

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 321**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2008 PCT/US2008/011260**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2009 WO09042231**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2008 E 08833994 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2198302**

54 Título: **Matrices de hidrogel de sol-gel de fase reversible y usos de las mismas**

30 Prioridad:

27.09.2007 US 995693 P

19.02.2008 US 66376 P

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

13.02.2018

73 Titular/es:

**SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS
CORPORATION (100.0%)
263, Yeonji-dong, Jongno-gu
Seoul 110-725, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, KINAM;
ACHARYA, GHANASHYAM y
PARK, HAESUN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 654 321 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

Matrices de hidrogel de sol-gel de fase reversible y usos de las mismas

5 Campo de la Invención

La presente invención se refiere a matrices de hidrogel y a su uso en la fabricación de nano/microestructuras que contienen ingredientes farmacológicamente activos y agentes de diagnóstico.

10 Antecedentes de la Invención

15 Para la administración de fármacos a largo plazo, en intervalos de entre días y meses, se ha utilizado ampliamente la administración parenteral de partículas en la escala nano o micro. Las nano/micropartículas son fáciles de administrar utilizando agujas convencionales. También se han utilizado para administración oral de diversos fármacos. A pesar de la gran cantidad de aplicaciones de los sistemas de nano/micropartículas, el desarrollo de productos de utilidad clínica ha transcurrido con lentitud, y solamente están disponibles un número limitado de productos químicos. Tal como se utiliza en la presente memoria, "nano" se refiere a nanopartículas y procesos en los que la escala está comprendida en el intervalo entre 1 nanómetro (nm) y 1 micrómetro (μm). Tal como se utiliza en la presente memoria, "micro" se refiere a partículas y procesos en el intervalo comprendido entre 1 μm y 1.000 μm . Cuando no resulta necesario distinguir entre los tamaños nano y micro, se utiliza genéricamente el término "micro" para hacer referencia a objetos de un tamaño en las escalas tanto nano como micro.

20 La lentitud en el desarrollo de preparados clínicamente exitosos se debe a diversas razones. Por ejemplo, el rendimiento de carga de un fármaco en micropartículas es en general muy bajo; típicamente por debajo del 10% para la mayor parte de los fármacos, especialmente fármacos basados en proteínas. Incluso para aquellos fármacos con un rendimiento de carga más elevado, como, por ejemplo, de entre un 10% y un 20%, la mayoría del fármaco se pierde durante la preparación. Esto puede ser aceptable para fármacos de bajo coste, pero la mayor parte de los fármacos basados en proteínas son muy caros y dichas pérdidas no serían aceptables para ningún preparado. Una de las razones que explican dichas pérdidas es que los fármacos solubles en agua en las micropartículas están expuestos a una gran cantidad de agua antes de que las micropartículas se solidifique en durante la preparación mediante métodos de emulsión, que constituye el método más común para la preparación de micropartículas. Adicionalmente, los métodos de emulsión actuales son difíciles de escalar para producción en masa y dan como resultado distribuciones de tamaños de partículas muy heterogéneas. Avances recientes en la nanotecnología, especialmente en la fabricación nano/micro (genéricamente, microfabricación) y en los procesos de fabricación han abierto nuevos caminos para producir preparados farmacéuticos.

35 El desarrollo de tecnologías de microfabricación de alta resolución ha revolucionado la industria microelectrónica y de microdispositivos. Mediante el uso de métodos de microfabricación, tales como la fotolitografía y la litografía de haz de electrones (E-beam), se han desarrollado matrices de silicio y de vidrio con características micro y nano. En los últimos años, se han desarrollado diversos métodos de microfabricación como alternativas a la litografía E-beam y a la fotolitografía que pueden conseguir alta resolución sin poner en riesgo la integridad de las características. Adicionalmente, estos métodos tienen una mayor versatilidad en estrategias de materiales y procesamiento en comparación con las técnicas de microfabricación basadas en silicio. Estos nuevos métodos de impresión incluyen la litografía de nanoimpresión [H. Schiff], la litografía de impresión *step and flash* [V. Truskett y otros], la litografía de transferencia molecular [C. Schaper], y la litografía blanda [Y. Xia y otros]. Estos métodos utilizan bien matrices microfabricadas de silicio o de vidrio, o bien matrices poliméricas con propiedades especiales, para formar patrones en varios sustratos.

40 La litografía de nanoimpresión (NIL) es un método de estructuración de patrones de alta resolución en el que se reproduce un patrón superficial de un sello en un material mediante contacto mecánico y desplazamiento de materiales en tres dimensiones. La mayor ventaja de la litografía NIL es la habilidad de estructurar patrones con estructuras por debajo de 25 nm sobre un área de gran tamaño con alto rendimiento específico y bajo coste. La litografía de impresión *step and flash* (S-FIL) se distingue de la litografía NIL en que se trata de una técnica de nanoimpresión asistida por ultravioleta que moldea líquidos fototratables en lugar de llevar a cabo moldeo asistido por calor de obleas revestidas de polímero.

55 La litografía de transferencia molecular (MxL) se utiliza para reproducir patrones superficiales como matrices solubles en agua. Las matrices se preparan mediante el centrifugado de una solución de alcohol polivinílico (PVA) en un patrón maestro de silicio. Las matrices solubles en agua resultantes son secadas y a continuación ligadas a otro sustrato utilizando una capa intermedia de adhesivo que se solidifica mediante fototratamiento, tratamiento térmico, o bien mediante esquemas de reactivo de dos partes. Las matrices son retiradas de manera química mediante disolución en agua dando lugar a la formación de una matriz en la capa de adhesión. Ver, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nº 7.125.639 a favor de Schaper.

60 La litografía blanda es un nombre genérico para designar un grupo de técnicas de microfabricación no fotolitográficas que utilizan un sello elastomérico con características de relieve para generar microestructuras. Entre las técnicas de litografía blanda, la impresión por microcontacto [Yan y otros], el moldeo por microtransferencia

[Zhao y otros], y la impresión por contacto de microfluido [Wang y otros] han producido estructuras de polímero aisladas. Los métodos de litografía blanda utilizan matrices de un polímero hidrofóbico (por ejemplo, poli-dimetil siloxano, o PDMS) para impresión. Estos métodos permiten la preparación de matrices de material blando utilizando polímeros orgánicos, biopolímeros, y materiales inorgánicos. Los sistemas de suministro de fármaco por nanopartículas y micropartículas actualmente disponibles están constituidos principalmente por métodos de emulsión. Los métodos de emulsión dan como resultado una población de partículas altamente poli-dispersas, y sus características fisicoquímicas, sus cinéticas de degradación, sus propiedades materiales y sus perfiles de liberación de fármaco representan sólo los valores promedio de las partículas. Puesto de las partículas son altamente heterogéneas, resulta difícil examinar el efecto del tamaño en las respuestas biológicas debido a la amplia distribución de tamaños de partículas. Más aún, la presencia de partículas de mucho mayor tamaño en comparación con el tamaño medio hace difícil desarrollar sistemas de suministro útiles desde el punto de vista clínico. Las técnicas de microfabricación permiten la preparación de partículas mono-dispersas. Se han desarrollado diversas estrategias basadas en litografía blanda en combinación con una estrategia de despegue para preparar partículas homogéneas. Estas estrategias permiten la fabricación de microestructuras hechas de polímeros que contienen fármaco, incluso aunque los procesos requieren mejoras sustanciales para la recogida sencilla de grandes cantidades.

La Impresión Caliente por Micro-Contacto (μ CHP, *MicroContact Hot Printing*) se ha desarrollado para preparar micropartículas de película delgada con formas bien definidas utilizando polímeros termoplásticos [Guan y otros]. Este método transfiere características de polímero de manera selectiva desde una película continua en un sello hasta un sustrato. Mediante este método, se han preparado micropartículas de polímeros termoplásticos, tales como ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), polimetilmetacrilato (PMMA), y poliestireno [ver, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE. UU. N° 2004/0115279]. Sin embargo, este método adolece de diversas limitaciones. En primer lugar, el control del grosor de las micropartículas resulta muy difícil puesto que depende de la transferencia completa de la solución polimérica desde el sello PDMS hasta el portaobjetos de liberación. Esto da como resultado la formación de micropartículas con un grosor no uniforme. Aunque el tamaño lateral de las micropartículas puede controlarse, el tamaño vertical (es decir, el grosor) de las micropartículas no puede ser controlado de manera exacta. En segundo lugar, este método resulta útil sólo con soluciones de polímero diluido (entre un 1% y un 7%), puesto que implica el llenado de los micropozos de la matriz mediante el goteo dentro de una solución polimérica. A mayores concentraciones, las soluciones poliméricas son altamente viscosas, lo que hace que los pozos sean difíciles de rellenar, puesto que las soluciones poliméricas tienden a formar una película polimérica continua en la superficie de la matriz. En tercer lugar, puesto que la mayoría de los polímeros son solubles solamente en solventes orgánicos, el solvente puede difundirse dentro de la matriz PDMS, dañando de este modo el sello e impidiendo la liberación suave de las micropartículas desde los pozos.

La Litografía de Impresión *Step and Flash* (S-FIL) se ha utilizado para la fabricación de nanopartículas de tamaños precisos. La litografía S-FIL es un proceso de nanomoldeo disponible comercialmente que utiliza la topografía de una matriz de cuarzo para moldear macrómeros entrecruzables para formar patrones en una oblea de silicio [ver la Publicación de Patente de EE. UU. N° 2007/0031505]. Aunque este método produce nanopartículas, posee serias limitaciones. En primer lugar, implica la foto-polimerización *in situ* de los macrómeros en la matriz de cuarzo. Esto puede provocar dudas sobre la pureza de las partículas producidas para aplicaciones clínicas. En segundo lugar, algunas moléculas fotoiniciadoras permanecerán activas en las nanopartículas que pueden reaccionar con otras biomoléculas presentes en el cuerpo humano, lo que puede conducir potencialmente a efectos secundarios graves. En tercer lugar, la exposición de las partículas impresas a plasma de oxígeno durante el aislamiento da como resultado la formación de iones reactivos en la superficie de las nanopartículas y también puede degradar las moléculas de fármaco.

La técnica de la reproducción de partículas en matrices no humectantes (PRINT) se ha desarrollado para fabricar micropartículas utilizando matrices basadas en fluoropolímeros. Utilizando este método, se han fabricado partículas poliméricas mono-dispersas, con estructuras entre por debajo de 200 nm y la escala micrométrica, de polietilén glicol di-acrilato, resina de tri-acrilato, ácido poliláctico (PLA), y polipirrol. La reproducción PRINT utiliza fluoropolímeros químicamente resistentes como materiales de moldeo, lo que elimina la formación de una película de interconexión residual entre objetos moldeados [ver, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE. UU. N° 2007/0264481]. El moldeo del método PRINT se ha utilizado en la fabricación de micropartículas de polímeros y proteínas [Rolland y otros, Kelly y otros]. El método PRINT ha demostrado el uso de matrices no humectantes basadas en fluoropolímeros para la fabricación de micropartículas para diversas aplicaciones. Sin embargo, las aplicaciones prácticas del método PRINT están limitadas por el carácter multi-paso del método para la preparación de matrices de PFPE, y por lo laborioso de los procedimientos de recolección de partículas. Por ejemplo, las partículas PRINT son recolectadas de la oblea utilizando bien raspadura física con cuchillas quirúrgicas o bien mediante la aplicación de fuerzas de cizallamiento utilizando un portaobjetos de vidrio, métodos que no resultan prácticos y podrían dañar las partículas y, por lo tanto, pueden no resultar apropiados para fabricación a gran escala. Además, las partículas PRINT recolectadas utilizando películas de recolección de cianoacrilato polimerizable *in situ* puede conducir a la adsorción de monómeros reactivos sobre las partículas PRINT, dando como resultado la contaminación de la superficie.

Los métodos descritos anteriormente, específicamente los métodos μ CHP, S-FIL y PRINT, son capaces de producir micro- y nano- partículas de formas y tamaños homogéneos, pero conllevan limitaciones severas para aplicaciones prácticas en el desarrollo de partículas de suministro de fármaco útiles desde el punto de vista clínico. En primer lugar, los métodos necesitan generalmente la polimerización *in situ* de los macrómeros en los pozos de la matriz tal como se ve en los procedimientos S-FIL y PRINT. Esto provoca dudas acerca de la pureza de las micropartículas para aplicaciones humanas. En segundo lugar, los métodos son incapaces de controlar el grosor de las micropartículas tal como se ve en el método μ CHP. En tercer lugar, los métodos son compatibles solo con ciertos materiales. En cuarto lugar, los métodos requieren procedimientos de recolección de micropartículas multi-paso y laboriosos. Las condiciones rigurosas, incluyendo las soluciones altamente agresivas y las elevadas temperaturas, que se utilizan para liberar micropartículas fabricadas en solución pueden dañar los compuestos frágiles que se han incorporado en las micropartículas. Por lo tanto, existen limitaciones significativas en la utilización de los métodos de fabricación actualmente disponibles para la preparación de microestructuras. En resumen, existe una necesidad crítica de desarrollar nuevos métodos de preparación de matrices y nuevos materiales para ser utilizados en la fabricación de microestructuras homogéneas con diversos tamaños y formas para aplicaciones en suministro de fármacos.

Sumario de la Invención

Las micropartículas se preparan de acuerdo con los principios de la presente invención tal como se definen en las reivindicaciones utilizando una matriz de hidrogel de sol-gel de fase reversible, que está dotada de una pluralidad de pozos/cavidades. Una matriz de hidrogel de la invención está formada en última instancia a partir de una matriz maestra, que está hecha preferiblemente a partir de una oblea de silicio utilizando técnicas convencionales de fotolitografía. Pueden utilizarse técnicas de grabado tales para diseñar pilares en la matriz maestra que posean una amplia variedad de formas, como, por ejemplo, forma circular, rectangular, de diamante, etc., de tal manera que la matriz de hidrogel posee pozos de las mismas formas que los pilares en la matriz maestra de silicio.

Una matriz de hidrogel de la presente invención puede fabricarse bien (i) directamente desde la matriz maestra de silicio, o bien (ii) indirectamente utilizando una matriz polimérica intermedia. Por lo tanto, en relación a la matriz de hidrogel que posee una imagen positiva de la pluralidad de pozos deseada, la opción (i) implica la formación de una matriz maestra de imagen negativa. Para la opción (ii), la matriz maestra tendría una imagen positiva sustancialmente idéntica a la de la matriz de hidrogel. La matriz polimérica intermedia que posee la imagen negativa se fabrica de manera conveniente a partir de un polímero de moldeo convencional, tal como poli-dimetil siloxano, o PDMS.

Utilizando bien la matriz maestra o bien la matriz polimérica opcional, se reviste una capa de un sol sobre la misma. El sol se convierte entonces en un gel para formar la matriz de hidrogel, que está separada de la matriz polimérica o maestra. La presente invención permite la formación de matrices de hidrogel de sol-gel de fase reversible en las que las cavidades diseñadas poseen un tamaño en el intervalo comprendido entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 1.000 μ m, preferiblemente en el intervalo comprendido entre 200 nm y 200 μ m, más preferiblemente en el intervalo comprendido entre 500 nm y 100 μ m.

En otro aspecto de la invención, las nanopartículas o las micropartículas se preparan mediante un método que comprende llenar una pluralidad de pozos en una matriz de hidrogel con una solución no acuosa que posee un polímero insoluble en agua disuelto en la misma, que contiene preferiblemente además una gente bioactivo. El polímero insoluble en agua se solidifica en los pozos mediante la evaporación de solvente de la solución no acuosa. Las nanopartículas o las micropartículas puede entonces recolectarse de la matriz de hidrogel, por ejemplo, disolviendo el hidrogel en una solución acuosa. En otra realización, la matriz de hidrogel que contiene micropartículas puede dividirse en tamaños apropiados y deshidratarse (liofilizarse), por ejemplo, en un vial. Esta última realización permite la reconstitución rápida mediante la simple adición de solución acuosa.

Los procesos de microfabricación anteriores (convencionales) no han utilizado matrices de hidrogel para fabricar micropartículas en el intervalo de tamaños deseado. La presente invención hace mucho más sencilla la formación y la recogida de partículas de tamaño de nano y micro, y los pasos de procesamiento sencillos permiten una escalabilidad hacia arriba sencilla. Más aún, la presente invención permite rendimientos de carga de fármaco extremadamente altos de hasta un 50%, que no resultan posibles utilizando métodos convencionales. Los agentes bioactivos preferidos cargados en las partículas incluyen fármacos de bajo peso molecular, tales como paclitaxel, sirolimus, probucol, y griseofulvina, así como fármacos con elevado peso molecular, por ejemplo en forma pulverizada, tales como fármacos con proteínas incluyendo inmunoglobulinas, factores de crecimiento, insulina, interferones y eritropoyetina.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una representación esquemática de un procedimiento de fabricación de micropartículas de acuerdo con los principios de la presente invención. Esta secuencia muestra la fabricación de una matriz maestra en oblea de silicio (A), la formación de una matriz de hidrogel (B y C), la formación de microestructuras mediante el llenado de las cavidades en la matriz de hidrogel (D), la disolución de la matriz de hidrogel en solución acuosa (E), y la recogida de una colección de microestructuras individuales (F).

La Figura 2 muestra una representación esquemática de un procedimiento de fabricación de micropartículas utilizando una matriz polimérica intermedia y una matriz de hidrogel. La secuencia muestra la fabricación de una matriz maestra en oblea de silicio (A), la formación de una matriz polimérica intermedia, por ejemplo, una matriz de PDMS (B), la formación de una matriz de hidrogel utilizando una matriz polimérica intermedia (C), y la formación de microestructuras mediante el llenado de cavidades en la matriz de hidrogel (D). Las microestructuras formadas pueden recogerse tal como se describe en los Pasos E y F de la Figura 1.

La Figura 3 muestra una representación esquemática del procedimiento de fabricación para fabricar micropartículas en donde el núcleo acuoso está cubierto por un polímero insoluble en agua, como, por ejemplo, PLGA. La secuencia muestra la formación de una matriz de hidrogel utilizando bien la matriz maestra en oblea de silicio o bien la matriz polimérica intermedia (A), la formación de la capa inicial de PLGA mediante revestimiento centrífugo o revestimiento por atomización (B), el llenado de los pozos mediante gotitas acuosas (C), y el recubrimiento de las cavidades con la segunda capa de PLGA para sellar el núcleo acuoso. Las microestructuras formadas son recogidas mediante la disolución de la matriz de hidrogel como se describe para la Figura 1.

La Figura 4 muestra imágenes de fluorescencia de matrices de hidrogel de gelatina dotadas de micropozos de diversas formas geométricas. Los pozos están llenos de solución PLGA dopada con rojo nilo, un tinte fluorescente, para su visualización sencilla. Todos los pozos tienen un diámetro de 50 μm y una profundidad de 50 μm .

La Figura 5 muestra imágenes de fluorescencia (izquierda) y campo claro (derecha) de microdiscos de PLGA de doble capa fabricados de acuerdo con los principios de la presente invención. Los microdiscos contienen dos capas diferentes de tinte rojo nilo (rojo, superior) y fármaco felodipina (azul, inferior).

Descripción detallada de la Invención

Se describirá a continuación con detalle la presente invención haciendo referencia a las Figuras y a los Ejemplos presentados a continuación en la presente memoria.

Preparación de las matrices maestras en oblea de silicio

Se fabrica una matriz maestra en oblea de silicio siguiendo una técnica bien conocida. Se reviste de una capa fotoresistente (positiva, AZ-1518) una oblea de silicio limpia, oxidada (5.000 Å) mediante revestimiento centrífugo. Después del proceso de fotoresistencia positiva, la oblea de silicio se inserta en una solución ácida hidrofúrica tamponada para decapar el dióxido de silicio. Después de retirar la capa fotoresistente, la oblea se sumerge en hidróxido de tetra metil amonio para decapar el silicio. La matriz maestra de oblea de silicio decapada se utiliza para un procesamiento posterior. La dimensión de los orificios grabados en la oblea de silicio se varía para obtener orificios con diámetros y profundidades diferentes. Puede variarse no sólo la dimensión sino también la forma de los orificios. Disponer de una variedad de formas, tales como una forma circular, de triángulo, de rectángulo, y de estrella, resultará muy útil en aplicaciones en las que es importante una distinción basada en la forma.

Fotolitografía UV para patrones de 10 μm y 50 μm

Pueden diseñarse máscaras fotolitográficas de diferentes tamaños y formas (por ejemplo, en forma de círculo, de varilla, de diamante, y de triángulo) utilizando el programa Auto CAD 2007, y las máscaras pueden fabricarse mediante el instrumento TR Electromask XX251. Se lleva a cabo un revestimiento centrífugo con hexametil disilazina (Mallinckrodt) de una oblea de 10,2 cm (4") de silicio cubierta con una capa de SiO_2 de 1 μm de grosor (University Wafer) a 3.500 rpm durante 30 segundos (SCS P6708 Spin Coater de Specialty Coating Systems). Se lleva a cabo entonces un revestimiento centrífugo de la oblea de silicio con una capa fotoresistente de AZ9260 (Microchemicals GmbH) a 1.000 rpm durante 30 segundos para formar una película fotoresistente uniforme con un grosor de 10 μm . A continuación, la oblea se cuece a 90°C durante 10 minutos para retirar el solvente y la humedad. La oblea de silicio revestida con una capa fotoresistente se expone entonces a luz ultravioleta (23 mW/cm^2) durante 26 segundos utilizando un alineador de máscara (Karl Suss MJB-3), y a continuación se revela utilizando revelador AZ 400K (Microchemicals GmbH) durante 2 minutos con agitación continua. La oblea de silicio revelada es aclarada con agua y secada bajo una corriente de gas nitrógeno.

Litografía de haz de electrones E-beam para patrones de 50 nm, 100 nm, 300 nm, 500 nm, y 1 μm

La fotolitografía UV tiene un límite de resolución de un tamaño de 1 μm y no resulta útil para la nanofabricación de características por debajo de 1 μm . Por otro lado, la litografía E-beam posee un intervalo de resolución entre 1 μm y 10 nm. La litografía E-beam utiliza un haz de electrones de alta potencia para producir un haz de electrones muy fuertemente focalizado que puede grabar diversas características muy finas con una resolución muy alta. Para la fabricación de matrices maestras de silicio utilizando litografía E-beam, se utiliza el siguiente proceso. Se lleva a cabo un revestimiento centrífugo de una oblea de silicio de 7,6 cm (3") cubierta por una capa de SiO_2 de 1 μm de grosor (University Wafer) con una capa fotoresistente de polimetilmetacrilato (PMMA, Microchem) de 300 nm de grosor utilizando revestimiento centrífugo a 3.500 rpm durante 30 segundos. La capa fotoresistente de revestimiento de PMMA se expone a un haz de electrones según un patrón pre-programado utilizando la Herramienta de Litografía de Haz de Electrones de Campo Extra-Ancho Leica VB-6 de Resolución Ultra-Alta (Leica VB-6 Ultra-High Resolution, Extra-Wide Field Electron Beam Lithography Tool) (que funciona a un voltaje de 100 KV, a una velocidad de transmisión de 25 MHz, y con una corriente de 5 nA). Después de la litografía de E-beam, la oblea de silicio se revela en una solución 3:1 de isopropanol:metil isobutil cetona. Sobre este patrón se deposita una capa de 5 nm de

Cr y de 20 nm de Au utilizando el evaporador Varian E-Beam Evaporator, seguido por un despegue de la película de PMMA residual en acetona de reflujo. El patrón es transferido al óxido de silicio subyacente mediante grabado iónico reactivo (STS Reactive Ion Etch (RIE) Systems). La matriz maestra de silicio es examinada bajo microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM, Hitachi S-4800) para caracterizar el tamaño, la forma, y la integridad de los patrones.

Producción de Micropartículas de Geometrías Predefinidas a partir de Matrices de Hidrogel

Un aspecto clave de esta invención es la utilización de matrices de hidrogel de sol-gel de fase reversible para fabricar microestructuras. El procedimiento general para fabricar una matriz de hidrogel para una recolección sencilla de microestructuras preparadas se ilustra de manera esquemática en la Figura 1. Los pasos A-F muestran la microfabricación de micropartículas a partir de una matriz maestra utilizando una matriz de hidrogel: (A) Se forma un patrón en una matriz maestra en oblea de silicio; (B) se sitúa una solución de gelatina sobre la matriz maestra y se baja la temperatura para formar una sobreimpresión de hidrogel (transición de fase de sol a gel); (C) después de que se solidifique la capa de gelatina, el molde de gelatina se despegar para dejar descubiertas las cavidades; (D) las cavidades en un molde de hidrogel se llenan mediante la salpicadura de una solución de fármaco/PLGA o una pasta con una cuchilla; (E) el molde de gelatina se disuelve mediante el aumento de la temperatura en un baño de agua (transición de fase de gel a sol); y (F) se recogen las partículas individuales mediante centrifugado.

En una variación del método descrito en la Figura 1, puede fabricarse una matriz polimérica intermedia, tal como una matriz intermedia de PDMS, antes de formar las matrices de hidrogel. Tal como se muestra en la Figura 2, puede fabricarse una matriz polimérica intermedia utilizando un polímero, tal como poli-dimetil siloxano (PDMS) (elastómero de silicio Sylgard® 184). La mezcla del monómero elastomérico y del agente de curado en un ratio de 10:1 (peso/peso) se mezcla a conciencia. La mezcla se vierte sobre la matriz maestra en oblea de silicio en un contenedor, como, por ejemplo, una placa de Petri de vidrio. El contenedor se sitúa entonces en el vacío durante 10 minutos para retirar burbujas de aire, y se transfiere a continuación a una cámara a 70°C para su curado durante 30 minutos. La matriz intermedia de PDMS se despegar de la matriz maestra de silicio (Figura 2B), y la matriz intermedia de PDMS se utiliza para preparar una matriz de hidrogel (Figura 2C).

Se forma una matriz de hidrogel aplicando una solución de un material de formación de hidrogel, bien en la superficie de la matriz maestra o bien en la superficie de la matriz polimérica intermedia. Se forma una matriz de hidrogel mediante una transición de fase de sol a gel que tiene lugar en la superficie. La conversión de sol a gel se induce, por ejemplo, mediante un cambio de temperatura, mediante la introducción de iones multivalentes, o mediante secado. Una vez se ha formado, la matriz de hidrogel simplemente se despegar de la matriz maestra o de la matriz intermedia. Matrices de hidrogel a modo de ejemplo formadas de esta manera pueden comprender polímeros naturales tales como gelatina, agarosa, quitosano y alginato.

Tal como se muestra en la Figura 1, un método para fabricación de micropartículas de acuerdo con la presente invención comprende la aplicación de una mezcla de un agente bioactivo y de un polímero disueltos en un solvente no acuoso a la pluralidad de pozos de la matriz de hidrogel, de tal manera que los pozos se llenan con la mezcla de fármaco/polímero. La mezcla de fármaco/polímero puede aplicarse como una solución o como una pasta, que puede ser endurecida posteriormente mediante, por ejemplo, evaporación del solvente. La forma de pasta permite la incorporación de altas concentraciones de un agente bioactivo y del polímero, y la pasta puede presionarse para llenar los pozos de la matriz de hidrogel. Las matrices de hidrogel llenas se sitúan entonces en una solución acuosa para inducir un cambio de fase de gel a sol para liberar microestructuras fármaco/polímero individuales, que pueden ser recogidas posteriormente mediante filtrado y/o centrifugado. Las microestructuras fabricadas según este procedimiento exhiben geometrías bien definidas que se corresponden exactamente con los micropozos de la matriz de hidrogel. Típicamente, las microestructuras tienen un diámetro en el intervalo comprendido entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 1.000 µm, preferiblemente en el intervalo comprendido entre aproximadamente 200nm y aproximadamente 200µm, y más preferiblemente en el intervalo comprendido entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 100 µm, y más preferiblemente todavía en el intervalo comprendido entre aproximadamente 1 µm y aproximadamente 50 µm.

Tal como se muestra en la Figura 3, otro método para la fabricación de nano- y/o micro- partículas de acuerdo con la presente invención comprende la aplicación de un polímero disuelto en un solvente orgánico a una superficie interna de la pluralidad de pozos de la matriz de hidrogel de tal manera que los pozos son revestidos con el polímero. Una gotita acuosa o más de una, que pueden contener agente(s) bioactivo(s) disuelto(s) en su interior, se proporcionan en los pozos revestidos, por ejemplo, mediante un atomizador ultrasónico. Ver, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nº 6.767.637. Los pozos se llenan a continuación con el polímero disuelto en solvente orgánico de tal manera que las gotitas acuosas quedan encapsuladas por el polímero, por ejemplo mediante intercambio de solvente. Ver la Patente de EE. UU. Nº 6.599.627. Finalmente, las gotitas encapsuladas en polímero son retiradas de la matriz de hidrogel, por ejemplo, mediante la disolución de la matriz en agua, para liberar las partículas.

Tal como se muestra en las Figuras 1 a 3, las microestructuras formadas se recogen simplemente disolviendo la matriz de hidrogel en solución acuosa, y este proceso hace que la producción a gran escala de microestructuras sea más simple y más sencilla que cualquier método anterior. Las microestructuras generadas por este método

poseerán cantidades despreciables de contaminantes, si es que existen, puesto que el método implica el uso de un polímero de formación de hidrogel biocompatible, tal como gelatina, y fármaco/PLGA en una pequeña cantidad de un solvente orgánico que puede retirarse mediante evaporación en vacío. La preparación de las microestructuras descrita en la presente memoria implica el llenado de un molde abierto. Un molde abierto significa que los pozos en la matriz de hidrogel están abiertos para ser llenados con la solución de fármaco/polímero y abiertos para la evaporación del solvente orgánico utilizado. En los métodos disponibles actualmente, como, por ejemplo, el método S-FIL, la matriz de vidrio es presionada dentro de una solución monomérica que forma un molde cerrado, seguido por fotopolimerización. Este molde cerrado da como resultado la formación de una película, lo que requiere un cierto número de pasos de procesamiento posterior, y reduce por lo tanto la eficiencia de la producción de microestructuras. El carácter abierto de los moldes puede reducir el número de pasos y secuencias de eventos requeridos durante el moldeo de microestructuras, y puede mejorar la velocidad de evaporación de solvente desde el material precursor, aumentando de ese modo el rendimiento y la velocidad de la producción de microestructuras.

Fabricación de Matrices de Hidrogel con Temperaturas de Fusión Ajustables

La producción a gran escala de microestructuras que contienen fármacos macromoleculares hidrofílicos, tales como fármacos basadas en proteínas, enzimas, ADN y ARNip, constituye un reto muy difícil de abordar puesto que esta clase de biomoléculas son altamente sensibles a las condiciones de procesamiento, como, por ejemplo, a la alta temperatura o la exposición a largo plazo solvente orgánico. La estrategia de matriz de hidrogel actual aborda de manera precisa y de manera perfecta estos problemas y puede ser utilizada fácilmente para la producción a gran escala de micropartículas de moléculas biológicas sensibles sin desnaturalizarlas. Mediante el dopaje de soluciones de gelatina de formación de hidrogel con ciertas sales inorgánicas, polímeros sintéticos, o biomoléculas, pueden modularse las temperaturas de fusión de las matrices de gelatina para adecuarse a los requerimientos de producción de micropartículas específicos. Más aún, puesto que los pasos de recolección de partículas se llevan a cabo en agua o en soluciones acuosas tampón, la desnaturalización de biomoléculas sensibles en micropartículas puede minimizarse o evitarse, preservando de este modo su actividad biológica. El dopaje de soluciones de formación de hidrogel con otros materiales puede reducir la temperatura de fusión de las matrices de hidrogel de gelatina. Por lo tanto, sales inorgánicas (tales como LiCl, NaCl, KCl, CaCl₂, y MgCl₂), polímeros sintéticos (tales como PVA, PEG, polietileno imina, y ácido poliacrílico), y biomoléculas (tales como albúmina de suero bovino, e histidina), pueden reducir la temperatura de fusión de matrices de gelatina, tal como se muestra en los ejemplos que siguen.

Resultados y Discusión

La traducción satisfactoria de las tecnologías de microfabricación a las aplicaciones de suministro de fármacos requiere el desarrollo de nuevos métodos que utilicen sólo condiciones moderadas para procesar y utilizar materiales biocompatibles, y que sean lo suficientemente simples como para poder producir a gran escala. Los métodos también dan como resultado un alto rendimiento de carga de fármacos y la habilidad para controlar la cinética de liberación del fármaco. Pueden cargarse agentes bioactivos en las micropartículas en un intervalo comprendido entre aproximadamente 1% y aproximadamente 80% en peso, preferiblemente comprendido entre 5% y 50% en peso. La presente invención permite una estrategia de matriz de hidrogel sorprendentemente simple, barata y eficiente para la fabricación de microestructuras poliméricas del tamaño y la forma predefinidos. Los materiales de formación de hidrogel se han utilizado por primera vez en la preparación de matrices impresas para la fabricación de microestructuras individuales de tamaño y forma homogénea.

Cualquier material que pueda formar un hidrogel de fase reversible de sol a gel puede utilizarse en la preparación de la matriz de hidrogel de la presente invención. Geles a modo de ejemplo incluyen gelatina, agarosa, y pectina. Algunos polímeros forman un hidrogel a una temperatura mayor y se funden a temperaturas inferiores. Estos se denominan hidrogeles termorreversibles inversos y ejemplos de los mismos incluyen copolímeros de metil-celulosa y polioxietileno / polioxipropileno / polioxietileno de tres bloques. Otros polímeros que pueden formar hidrogeles reversibles en presencia de una sal orgánica, tal como la formación de un hidrogel utilizando alginato de sodio en presencia de iones de calcio, también puede utilizarse en la preparación de matrices de hidrogel. Preferiblemente, se utiliza gelatina puesto que posee propiedades ideales para fabricar microestructuras utilizando el método de la matriz de hidrogel. La gelatina posee una combinación de propiedades, tales como una transición de gel a sol reversible en solución acuosa, insolubilidad en agua fría pero a la vez solubilidad completa en agua templada, y la habilidad de actuar como un coloide protector. La habilidad de actuar como un coloide protector es una propiedad de la gelatina de gran utilidad que es críticamente útil en la fabricación de microestructuras utilizando el método de la matriz de hidrogel, puesto que la gelatina puede adsorberse sobre la superficie de la microestructura para protegerla de la agregación en solución acuosa mediante repulsión estérica.

Los materiales que forman hidrogel se han utilizado en ingeniería de tejidos, administración de fármacos, diagnóstico, y como sensores médicos y biológicos. Sin embargo, los materiales de hidrogel no se han utilizado anteriormente para formar matrices sacrificiales con micropatrones. Era una creencia generalizada que los hidrogeles son demasiado débiles desde el punto de vista mecánico como para utilizarse como una matriz para preparar microestructuras. Los hidrogeles contienen habitualmente un 10% de agua o un porcentaje mayor, y aquellos hidrogeles que contienen más de un 95% de agua se conocen como superabsorbentes. Los hidrogeles de gelatina contienen entre un 40% y un 90% de agua. Debido a la presencia de una gran cantidad de agua, se asume

comúnmente que los hidrogeles son muy débiles y, por lo tanto, se pensaba que los hidrogeles no podrían utilizarse como matrices para preparar micropartículas. De manera sorprendente, sin embargo, los hidrogeles de gelatina proporcionaron una resistencia mecánica suficiente para el procesamiento.

5 Las mayores ventajas de una estrategia de matrices de hidrogel son las siguientes. (1) La naturaleza reversible de la fase sol-gel, es decir, la termoreversibilidad, o la reversibilidad de pH, o los atributos de respuesta a un estímulo, de los materiales que forman hidrogel permite la preparación más simple de matrices y de métodos de recolección de partículas. (2) Las matrices de hidrogel pueden hacerse altamente elásticas y mecánicamente robustas como para soportar la deformación y la fractura, permitiendo de este modo la manipulación que de las mismas se requiere para la preparación y el llenado de matrices. (3) La red tridimensional de las matrices de hidrogel reduce drásticamente la velocidad de difusión de un fármaco, proteína, ADN, ARNip, y precursores poliméricos desde los micropozos hasta la matriz. (4) El método de la matriz de hidrogel es aplicable a una variedad de polímeros y materiales polimerizables *in situ* bajo condiciones en las que no se produce fusión o disolución del hidrogel. (5) La utilización de geles físicos reversibles con propiedades funcionales deseadas, tales como una sensibilidad al pH y una sensibilidad a la temperatura, para la preparación de matrices y la liberación de partículas mejora la versatilidad de la estrategia.

La invención puede resumirse en los elementos siguientes:

- 20 1. Un método para fabricar nanopartículas o micropartículas que comprende:
 - (a) fabricar una matriz maestra dotada de una pluralidad de microestructuras;
 - (b) de manera opcional, fabricar una matriz polimérica como una imagen negativa de la matriz maestra y separar la matriz polimérica de la matriz maestra;
 - (c) revestir la matriz maestra, o la matriz polimérica opcional, con una capa de un sol;
 - 25 (d) convertir el sol en un gel para formar la matriz de hidrogel; y
 - (e) separar la matriz de hidrogel de la matriz maestra, o de la matriz polimérica opcional, permitiendo de este modo la formación de una matriz de hidrogel de sol-gel de fase reversible dotada de una pluralidad de microestructuras, en donde el sol se convierte en gel mediante la inducción de una transición de fase con un cambio de temperatura o bien mediante la inducción de una transición de fase al añadir una sal, una proteína, o un cambio en la valencia de una sal, o un secado;
 - 30 (f) llenar una pluralidad de pozos en la matriz de hidrogel del paso (e) con una solución no acuosa que posee un polímero insoluble en agua disuelto en la misma;
 - (g) solidificar el polímero insoluble en agua en los pozos mediante la evaporación del solvente de la solución no acuosa; y
 - 35 (h) recolectar las nanopartículas por las micropartículas de la matriz de hidrogel.
- 40 2. Un método para fabricar nanopartículas o micropartículas que comprende:
 - (a) fabricar una matriz maestra dotada de una pluralidad de microestructuras;
 - (b) de manera opcional, fabricar una matriz polimérica como una imagen negativa de la matriz maestra y separar la matriz polimérica de la matriz maestra;
 - (c) revestir la matriz maestra, o la matriz polimérica opcional, con una capa de un sol;
 - (d) convertir el sol en un gel para formar la matriz de hidrogel; y
 - 45 (e) separar la matriz de hidrogel de la matriz maestra, o de la matriz polimérica opcional, permitiendo de este modo la formación de una matriz de hidrogel de sol-gel de fase reversible dotada de una pluralidad de microestructuras, en donde el sol se convierte en gel mediante la inducción de una transición de fase con un cambio de temperatura o bien mediante la inducción de una transición de fase al añadir una sal, una proteína, o un cambio en la valencia de una sal, o un secado;
 - 50 (f) revestir paredes de una pluralidad de pozos en la matriz de hidrogel del paso (e) con una solución no acuosa que posee un polímero insoluble en agua disuelto en la misma;
 - (g) añadir gotitas de una solución acuosa a los pozos revestidos;
 - (h) cubrir las gotitas acuosas con la solución no acuosa que posee el polímero insoluble en agua disuelto en ella; y
 - 55 (i) recolectar las nanopartículas o las micropartículas de la matriz de hidrogel.
- 60 3. El método del elemento 1 o del elemento 2, en donde la solución no acuosa contiene al menos un agente bioactivo disuelto en ella.
4. El método del elemento 3, en donde el agente bioactivo está presente en las nanopartículas o en las micropartículas en el intervalo comprendido entre aproximadamente 1% y aproximadamente 80% en peso, preferiblemente en el intervalo comprendido entre aproximadamente 5% y aproximadamente 50% en peso.
5. El método del elemento 1 o del elemento 2, en donde el polímero insoluble en agua es PGLA.
- 65 6. El método del elemento 3, en donde el agente bioactivo se selecciona de entre el conjunto formado por

paclitaxel, sirolimus, probucol, griseofulvina, inmunoglobulina, factor de crecimiento, insulina, interferón y eritropoyetina.

5 7. El método del elemento 1 o del elemento 2, en donde las partículas o las micropartículas son recolectadas mediante la disolución de la matriz de hidrogel en solución acuosa o bien mediante el liofilizado de la matriz de hidrogel en un contenedor.

10 8. El método del elemento 1 o del elemento 2, en donde la matriz maestra comprende una oblea de silicio y está formada mediante fotolitografía o mediante grabado por haz de electrones.

9. El método del elemento 1 o del elemento 2, en donde la matriz polimérica comprende poli-dimetil siloxano.

15 10. El método del elemento 1 o del elemento 2, en donde el hidrogel comprende gelatina, agarosa, poli(N-isopropilacrilamida) o alginato.

11. El método del elemento 1 o del elemento 2, en donde una estructura formada en la matriz de hidrogel es tridimensional.

20 12. El método del elemento 1 o del elemento 2, en donde el sol se convierte en gel mediante la inducción de una transición de fase con un cambio de temperatura.

13. El método del elemento 1 o del elemento 2, en donde el sol se convierte en gel mediante la inducción de una transición de fase con la adición de una sal, una proteína, o un cambio en la valencia de una sal.

25 14. El método del elemento 1 o del elemento 2, en donde las microestructuras de la matriz de hidrogel tienen un diámetro en el intervalo comprendido entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 1000 µm.

30 15. El método del elemento 14, en donde las microestructuras tienen un diámetro comprendido en el intervalo entre aproximadamente 200 nm y aproximadamente 200 µm.

16. El método del elemento 15, en donde las microestructuras tienen un diámetro comprendido en el intervalo entre aproximadamente 500 nm y 100 µm.

35 17. El método del elemento 16, en donde las microestructuras tienen un diámetro comprendido en el intervalo entre aproximadamente 1 µm y aproximadamente 50 µm.

40 18. Una nanopartícula o una micropartícula que pueden obtenerse mediante el método de uno cualquiera de los elementos 1 a 17, en donde la partícula comprende al menos dos capas distintas de forma que cada capa contiene un agente diferente.

Los ejemplos representativos que siguen muestran la fabricación de microestructuras utilizando el método de la matriz de hidrogel. Pueden llevarse a cabo una multitud de cambios, modificaciones, y alteraciones sin apartarse del alcance del objeto de la presente descripción.

45 Ejemplos

Ejemplo 1. Fabricación de Matrices de Hidrogel de Gelatina con Pozos de Geometría Específica

50 En una fabricación típica de la matriz de hidrogel, se preparó una solución de gelatina (30% en peso) disolviendo 30 g de gelatina (proveniente de piel de porcino para electroforesis Tipo 1, 300 Bloom, Sigma) en un total de 100 ml de agua nanopura (en una botella de Pyrex de 150 ml) y se mezcló a conciencia. La botella fue tapada para evitar la evaporación y fue situada en un horno a una temperatura de 65°C durante 2 horas o hasta la formación de una solución clara. La solución clara de gelatina se utilizó para preparar matrices de hidrogel. Esta solución clara y templada de gelatina (10 ml) fue transferida con una pipeta a una oblea de silicio microfabricada (de 7,6 cm (3") de diámetro) que contenía pilares circulares de 50 µm de diámetro y 50 µm de altura (Figura 1A). La solución de gelatina se esparció de manera uniforme para formar una película delgada que cubría completamente la oblea. Esta oblea de silicio que contenía la película de gelatina fue enfriada a una temperatura de 4°C durante 5 minutos manteniéndola en un refrigerador. El enfriamiento dio como resultado la formación de una matriz de gelatina elástica y resistente desde el punto de vista mecánico. Después del enfriamiento, la matriz de hidrogel de gelatina fue despegada de la oblea de silicio (Figura 1B). La matriz de hidrogel, de 7,6 cm (3") de diámetro, contenía pozos circulares de 50 µm de diámetro y 50 µm de profundidad. La matriz de hidrogel de gelatina fue examinada bajo microscopio de reflectancia de campo claro para determinar su integridad estructural (Figura 1C). Así, la matriz de hidrogel de gelatina se fundió a 45°C.

65 Ejemplo 2. Fabricación de micropartículas de PLGA

Se preparó una solución de PLGA al 20% (MW 60.000; IV 0,8, Birmingham Polymers) disolviendo 2 g de PLGA en 10 ml de diclorometano. Utilizando una pipeta, se transfirieron 200 µl de solución de PLGA al 20% a una matriz de hidrogel de 7,6 cm (3") de diámetro que contenía pozos circulares de 50 µm de diámetro y 50 µm de profundidad. La solución de PLGA se esparció de manera uniforme en la matriz de hidrogel deslizando con una cuchilla formando un ángulo de 45°. Se aplicó una presión moderada para forzar a la solución de PLGA a llenar completamente los pozos sin deformar la matriz de hidrogel (Figura 1D). El deslizamiento de la cuchilla minimizó la formación de película de PLGA en la superficie de la matriz de hidrogel. El llenado completo de los pozos circulares con solución de PLGA y la presencia de micropartículas aisladas se observaron bajo un microscopio de fluorescencia y de campo claro (Olympus BX51 Microscope).

Ejemplo 3. Recogida de Micropartículas

Una matriz de hidrogel llena con una solución de PLGA al 20% se expuso a una temperatura de 25°C durante 10 minutos para retirar el diclorometano de las micropartículas de PLGA. La matriz de hidrogel de gelatina se situó entonces en un matraz de 50 ml que contenía 25 ml de agua nanopura a una temperatura de 45° y se agitó suavemente durante 2 minutos para disolver completamente la matriz de hidrogel (Figura 1E). La temperatura para disolver las matrices de hidrogel de gelatina podía reducirse mediante el dopaje con diversos agentes tales como cloruro de potasio. Este paso dio como resultado una liberación completa de micropartículas individuales. La solución se transfirió a un tubo centrífugo cónico y fue centrifugada (Eppendorf Centrifuge 5804, Rotor A-4-44, a 5.000 rpm, 19,1 RCF) durante 5 minutos, se descartó el líquido flotante, y se recogió el sedimento. El sedimento obtenido después del centrifugado se liofilizó y se almacenó en un refrigerador. El sedimento, después de una re-suspensión en 1 ml de agua nanopura, formó una dispersión de micropartículas libres y aisladas debido a la presencia de moléculas de gelatina adsorbidas en la superficie que funcionan como un estabilizador coloidal mediante repulsión estérica (Figura 1F).

Ejemplo 4. Formación Opcional de Moldes Elastoméricos de PDMS a partir de Matriz maestra de Silicio

Tal como se muestra en la Figura 2, se prepara un molde de impresión de poli-dimetil siloxano (PDMS) (elastómero de silicona SYLGARD® 184) en la parte superior de la matriz maestra en oblea de silicio. La mezcla del monómero elastomérico y el agente de curado (Sylgard 184 Silicone Elastomer, Dow Corning) en un ratio de 10:1 (peso/peso) se mezcla a conciencia. La mezcla se vierte sobre la matriz maestra en oblea de silicio dentro de una placa de Petri (Figura 2A). La placa de Petri se sitúa en el vacío durante 10 minutos para retirar burbujas de aire, y se transfiere entonces a una cámara a 70°C para su curado durante 30 minutos. El molde de impresión de PDMS se despegue de la matriz maestra de silicio (Figura 2B), y el molde de impresión de PDMS se utiliza como una matriz para preparar una matriz de hidrogel (Figura 2C) que se utiliza para preparar nano/micropartículas tal como se describió en los Ejemplos 1 a 3.

Ejemplo 5. Fabricación de Cápsulas de Nano/Micro Mononucleares

Las cápsulas nano/micro con una parte central acuosa mononuclear se forman encapsulando gotitas acuosas con membranas poliméricas biodegradables. Haciendo referencia a la Figura 3, se utiliza PLGA como un polímero representativo. La PLGA se disuelve en un solvente orgánico y la solución se pulveriza sobre un molde de hidrogel utilizando revestimiento centrífugo o bien un atomizador ultrasónico (Figura 3B). La solución de PLGA forma una película delgada en el molde de hidrogel. Debido a la tensión interfacial entre el agua y el solvente orgánico, la mayor parte del solvente orgánico queda esparcido en la superficie del hidrogel. Puesto que existen muchos solventes que pueden utilizarse en este proceso, se examinaron un cierto número de solventes para encontrar el mejor solvente para la formación de la película de PLGA. Se sintetizó un copolímero de PLGA (75/25) y se disolvió en diversos solventes orgánicos para preparar una solución al 2%. El molde de hidrogel está hecho de gelatina con una concentración del 30%.

Una vez que se forma la primera película de PLGA en un molde de hidrogel, se pulverizan gotitas acuosas que contienen agentes bioactivos, que incluyen agentes farmacológicamente activos o agentes de imagen, sobre la primera película de PLGA (Figura 3C). Debido a la alta tensión superficial de las gotitas acuosas, éstas permanecen como gotitas esféricas después de llenar cada orificio. Una vez que los orificios están llenos con solución acuosa, se forma una nueva película de PLGA mediante el mismo proceso (Figura 3D). Esto da como resultado la formación de una gotita acuosa rodeada de una capa de PLGA en cada pozo, es decir, una microcápsula con un núcleo acuoso rodeado por una película de PLGA.

Después de que se ha formado una segunda película de PLGA en las gotitas acuosas, resulta posible que la película de PLGA cubra todo el molde de hidrogel, incluyendo el espacio entre los pozos. En este caso, para separar microcápsulas individuales, se retira la película entre las cápsulas mediante la exposición de todo el molde de hidrogel a decapado por plasma de oxígeno. El decapado por plasma de oxígeno durante unos minutos degrada una fina película de PLGA mientras que a la vez deja intactas las cápsulas. El molde de hidrogel con cápsulas de PLGA en pozos se sitúa entonces en un baño de agua para disolver el molde de gelatina. Cuando se disuelve el molde de gelatina, las moléculas de gelatina pueden adsorberse a la superficie de cápsulas individuales proporcionando repulsión estérica contra la agregación de las cápsulas formadas. Otras técnicas actualmente disponibles no proporcionan ningún medio para estabilizar las cápsulas utilizando el molde de hidrogel.

Ejemplo 6. Fabricación de Matrices de Hidrogel de Gelatina con Temperaturas de Fusión Ajustables

En una fabricación típica de una matriz de gelatina dopada con una gente que puede alterar la temperatura de fusión del gel de gelatina, se disolvieron diferentes sales inorgánicas y agentes biológicos en 100 ml de agua nanopura contenida en una botella de Pyrex de 150 ml. Los diferentes agentes se listan en la Tabla 1. A esta solución, se añadieron 30 g de gelatina (proveniente de piel de porcino para electroforesis Tipo 1, 300 Bloom, Sigma) y se mezcló a conciencia. La botella fue tapada para evitar la evaporación y fue situada en un horno a una temperatura de 55°C durante 2 horas o hasta la formación de una solución clara. La solución clara se utilizó para preparar matrices de hidrogel. Esta solución clara y templada de gelatina (10 ml) fue transferida con una pipeta a una oblea de silicio microfabricada (de 7,6 cm (3") de diámetro) que contenía pilares circulares de 50 µm de diámetro y 50 µm de altura. La solución de gelatina se esparció de manera uniforme para formar una película delgada que cubría completamente la oblea. Esta oblea de silicio que contenía la película de gelatina fue enfriada a una temperatura de 4°C durante 5 minutos manteniéndola en un refrigerador. El enfriamiento dio como resultado la formación de una matriz de gelatina elástica y resistente desde el punto de vista mecánico. Después del enfriamiento, la matriz de hidrogel de gelatina fue despegada de la oblea de silicio. La matriz de hidrogel, de 7,6 cm (3") de diámetro, contenía pozos circulares de 50 µm de diámetro y 50 µm de profundidad. La matriz de hidrogel de gelatina fue examinada bajo microscopio de reflectancia de campo claro para determinar su integridad estructural. Las matrices de hidrogel de gelatina preparadas en presencia de diferentes agentes se fundieron a temperaturas inferiores a 45°C, tal como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Temperatura de fusión de placas de hidrogel de gelatina (30% de gelatina) utilizando diferentes agentes de dopaje.

| Agente de dopaje | Temperatura de fusión |
|--|-----------------------|
| Ninguno (control) | 45°C |
| 5 g de KCl (99+% de pureza, Aldrich) | 29 - 31°C |
| 5 g de NaCl (99+% de pureza, Mallinkrodt) | 35 - 36°C |
| 5 g de LiCl (99+% de pureza, Aldrich) | 35 - 37°C |
| 2 g de albúmina de suero bovino (98% de pureza, Sigma) | 32 - 34°C |

Ejemplo 7. Fabricación de Micropartículas de PLGA con Diversas Formas

Se prepararon micropartículas con formas diversas, y en la Figura 4 se muestran formas a modo de ejemplo. Tal como se muestra, se pudieron preparar de manera sencilla micropartículas con forma de anillo, comecocos, triángulo, estrella, cruz, y diamante. Además de estas formas, también pudieron prepararse de manera sencilla micropartículas con otras formas tales como un círculo común y un cuadrado común.

Ejemplo 8. Fabricación de Micropartículas de Policaprolactona (PCL)

Se preparó una solución de PCL al 20% (d. 1.145, Aldrich) mediante la disolución de 2 g de PCL en 10 ml diclorometano. Se utilizó el mismo proceso para fabricar micropartículas que el descrito en los Ejemplos 1 a 3.

Ejemplo 9. Fabricación de Micropartículas de PLGA de Tamaños Diversos

El tamaño de las micropartículas se varió desde 1,2 µm hasta más de 50 µm simplemente variando el tamaño de microestructuras de la matriz maestra de silicio. Cambiando el tamaño desde 1,2 µm y valores superiores pudo conseguirse fácilmente utilizando fotolitografía UV, pero para tamaños menores de 1,2 µm se utilizó litografía E-beam.

Ejemplo 10. Fabricación de Microestructuras de PLGA Cargadas con Fármaco

Se preparó una solución de PLGA al 20% (MW 60,000; IV 0.8, Birmingham Polymers) disolviendo 2 g de PLGA en 10 ml de diclorometano. A esta solución se le añadió 1 ml de felodipina (1 g/ml en CH₂Cl₂) y se mezcló a conciencia mediante vórtice para obtener una solución felodipina/PLGA (1:2 peso/peso). Utilizando una pipeta, se transfirieron 200 µl de solución felodipina/PLGA a una matriz de hidrogel de 7,6 cm (3") de diámetro que contenía pozos circulares de 50 µm de diámetro y 50 µm de profundidad. La solución de felodipina/PLGA se esparció de manera uniforme en la matriz de hidrogel deslizándolo con una cuchilla. Se aplicó una presión moderada para forzar a la solución de PLGA a llenar completamente los pozos sin deformar la matriz de hidrogel. Además de felodipina, también se incorporaron dentro de las microestructuras otros fármacos, tales como progesterona, griseofulvina, probucol y paclitaxel.

Ejemplo 11. Fabricación de Microestructuras con una Doble Capa de Dos Fármacos o Tintes Diferentes

Se utilizó también una matriz de hidrogel de gelatina para fabricar microestructuras de doble capa que poseen dos capas distintas de dos fármacos diferentes, o bien un fármaco y un tinte, o bien dos tintes diferentes. Se utilizó el mismo método descrito en los Ejemplos 1 a 3 para preparar microdiscos de PLGA de doble capa de fármaco felodipina y tinte nilo rojo. La preparación de micropartículas de doble capa es exclusiva de la estrategia de matriz de hidrogel puesto que resulta muy difícil prepararlas utilizando los métodos actualmente disponibles. Las imágenes de fluorescencia y de campo claro de la Figura 5 muestran claramente la presencia de dos capas claras y distintas de felodipina (azul) y Nilo rojo (rojo).

Ejemplo 12. Fabricación a gran escala de matrices y microestructuras de hidrogel

Se preparó una solución de gelatina (al 30% en volumen) disolviendo 30 g de gelatina (proveniente de piel de porcino para electroforesis Tipo 1, 300 Bloom, Sigma) en 100 ml de agua nanopura (en una botella de Pyrex de 150 ml) y se mezcló a conciencia. La botella fue tapada para evitar la evaporación y situada en un horno a una temperatura de 65°C durante 2 horas o hasta la formación de una solución clara. La solución clara de gelatina preparada de ese modo se utilizó para llenar un revestidor de placa de cromatografía de capa delgada (Camag). Utilizando el revestidor de placa lleno de gelatina, se revistió una lámina de plástico hidrofílica (20 cm x 20 cm; 3M Corporation) con una capa gruesa de gelatina de 300 µm. Las obleas de silicio microfabricadas (de 7,6 cm (3") de diámetro) que contenían pilares circulares de 50 µm de diámetro y 50 µm de altura fueron presionadas contra la película de gelatina y enfriadas a una temperatura de 4°C durante 5 minutos manteniéndolas en un refrigerador. El enfriamiento dio como resultado la formación de una matriz de gelatina elástica y resistente desde el punto de vista mecánico. Después del enfriamiento, la matriz de hidrogel de gelatina fue despegada de la oblea de silicio. La matriz de hidrogel así obtenida tenía un diámetro de 20 cm x 20 cm, y contenía pozos circulares de 50 µm de diámetro y 50 µm de profundidad la matriz de hidrogel así preparada fue llenada con una solución polimérica y a continuación se fundió la matriz de hidrogel para recoger las micropartículas formadas.

Innovación y ventajas

Esta estrategia innovadora utiliza una matriz de hidrogel para fabricar micropartículas. La matriz de hidrogel no sólo sirve como una matriz para fabricar micropartículas, sino que también sirve como un componente de estabilización para micropartículas suspendidas en una solución acuosa al final del proceso. Otro proceso crítico en esta estrategia es la solidificación de un polímero biodegradable mientras está en las microcavidades de la matriz de hidrogel. Esta estrategia supone un contacto mínimo con agua hasta el último paso cuando toda la matriz de hidrogel se disuelve para liberar micropartículas individuales. Este proceso particular es responsable de un alto rendimiento de carga de fármacos dentro de las partículas. No sólo pueden utilizarse polímeros biodegradables, sino que también pueden usarse polímeros inertes, tales como polietileno co-vinil acetato, nailon, caucho de silicona, y poliestireno para fabricar partículas dependiendo de las aplicaciones pretendidas.

Los procesos de microfabricación utilizan una matriz maestra en oblea de silicio, y la forma y el tamaño de las cavidades formadas en la matriz de silicio pueden ser fácilmente controladas, y la distribución de tamaños será muy homogénea. El tamaño puede variarse desde nanómetros hasta micrómetros, y la forma puede variarse desde un simple disco hasta formas más complejas, tales como una estrella o una cruz. La habilidad para controlar el tamaño y la forma en la matriz maestra, es decir, el molde de hidrogel, junto con la habilidad de cargar diversos ingredientes activos, hace que este método innovador de microfabricación sea muy útil.

La presente invención se ha descrito haciendo referencia a ejemplos específicos en aras de la claridad y la comprensión. Las personas expertas en la técnica apreciarán que pueden llevarse a la práctica ciertas modificaciones y mejoras en el seno del alcance de las reivindicaciones anexas y equivalentes de las mismas.

Referencias

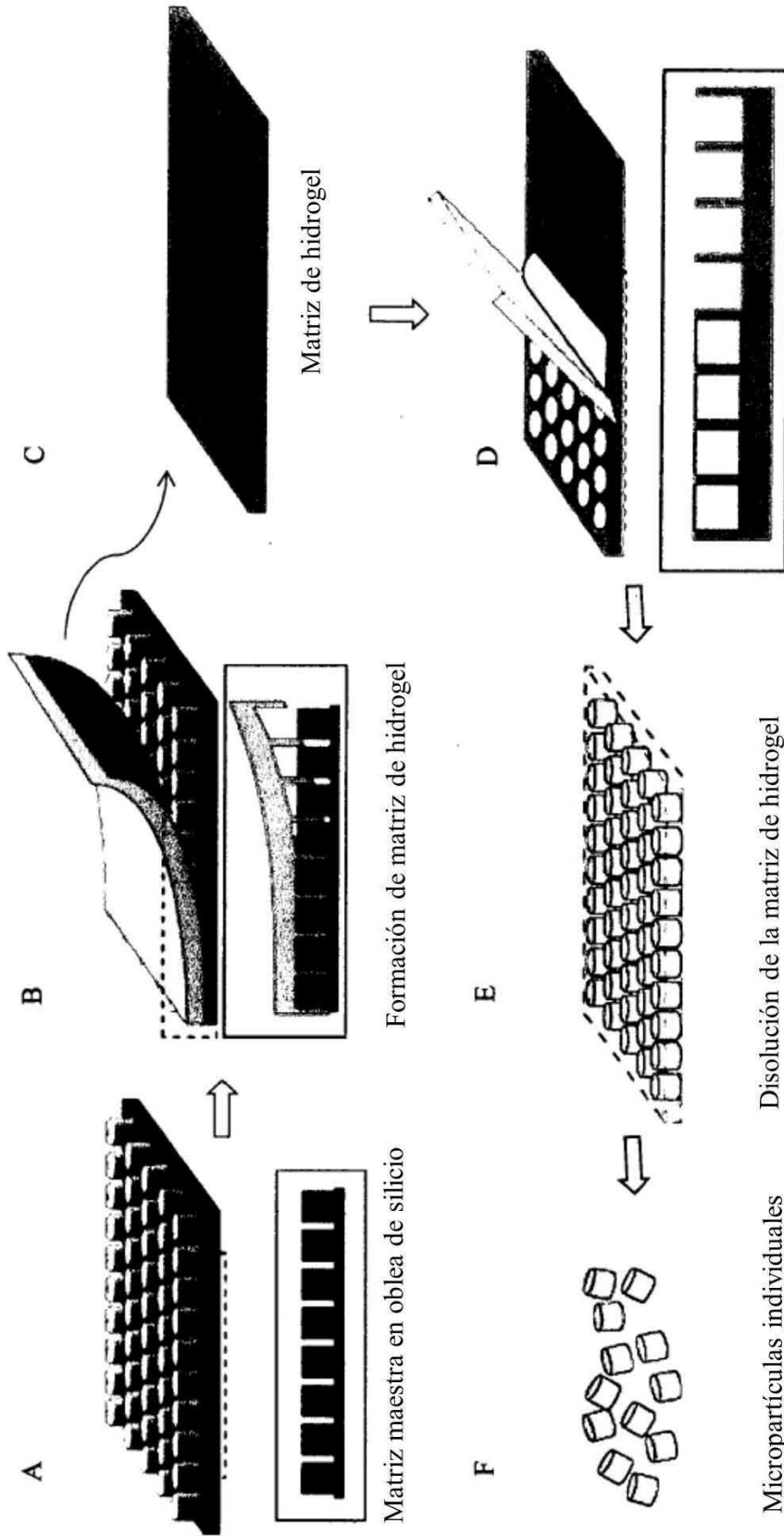
- H. Schiff, Nanoimprint lithography: An old story in modern times? A review. *J. Vac. Sci. Technol.* B26 (2008) 458-479.
- V.N. Truskett, P.C. Watts, Trends in imprint lithography for biological applications. *Trends Biotechnol.* 24 (2006) 312-317.
- C.D. Schaper, Molecular transfer lithography for pseudomaskless, high-throughput, aligned nanolithography. *J. Vac. Sci. Technol.* B21 (2003) 2961-2965.
- Y. Xia, G.M. Whitesides, Soft lithography. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 28 (1998) 153-184.
- L. Yan, W.T.S. Huck, X.-M. Zhao, G.M. Whitesides, Patterning thin films of poly(ethylene imine) on a reactive SAM using microcontact printing. *Langmuir* 15 (1999) 1208-1214.
- X.-M. Zhao, Y. Xia, G.M. Whitesides, Fabrication of three-dimensional micro-structures: Microtransfer molding. *Adv. Mater.* 8(10) (1996) 837-840.
- M. Wang, H.-G. Braun, T. Kratzmüller, E. Meyer, Patterning polymers by micro-fluid-contact printing. *Adv. Mater.* 13 (2001) 1312-1317.
- J. Guan, A. Chakrapani, D.J. Hansford, Polymer microparticles fabricated by soft lithography. *Chem. Mater.* 17 (2005) 6227-6229.
- J.P. Rolland, et al., Direct fabrication and harvesting of monodisperse, shape-specific nanobiomaterials. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 10096-10100.
- J.Y. Kelly, J.M. DeSimone, Shape-specific, monodisperse nano-molding of protein particles. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 5438-5439.

REIVINDICACIONES

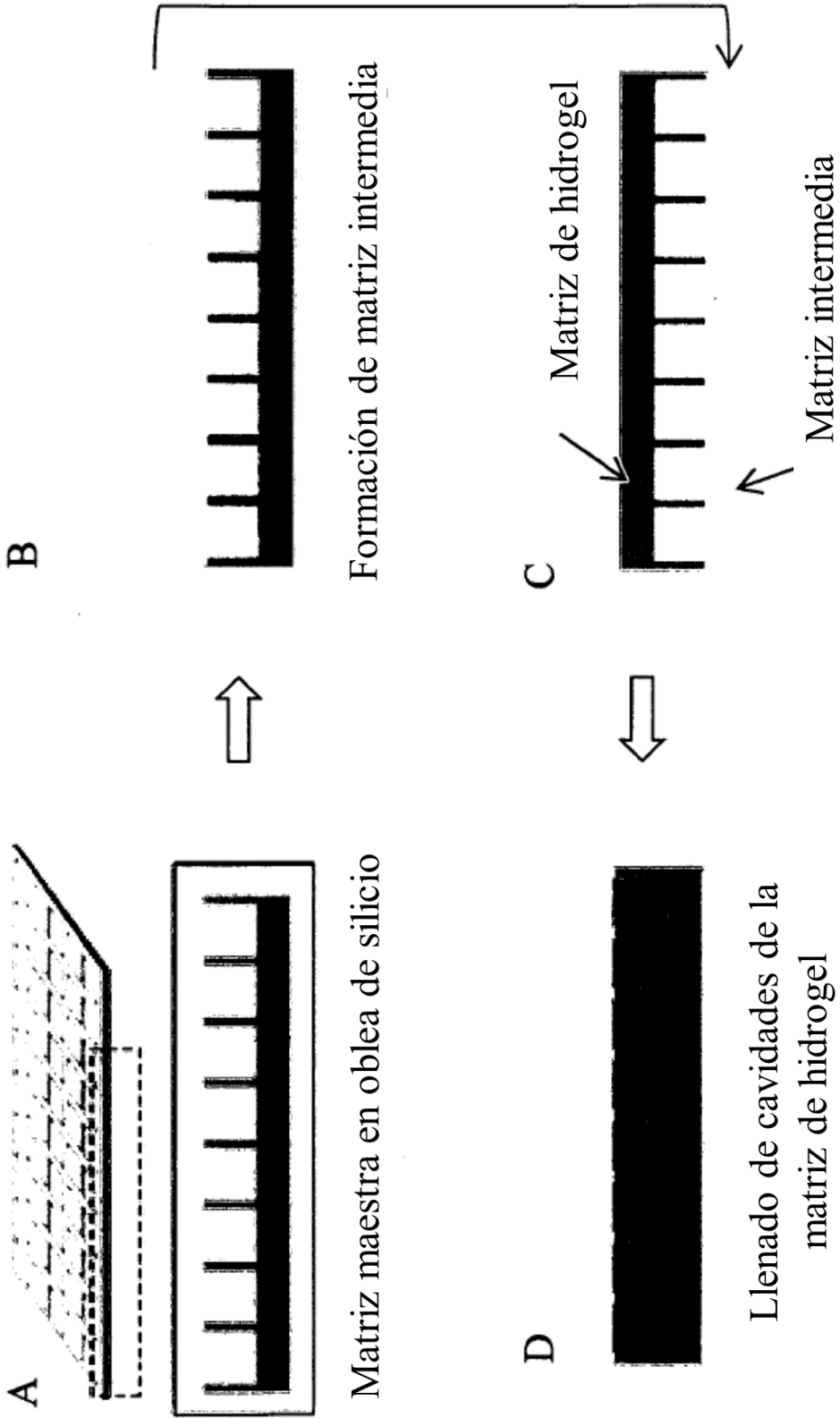
- 1.- Un método para fabricar nanopartículas o micropartículas que comprende:
- 5 (a) fabricar una matriz maestra dotada de una pluralidad de microestructuras;
 (b) de manera opcional, fabricar una matriz polimérica como una imagen negativa de la matriz maestra y separar la matriz polimérica de la matriz maestra;
 (c) revestir la matriz maestra, o la matriz polimérica opcional, con una capa de un sol;
 (d) convertir el sol en un gel para formar la matriz de hidrogel; y
 10 (e) separar la matriz de hidrogel de la matriz maestra, o de la matriz polimérica opcional, permitiendo de este modo la formación de una matriz de hidrogel de sol-gel de fase reversible dotada de una pluralidad de microestructuras, en donde el sol se convierte en gel mediante la inducción de una transición de fase con un cambio de temperatura o bien mediante la inducción de una transición de fase al añadir una sal, una proteína, o un cambio en la valencia de una sal, o un secado;
 15 (f) llenar una pluralidad de pozos en la matriz de hidrogel del paso (e) con una solución no acuosa que posee un polímero insoluble en agua disuelto en la misma;
 (g) solidificar el polímero insoluble en agua en los pozos mediante la evaporación del solvente de la solución no acuosa; y
 (h) recolectar las nanopartículas por las micropartículas de la matriz de hidrogel.
- 20 2.- Un método para fabricar nanopartículas o micropartículas que comprende:
- (a) fabricar una matriz maestra dotada de una pluralidad de microestructuras;
 (b) de manera opcional, fabricar una matriz polimérica como una imagen negativa de la matriz maestra y separar la matriz polimérica de la matriz maestra;
 25 (c) revestir la matriz maestra, o la matriz polimérica opcional, con una capa de un sol;
 (d) convertir el sol en un gel para formar la matriz de hidrogel; y
 (e) separar la matriz de hidrogel de la matriz maestra, o de la matriz polimérica opcional, permitiendo de este modo la formación de una matriz de hidrogel de sol-gel de fase reversible dotada de una pluralidad de microestructuras, en donde el sol se convierte en gel mediante la inducción de una transición de fase con un cambio de temperatura o bien mediante la inducción de una transición de fase al añadir una sal, una proteína, o un cambio en la valencia de una sal, o un secado;
 30 (f) revestir paredes de una pluralidad de pozos en la matriz de hidrogel del paso (e) con una solución no acuosa que posee un polímero insoluble en agua disuelto en la misma;
 (g) añadir gotitas de una solución acuosa a los pozos revestidos;
 35 (h) cubrir las gotitas acuosas con la solución no acuosa que posee el polímero insoluble en agua disuelto en ella; y
 (i) recolectar las nanopartículas o las micropartículas de la matriz de hidrogel.
- 40 3.- El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la solución no acuosa contiene al menos un agente bioactivo disuelto en ella.
- 4.- El método de la reivindicación 3, en donde el agente bioactivo está presente en las nanopartículas o en las micropartículas en el intervalo comprendido entre aproximadamente 1% y aproximadamente 80% en peso, preferiblemente en el intervalo comprendido entre aproximadamente 5% y aproximadamente 50% en peso.
- 45 5.- El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el polímero insoluble en agua es PGLA.
- 6.- El método de la reivindicación 3, en donde el agente bioactivo se selecciona de entre el conjunto formado por paclitaxel, sirolimus, probucol, griseofulvina, inmunoglobulina, factor de crecimiento, insulina, interferón y eritropoyetina.
- 50 7.- El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde las partículas o las micropartículas son recolectadas mediante la disolución de la matriz de hidrogel en solución acuosa o bien mediante el liofilizado de la matriz de hidrogel en un contenedor.
- 55 8.- El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la matriz maestra comprende una oblea de silicio y está formada mediante fotolitografía o mediante grabado por haz de electrones.
- 60 9.- El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la matriz polimérica comprende poli-dimetil siloxano.
- 10.- El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el hidrogel comprende gelatina, agarosa, poli(N-isopropilacrilamida) o alginato.
- 65 11.- El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde una estructura formada en la matriz de hidrogel es

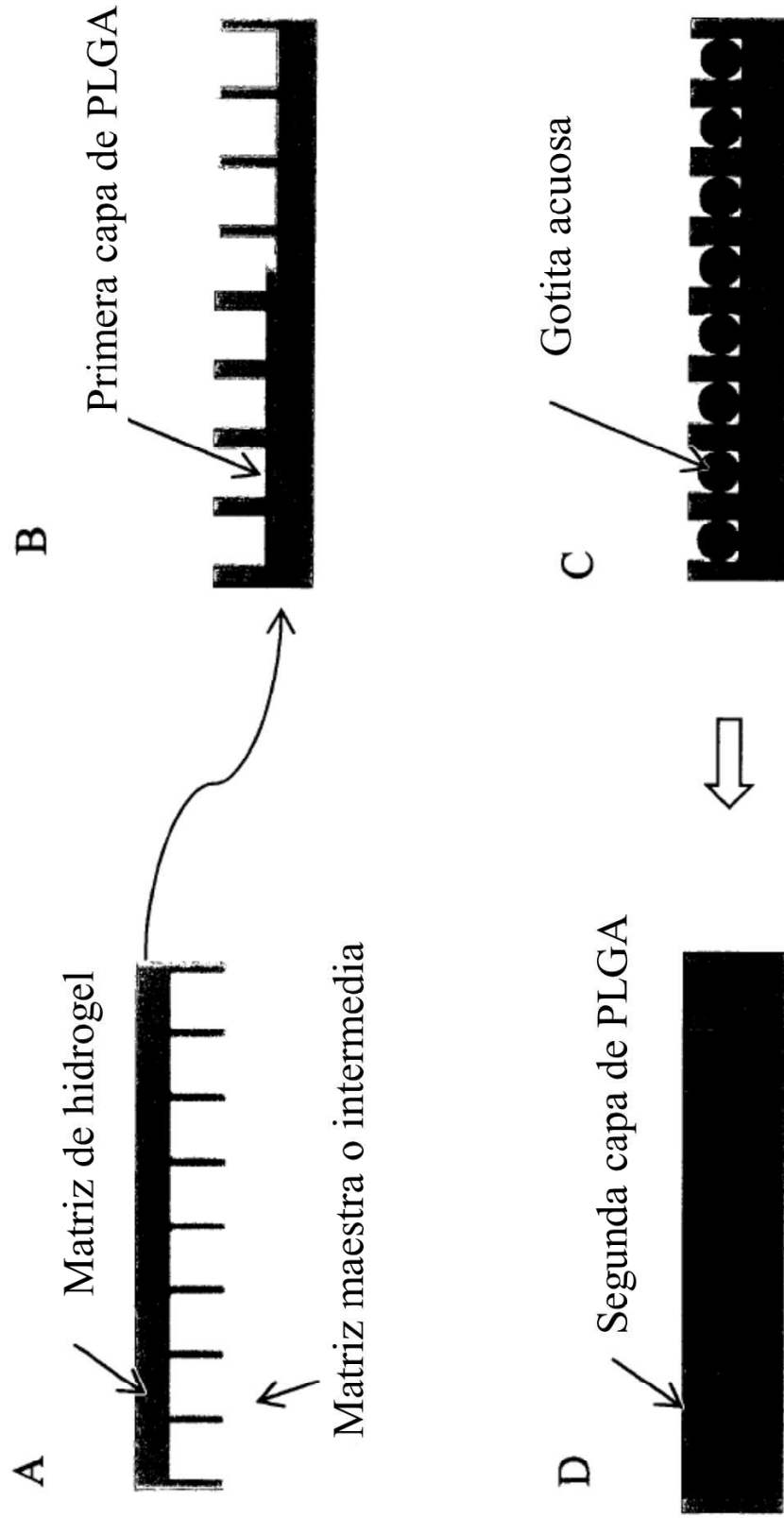
tridimensional.

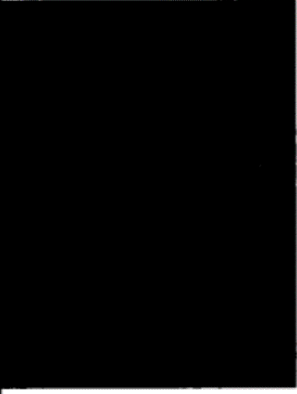
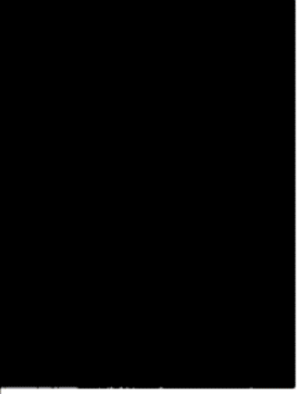
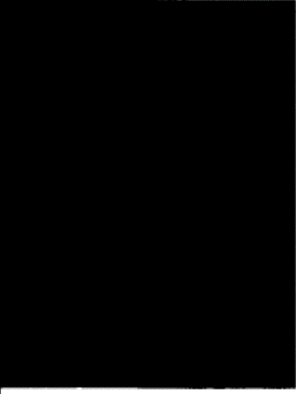
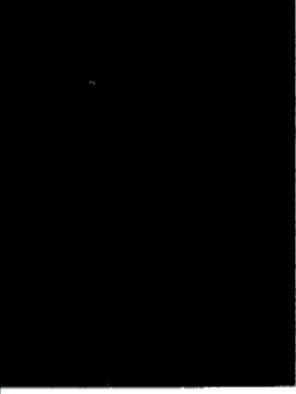
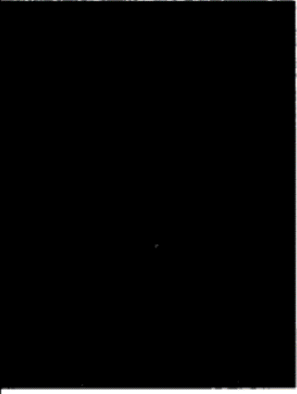
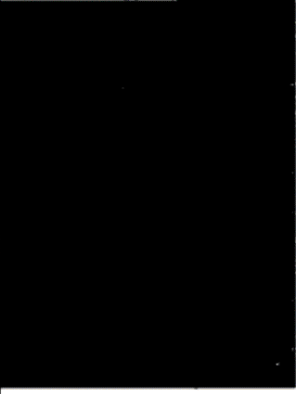
- 5 12. Una nanopartícula o una micropartícula que pueden obtenerse mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la partícula comprende al menos dos capas distintas de forma que cada capa contiene un agente diferente.



Llenado de cavidades de la matriz de hidrogel





| | | | |
|--|---|---|---|
|  <p>Microanillo</p> |  <p>Microtriángulo</p> |  <p>Microestrella</p> |  <p>Microdiamante</p> |
|  <p>Microcomecocos</p> |  <p>Micrococruz</p> | | |

