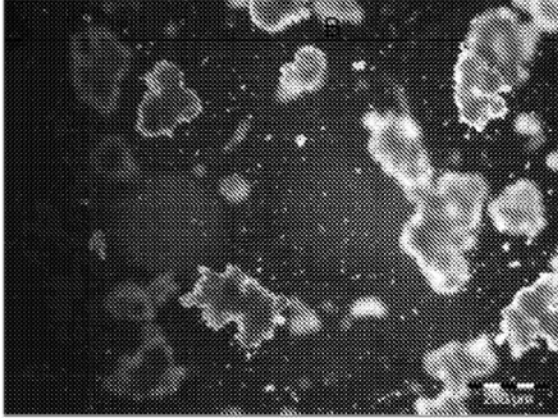


Figura 20B: micropartículas de BALC-HEMA durante elución en un ambiente normal

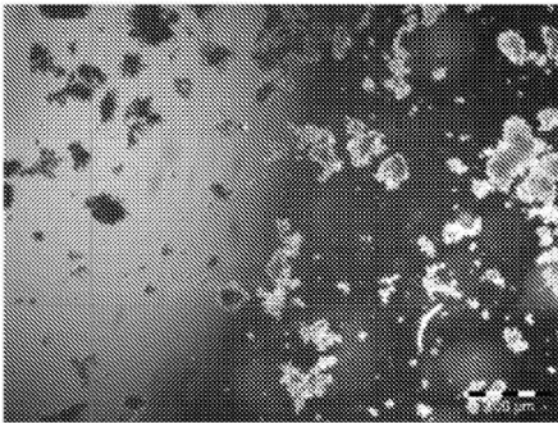


Figura 20C: micropartículas de BALC-HEMA durante elución en un ambiente reductor

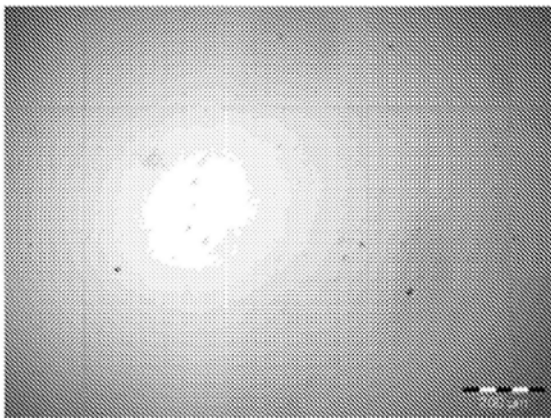


Figura 21: elución de la doxorubicina desde BALC-AA

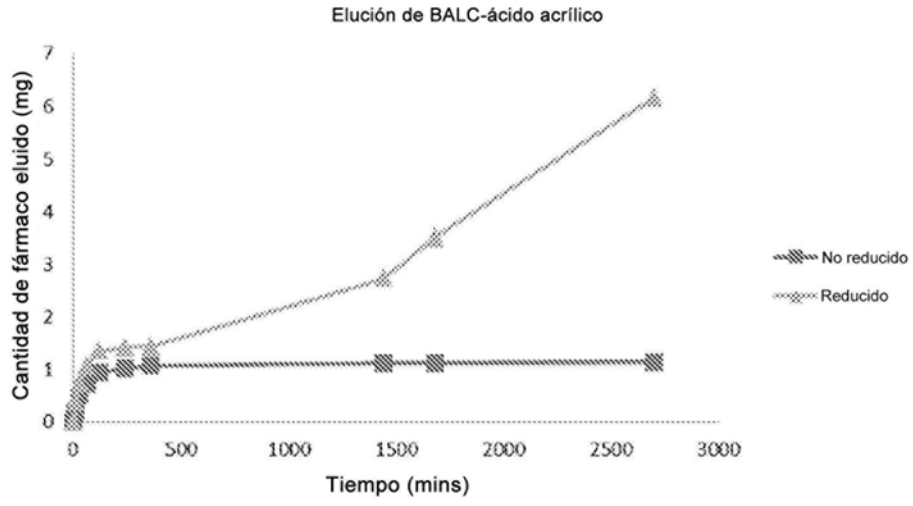


Figura 22A: micropartículas de BALC-ácido acrílico cargadas con fármaco antes de la elución

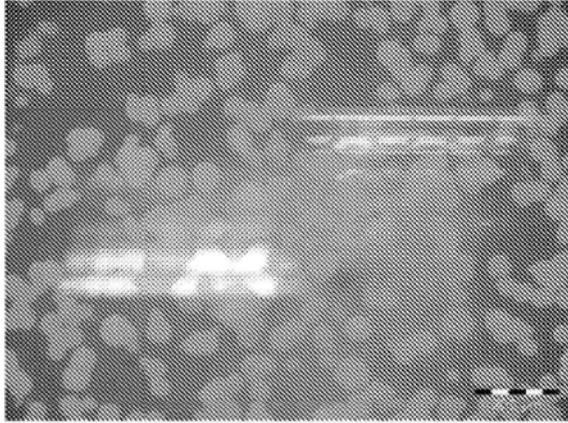


Figura 22B: micropartículas de BALC-ácido acrílico durante la elución en un ambiente normal

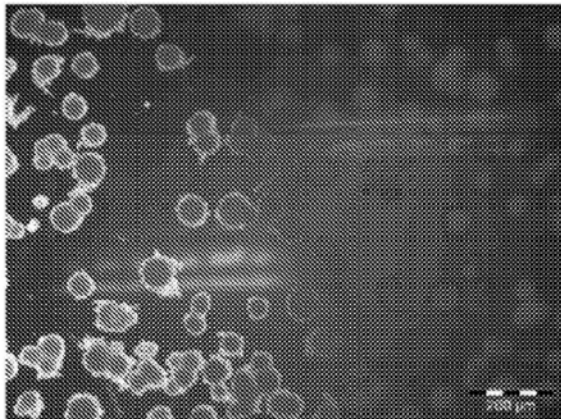


Figura 22C: micropartículas de BALC-ácido acrílico durante la elución en un ambiente reductor

