

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 972**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 47/34 (2007.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 9/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2013 PCT/CA2013/050475**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13188979**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2013 E 13806729 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2863892**

54 Título: **Sistema de administración de nanopartículas mucoadhesivas**

30 Prioridad:

20.06.2012 US 201261690127 P

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

13.03.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF WATERLOO (100.0%)
200 University Avenue West
Waterloo, Ontario N2L 3G1, CA**

72 Inventor/es:

**GU, FRANK;
JONES, LYNDON WILLIAM JAMES y
LIU, SHENGYAN (SANDY)**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 658 972 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

Sistema de administración de nanopartículas mucoadhesivas

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/690.127, presentada el 20 de junio de 2012.

Campo técnico

10 La presente divulgación se refiere generalmente a un sistema de administración de nanopartícula mucoadhesiva. Las nanopartículas pueden adaptarse para el direccionamiento controlado y la adhesión de las nanopartículas a un sitio de la mucosa sin alterar negativamente la estabilidad de las partículas. La presente divulgación se refiere también a componentes útiles en la preparación de las nanopartículas, así como las composiciones, procedimientos, procesos, envases comerciales, kits y usos relacionados con los mismos.

Antecedentes

15 La administración de un fármaco a un paciente con liberación controlada del principio activo ha sido un área de investigación activa durante décadas y se ha visto alimentada por los muchos desarrollos recientes en la ciencia de polímeros. Pueden diseñarse sistemas poliméricos de liberación controlada para proporcionar un nivel de fármaco en el intervalo óptimo a lo largo de un periodo de tiempo más prolongado que otros procedimientos de administración de fármacos, aumentando de este modo la eficacia del fármaco y minimizando los problemas con el cumplimiento del paciente.

20 Nanomedicina -la fusión de nanotecnología y medicina- está entre los enfoques más prometedores para abordar los retos asociados con los procedimientos de administración de fármacos convencionales. En la década pasada, los sistemas de administración de fármacos desarrollados a partir de nanopartículas poliméricas (NP) han sido la piedra angular del progreso en el campo de la nanomedicina. Se han estudiado diversos tipos de materiales poliméricos para las aplicaciones de administración de fármacos NP.

25 PLGA-PEG es el polímero más ampliamente utilizado para preparar sistemas de administración de fármacos biodegradables. El autoensamblaje de los copolímeros en bloque de PLGA-PEG da como resultado generalmente NP de tamaños mayores de 150 nm (Karnik, 2008). Aunque se pueden sintetizar partículas más pequeñas, generalmente adolecen de baja encapsulación del fármaco y una rápida liberación del fármaco (Karnik, 2008). Los presentes inventores notificaron que la carga máxima normal del fármaco en PLGA-PEG se encontró que era de 7,1% en p/p (Verma, 2012). Otros polímeros basados en PEG mostraron que la carga de fármaco variaba de 4,3 a 30 11,2% en p/p (Shuai, 2004; He, 2010; Missirlis, 2006).

35 Se han desarrollado nanopartículas como vehículos de liberación sostenida utilizados en la administración de fármacos de molécula pequeña así como fármacos de proteínas y péptidos y ácidos nucleicos. Los fármacos se encapsulan típicamente en una matriz polimérica que es biodegradable y biocompatible. A medida que se degrada el polímero y/o a medida que el fármaco difunde hacia afuera del polímero, el fármaco se libera en el cuerpo. De forma típica, los polímeros utilizados en la preparación de estas partículas son poliésteres tales como poli(láctido-co-glicólido) (PLGA), ácido poliglicólico, poli-beta-hidroxibutirato, éster de ácido poliacrílico, etc. Estas partículas pueden proteger también el fármaco de la degradación por el cuerpo. Además, estas partículas pueden administrarse usando una gran diversidad de rutas de administración. Se han desvelado diversos tipos de materiales utilizados para sintetizar transportadores de fármacos de nanopartículas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 40 2011/0300219. Se han desvelado nanopartículas asistidas con compuestos anfifílicos para la administración dirigidas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 2010/0203142, documentos EP 1857489 A1 y JP 3412198 B2.

45 Son deseables los sistemas poliméricos de liberación controlada para direccionamiento (por ejemplo, dirigidos a un tejido o tipo de célula concreto o dirigidos a un tejido con una enfermedad específica pero no a un tejido normal). Pueden potenciar el efecto del fármaco en el sitio diana y reducir la cantidad de fármaco presente en los tejidos del cuerpo que no son la diana. Por lo tanto, aunque eficaz para el direccionamiento de fármacos, puede ser posible reducir la cantidad de fármaco administrado para tratar una enfermedad o dolencia concreta y se pueden reducir también los efectos secundarios indeseables.

50 Se pueden obtener diversos beneficios mediante la administración de agentes terapéuticos a través de un tejido mucosal. Por ejemplo, la administración mucosal es generalmente no invasiva, evitando aspectos desagradables de los medios de administración intravenosa, intramuscular, o subcutánea. La aplicación de un agente terapéutico a un tejido mucosal puede reducir también el efecto del metabolismo del primer paso y el aclaramiento por las células inmunitarias en circulación. Sin embargo, dada la tendencia de los fluidos corporales naturales para aclarar los agentes terapéuticos aplicados del sitio de la administración, la administración de agentes terapéuticos a los sitios 55 mucosales, tales como el ojo, nariz, boca, estómago, intestino, recto, vagina, o pulmones, entre otros, puede ser problemática.

La administración tópica es el procedimiento de administración más común empleado para tratar enfermedades y dolencias que afectan al ojo, tales como enfermedades de la córnea. Las formulaciones tópicas comunes, tales como los colirios o pomadas, adolecen de una baja biodisponibilidad ocular debido al rápido drenaje a través del conducto naso-lacrimal, la dilución casi constante debida a la renovación de las lágrimas, y baja permeabilidad del fármaco a través del epitelio de la córnea. Como resultado, las formulaciones tópicas se administran múltiples veces al día para conseguir la eficacia terapéutica, dando como resultado un mayor potencial de efectos secundarios y un cumplimiento del paciente más bajo.

Recientemente, se han propuesto formulaciones que utilizan NP como transportadores de fármacos para superar la limitación asociada con los procedimientos de administración tópica. Los transportadores de NP han mostrado mejorar la estabilidad del fármaco en agua y prolongan también la actividad del fármaco liberando los compuestos encapsulados de una manera controlada (Ludwig, 2005; Nagarwal 2009; Liu, 2012). Las NP formuladas usando polímeros biodegradables, tales como poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), se han ensayado para aplicaciones oculares de administración de fármacos tópicos (Diebold, 1990; Zimmer, 1995). Las NP basadas en poli(etilenglicol) han atraído una atención significativa debido a su capacidad de mejorar la estabilidad de los sistemas transportadores de fármacos en entornos fisiológicos (Bazile, 1995; Dhar, 2008; Dong, 2007; Esmaeili, 2008).

Se ha explorado la síntesis de sistemas de administración de fármacos de NP de superficie funcionalizada. Para conseguir la mucoadhesión, la síntesis requiere normalmente una síntesis en dos etapas, por lo cual la primera etapa implica la formación de NP, mientras que la segunda etapa implica la conjugación de ligandos sobre la superficie de estas NP. Recientemente, la nueva tecnología demostró la formación de NP de direccionamiento usando la síntesis en una etapa por lo cual, la formación de las NP y la funcionalización de la superficie pueden realizarse en una etapa (patente de Estados Unidos n.º 8.323.698). Esta tecnología es particularmente útil para aplicaciones donde se requiere un ligando de direccionamiento mínimo, por ejemplo, para inyecciones de bolos sistémicos, donde el número de ligandos de direccionamiento sobre la superficie debe controlarse para minimizar la inmunogenicidad sistémica. Cuando se forman nanopartículas utilizando el procedimiento en una etapa, se pueden detectar ligandos de direccionamiento en el núcleo de las nanopartículas. Por lo tanto, esta metodología puede no ser ideal cuando se desea un direccionamiento máximo.

Las superficies de las NP poliméricas se han funcionalizado con ligandos moleculares que se pueden unir selectivamente a la mucosa ocular para aumentar la retención del fármaco en la precórnea (du Toit, 2011; Khutoryanskiy, 2011; Shaikh, 2011). Hasta la fecha, el procedimiento utilizado más ampliamente para conseguir la mucoadhesión explota las interacciones electrostáticas entre los residuos de ácido siálico cargados negativamente de la mucina de la córnea y los polímeros catiónicos tales como quitosán (Sogias, 2008). Sin embargo, diversas contraindicaciones pueden impedir las interacciones electrostáticas en el fluido de la lágrima, dando como resultado el aclaramiento de estas NP mediante la renovación de la lágrima.

Se han sugerido en el pasado numerosos grupos de direccionamiento moleculares para el direccionamiento del revestimiento mucosal: patente de Estados Unidos 7.803.392 B2 presentada el 8 de diciembre de 2011, titulada "pH-sensitive mucoadhesive film-forming gels and wax-film composites suitable for topical and mucosal delivery of molecules"; patente de Estados Unidos 2005/0196440, presentada el 8 de septiembre de 2005, titulada "Mucoadhesive drug delivery devices and methods of making and using thereof"; patente de Estados Unidos 2005/0281775, presentada el 22 de diciembre 2005, titulada "Mucoadhesive and bioadhesive polymers"; documento EP 2167044 A1, presentada el 11 de diciembre 2008, titulado "Mucoadhesive vesicles for drug delivery"; documento WO 2005/117844, presentado el 17 de septiembre de 2009, titulado "Mucoadhesive nanocomposite delivery system"; documento WO 2010/096558, presentado el 18 de febrero de 2010, titulado "Bi-functional co-polymer use for ophthalmic and other topical and local applications"; patente de Estados Unidos 2013/0034602, presentada el 30 de julio de 2012, titulada "Enteric-coated capsule containing cationic nanoparticles for oral insulin delivery"; patente EP 2510930 A1, presentada el 15 de abril de 2011, titulada "Nanoparticles comprising half esters of poli (metil vinil éter-co-maleic anhídrido) and uses thereof"; patente de Estados Unidos 8242165 B2, presentada el 26 de octubre de 2007, titulada "Mucoadhesive nanoparticles for cancer treatment"; patente EP 0516141 B1 presentada el 29 de mayo de 1992, titulada "Pharmaceutical controlled-release composition with bioadhesive properties"; documento WO 1998/030207 A1, presentado el 14 de enero de 1998, titulado "Chitosangelatin a microparticles"; patente EP 1652517 B1, presentado el 17 de junio de 2004, titulado "Hyaluronic acid nanoparticles"; patente de Estados Unidos 8361439 B1, presentada el 20 de agosto de 2012, titulada "Pharmaceutical composition of nanoparticles". Sin embargo, estos documentos describen únicamente materiales mucoadhesivos que experimentan interacción física con el revestimiento de la mucosa (por ejemplo, interacción electrostática entre materiales de quitosán catiónicos con la capa de mucina cargada negativamente). La principal desventaja de la interacción física es que es inespecífica y mucho más débil en comparación con las interacciones covalentes.

Unos pocos estudios han notificado grupos de direccionamiento molecular con potencial para unirse covalentemente al tejido mucosal. El ácido fenilborónico (PBA), que contiene un sustituyente fenilo y dos grupos hidroxilo unidos al boro, se ha notificado que forma un complejo con los grupos diol del ácido siálico a pH fisiológico (Matsumoto, 2010; Matsumoto, 2010; Matsumoto, 2009). Otras clases de moléculas que se pueden unir covalentemente a la membrana mucosa son los tíómeros poliméricos (Ludwig, 2005). Estos tíómeros son capaces de formar un enlace disulfuro covalente con los subdominios ricos en cisteína de la membrana mucosa (Khutoryanskiy, 2010). Los ejemplos típicos de tíómeros poliméricos incluyen los siguientes conjugados: poli(ácido

acrílico)/cisteína (Gugg, 2004), quitosán/N-acetilcisteína (Schmitz, 2008), alginato/cisteína (Bernkop-Schnurch, 2008) quitosán/ácido tio-glicólico (Sakloetsakun, 2009) y quitosán/tioetilamidina (Kafedjiiski, 2006). Un estudio reciente sugirió también que los polímeros con grupos terminales acrilato son también capaces de unirse a los residuos tioles de la membrana mucosa a través de la adición de Michael (Davidovich-Pinhas y Bianco-Peled 2010). El estudio demostró que el diacrilato de poli(etilenglicol) formó un enlace covalente estable con los grupos tiol de la mucina del intestino delgado de porcino extraído recientemente en condiciones fisiológicas, lo que se confirmó usando la caracterización mediante RMN.

Es deseable proporcionar sistemas de administración de nanopartículas de direccionamiento para la administración controlada de una carga útil a un sitio de la mucosa. En particular, Es deseable proporcionar sistemas de administración mucoadhesiva mejorados que puedan ser retenidos en un sitio de la mucosa durante un periodo de tiempo suficiente para proporcionar la liberación sostenida de la carga útil. Es particularmente deseable ser capaces de ajustar dichos sistemas de administración de tal manera que se pueda controlar la extensión del direccionamiento y la adhesión sin comprometer sustancialmente la estabilidad del sistema de administración.

Sumario

La presente divulgación se refiere generalmente a un sistema de administración de nanopartícula mucoadhesiva. La presente invención se define mediante las reivindicaciones 1 a 9 adjuntas.

En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona una composición de nanopartículas útil para la administración de una carga útil a un sitio de la mucosa, comprendiendo las nanopartículas una pluralidad de macromoléculas anfifílicas, comprendiendo las macromoléculas: una porción hidrófoba; una porción hidrófila que comprende múltiples residuos funcionales; y un residuo de direccionamiento a la mucosa, en el que al menos una parte de dichos residuos funcionales de la porción hidrófila se conjugan con el residuo de direccionamiento a la mucosa.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona una composición de nanopartículas útil para la administración de una carga útil a un sitio de la mucosa, comprendiendo las nanopartículas una pluralidad de macromoléculas anfifílicas, comprendiendo las macromoléculas: una porción hidrófoba que comprende un polímero biocompatible seleccionado entre un poliláctido, un poliglicólido, poli(láctido-co-glicólido), poli(ϵ -caprolactona), o una combinación de los mismos; una porción hidrófila que comprende un polímero biocompatible seleccionado entre un polisacárido, polinucleótido, polipéptido, o una combinación de los mismos, comprendiendo la porción hidrófila múltiples residuos funcionales; y un residuo de direccionamiento a la mucosa seleccionado entre derivados de ácido fenilborónico (PBA), un derivado de tiol o un derivado de acrilato, en el que al menos una parte de dichos residuos funcionales de la porción hidrófila se conjugan con el residuo de direccionamiento a la mucosa.

En una realización adicional, se proporciona una composición de nanopartículas útil para la administración de una carga a un sitio de la mucosa, comprendiendo las nanopartículas una pluralidad de macromoléculas anfifílicas, comprendiendo cada una de las macromoléculas: un polímero biocompatible hidrófobo seleccionado entre un poliláctido, un poliglicólido, poli(láctido-co-glicólido), poli(ϵ -caprolactona), o una combinación de los mismos, formando el polímero hidrófobo el núcleo de la nanopartícula; un polímero biocompatible hidrófilo seleccionado entre un polisacárido, polinucleótido, polipéptido, o una combinación de los mismos, que tiene múltiples residuos funcionales, formando el polímero hidrófilo la envoltura de la nanopartícula; estando conjugada al menos una parte de los residuos funcionales con un residuo de direccionamiento a la mucosa seleccionado entre un derivado de ácido fenilborónico (PBA), un derivado de tiol o un derivado de acrilato.

En una realización adicional, se proporciona una composición de nanopartículas útil para la administración de una carga a un sitio de la mucosa, comprendiendo las nanopartículas una pluralidad de macromoléculas anfifílicas, comprendiendo las macromoléculas: una porción hidrófoba que comprende un poliláctido; una porción hidrófila que tiene múltiples residuos funcionales, comprendiendo dicha porción hidrófila dextrano; y un residuo de direccionamiento a la mucosa que es un derivado de un ácido fenilborónico (PBA), en el que al menos una parte de dichos residuos funcionales de la porción hidrófila se conjugan con el residuo de direccionamiento a la mucosa.

En una realización adicional, se proporciona una composición de nanopartículas útil para la administración de una carga a un sitio de la mucosa, comprendiendo las nanopartículas una pluralidad de macromoléculas anfifílicas, comprendiendo cada una de las macromoléculas un polímero de poliláctido hidrófobo conjugado con un polímero de dextrano hidrófilo que tiene múltiples residuos funcionales, estando conjugada al menos una parte de dichos residuos funcionales con un derivado de ácido fenilborónico (PBA).

En una realización adicional, se proporciona un copolímero en bloques de dextrano-p-PLA, en el que al menos una parte de los grupos funcionales del dextrano se conjugan con un residuo de direccionamiento capaz de formar un enlace de alta afinidad con una diana en un sitio de la mucosa.

En algunas realizaciones, la nanopartícula se forma conjugando el poliláctido con el dextrano para formar una nanopartícula y posteriormente funcionalizado la superficie de la nanopartícula conjugando al menos una parte de los residuos funcionales del dextrano con el derivado de PBA para conseguir una densidad de superficie deseada del derivado de PBA.

En algunas realizaciones, la nanopartícula se forma conjugando el poliláctido con el dextrano para formar una nanopartícula y, posteriormente, haciendo reaccionar los grupos funcionales del dextrano con el PBA de tal manera que sustancialmente todo el PBA se localiza en la envoltura/sobre la superficie de la nanopartícula.

5 En algunas realizaciones, el núcleo de la nanopartícula está sustancialmente exento de un residuo de direccionamiento.

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una composición de nanopartículas como se define en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En otro aspecto, se proporciona un sistema de administración mucoadhesivo para administrar una carga útil a una superficie de la mucosa, comprendiendo el sistema de administración una composición de nanopartículas como se define en el presente documento; un transportador farmacéuticamente aceptable; y una carga.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o dolencia que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una composición de nanopartículas o una composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

15 En otro aspecto, se proporciona un uso de la composición de nanopartículas o la composición farmacéutica como se describe en el presente documento para tratar una enfermedad capaz de tratarse administrando un agente terapéutico a un sitio de la mucosa.

En otro aspecto, se proporciona a uso de la composición de nanopartículas. como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad capaz de tratarse administrando un agente terapéutico a un sitio de la mucosa.

20 En otro aspecto, se proporciona una composición de nanopartículas o una composición farmacéutica como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad capaz de tratarse administrando un agente terapéutico a un sitio de la mucosa.

25 En otro aspecto, se proporciona un envase comercial que comprende una composición de nanopartículas o una composición farmacéutica como se describe en el presente documento, junto con instrucciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para preparar una composición de nanopartículas útil para la administración de una carga a un sitio de la mucosa, comprendiendo el procedimiento:

30 a) preparar una macromolécula hidrófila que comprende una porción hidrófila y una porción hidrófoba, comprendiendo la porción hidrófila múltiples residuos funcionales; b) ensamblar una pluralidad de dichas macromoléculas en condiciones adecuadas para formar una nanopartícula que tiene un núcleo hidrófobo y una envoltura hidrófila; y c) conjugar al menos una parte de dichos residuos funcionales de la porción hidrófoba con un residuo de direccionamiento a la mucosa para proporcionar una nanopartícula funcionalizada en la superficie.

35 Otros aspectos y características de la presente divulgación serán evidentes para las personas normalmente expertas en la materia tras una revisión de la siguiente descripción de las realizaciones específicas junto con las figuras acompañantes.

Breve descripción de los dibujos

Se describirán ahora las realizaciones de la presente divulgación, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a las Figuras adjuntas.

40 La Fig. 1 son espectros de RMN en diversas etapas de la síntesis del copolímero en bloque: a) RMN de protón de I. Dextrano de 6kDa (D2O), II. Dextrano-NH-Et-NH-Boc (D2O), III. Dextrano-NH-Et-NH₂ (D2O), IV. PLA 20 kDa (DMSO-d₆), V. Dextrano-Et-PLA, o PLA20-Dex6 (DMSO-d₆); b) RMN de carbono del copolímero en bloque I. PLA de 20 kDa, II. Dextrano de 6 kDa, III. Dex-Et-PLA (PLA20-Dex6) confirmando la conjugación de dextrano y PLA.

45 La Fig. 2 muestra el tamaño de partículas y la morfología de las NP de dextrano-b-PLA: a) Efecto de los PM de PLA y dextrano sobre los tamaños de las NP formadas a partir de nueve polímeros diferentes usando PLA con un PM de 10 kDa (rojo), 20 kDa (verde) y 50 kDa (azul), y Dextrano con un PM de 1,5 kDa, 6 kDa y 10 kDa. Las barras negras representan la desviación estándar de los tamaños de partículas de los tamaños de partículas de cada copolímero en bloque; b) Imagen de las NP de TEM de PLA20-Dex6 (la barra de escala es de 100 nm) para demostrar la forma esférica de las nanopartículas.

50 La Fig. 3 es una gráfica de la encapsulación del fármaco en las NP: a) Eficacia de encapsulación de la doxorubicina en NP de Dex-b-PLA y PLGA-PEG usando nanoprecipitación y b) la correspondiente carga de fármaco en % en peso. Las columnas de color gris relleno son para las NP de PLA20-Dex6, las columnas de color blanco relleno son para las NP de PLA20-Dex10 y las columnas con el modelo de líneas en diagonal son para las NP de PLGA-PEG (n = 3; promedio ± S.D).

La Fig. 4 es una gráfica de los perfiles de liberación acumulativos de la doxorubicina *in vitro* de las NP de Dex-b-PLA y PLGA-PEG realizados en PBS a 37°C. los cuadrados rellenos (■) son para PLA20-Dex10, los círculos rellenos (●) son para PLA20-Dex6 y los triángulos rellenos (▲) son para las NP de PLGA-PEG NP (n = 3; promedio ± S.D).

5 La Fig. 5 es una gráfica de la actividad hemolítica de las NP de Dex-b-PLA y PLGA-PEG para las concentraciones relevantes respecto de la dosis teórica administrada en sangre. Se usó VSB como control negativo y se usó agua desionizada como control positivo en eritrocitos de oveja. Las columnas de color gris relleno son para las NP de PLA20-Dex6, las columnas de color blanco relleno son para las NP de PLA20-Dex10 y las columnas con el modelo de líneas en diagonal son para las NP de PLGA-PEG (n = 3; promedio ± S.D).

10 La Fig. 6 es una gráfica que ilustra perfiles farmacocinéticos de las NP de Dextrano-b-PLA y PLGA-PEG administradas a 30 mg/kg *i.v.* a ratas. Se realizó un seguimiento de la concentración de NP en sangre usando nanocristales radiomarcados con [3H]-PLA. Los cuadrados rellenos (■) son para PLA20-Dex10, los círculos rellenos (●) son para PLA20-Dex6 y los triángulos rellenos (▲) son para NP de PLGA-PEG (n = 5, promedio ± S.D).

15 La Fig. 7. es una gráfica que ilustra la biodistribución de las NP de Dextrano-b-PLA y PLGA-PEG en diversos órganos en las ratas 24 después de la inyección. Las columnas de color gris relleno son para las NP de PLA20-Dex6, las columnas de color blanco relleno son par las NP de PLA20-Dex10 y las columnas con un modelo de líneas en diagonal son para las NP de PLGA-PEG (n = 5, promedio ± S.D) **: p < 0,01.

20 La Fig. 8 es una ilustración esquemática de la mucoadhesión usando partículas sobre la mucosa ocular mucosa para evitar los mecanismos de aclaramiento tales como la dilución de las lágrimas y la renovación de las lágrimas. Los agentes mucoadhesivos están presentes a través de la superficie de los transportadores de nanopartículas.

La Fig. 9 es una ilustración esquemática de la mucoadhesión de NP de Dextrano-b-PLA modificado con PBA sobre residuos de ácido siálico presentes en la mucosa ocular para evitar los mecanismos de aclaramiento tales como la dilución de las lágrimas y la renovación de las lágrimas.

25 La Fig. 10 es una ilustración esquemática de la estructura de las nanopartículas mucoadhesivas con variaciones de residuos de direccionamiento sobre la superficie de las nanopartículas. La presencia de múltiples sitios para la conjugación de los residuos de direccionamiento con la superficie de la nanopartícula proporciona un alto grado de adaptabilidad del direccionamiento.

30 La Fig. 11 es una ilustración esquemática de una realización que muestra la superficie modificada de las NP con PBA utilizando una solución en dos etapas: la oxidación del peryodato de dextrano y la conjugación de los grupos aldehído en el dextrano oxidado con grupos amina del PBA.

La Fig. 12a demuestra la verificación de la RMN H¹ de la presencia de PBA en las cadenas poliméricas de Dex-b-PLA. La Fig. 12b demuestra la morfología esférica de las NP del Dex-b-PLA_PBA.

35 La Fig. 13 demuestra la verificación por RMN H¹ de la presencia de cisteamina en las cadenas poliméricas de Dex-b-PLA que expondría los grupos tiol sobre la superficie de las NP.

Fig. 14 demuestra la propiedad de mucoadhesión mejorada, medida usando el procedimiento de tinción PAS, de las NP de Dex-b-PLA después de la superficie modificada con PBA.

40 Las Figs. 15 y 16 demuestra la capacidad de las NP de Dex-b-PLA_PBA para cargar hasta 13,7% en p/p del fármaco ciclosporina A, y su capacidad para liberarlo de manera sostenida durante hasta 5 días en un experimento *in vitro*.

La Fig. 17 demuestra la capacidad de las NP de Dex-b-PLA para encapsular diversos principios activos. Se encapsularon olopatadina y doxorubicina en Dex-b-PLA. Dorzolamida, brinzolamida, y natamicina se encapsularon en las NP Dex-b-PLA_PBA.

45 La Fig. 18 demuestra la capacidad de las NP de Dex-b-PLA_PBA de liberar dorzolamida (utilizada en el tratamiento del glaucoma) de una manera sostenida durante hasta 18 horas en un experimento *in vitro*. Las NP fueron capaces de cargar hasta un 2,8% en p/p de dorzolamida.

La Fig. 19 demuestra la capacidad de las NP de Dex-b-PLA_PBA de liberar brinzolamida (utilizada en el tratamiento del glaucoma) de una manera sostenida durante hasta 11 días en un experimento *in vitro*. Las NP fueron capaces de cargar hasta 6,54% en p/p de brinzolamida.

50 La Fig. 20 demuestra la capacidad de las NP de Dex-b-PLA_PBA de liberar natamicina (utilizada en el tratamiento de la infección fúngica ocular) de una manera sostenida durante hasta 24 horas en un experimento *in vitro*. Las NP fueron capaces de cargar hasta 3,88% en p/p de natamicina.

La Fig. 21 es una ilustración esquemática del reparto de nanotransportadores de nanopartículas a través de la capa lipídica del fluido de lágrimas.

55 La Fig. 22 demuestra que estos diversos tipos de transportadores de nanopartículas son capaces de conseguir un alto porcentaje de reparto a través de la capa lipídica del fluido de lágrimas.

La Fig. 23 demuestra la compatibilidad de la formulación de NP que no muestra efectos de toxicidad a corto plazo sobre la superficie ocular en conejos. Las NP tratadas y los ojos del control (ojos contralaterales) tras la administración una vez de la formulación de NP se graduaron utilizando 7 categorías diferentes (incomodidad, enrojecimiento de la conjuntiva e hinchazón, hinchazón del párpado, descarga, opacificación de la córnea, e infiltraciones) mediante examen diario con lámpara de hendidura. Los grados demuestran que no existe un aumento significativo en términos de gravedad en cada categoría en el ojo tratado con NP en comparación con el ojo del control.

65 La Fig. 24 muestra el análisis histopatológico de la córnea, la conjuntiva bulbar y tarsal, una semana después de la administración de la formulación de NP ilustrativa en conejos. Los resultados demuestran que la estructura y la

morfología de los tejidos oculares están bien preservadas tras la formulación de NP y no se observaron signos de inflamación.

La Fig. 25 demuestra la compatibilidad de la formulación de NP ilustrativa que no muestra efecto de toxicidad a largo plazo sobre la superficie ocular en conejos tras una administración semanal durante hasta 12 semanas. La respuesta crónica de las superficies oculares entre las NP tratadas y los ojos del control (ojos contralaterales) se evaluaron de forma similar utilizando 7 categorías diferentes (incomodidad, enrojecimiento de la conjuntiva e hinchazón, hinchazón del párpado, descarga, opacificación de la córnea, e infiltraciones) mediante el examen con lámpara de hendidura. Los grados demuestran que no existe diferencia significativa en términos de gravedad de cada categoría en el ojo tratado con NP en comparación con el ojo del control a lo largo de la duración del estudio.

La Fig. 26 compara la respuesta crónica de las superficies oculares entre el fármaco de NP tratado y los ojos del control (ojos contralaterales) tras una administración semanal de la formulación que contiene NP encapsuladas con ciclosporina A en conejos. Los grados de 7 categorías diferentes (incomodidad, enrojecimiento de la conjuntiva e hinchazón, hinchazón del párpado, descarga, opacificación de la córnea, e infiltraciones) se obtuvieron mediante el examen diario con lámpara de hendidura durante hasta 4 semanas. Los grados demuestran que no existe diferencia significativa en términos de gravedad de cada categoría en el ojo tratado con NP en comparación con el ojo del control a lo largo de la duración del estudio.

Descripción detallada

En general, la presente divulgación se refiere a un sistema de administración de nanopartícula mucoadhesiva. Las nanopartículas se forman a partir de macromoléculas anfifílicas, tales como copolímeros de bloques, que comprenden una porción hidrófila y una porción hidrófoba. La porción hidrófoba comprende múltiples grupos funcionales que se pueden conjugar con un residuo de direccionamiento, tal como un residuo de direccionamiento a la mucosa. En un entorno acuoso, la porción hidrófila constituye la envoltura de la nanopartícula, proporcionando una superficie que se puede funcionalizar revistiendo la nanopartícula con una densidad superficial deseada del residuo de direccionamiento. El tamaño de las nanopartículas y la densidad superficial de los residuos de direccionamiento se pueden adaptar sin comprometer sustancialmente la estabilidad de las partículas. Las nanopartículas son útiles para suministrar una gran diversidad de cargas a un sitio mucoso de un sujeto, y son capaces de proporcionar liberación sostenida de la carga. Las nanopartículas demostraron buena capacidad de carga y eficacia de carga.

La presente divulgación también se refiere a componentes útiles en la preparación de las nanopartículas mucoadhesivas, así como composiciones, procedimientos, procesos, envases comerciales, kits y usos relacionados con los mismos.

MACROMOLÉCULAS

Las nanopartículas de la presente divulgación están generalmente formadas por la asociación o ensamblaje de macromoléculas anfifílicas. Las macromoléculas están compuestas de al menos una porción hidrófoba y al menos una porción hidrófila. La macromolécula puede comprender un polímero hidrófobo conjugado con un polímero hidrófilo. Dichas macromoléculas pueden autoensamblarse para formar nanopartículas de acuerdo con procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, incluidos los procedimientos de nanoprecipitación.

Un "polímero", como se usa en el presente documento, se refiere a una estructura molecular que comprende una o más unidades de repetición (por ejemplo, monómeros), conectadas por enlaces covalentes. Las unidades de repetición pueden ser idénticas o, en algunos casos, puede haber más de un tipo de unidad de repetición presente dentro del polímero. Los polímeros se pueden obtener de fuentes naturales o se pueden sintetizar químicamente. En algunos casos, el polímero es un biopolímero, tal como un polisacárido, polipéptido o polinucleótido. Los biopolímeros pueden comprender monómeros naturales o derivados de los mismos, por ejemplo, derivados o análogos que comprenden azúcares modificados, nucleótidos o aminoácidos. Algunas de estas modificaciones son conocidas por los expertos en la materia. En algunos casos, el polímero es un polímero sintético, tal como poliláctido (PLA), poliglicólido (PGA), o poli(láctido-co-glicólido) (PLGA) o poli(ϵ -caprolactona) (PCL).

Si está presente más de un tipo de unidad de repetición en el polímero, entonces se dice que el polímero es un "copolímero". Las unidades de repetición que forman un copolímero pueden disponerse de cualquier forma. Por ejemplo, las unidades de repetición pueden disponerse en un orden aleatorio, en un orden alternante, o en "bloques". Tal como se usa en el presente documento, un "copolímero de bloques" comprende dos o más bloques o regiones distintos, por ejemplo al menos un primer bloque que comprende un primer polímero y un segundo bloque que comprende un segundo polímero. Debe entenderse que, en este contexto, los términos "primero" y "segundo" no describen un orden o número de elementos concretos, sino que son meramente descriptivos. Un copolímero de bloques, puede tener dos bloques (un "copolímero dibloque"), tres bloques (un copolímero tribloque) o más bloques distintos.

Los copolímeros de bloques pueden sintetizarse químicamente o pueden ser conjugados poliméricos. Tal como se usa en el presente documento, un "conjugado polimérico" describe dos o más polímeros que se han asociado entre sí, habitualmente mediante enlaces covalente de dos o más polímeros entre sí. Por lo tanto, un conjugado polimérico

puede comprender un primer polímero y un segundo polímero, que se han conjugado entre sí para formar un copolímero en bloque, en el que el primer polímero es un primer bloque del copolímero en bloque y el segundo polímero es un segundo bloque del copolímero en bloque. Por supuesto, los expertos en la materia entenderán que un copolímero de bloques puede, en algunos casos, contener múltiples bloques de polímero. Por ejemplo, un copolímero de bloques puede comprender un primer bloque que comprende un primer polímero, un segundo bloque que comprende un segundo polímero y un tercer bloque que comprende un tercer polímero o el primer polímero, etc. Además, debería señalarse los copolímeros de bloques también pueden formarse, en algunos casos, a partir de otros copolímeros de bloques. Por ejemplo, un primer copolímero de bloques se puede conjugar con otro polímero para formar un nuevo copolímero de bloques que contiene múltiples tipos de bloques. Los polímeros se pueden conjugar por cualquier medio conocido en la técnica y opcionalmente se pueden conectar mediante un residuo enlazador adecuado.

Un copolímero de bloques anfílico tiene generalmente una porción hidrófoba y una porción hidrófila, o al menos una porción relativamente hidrófila y una porción relativamente hidrófoba cuando dos porciones se consideran una respecto de la otra. Un polímero hidrófilo es uno que generalmente atrae agua y un polímero hidrófobo es uno que generalmente repele el agua. Un polímero hidrófilo o hidrófobo puede identificarse, por ejemplo, mediante la preparación de una muestra del polímero y medición de su ángulo de contacto con el agua (típicamente, el polímero hidrófilo tendrá un ángulo de contacto de menos de 60°, mientras que un polímero hidrófobo tendrá un ángulo de contacto de más de aproximadamente 60°). En algunos casos, la hidrofiliidad de dos o más polímeros puede medirse de un polímero respecto al otro, es decir, un primer polímero puede ser más hidrófilo que un segundo polímero.

En algunas realizaciones, la macromolécula es un copolímero que comprende una porción hidrófoba y una porción hidrófila. En algunas realizaciones, la macromolécula es un copolímero dibloque que comprende un primer polímero hidrófilo y un segundo polímero hidrófilo. Dichas configuraciones son generalmente útiles para formar nanopartículas para encapsular agentes hidrófobos de interés en un entorno acuoso, tal como en condiciones fisiológicas, ya que las porciones hidrófobas protegerán el agente hidrófobo situado en la región del núcleo de la nanopartícula y la porción hidrófila formará la envoltura de la nanopartícula mediante su orientación hacia el entorno acuoso.

En una realización, la macromolécula es un copolímero dibloque Dextrano-b-PLA (Dex-b-PLA), que puede estar opcionalmente funcionalizada en la porción del dextrano con uno o más residuos de direccionamiento, tal como un residuo de direccionamiento a la mucosa.

En algunas realizaciones, la macromolécula es un copolímero tribloque que comprende un primer polímero hidrófilo, un segundo polímero hidrófilo, y un tercer polímero hidrófilo. Dichas configuraciones son generalmente útiles para formar nanopartículas para encapsular agentes hidrófilos de interés en un entorno acuoso, tal como en condiciones fisiológicas.

Como la macromolécula quedará expuesta a los tejidos corporales, es preferible que la macromolécula comprenda un polímero biocompatible, por ejemplo, que el polímero no induzca una respuesta adversa significativa cuando se administra a un sujeto vivo, por ejemplo, se puede administrar sin producir una inflamación significativa, irritación y/o rechazo agudo por el sistema inmunitario.

En algunas realizaciones, el polímero biocompatible es biodegradable, por ejemplo, el polímero puede degradarse, química y/o biológicamente, en un entorno fisiológico, tal como cuando está expuesto a un tejido corporal. Por ejemplo, el polímero puede ser uno que se hidrolice espontáneamente tras su exposición a agua (por ejemplo, dentro de un sujeto), el polímero puede degradarse tras su exposición a calor (por ejemplo, a temperaturas de aproximadamente 37° C). La degradación de un polímero puede producirse a diferentes velocidades, dependiendo del polímero o copolímero usado. Por ejemplo, la semivida del polímero (el tiempo en que se degrada el 50 % del polímero en monómeros y/u otros residuos no poliméricos) puede ser de unas horas, días, semanas, meses o años, dependiendo del polímero. Los polímeros pueden degradarse biológicamente, por ejemplo, mediante actividad enzimática o por la maquinaria celular, en algunos casos, por ejemplo, mediante la exposición a una lisozima (por ejemplo, que tenga un pH relativamente bajo). En algunos casos, los polímeros pueden descomponerse en monómeros y/u otros residuos no poliméricos que las células pueden reutilizar o desechar sin efectos tóxicos significativos sobre las células (por ejemplo, el poliláctido puede hidrolizarse para formar ácido láctico, el poliglicólido puede hidrolizarse para formar ácido glicólico, etc.).

Los ejemplos no limitantes de polímeros biodegradables incluyen, aunque no de forma limitativa, polisacáridos, polinucleótidos, polipéptidos, poli(láctido) (o poli(ácido láctico)), poli(glicólido) (o poli(ácido glicólico)), poli(ortoésteres), poli(caprolactonas), polilisina, poli(etiliminina), poli(ácido acrílico), poli(uretanos), poli(anhídridos), poli(ésteres), poli(trimetilencarbonato), poli(etiliminina), poli(ácido acrílico), poli(uretano), poli(beta aminoésteres) o similares, y copolímeros o derivados de estos y otros polímeros, por ejemplo, poli(láctido-co-glicólido) (PLGA).

En determinadas realizaciones, los copolímeros pueden contener poli(éster-éter)es, por ejemplo, polímeros que tienen unidades de repetición unidas por enlaces éster (por ejemplo, enlaces R-C(O)-O-R') y enlaces éter (por ejemplo, enlaces R-O-R'). En algunas realizaciones, la nanopartícula puede incluir además un polímero capaz de reducir la inmunogenicidad, por ejemplo, a poli(alquilienglicol) tal como poli(etilenglicol) ("PEG"). La cantidad de PEG

5 en la nanopartícula, sin embargo, deberá limitarse, para que no comprometa sustancialmente la adaptabilidad de las nanopartículas, que está potenciada por la selección de un polímero con una cadena principal que tiene múltiples grupos funcionales por unidad monomérica, tal como un polisacárido, en comparación con PEG, que solamente tiene un grupo funcional por cadena polimérica. En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas está exenta de PEG.

10 La porción hidrófoba de la macromolécula comprende generalmente un polímero hidrófobo, por ejemplo, un polímero hidrófobo seleccionado entre poliésteres, poliortoéster, policarbonatos, poliimididas, polibenzoimidazoles, poliuretanos, poliureas, polisulfuros, poliéteres, polisulfonas, plásticos fenólicos y aminoplásticos, quitina y lipopolisacáridos, colesterol, proteoglicanos, y combinaciones de los mismos. En un entorno acuoso, por ejemplo, en condiciones fisiológicas, la porción hidrófoba formará sustancialmente el núcleo de la nanopartícula.

15 En algunas realizaciones, la porción hidrófoba de la macromolécula comprende un polímero biocompatible, por ejemplo, seleccionado entre poliláctido (PLA), poliglicólido (PGA), poli(láctido-co-glicólido) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), y combinaciones de los mismos. Dichos polímeros también son biodegradables. En un polímero de PLGA, la relación entre láctido a glicólido puede variar. En algunas realizaciones, la porción hidrófoba de la macromolécula comprende poliláctido (PLA). En algunas realizaciones, la porción hidrófoba de la macromolécula comprende poliglicólido (PGA). En algunas realizaciones, la porción hidrófoba de la macromolécula comprende poli(láctido-co-glicólido) (PLGA). En algunas realizaciones, la porción hidrófoba de la macromolécula comprende poli(ϵ -caprolactona) (PCL).

20 En algunas realizaciones, la porción hidrófoba es un polímero que comprende 2 o más unidades de repetición. La porción hidrófila puede comprender, por ejemplo, de 2 a 200.000 unidades de repetición dependiendo del tamaño de la porción hidrófoba deseada.

25 En algunas realizaciones, el peso molecular de la porción hidrófoba está en el intervalo de aproximadamente 100 g/mol a aproximadamente 2.000.000 g/mol. En algunas realizaciones, el peso molecular de la porción hidrófoba está en el intervalo de aproximadamente 500 g/mol a aproximadamente 200.000 g/mol. En algunas realizaciones, el peso molecular de la porción hidrófoba está en el intervalo de aproximadamente 1.000 g/mol a aproximadamente 100.000 g/mol. La unidad "g/mol" en este caso se refiere al peso de la porción hidrófoba por mol de la macromolécula antes de la conjugación con un residuo de direccionamiento.

30 En algunas realizaciones, el peso molecular de la porción hidrófoba es de aproximadamente 0,1 kDa a aproximadamente 2000 kDa. En algunas realizaciones, el peso molecular de la porción hidrófoba es de aproximadamente 0,5 kDa a aproximadamente 200 kDa. En algunas realizaciones, el peso molecular de la porción hidrófoba es de aproximadamente 1 kDa a 100 kDa. Estos valores representan intervalos antes de la conjugación con un residuo de direccionamiento.

35 La porción hidrófila de la macromolécula comprende por lo general un polímero que tiene múltiples grupos funcionales que pueden acoplarse a un residuo de direccionamiento. Por ejemplo, el polímero puede comprender una cadena principal compuesta por múltiples unidades monoméricas, teniendo cada unidad monomérica múltiples grupos funcionales disponibles para la conjugación con un residuo de direccionamiento. Cada unidad monomérica puede tener, por ejemplo, 2, 3, 4 o 5 grupos funcionales. En algunas realizaciones, cada unidad monomérica tiene 4 grupos funcionales. Los grupos funcionales, por ejemplo, se pueden seleccionar independientemente entre grupos OH, grupos tiol, grupos cetona, grupos amino, y grupos ácido carboxílico, entre otros. Por ejemplo, un residuo azúcar en un polímero de dextrano puede tener 4 grupos OH disponibles para la conjugación con un residuo de direccionamiento (véase el Esquema 1).

40 La proporción de residuos funcionales conjugados con un residuo de direccionamiento se puede controlar para realizar el direccionamiento. En algunas realizaciones, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de los residuos funcionales en la superficie de la nanopartícula están conjugados con un residuo de direccionamiento.

45 La selección de un polímero hidrófilo que tiene múltiples residuos funcionales por unidad de monómero permite una adaptabilidad mejorada de las nanopartículas en comparación con, por ejemplo, las nanopartículas convencionales basadas en PEG que tienen solamente un grupo funcional reactivo en el extremo final de cada cadena de PEG. Además, en algunas realizaciones, los polímeros hidrófilos de la presente divulgación son más hidrófilos que un polímero de PEG de forma que la porción hidrófila de la macromolécula es menos probable que se oriente hacia el centro de la nanopartícula durante la formación de la nanopartícula. Puesto que los residuos de direccionamiento estarán normalmente conjugados con la porción hidrófila, esto da como resultado una nanopartícula en la que todos los residuos de direccionamiento están en la superficie de la nanopartícula para direccionamiento. En dichas realizaciones, el núcleo de la nanopartícula está sustancialmente exento de residuo de direccionamiento (es decir, no tiene sustancialmente residuo de direccionamiento en el núcleo de la nanopartícula).

50 En algunas realizaciones, la porción hidrófila de la macromolécula que tiene múltiples grupos funcionales comprende un polímero seleccionado entre un polisacárido, un polinucleótido, un polipéptido o una combinación de los mismos. El polisacárido, polinucleótido, o polipéptido puede estar basado en monómeros naturales o derivados o análogos de

los mismos. Dichos derivados y análogos de los mismos son conocidos por el experto en la técnica y pueden obtenerse o sintetizarse de forma sencilla. En algunas realizaciones, polisacáridos, por ejemplo, dextrano, se prefieren porque tienen múltiples grupos funcionales por cada unidad monomérica.

5 En algunas realizaciones, la porción hidrófila de la macromolécula comprende un "polisacárido", por ejemplo un polímero de unidades de monosacárido unidas entre sí mediante enlaces glucosídicos. Se puede usar cualquier polisacárido adecuado de acuerdo con la presente divulgación. En algunas realizaciones, el polisacárido está compuesto de monómeros de anillo de 4 a 8 átomos de carbono, tales como monómeros anillo de 5 átomos de carbono. Los monómeros de anillo pueden ser heterocíclicos, por ejemplo, que comprenden uno o más átomos de N, O o S en el anillo de monómero. El polisacárido puede ser un "homopolisacárido", donde todos los monosacáridos del polisacárido son del mismo tipo, o un "heteropolisacárido", donde está presente más de un tipo de monosacárido. En algunas realizaciones, el polisacárido es un "homopolisacárido". En algunas realizaciones, el polisacárido es un "heteropolisacárido". En algunas realizaciones, el polisacárido es un polisacárido ramificado. En algunas realizaciones, el polisacárido tiene un extremo reductor que se puede modificar con fines de conjugación. En algunas realizaciones, el polisacárido es un homopolisacárido con un extremo reductor.

En algunas realizaciones, el polisacárido está compuesto por monómeros de glucosa, fructosa, lactosa o una combinación de los mismos.

20 En algunas realizaciones, el polisacárido se selecciona entre dextrano, quitosano, alginato, ácido hialurónico, heparina, sulfato de condroitina, pectina, pululano, amilosa, ciclodextrina, carboximetilcelulosa o un polisacárido con grupos funcionales tiol conjugados con la cadena principal del polímero.

En algunas realizaciones, el polisacárido es dextrano, alginato, ácido hialurónico, quitosano, ciclodextrina, o carboximetilcelulosa. En algunas realizaciones, el polisacárido es dextrano.

25 En algunas realizaciones, la porción hidrófila comprende un polinucleótido, por ejemplo un polímero de nucleótidos. Tal como se usa en el presente documento, "nucleótido" se refiere a una molécula que comprende un residuo de azúcar, un grupo fosfato, y una base (normalmente nitrogenada). De forma típica, el nucleótido comprende una o más bases conectadas a una cadena principal de azúcar-fosfato (una base conectada solamente a un residuo de azúcar, sin el grupo fosfato, es un "nucleósido"). Los azúcares del nucleótido pueden ser, por ejemplo, azúcares de ribosa (un "ácido ribonucleico", o "ARN"), o azúcares de desoxirribosa (un "ácido desoxirribonucleico", o "ADN"). En algunos casos, el polímero puede comprender azúcares tanto de ribosa como de desoxirribosa. Los ejemplos de bases incluyen, aunque no de forma limitativa, las bases naturales (por ejemplo, adenosina o "A," timidina o "T," guanosina o "G," citidina o "C," o uridina o "U"). El nucleótido puede ser un nucleótido natural o un derivado o análogo del mismo. Los expertos en la materia conocen algunos derivados y análogos.

35 En algunas realizaciones, la porción hidrófila comprende un polipéptido, por ejemplo, un polímero de aminoácidos. El aminoácido puede ser un aminoácido natural o un derivado o análogo del mismo. Los expertos en la materia conocen algunos derivados y análogos. En algunas realizaciones, al menos una porción (por ejemplo, más del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100%) de los nucleótidos del polinucleótido tienen cadenas secundarias con grupos funcionales reactivos que se pueden conjugar con el residuo de direccionamiento.

40 En algunas realizaciones, la porción hidrófila es un polímero que comprende 2 o más unidades de repetición. La porción hidrófila puede comprender, por ejemplo, de 2 a 100.000 unidades de repetición, dependiendo del tamaño deseado de la nanopartícula.

45 En algunas realizaciones, el peso molecular de la porción hidrófila está comprendido en un intervalo de aproximadamente 100 g/mol a aproximadamente 1.000.000 g/mol. En algunas realizaciones, el peso molecular de la porción hidrófila está comprendido en un intervalo de aproximadamente 500 g/mol a 100.000 g/mol. En algunas realizaciones, el peso molecular de la porción hidrófila está comprendido en un intervalo de aproximadamente 1.000 g/mol a aproximadamente 50.000 g/mol. La unidad "g/mol" en este caso se refiere al peso de la porción hidrófila por mol de la macromolécula antes de la conjugación con un residuo de direccionamiento.

50 En algunas realizaciones, el peso molecular de la porción hidrófila está comprendido en un intervalo de aproximadamente 0,1 kDa a aproximadamente 1.000 kDa. En algunas realizaciones, el peso molecular de la porción hidrófila está comprendido en un intervalo de aproximadamente 0,5 kDa a 100 kDa. En algunas realizaciones, el peso molecular de la porción hidrófila está comprendido en un intervalo de aproximadamente 1 kDa a 50 kDa. Estos valores representan intervalos antes de la conjugación con un residuo de direccionamiento.

55 La cantidad relativa de polímero hidrófobo a polímero hidrófilo en la macromolécula puede ser cualquier relación adecuada que proporcione las características deseadas a la partícula resultante. En algunas realizaciones, el peso molecular de la porción hidrófoba es mayor que el peso molecular de la porción hidrófila. En algunas realizaciones, el peso molecular de la porción hidrófila es mayor que el peso molecular de la porción hidrófoba.

En algunas realizaciones, la relación entre el peso molecular de la parte hidrófoba y el peso molecular de la parte hidrófila (parte hidrófoba:porción hidrófila) es aproximadamente de 0,1:1 a 100:1. En algunas realizaciones, la

relación de pesos moleculares es de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 50:1. En algunas realizaciones, la relación de pesos moleculares es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1. En algunas realizaciones, la relación de pesos moleculares es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 5:1, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 4:1, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 3:1, o de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 2:1. En algunas realizaciones, la relación de pesos moleculares es de aproximadamente 5:1, 4:1,3:1,2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 o 1:5. Estos valores representan relaciones antes de la conjugación con el residuo de direccionamiento. Un experto en la materia podrá determinar una relación adecuada basándose en los polímeros concretos seleccionados y el agente de interés a encapsular.

DIRECCIONAMIENTO

10 Las macromoléculas descritas en el presente documento están conjugadas con un residuo de direccionamiento, tal como el residuo de direccionamiento situado en la superficie de la nanopartícula cuando la nanopartícula se forma para funcionalizar de esta manera la superficie de la nanopartícula. La interacción entre el residuo de direccionamiento y la diana en el sitio de la mucosa dirige la nanopartícula a un sitio concreto y/o aumenta el tiempo de retención de la nanopartícula en un sitio concreto en comparación con una nanopartícula sin residuo de
15 direccionamiento. Se puede seleccionar cualquier residuo de direccionamiento adecuado. Los ejemplos de residuos de direccionamiento incluyen, aunque no de forma limitativa, moléculas pequeñas, polinucleótidos, polipéptidos, polisacáridos, ácidos grasos, lípidos y anticuerpos.

El residuo de direccionamiento puede ser un residuo de direccionamiento a la mucosa. Tal como se usa en el presente documento, un "residuo de direccionamiento a la mucosa" es un residuo de direccionamiento capaz de
20 unirse a una diana expresada en el sitio de la mucosa. En algunas realizaciones, las nanopartículas pueden comprender más de un tipo de residuo de direccionamiento a la mucosa. Por ejemplo, una macromolécula individual se puede funcionalizar con dos o más residuos de direccionamiento, o la nanopartícula se puede formar a partir de dos o más macromoléculas, estando cada una funcionalizada con un residuo de direccionamiento diferente.

El término "unión", como se usa en el presente documento, se refiere a la interacción entre una pareja de moléculas correspondiente o partes de las mismas, que presentan una capacidad de afinidad o unión mutua, de forma típica, debido a la unión o interacción específica o inespecífica, incluyendo, aunque no de forma limitativa, interacciones bioquímicas, fisiológicas, electrostáticas y/o químicas. En algunos casos, el residuo de direccionamiento es capaz de unirse selectivamente a una diana expresada en el sitio de la mucosa, por ejemplo, una molécula, receptor o residuo expresadas en el sitio de la mucosa. "Unión selectiva", como se usa en el presente documento, se refiere a un
25 residuo de direccionamiento, que puede ser una molécula pequeña o una molécula grande, que es capaz de unirse preferentemente o reconocer una diana particular o subconjunto de dianas, en un grado sustancialmente más elevado que los demás. La diana, por ejemplo, puede ser un sustrato biológico que se expresa preferentemente en el sitio de la mucosa, tal como mucina o un receptor de glucoproteína o un polisacárido o residuo expresado sobre la superficie de una célula epitelial. En algunos casos, la unión es una unión de alta afinidad, tal como enlace covalente, fuerzas de van der Waals, o enlace de hidrógeno. Preferentemente, la unión es un enlace covalente. Por
30 ejemplo, en algunos casos, la diana puede tener grupos funcionales reactivos con el residuo de direccionamiento y, en particular, que permiten el enlace covalente con el residuo de direccionamiento.

En algunas realizaciones, el residuo de direccionamiento es capaz de unirse a los residuos de carbohidrato que contienen grupos diol en cis, por ejemplo, galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetil-glucosamina, fucosa, y ácidos siálicos. Dichos residuos de carbohidrato, por ejemplo, pueden estar presentes en la mucina. En algunas realizaciones, el residuo de carbohidrato es un residuo de ácido siálico. En algunas realizaciones, el residuo de direccionamiento es un derivado de ácido borónico capaz de unirse a un grupo diol en cis de un residuo de ácido siálico. En algunas realizaciones, el residuo de direccionamiento es un derivado de ácido fenilborónico (PBA).

En algunas realizaciones, el residuo de direccionamiento es un derivado de tiol o un derivado de acrilato que puede unirse a los grupos tiol de los residuos de cisteína. Los residuos de cisteína, por ejemplo, pueden estar presentes en la mucina. En algunas realizaciones, el residuo de direccionamiento es un derivado de tiol, tal como cisteamina. En algunas realizaciones, el residuo de direccionamiento puede ser un derivado de cisteamina que puede formar enlaces disulfuro con un residuo cisteína de la membrana mucosa. En algunas realizaciones, el residuo de direccionamiento es un derivado de acrilato que puede unirse a los grupos hidroxilo de las glicoproteínas de la
45 membrana mucosa. Los derivados de acrilato incluyen, aunque no de forma limitativa, metacrilato, acrilato de etilo, y diacrilato. En algunas realizaciones, el residuo de direccionamiento es un derivado de acrilato seleccionado entre metacrilato, acrilato de etilo, y diacrilato.

En algunas realizaciones, el residuo de direccionamiento es un derivado de ácido fenilborónico (PBA), un derivado de tiol o un derivado de acrilato.

55 En algunas realizaciones, el residuo de direccionamiento es la porción hidrófoba de la macromolécula que comprende PLA; la porción hidrófila comprende dextrano; y el residuo de direccionamiento comprende PBA. En algunas realizaciones, el residuo de direccionamiento es la porción hidrófoba que contiene PLA; la porción hidrófila es dextrano, y el residuo de direccionamiento es PBA.

En algunas realizaciones, el residuo de direccionamiento es un residuo biológico. Los ejemplos no limitantes de residuos biológicos incluyen un peptídico, una proteína, una enzima, un ácido nucleico, un ácido graso, una hormona, un anticuerpo, un hidrato de carbono, un peptidoglicano, un glucopéptido, o similares. En algunos casos, el residuo biológico puede ser relativamente grande, por ejemplo, como péptidos, ácidos nucleicos, o similares. Por ejemplo, el residuo biológico puede tener un peso molecular de al menos aproximadamente 1.000 Da, al menos aproximadamente 2.500 Da, al menos aproximadamente 3000 Da, al menos aproximadamente 4000 Da, o al menos aproximadamente 5.000 Da, etc. Residuos de direccionamiento relativamente grandes pueden ser útiles, en algunos casos, para diferenciar entre células. Por ejemplo, en algunos casos, residuos de direccionamiento más pequeños (por ejemplo, menores de aproximadamente 1000 Da) pueden no tener la especificidad adecuada para determinadas aplicaciones de direccionamiento, tales como aplicaciones de direccionamiento a la mucosa. Por el contrario, residuos de direccionamiento con un peso molecular mayor pueden ofrecer una afinidad y/o especificidad de direccionamiento mucho mayor. Por ejemplo, un residuo de direccionamiento puede ofrecer constantes de disociación más pequeñas, por ejemplo, una unión más fuerte. Sin embargo, en otras realizaciones, el residuo de direccionamiento puede ser relativamente pequeño, por ejemplo, con un peso molecular de menos de aproximadamente 1000 Da o menos de aproximadamente 500 Da.

NANOPARTÍCULAS

Otro aspecto de la divulgación se refiere a nanopartículas formadas de forma general a partir de la asociación de macromoléculas, tales como las macromoléculas anteriormente descritas. Las nanopartículas demostraron un direccionamiento y una adhesión eficaces, así como una liberación sostenida de la carga en el sitio de la mucosa.

En las condiciones adecuadas, las macromoléculas pueden ensamblarse para formar una nanopartícula del tipo núcleo-envoltura, donde el núcleo de la nanopartícula es relativamente hidrófobo en comparación con la envoltura. Como alternativa, en diferentes condiciones, el núcleo de la nanopartícula puede ser relativamente hidrófilo en comparación con la envoltura. La envoltura proporciona una superficie de las nanopartículas, que puede comprender un residuo de direccionamiento con la densidad superficial deseada, de forma que las nanopartículas quedan revestidas con el residuo de direccionamiento.

Las nanopartículas pueden tener una forma sustancialmente esférica (es decir, las partículas aparecen como esféricas). Dichas nanopartículas también se pueden denominar "nanoesferas" o "nanovesículas" debido a su forma generalmente esférica y la formación de una cavidad en el interior de la nanopartícula. Se entenderá que las partículas, por ejemplo, tras hincharse o encogerse, pueden adoptar una configuración no esférica.

Las nanopartículas formadas tienen un tamaño de partículas promedio de menos de aproximadamente 1000 nm (1 micrómetro). En algunas realizaciones, el tamaño de partícula promedio es menor de aproximadamente 500 nm, menor de aproximadamente 300 nm, menor de aproximadamente 200 nm, menor de aproximadamente 150 nm, menor de aproximadamente 100 nm, menor de aproximadamente 50 nm, menor de aproximadamente 30 nm, menor de aproximadamente 10 nm, menor de aproximadamente 3 nm o menor de aproximadamente 1 nm en algunos casos. En algunos casos, se prefieren partículas de menos de 150 nm, por ejemplo, dichas partículas son más capaces de penetrar la capa lacrimonal del ojo en comparación con partículas más grandes.

En algunas realizaciones, el tamaño de partícula promedio está comprendido entre aproximadamente 0,1 nm y aproximadamente 1000 nm, aproximadamente 1 nm y aproximadamente 500 nm, aproximadamente 1 nm y aproximadamente 300 nm, aproximadamente 1 nm y aproximadamente 200 nm, aproximadamente 1 nm y aproximadamente 150 nm, aproximadamente 1 nm y aproximadamente 100 nm, aproximadamente 1 nm y aproximadamente 50 nm, aproximadamente 10 nm y aproximadamente 150 nm, aproximadamente 10 nm y aproximadamente 100 nm, aproximadamente 10 nm y aproximadamente 75 nm, aproximadamente 10 nm y aproximadamente 60 nm, y aproximadamente 10 nm y aproximadamente 50 nm, o aproximadamente 20 y aproximadamente 40 nm.

Tal como se usa en el presente documento, "tamaño de partícula" se refiere a la dimensión característica promedio de una población de nanopartículas formada, donde la dimensión característica de una partícula es el diámetro de una esfera perfecta que tiene el mismo volumen que la partícula. Una población de nanopartículas, por ejemplo, puede incluir al menos 20 partículas, al menos 50 partículas, al menos 100 partículas, al menos 300 partículas, al menos 1.000 partículas, al menos 3.000 partículas, al menos 5.000 partículas, al menos 10.000 partículas, o al menos 50.000 partículas. Varias realizaciones de la presente invención se dirigen a este tipo de poblaciones de partículas.

En algunas realizaciones, cada una de las partículas puede tener sustancialmente la misma forma y/o tamaño, en cuyo caso, la población es "monodispersa". Por ejemplo, las partículas pueden tener una distribución de tamaños de partícula de tal forma que no más de aproximadamente un 5% o aproximadamente un 10% de las partículas tienen un tamaño de partícula mayor de aproximadamente un 10% mayor que el tamaño de partícula promedio de las partículas y, en algunos casos, de modo que no más de aproximadamente un 8%, aproximadamente un 5%, aproximadamente un 3%, aproximadamente un 1%, aproximadamente un 0,3%, aproximadamente un 0,1%, aproximadamente un 0,03%, o aproximadamente un 0,01% tenga un tamaño de partícula promedio mayor de aproximadamente un 10% mayor que el tamaño de partícula promedio de las partículas. En algunos casos, no más

de aproximadamente un 5% de las partículas tienen un tamaño de partícula mayor de aproximadamente un 5%, aproximadamente un 3%, aproximadamente un 1%, aproximadamente un 0,3%, aproximadamente un 0,1%, aproximadamente un 0,03% o aproximadamente un 0,01% mayor que el tamaño de partícula promedio de las partículas.

- 5 En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen un núcleo interior y una envoltura exterior que constituyen la nanopartícula, donde la envoltura tiene una composición diferente del núcleo, es decir, puede existir al menos un polímero o residuo presente en la envoltura pero no en el núcleo (o viceversa), y/o al menos un polímero o residuo presente en el núcleo y/o la envoltura en diferentes concentraciones.

- 10 En algunos casos, el núcleo de la partícula es más hidrófobo que la envoltura de la partícula. En algunos casos, un fármaco u otra carga puede ser hidrófoba y, por tanto, asociarse fácilmente con el interior relativamente hidrófobo de la partícula. El fármaco u otra carga puede estar por tanto contenido en el interior de la partícula, que de este modo puede protegerlo del entorno externo que rodea a la partícula (o viceversa). Un residuo de direccionamiento presente en la superficie de la partícula puede permitir que la partícula se localice en un sitio de direccionamiento concreto, por ejemplo, un sitio de la mucosa. A continuación, el fármaco u otra carga puede liberarse, en algunos
15 casos, desde la partícula y permitir su interacción con el sitio de direccionamiento concreto.

- Otro aspecto de la divulgación se refiere a nanopartículas que tienen más de un polímero o macromolécula presente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las partículas pueden contener más de una macromolécula distinguible, y las relaciones entre las dos (o más) macromoléculas se pueden controlar independientemente, lo que permite el control de propiedades de la partícula. Por ejemplo, una primera macromolécula puede ser un conjugado polimérico
20 biocompatible, tales como un copolímero de bloques, que comprende un residuo de direccionamiento, y una segunda macromolécula puede comprender un polímero biocompatible pero no un residuo de direccionamiento, o la segunda macromolécula puede contener un polímero biocompatible distinguible diferente del de la primera macromolécula. El control de las cantidades de estas macromoléculas comprendidas en la partícula polimérica puede usarse por lo tanto para controlar diversas propiedades físicas, biológicas o químicas de la partícula, por
25 ejemplo, el tamaño de la partícula (por ejemplo, variando los pesos moleculares de uno o ambos polímeros), la carga superficial (por ejemplo, controlando las proporciones de los polímeros si los polímeros tienen diferentes cargas o grupos diferentes en sus extremos), la hidrofiliidad superficial (por ejemplo, si los polímeros tienen pesos moleculares y hidrofiliidades diferentes), la densidad superficial del residuo de direccionamiento (por ejemplo, controlando las proporciones de los dos o más polímeros), etc.

30 NANOPARTÍCULAS ADAPTABLES

Las nanopartículas descritas en el presente documento son muy adaptables.

- Por ejemplo, el tamaño de las nanopartículas se puede adaptar ajustando el peso molecular y/o la composición de la porción hidrófoba y/o la porción hidrófila. El residuo de direccionamiento concreto seleccionado, así como la densidad superficial del residuo de direccionamiento sobre la superficie de las nanopartículas, también afectará el
35 tamaño de partícula.

- Debe señalarse que el tamaño creciente de los componentes de polímero hidrófilo y/o hidrófobo no siempre da como resultado un tamaño de partícula mayor. Por ejemplo, en algunos casos, cadenas de polímero más largas pueden ser más flexible y capaces de plegarse para producir una partícula más compacta, mientras que una cadena de polímero más corta puede quedar confinada a una configuración más lineal. La selección de un polímero ramificado o lineal también puede alterar el tamaño de partícula. Una persona experta podrá seleccionar polímeros adecuados para una determinada aplicación.
40

- La porción hidrófila de las macromoléculas formará la envoltura de las nanopartículas en un entorno acuoso. La porción hidrófila se selecciona de tal forma que tenga múltiples residuos funcionales para su conjugación con un residuo de direccionamiento. La proporción de residuos funcionales conjugados con un residuo de direccionamiento se puede controlar, al menos en parte, mediante la cantidad de residuo de direccionamiento añadido a la reacción de conjugación. En general, cuanto más residuos funcionales estén presentes en la porción hidrófila, mayor será el grado de adaptabilidad de las nanopartículas. En general, las nanopartículas desveladas en el presente documento son más adaptables que las nanopartículas basadas en PEG que tienen solamente un residuo funcional por cadena de PEG, u otros polímeros similares.
45

- Ajustando la densidad superficial del residuo de direccionamiento, la extensión del direccionamiento se puede controlar. Se puede conseguir una elevada densidad superficial del residuo de direccionamiento con las nanopartículas desveladas en el presente documento, debido a la presencia de múltiples residuos funcionales sobre la porción hidrófila. Ventajosamente, un experto en la materia podrá controlar la extensión del direccionamiento sin alterar negativamente la estabilidad del sistema de administración de nanopartículas. En algunas realizaciones, se
50 puede determinar una densidad óptima en la que el direccionamiento máximo se consigue sin alterar negativamente de forma sustancial la estabilidad de la nanopartícula.
55

En algunas realizaciones, una mayoría (por ejemplo, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100%) de los residuos de direccionamiento de la mucosa se localizan en la superficie de la nanopartícula. Se

entiende que, en algunos casos, una parte de los residuos de direccionamiento a la mucosa pueden estar situados dentro del núcleo de la nanopartícula cuando la nanopartícula se forma, dependiendo de los componentes de la nanopartícula y del procedimiento utilizado. Por ejemplo, cuando se utiliza un procedimiento de una etapa, es posible que parte de los residuos de direccionamiento se orienten hacia el núcleo de las partículas.

5 La selección de un polímero hidrófilo que tenga múltiples residuos funcionales a lo largo de la cadena principal del polímero convierte la porción hidrófila de la molécula es más hidrófila que otros polímeros, tales como PEG, así, es más probable que la porción hidrófila se oriente hacia un entorno acuoso. Puesto que el residuo de direccionamiento está conjugado con la porción hidrófila, típicamente tras la formación de una nanopartícula, sustancialmente todos los residuos de direccionamiento se encuentran sobre la superficie de la nanopartícula en oposición al núcleo.

10 En algunas realizaciones, sustancialmente la totalidad (por ejemplo, al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) de los residuos de direccionamiento de la mucosa se localizan en la superficie de la nanopartícula. La localización de la práctica totalidad de los residuos de direccionamiento en la superficie de las nanopartículas mejora la eficacia de direccionamiento. La selección de un polímero hidrófilo que tenga múltiples residuos funcionales a lo largo de la cadena principal del polímero convierte la porción hidrófila de la molécula es más hidrófila que otros polímeros, tal como PEG, que tiene solamente un residuo funcional, así, es más probable que la porción hidrófila se oriente hacia un entorno acuoso. Puesto que el residuo de direccionamiento está conjugado con la porción hidrófila, típicamente tras la formación de una nanopartícula, sustancialmente todos los residuos de direccionamiento se encuentran sobre la superficie de la nanopartícula en oposición al núcleo.

20 Las nanopartículas se pueden adaptar mediante el control de la densidad superficial de los residuos de direccionamiento en la nanopartícula. Un experto en la materia podrá adaptar con precisión la nanopartícula a una aplicación concreta sin alterar negativamente la estabilidad de las nanopartículas.

25 En algunas realizaciones, la densidad superficial del residuo de direccionamiento es de aproximadamente 1 por nm^2 a 15 por nm^2 , de aproximadamente 1 por nm^2 a 10 por nm^2 , de aproximadamente 1 por nm^2 a 5 por nm^2 , de aproximadamente 1 por nm^2 a aproximadamente 15 por nm^2 , de aproximadamente 3 por nm^2 a aproximadamente 12 por nm^2 , o de aproximadamente 5 por nm^2 a aproximadamente 10 por nm^2 .

En algunas realizaciones, la densidad superficial del residuo de direccionamiento es de aproximadamente 1, 2, 3, 4,5, 6, 7, 8, 8, 9, 11, 12, 13, 14 o 15 por nm^2 .

30 En algunas realizaciones, la nanopartícula tiene un tamaño de aproximadamente 10 nm y la densidad de los residuos de direccionamiento en la superficie de la nanopartícula (es decir, la densidad superficial) está comprendida en un intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 3.500, de aproximadamente 500 a aproximadamente 3500, o de aproximadamente 1000 a aproximadamente 3500 por nanopartícula.

35 En algunas realizaciones, la nanopartícula tiene un tamaño de aproximadamente 30 nm y la densidad de los residuos de direccionamiento en la superficie de la nanopartícula (es decir, la densidad superficial) está comprendida en un intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 30000, de aproximadamente 1000 a aproximadamente 30000, o de aproximadamente 10000 a aproximadamente 30000 por nanopartícula.

En algunas realizaciones, la nanopartícula tiene un tamaño de aproximadamente 50 nm y la densidad de los residuos de direccionamiento en la superficie de la nanopartícula (es decir, la densidad superficial) está comprendida en un intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 90000, de aproximadamente 3000 a aproximadamente 90000, o de aproximadamente 30000 a aproximadamente 90000 por nanopartícula.

40 En algunas realizaciones, la nanopartícula tiene un tamaño de aproximadamente 100 nm y la densidad de los residuos de direccionamiento en la superficie de la nanopartícula (es decir, la densidad superficial) está comprendida en un intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 350000, de aproximadamente 10000 a aproximadamente 350000, o de aproximadamente 100000 a aproximadamente 350000 por nanopartícula.

45 En algunas realizaciones, la nanopartícula tiene un tamaño de aproximadamente 150 nm y la densidad de los residuos de direccionamiento en la superficie de la nanopartícula (es decir, la densidad superficial) está comprendida en un intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 800000, de aproximadamente 30000 a aproximadamente 800000, o de aproximadamente 300000 a aproximadamente 800000 por nanopartícula.

50 En algunas realizaciones, la nanopartícula tiene un tamaño de aproximadamente 200 nm y la densidad de los residuos de direccionamiento en la superficie de la nanopartícula (es decir, la densidad superficial) está comprendida en un intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.500.000, de aproximadamente 60000 a aproximadamente 1.500.000, o de aproximadamente 600000 a aproximadamente 1.500.000 por nanopartícula.

55 En algunas realizaciones, la nanopartícula tiene un tamaño de aproximadamente 250 nm y la densidad de los residuos de direccionamiento en la superficie de la nanopartícula (es decir, la densidad superficial) está comprendida en un intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 2.500.000, de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 2.500.000, o de aproximadamente 1.000.000 a aproximadamente 2.500.000 por nanopartícula.

En algunas realizaciones, la nanopartícula tiene un tamaño de aproximadamente 300 nm y la densidad de los residuos de direccionamiento en la superficie de la nanopartícula (es decir, la densidad superficial) está comprendida en un intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 3.500.000, de aproximadamente 150.000 a aproximadamente 3.500.000, o de aproximadamente 1.500.000 a aproximadamente 3.500.000 por nanopartícula.

- 5 En algunas realizaciones, la densidad superficial del residuo de direccionamiento se adapta mediante la cantidad de residuo de direccionamiento añadido a la reacción durante la una o más etapas de funcionalización.

En algunas realizaciones, la densidad del derivado de ácido fenilborónico en la superficie de la nanopartícula se puede adaptar mediante la cantidad de ácido fenilborónico añadido a la reacción para controlar la extensión de las propiedades de mucoadhesión de las nanopartículas.

- 10 En algunas realizaciones, la densidad del derivado de cisteamina en la superficie de la nanopartícula se puede adaptar mediante la cantidad de derivado de cisteamina añadido a la reacción para controlar la extensión de las propiedades de mucoadhesión de las nanopartículas.

- 15 En algunas realizaciones, la densidad del derivado de acrilato en la superficie de la nanopartícula se puede adaptar mediante la cantidad de derivado de acrilato a la reacción para controlar la extensión de las propiedades de mucoadhesión de las nanopartículas.

Un experto en la materia puede determinar la densidad óptima para conseguir un equilibrio entre la extensión de la mucoadhesión y la estabilidad coloidal de las nanopartículas.

En algunas realizaciones, las nanopartículas están dispersas en medio acuoso. El medio acuoso, por ejemplo, puede ser un medio acuoso fisiológicamente compatible.

20 LIBERACIÓN CONTROLADA

- Un sistema de liberación controlada, como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema de administración de nanopartículas capaz de suministrar una carga, tal como un agente terapéutico, un agente diagnóstico, un agente de pronóstico, un agente profiláctico, a un tejido corporal, tal como una membrana mucosa, donde la carga se libera de una forma prediseñada o controlada. Por ejemplo, el principio activo se puede liberar de una forma constante durante un periodo de tiempo predeterminado, el principio activo se puede liberar de una forma cíclica durante un periodo de tiempo predeterminado, o bien una condición ambiental o un evento externo puede desencadenar la liberación del principio activo. El sistema polimérico de liberación controlada puede incluir un polímero que sea biocompatible y, en algunos casos, el polímero es biodegradable. En algunos casos, las nanopartículas desveladas en el presente documento forman parte de un sistema de administración de liberación controlada. Las nanopartículas desveladas en el presente documento demostraron una liberación sostenida de la carga.

- El residuo de direccionamiento a la mucosa ayuda a retener las nanopartículas en el sitio de la mucosa, es decir, durante un periodo de tiempo más prolongado que la misma nanopartícula sin el residuo de direccionamiento, de forma que se puede conseguir la administración controlada de la carga en el sitio de la mucosa. La administración controlada puede incluir la administración sostenida.

- En algunas realizaciones, la carga se libera desde la nanopartícula durante un periodo de tiempo continuado de al menos 24, 36, 48, 60, 72, 84, o 96 horas. En algunas realizaciones, la carga se libera desde la nanopartícula durante un periodo de tiempo continuado de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 días. En algunas realizaciones, la carga se libera desde la nanopartícula durante un periodo de tiempo continuado de al menos 1 semana. En algunas realizaciones, la carga se libera desde la nanopartícula durante un periodo de tiempo continuado de al menos 1 mes.

En algunas realizaciones al menos el 50% de la carga se libera en las primeras 24 horas. En otras realizaciones, al menos el 10% de la carga se libera en las primeras 6 horas.

CARGA

- Una amplia variedad de cargas se puede cargar en las nanopartículas descritas en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, la "carga" puede ser cualquier agente de interés a administrar a un sitio de la mucosa, por ejemplo, un agente terapéutico (por ejemplo, fármaco), un agente diagnóstico, un agente profiláctico, un agente de formación de imágenes, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la carga es un único agente de interés. En otras realizaciones, la carga comprende más de un agente de interés, por ejemplo, una combinación de dos o más agentes de interés. En algunas realizaciones, la carga comprende 2, 3 o 4 agentes de interés. Por ejemplo, la carga puede comprender dos o más agentes de interés seleccionados entre un agente terapéutico, un agente diagnóstico, un agente profiláctico, un agente de formación de imágenes, y combinaciones de los mismos.

Cuando se combinan con una carga, las nanopartículas descritas en el presente documento tienen utilidad como sistema de administración de nanopartículas adhesivas para administrar la carga a un sitio de la mucosa. En algunas

realizaciones, la carga se encapsula predominantemente en el núcleo de la nanopartícula. Por "predominantemente" se entiende que más del 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de la carga está encapsulada en el núcleo de la nanopartícula. Se entenderá que, dependiendo de la composición de la nanopartícula y de la carga, una parte de la carga también se podría distribuir dentro de la envoltura de la nanopartícula y/o sobre la superficie de la nanopartícula.

En algunas realizaciones, la carga comprende un agente hidrófobo. Por ejemplo, la carga puede ser un agente terapéutico hidrófobo, un agente de diagnóstico hidrófobo, un agente profiláctico hidrófobo o un agente de formación de imágenes hidrófobo. En una realización, la carga es un agente terapéutico hidrófobo. En una realización, la carga es un agente de diagnóstico hidrófobo. En una realización, la carga es un agente profiláctico hidrófobo. En una realización, la carga es un agente de formación de imágenes hidrófobo. La encapsulación de los compuestos hidrófobos en las nanopartículas se debe a la interacción hidrófoba entre el agente hidrófobo y las porciones hidrófobas de los copolímeros que forman el núcleo de las nanopartículas.

En algunas realizaciones, la carga comprende un agente hidrófilo. Por ejemplo, la carga puede ser un agente terapéutico hidrófilo, un agente de diagnóstico hidrófilo, un agente profiláctico hidrófilo o un agente de formación de imágenes hidrófilo. En una realización, la carga es un agente terapéutico hidrófilo. En una realización, la carga es un agente de diagnóstico hidrófilo. En una realización, la carga es un agente profiláctico hidrófilo. En una realización, la carga es un agente de formación de imágenes hidrófilo. Se entenderá que la composición de la nanopartícula se modificará para encapsular una carga hidrófila, por ejemplo, se podría usar un polímero tribloque que comprende un primer bloque hidrófilo, y un segundo bloque hidrófobo y un tercer bloque hidrófilo. Dichas modificaciones son bien conocidas de los expertos en la técnica.

Se ha descubierto que las nanopartículas descritas en el presente documento tienen buena capacidad de carga y buena eficacia. La capacidad de carga de diferentes fármacos usando nanopartículas ilustrativas Dex-b-PLA (opcionalmente funcionalizadas en la superficie con PBA) se demuestra en los Ejemplos. En algunas realizaciones, las nanopartículas desveladas en el presente documento tienen mayor capacidad de carga que la indicada en los polímeros convencionales de tipo PEG. Naturalmente, la capacidad de carga se verá alterada por la composición de las nanopartículas y la selección de la carga.

En algunas realizaciones, la capacidad de carga está en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 40% p/p, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30% p/p, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20%, 1 a aproximadamente 10%, de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 8%, de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 6%, de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 5%, de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 3%, o de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 2%. La capacidad de carga (%) se calcula en la presente memoria como el peso molecular del fármaco encapsulado respecto al peso total de la nanopartícula, multiplicado por 100. El peso total de la nanopartícula se refiere al peso de la nanopartícula que incluye el residuo de direccionamiento y el fármaco encapsulado.

En algunas realizaciones, la capacidad de carga es de hasta aproximadamente un 40%, hasta aproximadamente un 30% p/p, hasta aproximadamente un 20%, hasta aproximadamente un 10%, hasta aproximadamente un 8%, hasta aproximadamente un 6%, hasta aproximadamente un 5%, hasta aproximadamente un 3%, hasta aproximadamente un 2%, o hasta aproximadamente un 1%.

En algunas realizaciones la carga tiene un peso molecular de aproximadamente 0,001 kDa a 100 kDa, de aproximadamente 0,01 kDa a 50 kDa, de aproximadamente 0,1 kDa a 10 kDa.

En algunas realizaciones, la carga tiene un diámetro de aproximadamente 0,01 nm a aproximadamente 300 nm, de aproximadamente 0,01 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 0,01 nm a aproximadamente 50 nm.

Los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos potencialmente adecuados incluyen agentes antimicrobianos, analgésicos, agentes antiinflamatorios, agentes de disminución del IOP, contra irritaciones, agentes modificadores de la coagulación, diuréticos, simpatomiméticos, anoréxicos, antiácidos y otros agentes gastrointestinales; antiparasitarios, antidepresivos, antihipertensivos, anticolinérgicos, estimulantes, antihormonas, estimulantes centrales y del sistema respiratorio, antagonistas de fármacos, agentes reguladores de lípidos, uricosúricos, glicósidos cardiacos, electrolitos, ergot y derivados del mismo, expectorantes, hipnóticos y sedantes, agentes antidiabéticos, agentes dopaminérgicos, antieméticos, relajantes musculares, parasimpaticomiméticos, anticonvulsivos, antihistaminas, betabloqueantes, purgantes, antiaritmicos, materiales de contraste, compuestos radiofarmacéuticos, agentes antialérgicos, tranquilizantes, vasodilatadores, agentes antiviricos, y agentes antineoplásicos o citostáticos, u otros agentes con propiedades anticancerosas o una combinación de los anteriores. Otros agentes terapéuticos adecuados se pueden seleccionar entre anticonceptivos y vitaminas, así como micronutrientes y macronutrientes. Otros ejemplos adicionales incluyen antiinfectivos tales como antibióticos y agentes antiviricos; analgésicos y combinaciones de analgésicos; anoréxicos; antihelmínticos; antiartríticos; agentes antiasmáticos; anticonvulsivos; antidepresivos; agentes antidiuréticos; antidiarreicos; antihistaminas; agentes antiinflamatorios; preparaciones contra la migraña; antieméticos; antineoplásicos; fármacos antiparkinsonianos; antipruríticos; antipsicóticos; antipiréticos, antiespasmódicos; anticolinérgicos; simpatomiméticos; derivados de xantina; preparaciones cardiovasculares incluidos los bloqueantes del canal del calcio y los betabloqueantes tales

como pindolol y antiarrítmicos; antihipertensivos; diuréticos; vasodilatadores, incluidos vasos coronarios, periféricos y cerebrales; estimulantes del sistema nervioso central; preparaciones contra la tos y el resfriado, incluidos los descongestivos; hormonas tales como estradiol y otros esteroides, incluidos los corticoesteroides; hipnóticos; inmunosupresores; relajantes musculares; parasimpáticos; psicoestimulantes; sedantes; y tranquilizantes; y proteínas derivadas de forma natural o diseñadas mediante ingeniería genética, polisacáridos, glicoproteínas o lipoproteínas.

Otros ejemplos no limitantes de fármacos incluyen timolol, betaxolol, metipranolol, dorzolamida, brinzolamida, neptazano, acetazolamida, alfagan, xalatan, bimatoprost, travaprost, olopatadina, ketotifeno, aciclovir, ganciclovir, valciclovir, doxorubicina, mitomicina, cisplatino, daunorrubicina, bleomicina, actinomicina D, neocarzinostatina, carboplatino, estratoplatino, Ara-C. Otros ejemplos incluyen Capoten, Monopril, Pravacol, Avapro, Plavix, Cefzilo, Duricef/Ultracel, Azactam, Videx, Zerit, Maxipime, VePesid, Paraplatin, Platinol, Taxol, UFT, Buspar, Serzone, Stadol NS, Estrace, Glucophage (Bristol-Myers Squibb); Ceclor, Lorabid, Dynabac, Prozac, Darvon, Permax, Zyprexa, Humalog, Axid, Gemzar, Evista (Eli Lilly); Vasotec/Vaseretic, Mevacor, Zocor, Prinivilo/Prinizida, Plendilo, Cozaar/Hyzaar, Pepcid, Prilosec, Primaxin, Noroxin, Recombivax HB, Varivax, Timoptic/XE, Trusopt, Proscar, Fosamax, Sinemet, Crixivan, Propecia, Vioxx, Singulair, Maxalt, Ivermectin (Merck & Co.); Diflucan, Unasyn, Sulperazon, Zithromax, Trovan, Procardia XL, Cardura, Norvasc, Dofetilide, Feldene, Zolof, Zeldox, Glucotrol XL, Zyrtec, Eletriptan, Viagra, Droloxifeno, Aricept, Lipitor (Pfizer); Vantin, Rescriptor, Vistide, Genotropin, Micronase/Glyn./Glyb., Fragmin, Total Medrol, Xanax/alprazolam, Sermion, Halcion/triazolam, Freedox, Dostinex, Eronax, Mirapex, Farmorbucina, Adriamicina, Camptosar, Remisar, Depo-Provera, Caverject, Detrusitol, Estring, Healon, Xalatan, Rogaine (Pharmacia & Upjohn); Lopid, Accrupilo, Dilantin, Cognex, Neurontin, Loestrin, Dilzem, Fempatch, Estrostep, Rezulin, Lipitor, Omnicef, FemHRT, Suramin, o Clinafloxacin (Warner Lambert).

Otros ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos que se pueden incluir dentro de una partícula de la presente invención incluyen acebutolol, acetaminofeno, ácido acetohidroxámico, acetofenazina, aciclovir, adrenocorticoides, alopurinol, alprazolam, hidróxido de aluminio, amantadina, ambenonium, amiloride, aminobenzoato potasio, amobarbital, amoxicilina, anfetamina, ampicilina, andrógenos, anestésicos, anticoagulantes, anticonvulsivos de tipo diona, medicina contra el tiroides, supresores del apetito, aspirina, atenolol, atropina, azatadina, bacampicilina, baclofeno, beclometasona, beladonna, bendroflumetiazida, peróxido de benzoilo, benzotiazida, benzotropina, betametasona, betanecol, biperideno, bisacodilo, bromocriptina, bromodifenhidramina, bromfeniramina, buclizina, bumetanida, busulfán, butabarbital, butaperazina, cafeína, carbonato cálcico, captopril, carbamazepina, carbenicilina, carbidopa y levodopa, inhibidores de la carbinoxamina, anhídrido carbónico, carisoprodol, carfenazina, cáscara, cefaclor, cefadroxilo, cefalexina, cefradina, cefediano, hidrato de cloral, clorambucilo, cloranfenicol, clordiazepóxido, cloroquina, clorotiazida, clortrianiseno, clorfeniramina, 6x clorpromazina, clorpropamida, clorprotixeno, clortalidona, clorzoxazona, colestiramina, cimetidina, cinoxacina, Clemastina, clidinium, clindamicina, clofibrato, clomiphene, clonidina, clorazepato, cloxacilina, coloquicina, coloestipol, estrógeno conjugado, anticonceptivos, cortisona, cromolyn, ciclacilina, ciclandelato, ciclizina, ciclobenzaprina, ciclofosfamida, ciclotiazida, cicrimina, ciproheptadina, danazol, dantrón, dantroleno, dapsona, dextroanfetamina, dexametasona, dexclorfeniramina, dextrometorfano, diazepam, dicloxacilina, diclomina, dietilestilbestrol, diflunisal, digitalina, diltiazem, dimenhidrinato, dimetindeno, difenhidramina, difenidol, difenoxilato y atrophive, difenilpiralina, dipiradamol, disopiramida, disulfiram, divalproex, docusato de calcio, docusato de potasio, docusato de sodio, doxiloamina, dronabinol, efedrina, epinefrina, ergoloidmesilato, ergonovine, ergotamina, eritromicinas, estrógenos esterificados, estradiol, estrógeno, estrona, estropiputa, ácido etarínico, etclorvinol, etinilestradiol, etopropazina, etosaximida, etotoína, fenoprofeno, fumarato ferroso, glucono ferroso, sulfato ferroso, flavoxato, flecamida, flufenazina, fluprednisolona, flurazepam, ácido fólico, furosemida, gemfibrozil, glipizida, gliburida, glicopirrolato, compuestos de oro, griseofwín, guaifenesina, guanabenz, guanadrel, guanetidina, halazepam, haloperidol, hetacilina, hexobarbital, hidralazina, hidrocortisona, hidrocortisona (cortisol), hidroflunetiazida, hidroxiclozoquina, hidroxizina, hiosciamina, ibuprofeno, indapamida, indometacina, insulina, iofloquinol, hierro-polisacárido, isoetarina, isoniazida, isopropamida isoproterenol, isotretinoína, lorazepam, caolin y pectina, ketoconazol, lactulosa, levodopa, lincomicina liotironina, liotrix, litio, loperamida, lorazepam, hidróxido de magnesio, sulfato de magnesio, trisilicato de magnesio, maprotilina, meclizina, meclofenamato, medroxiprosterona, ácido melenámico, melfalano, mefeniloína, mefobarbital, meprobamato, mercaptopurina, mesoridazina, metaproterenol, metaxalona, metanfetamina, metacualona, metarbital, metenamina, metilicina, metocarbamol, metotrexato, metsuximida, metoclotinazida, metilcelulosa, metildopa, metilergonovina, metilfenidato, metilprednisolona, metisergida, metoclopramida, matolazona, metoprolol, metronidazol, minoxidilo, mitotano, inhibidores de la monoamina oxidasa, nadolol, nafilina, ácido nalidixico, naproxeno, analgésicos narcóticos, neomicina, neostigmina, niacina, nicotina, nifedipina, nitratos, nitrofurantoína), nomifensina, noretindrona, acetato de noretindrona, norgestrel, nilidrina, nistafina, orfenadrina, oxacilina, oxazepam, oxprenolol, oximetazolina, oxifenbutazona, pancrelipasa, ácido pantoténico, papaverina, ácido paraaminosalicílico, parametazona, paregórico, pemolina, penicilamina, penicilina, penicilina v, pentobarbital, perfenazina, fenacetina, fenazopiridina, feniramina, fenobarbital, fenoltaleína, fenprocumón, fensuximida, fenilbutazona, fenilefrina, fenilpropanolamina, fenil toloxamina, feniloína, pilocarpina, pindolol, piperacetazina, piroxicam, poloxámero, policarbifilo calcio, politiazida, suplementos de potasio, pruzepam, prazosina, prednisolona, prednisona, primidona, probenecid, probucol, procainamida, procarbazona, proclorperazina, prociclidina, promazina, prometazina, propantelina, propranolol, pseudoefedrina, psoralenos, silium, piridostigmina, pirodoxina, pirlamina, pirvinio, quínestrol, quínetazona, uinidina, quinina, ranitidina, alcaloides de rauwolfia, riboflavina, rifampicina, ritodrina, alicilatos, escopolamina, secobarbital, senna, sannósidos a y b, simeticona, bicarbonato de sodio, fosfato de sodio, fluoruro de sodio, espirolactona, sucrulato,

sulfacitina, sulfametoxazol, sulfasalazina, sulfipirazona, sulfisoxazol, sulindaco, talbutal, tamazepam, terbutalina, terfenadina, terpinhidrato, teraciclinas, tiabendazol, tiamina, tioridazina, tiotixeno, tirolobulina, tiroides, tiroxina, ticarcilina), timolol, tocamida, tolazamida, tolbutamida, tolmetin trozodona, tretinoína, triamcinolona, triantereno, triazolam, triclormetiazida, antidepressivos tricíclicos, tridhexetilo, trifluoperazina, triflupromazina, trihexifenidilo, 5
trimeprazina, trimetobenzamina, trimetoprim, tripclennamina, triprolidina, ácido valproico, verapamilo, vitamina A, vitamina B12, vitamina C, vitamina D, vitamina E, vitamina K, xantina, y similares.

Como ejemplo adicional, si el residuo de direccionamiento se dirige a una célula cancerosa, entonces la carga puede ser un fármaco anticanceroso tal como 20-epi-1,25 dihidroxivitamin D3,4-ipomeanol, 5-etiniluracilo, 9-dihidrotaxol, abiraterona, acivicina, aclarubicina, clorhidrato de acodazol, acronina, acifulveno, adecipenol, adozelesina, 10
aldesleucina, todos los antagonistas de tk, altretamina, ambamustina, ambomicina, acetato de ametantrona, amidox, amifostina, aminoglutetimida, ácido aminolevulínico, amrubicina, amsacrina, anagrelida, anastrozol, andrografolida, inhibidores de la angiogénesis, antagonista D, antagonista G, antarelix, antramícina, proteína-1 morfogenética antidorsalizante, antiestrógenos, antineoplastón, oligonucleótidos antisentido, glicinato de afidicolina, moduladores de genes de apoptosis, reguladores de la apoptosis, ácido apurínico, ARA-CDP-DL-PTBA, arginina desaminasa, 15
asparaginasa, asperlina, asulacrina, atamestano, atrimustina, axinastatina 1, axinastatina 2, axinastatina 3, azacitidina, azasetrón, azatocina, azatirosina, azetepa, azotomicina, derivados de bacatina III, balanol, batimastat, benzoclorinas, benzodepa, benzoilestaurosoprina, derivados de beta-lactama, beta-aletina, betaclamícina B, ácido betulínico, inhibidor de BFGF, bicalutamida, bisantreno, clorhidrato de bisantreno, bisaziridinilespermina, bisnafida, dimesilato de bisnafida, bistrateno A, bizelesina, bleomicina, sulfato de bleomicina, antagonistas de BRC/ABL, 20
breflato, brequinar sódico, bropirimina, budotitano, busulfán, butionina sulfoximina, cactinomicina, calcipotriol, calfofostina C, calusterona, derivados de camptotecina, IL-2 de viruela del canario, capecitabina, caracemida, carbetimer, carboplatino, carboxamida-amino-triazol, carboxiamidotriazol, carest M3, carmustina, carn 700, inhibidor derivado de cartilago, clorhidrato de carubicina, carzelesina, inhibidores de caseína cinasa, castanospermina, cecropina B, cedefingol, cetorelix, clorambucilo, clorinas, cloroquinoxalina sulfonamida, cicaprost, cirolemicina, 25
cisplatino, cisporfirina, cladribina, análogos de clomifeno, clotrimazol, colismicina A, colismicina B, combretastatina A4, análogo de combretastatina, conagenina, crambescidina 816, crisnatol, mesilato de crisnatol, criptoficina 8, derivados de criptoficina A, curacina A, ciclopentantraquinonas, ciclofosfamida, cicloplatam, cipemicina, citarabina, citarabina ocfosfato, factor citolítico, citostatina, dacarbazina, dacliximab, dactinomicina, clorhidrato de daunorrubicina, decitabina, deshdrodidemnina B, deslorelina, dexifosfamida, dexormaplatino, dexrazoxano, 30
dexverapamilo, dezaguanina, mesilato de dezaguanina, diazicuona, didemnina B, didox, dietilnorespermina, dihidro-5-azacitidina, dioxamicina, difenil espiromustina, docetaxel, docosanol, dolasetrón, doxifluridina, doxorubicina, clorhidrato de doxorubicina, droloxifeno, citrato de droloxifeno, propionato de dromostanolona, dronabinol, duazomicina, duocarmicina SA, ebselene, ecomustina, edatrexato, edelfosina, edrecolomab, eflornitina, clorhidrato de eflornitina, elemeno, elsamitrucina, emitefur, enloplatin, enpromato, epipropidina, epirubicina, clorhidrato de epirubicina, epristerida, erbulozol, sistema vector de terapia génica de eritrocitos, clorhidrato de esorubicina, 35
estramustina, análogo de estramustina, fosfato sódico de estramustina, agonistas de estrógenos, antagonistas de estrógenos, etanidazol, etopósido, fosfato de etopósido, etoprina, exemestano, fadrozol, clorhidrato de fadrozol, fazarabina, fenretinida, filgrastim, finasterida, flavopiridol, flezelastina, floxuridina, fluasterona, fludarabina, fosfato de fludarabina, clorhidrato de fluorodaunorubicina, fluorouracilo, fluorocitabina, forfenimex, formestano, fosquidona, 40
fostriecina, fostriecina de sodio, fotemustina, texafirina de gadolinio, nitrato de galio, galocitabina, ganirelix, inhibidores de gelatinasa, gemcitabina, clorhidrato de gemcitabina, inhibidores de glutatión, hepsulfam, herregulina, bisacetamida de hexametileno, hidroxiiurea, hipericina, ácido ibandrónico, idarrubicina, clorhidrato de idarrubicina, idoxifeno, idramantona, ifosfamida, ilmofosina, ilomastat, imidazoacridonas, imiquimod, péptidos inmunoestimulantes, inhibidor del receptor del factor de crecimiento de tipo insulina-1, agonistas de interferón, 45
interferón alfa-2A, interferón alfa-2B, interferón alfa-N1, interferón alfa-N3, interferón beta-1A, interferón gamma-1B, interferones, interleuquinas, iobenguano, yododoxorrubicina, iroplatin, irinotecano, clorhidrato de irinotecán, iroplact, irsogladina, isobengazol, isohomohalicondrina B, itasetrón, jasplakinolida, kahalalida F, triacetato de lamelarina-N, lanreotida, acetato de lanreotida, leinamicina, lenograstim, sulfato de lentinán, leptostatina, letrozol, factor inhibidor de leucemia, interferón alfa de leucocitos, acetato de leuprolida, leuprolida/estrógeno/progesterona, 50
leuprorelina, levamisol, liarozol, clorhidrato de liarozol, análogo de poliamina lineal, péptido de disacárido lipófilo, compuestos de platino lipófilos, lisoclinamida 7, lobaplatino, lombricina, lometrexol, lometrexol sódico, lomustina, lonidamina, losoxantrona, clorhidrato de losoxantrona, lovastatina, loxoribina, lurtotecano, lutecio texafirina, lisofilina, péptidos líticos, maitansina, manostatina A, marimastat, masoprocol, maspina, inhibidores de matrilisina, inhibidores de metaloproteína de matriz, maitansina, clorhidrato de mecloretamina, acetato de megestrol, acetato de melengestrol, melfalano, menogaril, merbarona, mercaptopurina, meterelina, metioninasa, metotrexato, metotrexato de sodio, metoclopramida, metoprina, meturedopa, inhibidores de la proteína quinasa C de las microalgas, inhibidor de MIF, mifepristona, miltefosina, mirimostim, ARN bicatenario incorrectamente emparejado, mitindomida, mitocarcina, mitocromina, mitogilina, mitoguazona, mitolactol, mitomalcina, mitomicina, análogos de mitomicina, mitonafida, mitosper, mitotano, mitotoxina, factor de crecimiento de fibroblastos-saporina, mitoxantrona, mitoxantrona 55
clorhidrato, mofarotena, molgramostim, anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana, lípido A de monofosforilo/SK de la pared celular de Mycobacterium, mopidamol, inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos, terapia a base de supresor de múltiples tumores 1, agente anticanceroso de mostaza, micaperóxido B, extracto de pared celular micobacteriana, ácido micofenólico, miriaporona, n-acetil-dinalina, nafarelina, nagrestip, naloxona/pentazocina, napavina, nafterpina, nartograstim, nedaplatino, nemorrubicina, ácido neidrónico, 60
endopeptidasa neutra, nilutamida, nisamicina, moduladores del óxido nítrico, antioxidante de nitróxido, nitrulina,

nocodazol, nogalamicina, benzamidas n-sustituidas, O6-bencilguanina, octreotida, okicenona, oligonucleótidos, onapristona, ondansetron, oracina, inductor de citocinas oral, ormaplatino, osaterona, oxaliplatino, oxaunomicina, oxisuran, paclitaxel, análogos de paclitaxel, derivados de paclitaxel, palauamina, palmitoilrizoxina, ácido pamidrónico, panaxitriol, panomifeno, parabactina, pazeliptina, pegaspargasa, peldesina, peliomicina, pentamustina, polisulfato sódico de pentosano, pentostatina, pentozol, sulfato de peplomicina, perflubron, perfosfamida, alcohol perilílico, fenazinomicina, fenilacetato, inhibidores de fosfatasa, picibanil, clorhidrato de pilocarpina, pipobromano, piposulfan, pirarrubicina, piritrexim, clorhidrato de piroxantrona, placetina A, placetina B, inhibidor de activador de plasminógeno, complejo de platino, compuestos de platino, complejo de platino-triamina, plicamicina, plomestano, porfímero sódico, porfiromicina, prednimustina, clorhidrato de procarbazona, propil bis-acridona, prostaglandina J2, antiandrógeno de carcinoma prostático, inhibidores del proteosoma, inmunomodulador basado en proteína A, inhibidor de proteína cinasa C, inhibidores de proteína tirosina fosfatasa, inhibidores de fosforilasa de nucleósidos de purina, puomicina, clorhidrato de puomicina, purpurinas, pirazofurina, pirazoloacridina, conjugado de hemoglobina piridoxilada-polioxi-etileno, antagonistas de RAF, raltitrexed, ramosetrón, inhibidores de RAS farnesil proteína transferasa, inhibidor de RAS, inhibidor de RAS-GAP, reteliptina desmetilada, etidronato de renio Re 186, rizoxina, riboprina; ribozimas, RII retinamida, ARNi, roglitimida, rohitucina, romurtida, roquimex, rubiginona B1, ruboxil, safingol, safingol clorhidrato, saintopina, SarCNU, sarcofitol A, sargramostim, miméticos de Sdi 1, semustina, inhibidor 1 derivado de senescencia, oligonucleótidos sentido, inhibidores de la transducción de señales, moduladores de la transducción de señales, simtrazeno, proteína de unión a antígeno de cadena simple, sizofurán, sobuzoxano, borocaptato sódico, fenilacetato sódico, solverol, proteína de unión a somatomedina, sonermina, esparfosato de sodio, ácido esparfósico, esparsomicina, espicamicina D, clorhidrato de espirogermanio, espiromustina, espiroplatino, esplenopentina, espongistatina 1, escualamina, inhibidor de células madre, inhibidores de la división de células madre, estipiamicina, estreptonigrina, estreptozocina, inhibidores de estromelina, sulfinosina, sulofenur, antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo, suradista, suramina, swainsonina, glucosaminoglucanos sintéticos, talisomicina, talimustina, metyoduro de tamoxifeno, tauromustina, tazaroteno, tecogalan sódico, tegafur, telurapirilio, inhibidores de telomerasa, clorhidrato de teloxantrona, temporfina, temozolomida, tenipósido, teroxirona, testolactona, tetraclorodecaóxido, tetrazomina, taliblastina, talidomida, tiamiprina, tiocoralina, tioguanina, tiotepa, trombopoyetina, mimético de trombopoyetina, timafalsina, agonista del receptor de timopoyetina, timotrinano, hormona estimulante tiroidea, tiazofurina, etil etiopurina de estaño, tirapazamina, diclorhidrato de titanoceno, clorhidrato de topotecán, topsentina, toremifeno, citrato de toremifeno, factor de citoblastos totipotentes, inhibidores de la traducción, acetato de tresiduolona, tretinoína, triacetiluridina, triciribina, fosfato de triciribina, trimetrexato, glucuronato de trimetrexato, triptorelina, tropisetron, clorhidrato de tubulozol, turosterida, inhibidores de tirosina cinasa, trifostinas, inhibidores de UBC, ubenimex, mostaza de uracilo, uredepa, factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital, antagonistas del receptor de urocina, vapreotida, variolina B, velaresol, veramina, verdinas, verteporfina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, vindesina, sulfato de vindesina, sulfato de vinepidina, sulfato de vinglicinato, sulfato de vinleurosina, vinorelbina, sulfato de vinorelbina, sulfato de virosidina, vinxaltina, sulfato de vinzolidina, vitaxina, vorozol, zanoterona, zeniplatino, zilascorb, zinostatina, estimalámero de zinostatina o clorhidrato de zorrubicina. En una realización, el agente terapéutico es doxorubicina.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente utilizado para tratar o prevenir una enfermedad o afección que afecta al ojo (por ejemplo, un agente oftálmico). Los ejemplos no limitantes de agentes oftálmicos incluyen lubricantes, emolientes, antibióticos, antivirales (por ejemplo, aciclovir, ganciclovir, valciclovir), agentes antialérgicos (por ejemplo, antihistamina, por ejemplo olopatadina), agentes de disminución del IOP, contra irritaciones, acetazolamida, alfagan, antazolina, aspirina, atropina, azelastina, bacitracina, betaxolol, bimatoprost, fármacos botánicos, incluidos zeaxantina/luteína, licopeno/brimonodina, brinzolamida, carbacol, carteolol, ciprofloxacino, ofloxacina, cromalina, ciclosporina (incluyendo profármacos de ciclosporina y derivados de ciclosporina), otros inmunomoduladores, dapiprazol, dexametasona, diclofenac, dipivifren, dorzolamida, epinefrina, eritromicina, fluorometalona, flurbiprofeno, gentamicina, medicaciones contra el glaucoma (por ejemplo, prostaglandinas, inhibidores de la anhidrasa carbónica, epinefrina o alfa-agonistas, beta bloqueantes), gramicidina, homatropina, hidrocortisona, hioscina, keterolac, ibuprofeno, ketotifeno, latanaprost, levobunolol, levocabastina, levofloxacina, loteprednol, medrisona, metazolamida, metipranolol, nafazolina, natamicina, nedocromilo, neomicina, neptazano, agentes neuroprotectores, agentes antiinflamatorios no esteroideos, nepafanec, norfloxacina, ofloxacina, olopatadina, oximetazolina, pemirolast, feniramina, fenilefrina, pilocarpina, povidona, prednisolona, proparacaína, escopolamina, tetracaína, esteroides, sulfacetamida, tetrahidrozolina, lágrimas hipertónicas, timolal, tobramicina, travaprost, trifluridina, trimetiprim, tropicamida, unoprostona, xalatan, y cinc. Los profármacos y compuestos relacionados, así como los novedosos principios activos farmacéuticos, se pueden usar en el sistema de administración descrito en el presente documento.

En una realización, el agente terapéutico es un agente oftálmico seleccionado entre ciclosporina A, timolol, betaxolol, metipranolol, dorzolamida, brinzolamida, natamicina, neptazano, acetazolamida, alfagan, xalatan, bimatoprost, travaprost, olopatadina, ketotifeno, aciclovir, ganciclovir, valciclovir. En una realización, el agente terapéutico es ciclosporina A, natamicina, olopatadina, brinzolamida o dorzolamina.

En una realización, el agente terapéutico es un agente oftálmico utilizado para tratar el glaucoma, tal como un agente utilizado para reducir un signo y/o síntoma del glaucoma, por ejemplo, un agente utilizado para reducir la presión intraocular asociada con la hipertensión ocular. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es una

medicación contra el glaucoma, tal como una prostaglandina, inhibidor de la anhidrasa carbónica, epinefrina o alfa agonista o un beta-bloqueante. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es dorzolamida, brinzolamida, brimonidina, timolol, o latanoprost.

5 En una realización, el agente terapéutico es un agente oftálmico utilizado para tratar la conjuntivitis, tal como un agente utilizado para reducir un signo y/o síntoma de la conjuntivitis. En una realización, el agente terapéutico es olopatadina.

En una realización, el agente terapéutico es un agente oftálmico utilizado para tratar la queratoconjuntivitis seca (KCS) u "ojo seco", tal como un agente utilizado para reducir un signo y/o síntoma de la KCS. En una realización, el agente terapéutico es ciclosporina A.

10 En una realización, el agente terapéutico es ciclosporina A. En una realización, el agente terapéutico es dorzolamida. En una realización, el agente terapéutico es natamicina. En una realización, el agente terapéutico es olopatadina.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un antibiótico, por ejemplo, una fluoroquinolona, vancomicina, cefalosporina, gentamicina, eritromicina, azitromicina, un sulfofármaco, bacitracina, gatifloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, o ofloxacina.

15 En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un antiviral, por ejemplo, aciclovir, ganciclovir, valciclovir.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente antialérgico, por ejemplo, un antihistamínico. En una realización, el agente terapéutico es olopatadina.

En algunas realizaciones, la composición de nanopartícula que comprende el agente terapéutico se suministra a la superficie anterior del ojo.

20 En algunas realizaciones, el agente oftálmico se formula en una forma de dosificación para su administración a la superficie ocular, como una gota, pomada o gel. En algunas realizaciones, el agente oftálmico se formula en una forma de dosificación para su administración a la superficie ocular.

AGENTE DIAGNÓSTICO

25 En otra realización, la carga es un agente diagnóstico. Por ejemplo, la carga puede ser una molécula fluorescente; un gas; un metal; un agente de formación de imágenes comercialmente disponible utilizado en las tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía asistida por ordenador (CAT), tomografía computerizada de emisión de fotones únicos, rayos x, fluoroscopia, y formación de imágenes mediante resonancia magnética (IRM); o un agente de contraste. Los ejemplos no limitantes de materiales adecuados para su uso como agentes de contraste en IRM incluyen quelatos de gadolinio, así como hierro, magnesio, manganeso, cobre, y cromo. Ejemplos de materiales
30 útiles para el CAT y la formación de imágenes mediante rayos x incluyen, aunque no de forma limitativa, materiales basados en yodo.

RADIONUCLEÓTIDOS

35 Como ejemplo adicional, la carga útil incluir un radionucleido, por ejemplo, para uso como agente terapéutico, de diagnóstico, o pronóstico. Entre los radionucleidos utilizados, los emisores gamma, emisores de positrones, y emisores de rayos X son adecuados para el diagnóstico y/o el tratamiento, aunque se pueden utilizar también los emisores beta y los emisores alfa para el tratamiento. Los radionucleidos adecuados para su uso en diversas realizaciones de la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³⁰I, ¹³¹I, ¹³³I, ¹³⁵I, ⁴⁷Sc, ⁷²As, ⁷²Sc, ⁹⁰Y, ⁸⁸Y, ⁹⁷Ru, ¹⁰⁰Pd, ¹⁰¹mRh, ¹¹⁹Sb, ¹²⁸Ba, ¹⁹⁷Hg, ²¹¹At, ²¹²Pb, ²¹²Pb, ¹⁰⁹Pd, ¹¹¹In, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁶⁷Cu, ⁷⁵Br, ⁷⁷Br, ^{99m}Tc, ¹⁴C, ¹³N, ¹⁵O, ³²P, ³³P, o ¹⁸F. El radionucleótido puede estar contenido en la nanopartícula (por ejemplo, como
40 una especie separada), y/o forma parte de una macromolécula o polímero que forma la nanopartícula.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Otro aspecto de la divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una composición de nanopartículas como se define en el presente documento, y un transportador farmacéuticamente aceptable. Se pueden preparar composiciones farmacéuticas de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica, y se
45 pueden administrar mediante una variedad de rutas de administración, dependiendo de si se desea un efecto local o sistémico y del área que se va a tratar.

50 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra a un sitio de la mucosa deseado en un sujeto. La composición farmacéutica se puede administrar a un sitio de la mucosa deseado mediante cualquier vía de administración adecuada. En algunas realizaciones, la vía de administración es no parenteral, tal como tópica. Tal como se usa en el presente documento, la administración tópica puede incluir, por ejemplo, la administración a una membrana mucosa mediante la boca, ojo, oído, nariz, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, recto, vagina, uretra, pene, útero, etc. se entiende que la administración de un agente terapéutico a un sitio de la mucosa puede proporcionar un efecto local y/o sistémico, por ejemplo, dependiendo de la capacidad del agente que se va a absorber en la circulación mediante la membrana mucosa.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica incluyen generalmente pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos y polvos. Para la administración tópica a una membrana mucosa del intestino, se puede usar una forma de dosificación oral tal como un líquido, emulsión, comprimido, pastilla o cápsula. Se pueden emplear transportadores farmacéuticos, excipientes y diluyentes convencionales.

En algunas realizaciones, las composiciones se administran en una forma de dosificación adecuada para la administración tópica o transdérmica. Los ejemplos no limitantes de formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de una composición farmacéutica como se desvela en el presente documentos incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, pulverizadores, inhaladores o parches. La composición se premezcla normalmente en condiciones estériles con un transportador farmacéuticamente aceptable y cualquier conservantes o tampones necesarios según pueda requerirse.

En algunas realizaciones, la composición está en una forma de dosificación adecuada para su administración oral. Dicha forma de dosificación, por ejemplo, puede ser útil para la administración a un sitio de la mucosa oral, esofágica, gástrica o intestinal. La composición puede tragarse o no dependiendo del sitio de la mucosa diana. Por ejemplo, la forma de dosificación podría ser un enjuague bucal. En algunas realizaciones, la forma de dosificación oral es una forma de dosificación líquida, tal como una suspensión, solución o emulsión. En algunas realizaciones, la forma de dosificación es una forma farmacéutica sólida, tal como un polvo, comprimido, cápsula o pastilla.

En algunas realizaciones, la composición está en una forma de dosificación adecuada para la administración rectal o vaginal. En algunas realizaciones, la composición para la administración rectal o vaginal está en forma de un supositorio. En algunas realizaciones, la composición para la administración rectal o vaginal está en forma de un líquido, tal como una ducha o enema. En algunas realizaciones, la composición para la administración rectal o vaginal está en forma de una crema, pomada o gel, que puede aplicarse opcionalmente usando un aplicador.

En algunas realizaciones, la composición está en una forma de dosificación adecuada para la administración nasal o pulmonar. En algunas realizaciones, la forma de dosificación para administración nasal o pulmonar es un pulverizador o inhalante. En una realización, la forma de dosificación es un pulverizador. En una realización, la forma de dosificación es un inhalante, que se puede administrar con un inhalador.

En algunas realizaciones, la composición es una forma de dosificación adecuada para la administración ocular u ótica, es decir la administración al ojo o al oído. En algunas realizaciones, la forma de dosificación para la administración ocular u ótica es una gota. En algunas realizaciones, la composición es una forma de dosificación adecuada para la administración ocular, como una gota, gel o pomada. Dicha gota, gel o pomada, por ejemplo, se aplica a la superficie anterior del ojo.

Las rutas parenterales de administración incluyen la ruta intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal intramuscular o inyección o infusión; o intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intraventricular. La administración parenteral puede estar en forma de dosis única en bolo, o puede ser, por ejemplo, mediante una bomba de perfusión continua.

En algunas realizaciones, las rutas parenterales son deseables debido a que evitan el contacto con las enzimas digestivas que se encuentran en el canal alimentario. De acuerdo con dichas realizaciones, las composiciones de nanopartículas se pueden administrar mediante inyección (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular, intraperitoneal), rectal, vaginal, tópica (en forma de polvos, cremas, pomadas o gotas), o por inhalación (en forma de pulverizaciones).

Se pueden formular preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, según la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes suspensores adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución de cloruro sódico isotónica. Además, los aceites fijos estériles se usan convencionalmente como medio disolvente o de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite fijo suave incluyendo mono o diglicéridos. Además, se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de los inyectables. En una realización, el conjugado de la invención se suspende en un fluido transportador que comprende carboximetil celulosa sódica al 1% (p/v) y TWEEN™ 80 y al 0,1 % (v/v). Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o por incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes del uso.

Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además del sistema de administración de nanopartículas de la presente divulgación, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc o mezclas de los mismos.

Los polvos y pulverizadores pueden contener, además de los conjugados de la presente divulgación, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida o mezclas de

los mismos. Las pulverizaciones pueden contener además propulsores habituales tales como clorofluorohidrocarburos.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden ser líquidas o sólidas. Las formas de dosificación líquida adecuadas para la administración oral de composiciones de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de un conjugado encapsulado o no encapsulado, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados de manera habitual en la técnica tales como, por ejemplo, agua y otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceite de semillas de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán, y sus mezclas. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y suspensores, edulcorantes, saporíferos y perfumantes. Tal como se usa en el presente documento, el término "adyuvante" se refiere a cualquier compuesto que sea un modulador inespecífico de la respuesta inmunitaria. En determinadas realizaciones, el adyuvante estimula la respuesta inmunitaria. Se puede usar cualquier adyuvante de acuerdo con la presente invención. Se conocen en la técnica un gran número de compuestos adyuvantes (Allison Dev. Biol. Stand. 92:3-11, 1998; Unklesh y col. Annu. Rev. Immunol. 6:251-281, 1998; y Phillips y col. Vaccine 10:151-158, 1992).

Las formas de dosificación sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, comprimidos ovalados, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el conjugado encapsulado o no encapsulado se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte farmacéuticamente aceptable tal como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o (a) cargas o diluyentes tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidina, sacarosa y goma arábiga, (c) humectantes tales como glicerol, (d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico, (e) agentes retardantes de la disolución tales como parafina, (f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) absorbentes tales como caolín y arcilla bentonita e (i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación puede comprender también agentes tamponantes.

Se pueden emplear también composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas tales como el recubrimiento entérico y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica.

35 DOSIFICACIÓN

Se apreciará que la dosificación exacta de la nanopartícula o componentes de la misma, tal como un agente terapéutico, puede determinarla un médico según el paciente que se va a tratar. En general, la dosificación y la administración se ajustan para proporcionar una cantidad eficaz del conjugado de la invención al paciente a tratar. Tal como se usa en el presente documento, la "cantidad eficaz" de una partícula se refiere a la cantidad necesaria para generar la respuesta biológica deseada. Como apreciarán los expertos en la técnica, la cantidad eficaz puede variar dependiendo de factores tales como el criterio de valoración biológico deseado, el fármaco a administrar, el tejido diana, la vía de administración, etc. Los factores adicionales que deben tenerse en cuenta incluyen la gravedad de la patología; edad, el peso y el género del paciente a tratar; la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración; combinaciones de fármacos; sensibilidades de reacción; y la tolerancia/respuesta a la terapia.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden formularse en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma de dosificación unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente discreta de nanopartícula apropiada para el paciente a tratar. Se entenderá, sin embargo, que la dosis diaria total de la composición de la presente invención la decidirá un médico. Para cualquier composición, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, habitualmente ratones, conejos, perros, o cerdos. El modelo animal también se usa para conseguir una gama de concentraciones y una vía de administración deseables. Después, dicha información puede usarse para determinar dosis y vías de administración útiles en seres humanos. La eficacia y la toxicidad terapéutica de los conjugados pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, DE50 (la dosis es terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la DL50 (la dosis es letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y los terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como el cociente DL50/DE50. Las composiciones farmacéuticas que presentan índices terapéuticos grandes pueden ser útiles en algunas realizaciones. Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos.

60 KITS Y ENVASES COMERCIALES

La presente divulgación proporciona también cualquiera de las composiciones anteriormente mencionadas en kits o envases comerciales, opcionalmente con instrucciones para su uso o para administrar cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento por cualquier técnica adecuada como se ha descrito previamente. Las "instrucciones" pueden definir un componente de promoción, y típicamente implican instrucciones escritas en o asociadas con el envasado de composiciones de la invención. Las instrucciones también pueden incluir cualquier instrucción oral o electrónica proporcionada de cualquier forma. El "kit" define típicamente un envase que incluye una cualquiera o una combinación de las composiciones de la invención junto con las instrucciones, pero también puede incluir la composición de la invención e instrucciones de cualquier forma que se proporcionen en relación con la composición de forma tal que un profesional clínico reconocerá claramente que las instrucciones deben asociarse con la composición específica.

Los kits descritos en el presente documento también pueden contener uno o más recipientes, que pueden contener la composición inventiva y otros ingredientes que se han descrito previamente. Los kits también pueden contener instrucciones para la mezcla, dilución y/o administración de las composiciones de la invención en algunos casos. Los kits también pueden incluir otros recipientes con uno o más disolventes, tensioactivos, conservantes y/o diluyentes (por ejemplo, suero salino normal (NaCl al 0,9%) o dextrosa al 5%) así como recipientes para la mezcla, dilución o administración de los componentes en una muestra o a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

Las composiciones del kit pueden proporcionarse como cualquier forma adecuada, por ejemplo, como soluciones líquidas o como polvos secos. Cuando la composición proporcionada es un polvo seco, la composición puede reconstituirse por adición de un diluyente adecuado, que también puede proporcionarse. En realizaciones en las que se usan formas líquidas de la composición, la forma líquida puede estar concentrada o lista para usar. El diluyente dependerá de los componentes de la composición del modo de uso o administración. Los diluyentes adecuados para composiciones farmacológicas son bien conocidos, por ejemplo, como se han descrito previamente, y están disponibles en las referencias. El diluyente dependerá del conjugado y del modo de uso o administración.

La presente divulgación también abarca, en otro aspecto, la promoción del suministro del sistema de administración de nanopartículas descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, se promueve una o más composiciones de la invención para la prevención o el tratamiento de diversas enfermedades tales como las descritas en el presente documento a través de la administración de una cualquiera de las composiciones de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, "promovido" incluye todos los procedimientos de hacer negocios incluyendo procedimientos de educación, hospital y otra instrucción clínica, actividad de la industria farmacéutica incluyendo ventas farmacéuticas, y cualquier publicidad u otra actividad promocional incluyendo comunicación escrita, oral y electrónica de cualquier forma, asociada con las composiciones de la invención.

PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO Y USO

Las composiciones de nanopartículas desveladas en el presente documento pueden ser útiles en el tratamiento o la prevención de cualquier enfermedad o dolencia capaz de tratarse mediante la administración controlada de un agente terapéutico a un sitio de la mucosa. Como se usa en el presente documento, "tratar" incluye prevenir, reducir o aliviar uno o más signos y/o síntomas de la enfermedad o dolencia. Las composiciones de nanopartículas proporcionan la liberación controlada del agente terapéutico y se funcionalizan en la superficie para el direccionamiento y la retención de las nanopartículas en el sitio de la mucosa de tal manera que se pueda conseguir la liberación sostenida en el sitio de la mucosa.

En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos para tratar una enfermedad o dolencia en un sujeto administrando una cantidad eficaz de una composición o componente de la misma como se define en el presente documento. En otras realizaciones, se proporcionan usos de las composiciones o componentes de las mismas, como se define en el presente documento para tratar y/o prevenir una enfermedad o dolencia. En otras realizaciones, se proporcionan usos de las composiciones o componentes de los mismos, como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir una enfermedad o dolencia. En otras realizaciones, se proporcionan composiciones o componentes de las mismas desveladas en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir una enfermedad o dolencia. En otras realizaciones, se proporcionan composiciones o componentes de las mismas, como se define en el presente documento, para el tratamiento de una enfermedad o dolencia.

En algunas realizaciones, la enfermedad o dolencia que se va a tratar es una enfermedad o dolencia capaz de tratarse mediante la administración de un agente terapéutico a un sitio de la mucosa, tal como un sitio de la mucosa de la boca, ojo, oído, nariz, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, recto, vagina, uretra, pene o útero. En algunas realizaciones, la enfermedad o dolencia que se va a tratar es una enfermedad o dolencia que afecta a la boca, ojo, oído, nariz, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, recto, vagina, uretra, pene, o útero. En algunas realizaciones, la enfermedad o dolencia que se va a tratar es una enfermedad o dolencia que afecta a la boca, ojo, oído o nariz. En algunas realizaciones, la enfermedad o dolencia que se va a tratar es una enfermedad o dolencia que afecta al recto, vagina, uretra, pene, o útero. En algunas realizaciones, la enfermedad o dolencia que se va a tratar es una enfermedad o dolencia que afecta al esófago, estómago, intestino delgado o intestino grueso.

- En algunas realizaciones, la enfermedad o dolencia que se va a tratar es una enfermedad o dolencia que afecta al ojo. Los ejemplos no limitantes incluyen abrasión, queratitis por acanthamoeba, queratosis actínica, blefaroconjuntivitis alérgica aguda, conjuntivitis alérgica, queratoconjuntivitis adenovírica, aniridia, queratoconjuntivitis atópica, conjuntivitis bacteriana, queratitis bacteriana, queratopatía en banda, carcinoma basocelular, parálisis de Bell, blefaritis, queratopatía bullosa, canaliculitis, quiste caruncular, cataratas, chalazión, conjuntivitis clamidial, queratopatía por gotículas climáticas, concreciones, neoplasia intraepitelial de la conjuntiva, linfoma de la conjuntiva, papiloma de la conjuntiva, lesiones pigmentadas de la conjuntiva, cicatrización de la conjuntiva, conjuntivitis, conjuntivochalasis y quemosis, reticulación del colágeno de la córnea, edema de córnea, injerto de córnea - queratoplastia lamelar, rechazo de injerto de córnea, infiltraciones en la córnea, zapa de cocodrilo, queratopatía del cristalino, quistes de los párpados del ojo, dacriocistitis, marcas, úlcera dendrítica, dermatochalasis y blefarochalasis, roturas en la membrana de Descemet, queratitis disciforme, queratitis disciforme, queratoconjuntivitis seca, ectopia lentis, ectropión, endoftalmitis, entropión, epiblefaron y pliegues epicánticos, coristomas epibulbares, epífora, epiescleritis, crecimiento interno epitelial y fibroso, distrofia epitelial de la membrana basal, queratopatía por exposición, trauma en el párpado del ojo, queratopatía filamentaria, ampolla de filtración, destellos, síndrome del párpado flojo, conjuntivitis folicular, distrofia endotelial de Fuchs, iridociclitis heterocrómica de Fuchs, queratitis fúngica, conjuntivitis papilar gigante, glaucoma de ángulo cerrado, queratoconjuntivitis gonocócica, distrofia granular, hemangioma, queratitis por herpes simple, blefaroqueratoconjuntivitis primaria por herpes simple, herpes zóster oftálmico, hordeolum - interno y externo, hifema - trauma contundente, hipopion, queratopatía infecciosa del cristalino, queratitis intersticial, disgenesia iridocórnea, endoteliopatía iridocórnea, quiste del iris, iritis, líneas de hierro, queratoconos, queratocono forme frusta, queratoglobo, distrofia de la red de la córnea, leucocoria, piojos, deficiencia en citoblastos límbicos, queratopatía lipídica, distrofia estromal macular, queratitis marginal, distrofia de Meesmann, melanoma de la conjuntiva y el párpado, melanoma y nevo del iris, conjuntivitis membranosa y pseudomembranosa, molusco contagioso, úlcera de Mooren, obstrucción congénita del conducto nasolacrimal, queratopatía neurotrófica, nevo del párpado, penfigoide cicatricial ocular, oftalmia del neonato, pannus y pseudopterigia, degeneración marginal pellúcida, perforación de la córnea, queratitis ulcerosa periférica, defecto epitelial persistente, flictenulosis, pinguécula, opacificación capsular posterior, distrofia polimorfa posterior, celulitis preseptal, pseudoexfoliación de la cápsula del cristalino, pterigión, ptosis y pseudoptosis, estenosis puntual, granuloma piógeno, síndrome recurrente de erosión de la córnea, distrofia de Reis-Buckler, quiste de retención y linfangiectasia, artritis reumatoide, queratitis por rosácea, degeneración nodular de Salzmann, escleritis, carcinoma de células sebáceas, queratosis seborreica, carcinoma escamocelular de párpado, síndrome de Stevens-Johnson, hemorragia de la subconjuntiva, queratopatía punteada superficial, queratoconjuntivitis límbica superior, sinequia, degeneración marginal de Terrien, queratopatía puntiforme superficial de Thygeson, queratopatía tóxica, tracoma, triquiiasis, pseudotriquiiasis, distiquiiasis, pestañas metaplásicas, tricotilomanía, uveítis, queratoconjuntivitis vernal, deficiencia de vitamina A, queratopatía por vórtice, xantelasma.
- En algunas realizaciones, la enfermedad o dolencia que es una enfermedad o dolencia del ojo es glaucoma, queratoconjuntivitis sicca o conjuntivitis alérgica, infección fúngica, infección vírica o infección bacteriana. En algunas realizaciones, la enfermedad o dolencia del ojo es glaucoma, queratoconjuntivitis sicca o conjuntivitis alérgica. En algunas realizaciones, la enfermedad o dolencia del ojo es una infección fúngica, infección vírica o infección bacteriana.
- En algunas realizaciones, se administra ciclosporina A para el tratamiento de la queratoconjuntivitis sicca. En algunas realizaciones, se administra olopatadina para el tratamiento de la conjuntivitis alérgica. En algunas realizaciones, brinzolamida, brimonidina, o dorzolamida, se administran para el tratamiento de glaucoma.
- En algunas realizaciones, la composición se administra tópicamente sobre la superficie del ojo para el tratamiento de las enfermedades asociadas con los segmentos anteriores del ojo.
- En algunas realizaciones, la composición se administra tópicamente sobre la superficie del ojo para el tratamiento de las enfermedades asociadas con los segmentos posteriores del ojo. En algunas realizaciones, la composición se administra intranasalmente para dirigirse a la diana de la mucosa nasal. En algunas realizaciones, la composición se administra oralmente a la mucosa oral. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía intravenosa a la diana de la mucina gastrointestinal para el tratamiento de las enfermedades asociadas con el intestino. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía vaginal a la diana de la mucosa vaginal. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía rectal a la diana de la mucosa rectal.
- En algunas realizaciones, la enfermedad o dolencia que se va a tratar se selecciona entre una o más de angioedema adquirido, acrodermatitis enteropática, conjuntivitis serosa aguda, poliposis adenomatosa del colon, infecciones por adenoviridae, resfriado relacionado con adenovirus, asma alérgica, queilitis por contacto alérgico, rinitis alérgica, alergias, retraso mental por amiloidosis de la gíngiva y la conjuntiva, síndrome de asma por analgesia, tríada de Anderson, angina ampollosa hemorrágica, conjuntivitis angular, asma, bronquitis asmática, glositis atrófica, rinitis atrófica, poliposis familiar atenuada, enfermedad de Behçet, glositis migratoria benigna, penfigoides de la mucosa benigno, lengua negra peluda, cúmulo de Brodie, bronquitis, penfigoide ampolloso, candidiasis, aftas, síndrome del bebé con carbono, cariomegalía, catarro, conjuntivitis catarral o mucopurulenta, atrofia papilar central, pólipos del cuello del útero, queilitis, queilitis exfoliativa, queilitis glandular, queilitis granulomatosa, colecistitis, conjuntivitis cicatrizante, descordinación ciliar debida a orientación de los cilios aleatoria, discinesia ciliar, colitis, poliposis adenomatosa colorrectal, pólipos colorrectales, conjuntivitis leñosa, conjuntivitis con pseudomembrana, resfriado

relacionado con coronavirus, síndrome de Costello, resfriado relacionado con coxsackievirus, enfermedad de Crohn, síndrome de Cronkhite-Canada, fibrosis quística, cistitis, dermatostomatitis, gingivitis descamativa, dextrocardia-bronquiectasis-sinusitis, úlcera inducida por fármaco del labio, úlcera duodenal, disqueratosis congénita, disqueratosis congénita de Zinsser-Cole-Engman, resfriado relacionado echovirus, displasia ectodérmica, enterocolitis, cistitis eosinófila, sarcoma de kaposi epidérmico, épulis, épulis fisurado, hemangioma eruptivo, papilitis lingual eruptiva, eritroplasia, úlcera de esófago, esofagitis, asma extrínseca, poliposis adenomatosa familiar, poliposis intestinal familiar, acilia nasal familiar, poliposis familiar, úlcera de Fenwick, lengua fisurada, gripe, conjuntivitis folicular, hamartoma folicular, asma relacionada con alergia a alimentos, enfermedad de Fordyce, síndrome de Gardner, tos crónica relacionada con reflujo gastroesofágico, erosión gástrica, reflujo gástrico, úlcera gástrica, gastritis, gastritis, enfermedad del reflujo gastroesofágico, conjuntivitis papilar gigante, gonorrea, adenoma pituitario secretor de hormona de crecimiento, leucoplasia pilosa, hemophilus influenzae B, conjuntivitis hemorrágica, proctocolitis hemorrágica, herpes, virus del papiloma humano, síndrome de cilios inmóviles, conjuntivitis de inclusión, gripe A, gripe B, cistitis intersticial, seno dental intraoral, asma intrínseca, candidiasis invasiva, conjuntivitis irritativa, síndrome de Jadassohn-Lewandowsky, hemangioendoteloma kaposiforme, queratoconjuntivitis, queratosis de la faringe, reflujo laringofaríngeo, lepra, leucoencefalopatía, leucoplasia, leucoplasia con tilosis y carcinoma de esófago, lipogranulomatosis, síndrome lógico, úlcera del esófago inferior, colitis linfocítica, linfoma, tejido linfoide asociado a mucosa, estomatitis ulcerosa mayor, úlcera péptica maligna, síndrome de Melkersson-Rosenthal, conjuntivitis membranosa, úlceras de la boca, carcinoma mucinoso, mucocèle, mucoepidermoide, carcinoma mucoepidermoide, displasia mucoepitelial, tipo Witkop, leishmaniasis de la mucosa, líquen plano de la mucosa, carcinoma escamocelular de la mucosa, mucositis, quiste mucoso de la mucosa oral, manchas de Nagayama, pólipo nasal, enterocolitis necrotizante, enfermedades periodontales necrotizantes, estomatitis debida a nicotina, oftalmia del neonato, enfermedad de Crohn oral, papilomatosis oral por fluoruro, gránulos de Fordyce orales, muguet oral, úlcera oral, resfriado relacionado con ortomixovirus, síndrome de Osler-Rendu-Weber syndrome, pancolitis, conjuntivitis papilar, parainfluenza, resfriado relacionado con paramixovirus, asma paucigranulocítica, pénfigo, pénfigo foliáceo, pénfigo vulgar, úlcera péptica de Penign, pénfigo vulgar, úlcera péptica, periadenitis mucosa necrótica, fiebre periódica, fiebre faringoconjuntiva, Pinguécula, queilitis de células plasmáticas, plasmocantoma/gingivitis de células plasmáticas, discinesia ciliar primaria, colitis pseudomembranosa debida a proctitis, pseudomixoma peritoneal, psoriasis en membranas mucosas, enfermedad celíaca asociada con trastornos psiquiátricos, pterigión, pterigión de la conjuntiva, conjuntivitis purulenta, afta cicatrizante recurrente, laringitis por reflujo, enfermedad celíaca resistente al tratamiento, rinitis, rinosporidiosis, síndrome de Ritter, asma de Rostan, asma sensible a salicilato, síndrome de Schafer, sinusitis, síndrome de Sjögren, catarro de primavera, esprúe, síndrome de Stevens-Johnson, úlcera de estómago, estomatitis, queratoconjuntivitis límbica superior, enfermedad de Sutton, gripe porcina, candidiasis sistémica, enfermedad de Takahara, gonorrea, candidiasis, verruga del trompetista, enfermedad tuberculosa de la mucosa, colitis ulcerosa, conjuntivitis ulcerosa, proctosigmoiditis ulcerosa, síndrome urbano de Schosser Spohn, candidiasis vaginal, rinitis vasomotora, papilomatosis vestibular, angina de Vincent, síndrome gingival vulvovaginal, nevo esponjoso blanco, colecistitis xantogranulomatosa, xerostomía

SUJETO

El sujeto puede ser un animal humano o no humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. Los ejemplos no limitantes de mamíferos incluyen seres humanos, perro, gato, caballo, burro, conejo, vaca, cerdo, oveja, cabra, rata, ratón, cobaya, hamster, y primate. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

PROCEDIMIENTOS DE FABRICACIÓN

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para la preparación de macromoléculas útiles en la formación de un sistema de administración de nanopartícula mucoadhesiva. La macromolécula es, de forma típica, un copolímero anfifílico, en particular, un copolímero de bloques, que está conjugado a una pluralidad de residuos de direccionamiento a la mucosa. Las macromoléculas pueden ensamblarse en condiciones adecuadas para formar una nanopartícula, es decir, del tipo núcleo-envoltura. En un entorno acuoso, la nanopartícula tiene un núcleo hidrófobo y una envoltura hidrófila, proporcionando la envoltura una superficie de las nanopartículas, estando la superficie de la nanopartícula revestida en una cantidad deseada (es decir, la densidad superficial) del residuo de direccionamiento a la mucosa para el direccionamiento y adhesión controlados de la nanopartícula.

Las macromoléculas desveladas en el presente documento se pueden fabricar por cualquier procedimiento adecuado conocido de los expertos en la materia, por ejemplo, usando técnicas de conjugación adecuadas. Los materiales de partida, incluidos el polímero hidrófobo y el polímero hidrófilo, se pueden adquirir de varios proveedores comerciales. Si se desea, los expertos en la materia pueden preparar los materiales de partida. Por ejemplo, cuando se desean polímeros que comprenden residuos modificados de la cadena principal. Los procedimientos ilustrativos para fabricar macromoléculas útiles en la formación de un sistema de administración mucoadhesivo se describen a continuación.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento para preparar una composición de nanopartículas.

En algunas realizaciones, el procedimiento se realiza en una serie de etapas, tales como, preparación de una macromolécula anfifílica, formación de nanopartículas, y conjugación con un residuo de direccionamiento (es decir, revestimiento de la superficie de la nanopartícula con una densidad superficial deseada del residuo de

direccionamiento). Como alternativa, la porción hidrófila que comprende múltiples grupos funcionales se puede acoplar en primer lugar a una cantidad deseada del residuo de direccionamiento, seguido de conjugación de la porción hidrófila funcionalizada a un polímero hidrófobo, que puede estar en forma de una nanopartícula hidrófoba (es decir, revestimiento de la superficie de una nanopartícula hidrófoba con un polímero hidrófilo funcionalizado).

5 Cuando el polímero hidrófobo está modificado por conjugación, un extremo del polímero típicamente se volverá más hidrófilo (por ejemplo, presencia de un grupo carboxilo). Dichos polímeros se pueden ensamblar para formar nanopartículas hidrófobas en medio acuoso. La preparación de las nanopartículas en una secuencia controlada da como resultado nanopartículas con la superficie funcionalizada en la que sustancialmente todas (por ejemplo, más del 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) de los residuos de direccionamiento se ubican en la superficie de la nanopartícula formada por la porción hidrófila de la macromoléculas.

10

En una realización, el procedimiento de preparar una composición de nanopartículas útil para la administración de una carga a un sitio de la mucosa comprende preparar una macromolécula anfifílica que comprende una porción hidrófila y una porción hidrófoba, comprendiendo la porción hidrófila múltiples residuos funcionales; b) ensamblar una pluralidad de dichas macromoléculas en condiciones adecuadas para formar una nanopartícula que tiene un núcleo hidrófobo y una envoltura hidrófila; y c) conjugar al menos una parte de dichos residuos funcionales de la parte hidrófila con un residuo de direccionamiento a la mucosa, para proporcionar de esta forma una nanopartícula funcionalizada en la superficie.

15

En algunas realizaciones, a) comprende conjugar un polímero hidrófilo con un polímero hidrófobo para formar un polímero dibloque.

20

En algunas realizaciones, el polímero hidrófilo es dextrano y el polímero hidrófobo es PLA.

En algunas realizaciones, el residuo de direccionamiento es un derivado de ácido fenilborónico, un derivado de tiol o un derivado de acrilato. En algunas realizaciones, el residuo de direccionamiento es un derivado de ácido fenilborónico (PBA).

En algunas realizaciones, la etapa b) se realiza antes de la etapa c). Sin embargo, en otras realizaciones, la etapa c) se realiza antes de la etapa b).

25

En algunas realizaciones, la densidad superficial del residuo de direccionamiento a la mucosa de la nanopartícula se controla por la cantidad de residuo de direccionamiento a la mucosa introducido en la reacción.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende la aminación reductora entre el multímero y un enlazador adecuado. En algunas realizaciones, la reacción se produce entre el extremo amino de la etilendiamina N-protegida y el extremo reductor de un multímero que tiene múltiples grupos funcionales por unidad monomérica, tal como un polisacárido, un polinucleótido o polipéptido. Se puede usar cualquier grupo protector de N. En algunas realizaciones, el grupo protector de N es terc-butoxicarbonilo (BOC).

30

La selección de un polímero hidrófilo que tenga múltiples grupos funcionales por unidad monomérica permite adaptar la nanopartícula resultante para controlar el tamaño de partícula, el direccionamiento y/o la adhesión al sitio de la mucosa, como se describe adicionalmente a continuación. En algunas realizaciones, el polímero hidrófilo es un polisacárido. En algunas realizaciones, el polímero hidrófilo es dextrano. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la reacción se produce entre N-BOC-etilendiamina y un aldehído del extremo reductor de un polímero de dextrano. La reacción puede realizarse en un disolvente adecuado, tal como una solución tamponadora de borato, en presencia de un agente reductor, tal como NaCNBH_3 . La mezcla se agita durante un periodo de tiempo suficiente para completar la reacción, por ejemplo, de aproximadamente 24 a 120 horas. En una realización la mezcla se agita durante aproximadamente 24, 48, 72, 96, o 120 horas. En algunas realizaciones, esta etapa se realiza a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, esta etapa se realiza en la oscuridad.

35

40

A continuación, la mezcla se puede lavar para retirar las posibles moléculas o catalizadores sin reaccionar. En una realización se usa metanol en la etapa de lavado. El dextrano con extremos modificados puede secarse opcionalmente antes de continuar con el procedimiento.

45

A continuación, el grupo protector se elimina seguido de la conjugación del multímero con extremo amina con un polímero hidrófobo en un disolvente adecuado para proporcionar una macromolécula anfifílica. En una realización, el ácido clorhídrico y la trietil amina se usan para eliminar el grupo protector. La macromolécula se puede lavar, por ejemplo, usando metanol, para retirar el polímero sin reaccionar.

La conjugación del multímero con extremo amina con un polímero hidrófobo tiene lugar en un disolvente adecuado. En una realización, el disolvente es DMSO, acetona, o acetonitrilo. Se pueden utilizar catalizadores para dirigir la reacción. En una realización, los catalizadores son EDC y sulfo-NHS.

50

A continuación, la mezcla se puede lavar para retirar las posibles moléculas o catalizadores sin reaccionar. En una realización se usa metanol en la etapa de lavado. Se puede usar una etapa de lavado adicional para eliminar el polímero sin reaccionar. En una realización, el polímero sin reaccionar es dextrano. La mezcla final se disuelve en un disolvente adecuado, centrifugarse y el sobrenadante resultante se recoge. En una realización, el disolvente

55

adecuado es acetona o acetonitrilo. El producto final se seca. En una realización, el desecador al vacío se usa para secar el producto.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para la preparación de nanopartículas útiles en la formación de un sistema de administración de nanopartícula mucoadhesiva. Los polímeros o macromoléculas descritas en el presente documento pueden formar nanopartículas utilizando técnicas conocidas de los expertos en la materia. La geometría formada por la partícula a partir de la macromolécula puede depender de factores tales como el tamaño y la composición de los polímeros que forman la partícula. Además, también como se analiza a continuación, en algunos casos, la partícula puede incluir un agente de interés, tal como agente terapéutico, de diagnóstico o pronóstico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la nanopartícula puede contener un agente terapéutico, tal como un fármaco. El agente de interés se puede incorporar a la partícula durante la formación de la partícula, por ejemplo, incluyendo el agente en una solución que contiene los polímeros que se utilizan para formar la partícula, y/o el agente se puede incorporar a la partícula después de su formación.

Además, el procedimiento puede emplear polímeros o macromoléculas adicionales que se pueden distinguir de los polímeros o macromoléculas anteriormente descritos. Tal como se ha tratado anteriormente, la primera y la segunda (o más) macromoléculas se pueden combinar entre sí a diferentes relaciones para producir partículas que comprenden la primera y la segunda (o más) macromoléculas, teniendo en cuenta que, en algunas realizaciones, es deseable tener porciones hidrófilas con múltiples grupos funcionales presentes en la envoltura de la nanopartícula para un direccionamiento adaptable de las nanopartículas mediante acoplamiento de los grupos funcionales a un residuo de direccionamiento a la mucosa, tal como un residuo de direccionamiento capaz de formar una unión de alta afinidad a una diana en el sitio de la mucosa.

En algunas realizaciones, los residuos de direccionamiento se conjugan con las macromoléculas después de la formación de las nanopartículas.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento para conjugar residuos de direccionamiento sobre la superficie de las nanopartículas formada usando las macromoléculas anfífilas descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, la conjugación es entre los grupos funcionales de la porción hidrófila (por ejemplo, la cadena principal de un polímero hidrófilo) y los grupos funcionales de los residuos de direccionamiento. En algunas realizaciones, catalizadores, por ejemplo, EDC, se utilizan en la reacción de conjugación. En algunas realizaciones, los grupos funcionales de la cadena principal del polímero se modifican a otros tipos de grupos funcionales antes de la reacción de conjugación. En una realización, se usa NaIO_4 para oxidar los grupos hidroxilo a grupo s aldehído. La mezcla se puede lavar, por ejemplo, usando metanol, para retirar los residuos de direccionamiento no conjugados. En algunas realizaciones, se usa diálisis para eliminar las moléculas que no han reaccionado.

En algunos casos, el procedimiento puede incluir la conjugación con más de un tipo de residuo de direccionamiento. La densidad superficial del residuo de direccionamiento en las nanopartículas resultantes se puede controlar ajustando la cantidad de material en la mezcla de reacción.

En algunas realizaciones, la conjugación y la formación de nanopartículas se puede producir como una sola etapa de reacción, por ejemplo, de acuerdo con una sola etapa de reacción como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 8.323.698. Sin embargo, una reacción en una sola etapa como esta dará como resultado un nanopartícula que tenga una cantidad detectable de residuo de direccionamiento dentro del núcleo de la nanopartícula, disminuyendo de esta forma la eficacia de direccionamiento de las partículas, en comparación con una secuencia más controlada, como se ha descrito anteriormente.

Las condiciones de reacción específicas pueden determinarse por los expertos en la materia usando no más que una experimentación de rutina.

Realización del procedimiento

Un procedimiento ilustrativo para preparar un copolímero de bloques de Dextrano-b-PLA (Dex-b-PLA) se describe más adelante en el Ejemplo 1 (Verma, 2012). En resumen, un procedimiento ilustrativo para la síntesis de Dex-b-PLA se puede dividir en tres pasos: aminación reductora entre dextrano y N-Boc-etilendiamina, desprotección del grupo Boc, y conjugación del extremo del dextrano modificado con amina con PLA con extremo carboxilo. La aminación reductora puede realizarse disolviendo Dex en un tampón borato, y mezclándolo con N-Boc-etilendiamina y NaCNBH_3 en condiciones de oscuridad durante aproximadamente 72 h. Después de la reacción, la mezcla se lava con metanol y se seca en un desecador de vacío. La muestra se disuelve a continuación en $\text{DI-H}_2\text{O}$ y se trata con ácido clorhídrico y trietil amina para la desprotección del grupo Boc. La conjugación del dextrano con extremo amina y PLA se realiza en DMSO con EDC y Sulfo-NHS como catalizadores durante aproximadamente 4 h. El producto final se lavó varias veces con metanol. La muestra lavada se disolvió adicionalmente en acetona y se centrifugó. El sobrenadante se extrajo cuidadosamente para separar el dextrano sin reaccionar que había precipitado. Finalmente, el sobrenadante que contiene Dex-b-PLA se secó en un desecador a vacío.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento para preparar una macromolécula de Dex-b-PLA, comprendiendo el procedimiento: 1) aminación reductora entre dextrano y N-Boc-etilendiamina, 2) desprotección del grupo Boc, y 3) conjugación del dextrano con extremo modificado con PLA (Esquema 1). La

primera etapa de la síntesis implica la aminación reductora entre el aldehído del extremo reductor del dextrano y el grupo amina del reticulante N-Boc-etilendiamina. El agente reductor NaCNBH₃ se añadió a la solución de tampón borato, y la mezcla se agitó durante 72 horas en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente. Después, la mezcla se lavó en metanol para retirar las posibles moléculas o catalizadores sin reaccionar. El dextrano con extremos modificados se secó durante una noche al vacío. El dextrano seco se redisolvió en agua desionizada (DI-H₂O). La desprotección del grupo Boc se realizó añadiendo primero HCl durante 1 hora para escindir en enlace amida entre el grupo Boc y el residuo de amina protegida. Posteriormente, TEA se añadió para aumentar el pH de la solución hasta 9 para desprotonar los grupos finales NH₃⁺ que quedaron desprotegidos. Después, la mezcla se lavó dos veces usando metanol y se secó al vacío. Se preparó una mezcla del producto seco en D₂O () para RMN. El dextrano con extremo amina y el PLA20 con extremo carboxilo (Pm~ 20 kDa, 6 g, 0,3 mmol) se disolvieron en DMSO. La conjugación entre los dos polímeros se facilitó mediante la adición de los catalizadores EDC (120 mg, 0,773 mmol) y Sulfo-NHS (300 mg, 1,38 mmol) y dejando que la reacción transcurriera durante 4 horas a temperatura ambiente. El Dex-b-PLA resultante se precipitó dos veces y se purificó usando metanol en exceso. Para eliminar el dextrano libre, la mezcla se disolvió en acetona (30 ml) para formar una suspensión turbia. Esta se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se extrajo cuidadosamente. El sobrenadante se purgó con aire para retirar el disolvente y después se secó durante una noche al vacío para obtener los copolímeros finales.

Para funcionalizar los polímeros, Dex-b-PLA se puede disolver en DMSO (30 mg/ ml), y añadirse lentamente al agua con agitación suave. La oxidación con peryodato de la superficie de dextrano se realizó añadiendo 60 mg de NaIO₄ y agitando durante una hora. Posteriormente, se añadió glicerol para inactivar el NaIO₄ sin reaccionar. Se añadieron varias cantidades de PBA (es decir 40 mg para Dex-b-PLA_40PBA) a la mezcla, junto con NaCNBH₃, durante 24 horas. Todas las reacciones se realizaron en la oscuridad. La mezcla se dializó a continuación en agua durante 24 horas para retirar los posibles solutos sin reaccionar, a través de cambiar el medio de lavado 4 veces.

Los polímeros o macromoléculas descritas en el presente documento pueden formar nanopartículas utilizando técnicas conocidas de los expertos en la materia, incluidas las descritas en detalle a continuación. La geometría formada por la partícula a partir del polímero o macromolécula puede depender de factores tales como los polímeros que forman la partícula. Además, también como se analiza a continuación, en algunos casos, la partícula puede incluir un agente hidrófilo o un agente hidrófobo de interés, dependiendo de la estructura de la partícula. Por ejemplo, la partícula puede incluir un fármaco u otro agente terapéutico. El agente hidrófilo o hidrófobo se puede incorporar a la partícula durante la formación de la partícula, por ejemplo, incluyendo el agente en una solución que contiene los polímeros que se utilizan para formar la partícula, y/o el agente se puede incorporar a la partícula después de su formación.

Las NP de Dex-b-PLA se prepararon usando el procedimiento de nanoprecipitación: 1 ml de Dex-b-PLA en DMSO (10 mg/ ml) se añadió gota a gota a 10 ml de DI-H₂O con agitación constante para formar las NP. Esta se agitó durante 30 minutos y a continuación se prepararon muestras para dispersión dinámica de luz (DLS) extrayendo muestras de 3 ml en cubetas de poliestireno. Los tamaños de las NP se analizaron usando el analizador del tamaño de partícula 90Plus (Brookhaven, λ = 659 nm a 90°). Para los resultados se utilizaron los diámetros medios en distribución del tamaño multimodal promediada por volumen (MSD).

Además, el procedimiento puede emplear polímeros o macromoléculas adicionales, que se pueden distinguir de los polímeros o macromoléculas anteriormente descritos. Tal como se ha tratado anteriormente, la primera y la segunda macromoléculas se pueden combinar entre sí a diferentes relaciones para producir partículas que comprenden la primera y la segunda macromoléculas.

En algunos casos, el procedimiento puede incluir la conjugación con más de un tipo de residuo de direccionamiento. La densidad superficial del residuo de direccionamiento en las nanopartículas resultantes se puede controlar ajustando la cantidad de material en la mezcla de reacción.

Como alternativa, la reacción puede suceder como una reacción de una sola etapa, es decir, la conjugación se realiza sin usar intermedios tales como N-hidroxisuccinimida o una maleimida, tal como se describe en el documento US 8.323.698. Sin embargo, dichos procedimientos dan como resultado nanopartículas que tienen una parte del residuo de direccionamiento situado en el núcleo de la partícula. Por lo tanto, de forma típica, se utilizará un enfoque multietapa para conseguir una mayor eficacia de direccionamiento.

Las condiciones de reacción específicas pueden determinarse por los expertos en la materia usando no más que una experimentación de rutina.

REALIZACIONES PARTICULARES

En algunas realizaciones, se proporciona una composición de nanopartículas útil para la administración de una carga a un sitio de la mucosa, comprendiendo las nanopartículas una pluralidad de macromoléculas anfífilas, comprendiendo las macromoléculas: una porción hidrófoba que comprende un polímero biocompatible seleccionado entre un poliláctido, un poliglicólido, poli(láctido-co-glicólido), poli(ε-caprolactona), o una combinación de los mismos; una porción hidrófila que comprende un polímero biocompatible seleccionado entre un polisacárido, polinucleótido,

polipéptido, o una combinación de los mismos, comprendiendo la porción hidrófila múltiples residuos funcionales; y un residuo de direccionamiento a la mucosa seleccionado entre derivados de ácido fenilborónico (PBA), un derivado de tiol o un derivado de acrilato, en el que al menos una parte de dichos residuos funcionales de la porción hidrófila se conjugan con el residuo de direccionamiento a la mucosa.

5 En algunas realizaciones, se proporciona una composición de nanopartículas útil para la administración de una carga a un sitio de la mucosa, comprendiendo las nanopartículas una pluralidad de macromoléculas anfífilas, comprendiendo cada una de las macromoléculas: un polímero biocompatible hidrófobo seleccionado entre un poliláctido, un poliglicólido, poli(láctido-co-glicólido), poli(ϵ -caprolactona), o una combinación de los mismos, formando el polímero hidrófobo el núcleo de la nanopartícula; un polímero biocompatible hidrófilo seleccionado entre un polisacárido, polinucleótido, polipéptido, o una combinación de los mismos, que tiene múltiples residuos funcionales, formando el polímero hidrófilo la envoltura de la nanopartícula; estando conjugada al menos una parte de los residuos funcionales con un residuo de direccionamiento a la mucosa seleccionado entre un derivado de ácido fenilborónico (PBA), un derivado de tiol o un derivado de acrilato.

15 En algunas realizaciones, se proporciona una composición de nanopartículas útil para la administración de una carga a un sitio de la mucosa, comprendiendo las nanopartículas una pluralidad de macromoléculas anfífilas, comprendiendo las macromoléculas: una porción hidrófoba que comprende un poliláctido; una porción hidrófila que tiene múltiples residuos funcionales, comprendiendo dicha porción hidrófila dextrano; y un residuo de direccionamiento a la mucosa que es un derivado de un ácido fenilborónico (PBA), en el que al menos una parte de dichos residuos funcionales de la porción hidrófila se conjugan con el residuo de direccionamiento a la mucosa.

20 En algunas realizaciones, se proporciona una composición de nanopartículas útil para la administración de una carga a un sitio de la mucosa, comprendiendo las nanopartículas una pluralidad de macromoléculas anfífilas, comprendiendo cada una de las macromoléculas un polímero de poliláctido hidrófobo conjugado con un polímero de dextrano hidrófilo que tiene múltiples residuos funcionales, estando conjugada al menos una parte de dichos residuos funcionales con un derivado de ácido fenilborónico (PBA).

25 En algunas realizaciones, la macromolécula es dextrano-p-PLA. En algunas realizaciones, la macromolécula funcionalizada es dextrano-p-PLA_PBA.

30 En algunas realizaciones, la nanopartícula se forma conjugando el poliláctido con el dextrano para formar la macromolécula, formando seguidamente la nanopartícula, y posteriormente funcionalizado la superficie de la nanopartícula conjugando al menos una parte de los residuos funcionales del dextrano con el derivado de PBA para conseguir una densidad de superficie deseada del derivado de PBA.

Todas las definiciones, tal como se definen y utilizan en el presente documento, deberán considerarse superiores a las definiciones del diccionario, y/o a los significados habituales de los términos definidos.

Los artículos indefinidos "a" y "uno", tal como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, salvo que se indique claramente otra cosa, deberá entenderse como que significa "al menos uno".

35 En las reivindicaciones, así como en la memoria descriptiva anterior, todas las expresiones de transición tales como "que comprende", "que incluye", "que contiene", "que tiene", "que contienen", "que implican", "que sujetan", "formado a partir de", "compuesto de", y similares, deben entenderse como no limitadas, es decir, que significan incluyendo, pero sin limitación.

40 Solamente las expresiones transicionales "que consiste en" y "que esencialmente consiste en" deberán considerarse frases transicionales limitadas o parcialmente limitadas, respectivamente.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar ciertas realizaciones ilustrativas de la presente divulgación. Sin embargo, el ámbito de la presente divulgación no está limitada a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Síntesis y caracterización de Dex-b-PLA

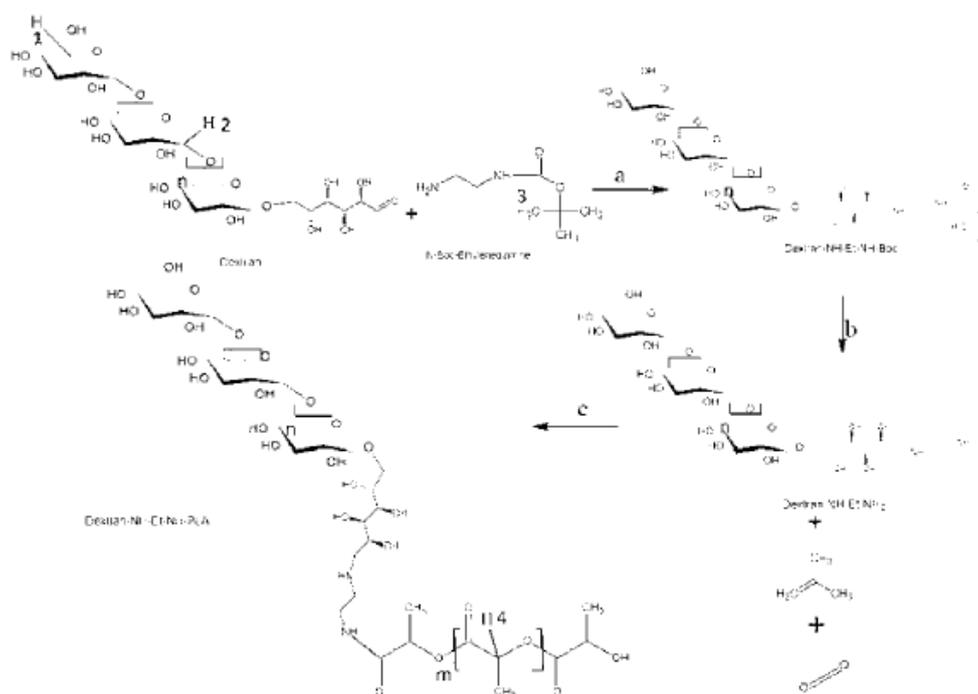
45 1.1 Materiales

50 Poli(D,L-láctido) con extremo acilo (PLA, $M_w \sim 10, 20$ y 50 kDa) y PLGA-PEG (PLGA $M_w \sim 40$ kDa, PEG $M_w \sim 6$ kDa) se adquirieron a Lakeshore Biomaterials (Birmingham, AL, EE.UU.). PLA se purificó por disolución en dimetilsulfóxido (DMSO) y precipitación en metanol para retirar los monómeros residuales. El dextrano (Dex, $M_r \sim 1, 5, 6,$ y 10 kDa), ácido clorhídrico (HCl), trietilamina (TEA), *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida (EDC), y cianoborohidruro sódico (NaCNBH_3) se adquirieron de Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canadá), y se usaron sin purificación adicional. La *N*-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS) y *N*-Boc-etilendiamina se adquirieron de CNH Technologies (Massachusetts, EE.UU.). Doxorubicina-HCl ($MW = 580$ Da, Intatrade GmbH, Bitterfeld, Alemania) se desprotonó por adición de TEA (2 M equivalente) a la solución acuosa de doxorubicina-HCl, y la forma hidrófoba de la doxorubicina se extrajo usando diclorometano (DCM) (Chittasupho, 2009). Se preparó tampón borato a una

concentración de 0,05 M a un pH de 8,2 mezclando ácido bórico e hidróxido sódico. La sangre completa de oveja (de Alsever) se adquirió de Cedarlane (Burlington, ON, Canadá). La solución tampón Veronal (VBS, 5x) se adquirió de Lonza Walkersville Inc (Walkersville, MD, EE.UU.). Los nanocristales radiomarcados con tritio [^3H]-PLA se adquirieron de PerkinElmer (Boston, MA, EE.UU.).

5 1.2 Síntesis de Dex-*b*-PLA

La síntesis del copolímero de bloques lineal se divide en tres etapas: 1) aminación reductora entre dextrano y *N*-Boc-etilendiamina, 2) desprotección del grupo Boc, y 3) conjugación del dextrano con extremo modificado con PLA (Esquema 1). La primera etapa de la síntesis implica la aminación reductora entre el aldehído del extremo reductor del dextrano y el grupo amina del reticulante *N*-Boc-etilendiamina. En una reacción típica, Dex6 (M_r ~6 kDa, 6 g, 1 mmol) se disolvió en 15 ml de tampón borato (0,05 M, pH 8,2) con 4 g (2,5 mmol) de *N*-Boc-etilendiamina. El agente reductor NaCNBH_3 (1 g, 15 mmol), se añadió a la solución de tampón borato y la mezcla se agitó durante 72 horas en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente. Después, la mezcla se lavó en metanol para retirar las posibles moléculas o catalizadores sin reaccionar. El dextrano con extremos modificados se secó durante una noche al vacío. Las muestras para RMN 1H se prepararon disolviendo el dextrano de extremos modificados en D_2O (30 mg/ ml). El dextrano seco se redisolvió en agua desionizada ($\text{DI-H}_2\text{O}$). La desprotección del grupo Boc se realizó añadiendo primero HCl (~ 4 M) durante 1 hora para escindir en enlace amida entre el grupo Boc y el residuo de amina protegida. Posteriormente, TEA se añadió para aumentar el pH de la solución hasta 9 para desprotonar los grupos finales NH_3^+ que quedaron desprotegidos. Después, la mezcla se lavó dos veces usando metanol y se secó al vacío. Se preparó una mezcla del producto seco en D_2O (30 mg/ ml) para RMN. El dextrano con extremo amina y el PLA20 con extremo carboxilo (M_r ~ 20 kDa, 6 g, 0,3 mmol) se disolvieron en DMSO. La conjugación entre los dos polímeros se facilitó mediante la adición de los catalizadores EDC (120 mg, 0,773 mmol) y Sulfo-NHS (300 mg, 1,38 mmol) y dejando que la reacción transcurriera durante 4 horas a temperatura ambiente. El Dex-*b*-PLA resultante se precipitó dos veces y se purificó usando metanol en exceso. Para eliminar el dextrano libre, la mezcla se disolvió en acetona (30 ml) para formar una suspensión turbia. Esta se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se extrajo cuidadosamente. El sobrenadante se purgó con aire para retirar el disolvente y después se secó durante una noche al vacío para obtener los copolímeros finales. Se prepararon muestras para RMN a una concentración de 30 mg/ ml en DMSO-d_6 para RMN de protón y 150 mg/ ml en DMSO-d_6 para RMN de carbono.



30 **Esquema 1.** Síntesis de los copolímeros de bloques Dex-*b*-PLA, a) Síntesis de dextrano-NH-Et-NH-Boc. Condiciones: NaCNBH_3 en tampón borato (pH 8,2) durante 72 h a TA en la oscuridad, a) Síntesis de dextrano-NH-Et-NH $_2$. Condiciones: HCl/TEA en $\text{DI-H}_2\text{O}$ durante 1 h cada a TA. c) Síntesis de dextrano-NH-Et-NH-PLA. Condiciones: EDC/Sulfo-NHS RT durante 4 h.

1.3 Caracterización de Dex-*b*-PLA usando resonancia magnética nuclear (RMN)

35 Las diferentes etapas de la síntesis de Dex-*b*-PLA se verificaron usando espectroscopía de RMN de protón (Bruker 300 MHz). La conjugación del polímero final también se verificó usando espectroscopía de RMN de carbono (Bruker

300 MHz). Antes de cualquier modificación, el dextrano se disolvió en D₂O (30 mg/ ml) y el PLA de extremo ácido se disolvió en CDCl₃ (5 mg/ ml) para preparar las muestras de RMN. Como se ha mencionado en los procedimientos de síntesis anteriores, los productos finales de las primeras dos etapas se disolvieron en D₂O, mientras que el producto final, Dex-*b*-PLA, se disolvió en DMSO-*d*₆ para el análisis mediante RMN.

5 1.4 Formación de NP de Dex-*b*-PLA mediante nanoprecipitación

Las NP de Dex-*b*-PLA se prepararon usando el procedimiento de nanoprecipitación: 1 ml de Dex-*b*-PLA en DMSO (10 mg/ ml) se añadió gota a gota a 10 ml de DI-H₂O con agitación constante para formar las NP. Esta se agitó durante 30 minutos y a continuación se prepararon muestras para dispersión dinámica de luz (DLS) extrayendo muestras de 3 ml en cubetas de poliestireno. Los tamaños de las NP se analizaron usando el analizador del tamaño de partícula 90Plus (Brookhaven, $\lambda = 659 \text{ nm}$ a 90°). Para los resultados se utilizaron los diámetros medios en distribución del tamaño multimodal promediada por volumen (MSD).

1.5 Microscopía de transmisión electrónica

El tamaño de partícula y la morfología de las NP de Dex-*b*-PLA NP se verificaron adicionalmente mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM, Philips CM10) con una tensión de aceleración de 60 kV y filamento de hexaboruro de lantano (LaB₆). En este experimento se usaron rejillas de cobre revestidas de Formvar malla 300 (Canemco & Marivac). La suspensión de NP en agua se preparó usando el procedimiento de nanoprecipitación que se ha mencionado anteriormente. Una gota de la suspensión de NP se puso sobre la rejilla, y la rejilla se tiñó durante un corto plazo de tiempo con una solución de ácido fosfotúngstico. La rejilla de cobre con la suspensión de NP se secó en condiciones ambientales durante una noche antes de obtener imágenes por TEM.

20 1.6 Resultados y discusión

La síntesis de copolímeros de bloques Dex-*b*-PLA se analizó usando un espectrómetro de RMN de protón. Como se muestra en la Figura 1 a I, el multiplete de 4,86 ppm se asignó al protón del carbono 1 de las unidades de repetición de dextrano. El multiplete de 3,14 ppm se asignó al protón del carbono 5 del extremo no reductor, se usó la relación de integración entre estos dos multipletes para confirmar el MW del dextrano. La reacción de aminación reductora entre el dextrano y la *N*-Boc-etilendiamina se confirmó por la presencia del pico a 1,3 ppm (grupo Boc) tras eliminar la *N*-Boc-etilendiamina libre sin reaccionar (Figura 1a II). La posterior desprotección del grupo Boc expone el grupo final -NH₂ del dextrano que se verificó por la desaparición del pico a 1,3 ppm (Figura 1a III). Se demostró que los picos a 1,3 ppm habían desaparecido por completo tras las etapas de desprotección con HCl y TEA. Después de la conjugación del dextrano con extremo -NH₂ con PLA con extremo COOH (Figura 1a IV), el exceso de moléculas de dextrano libres se retiraron por precipitación con acetona. El producto final muestra picos correspondientes tanto al dextrano (multipletes a 4,86 ppm) y al PLA (multipletes a 5,2 ppm) que confirman la conjugación de ambos polímeros (Figura 1a V). La conjugación entre extremos lineal del PLA y el dextrano también se confirmó mediante RMN de carbono (Figura 1b). El pico a 166,81 ppm se asignó al carbono del PLA que se une a la amina del extremo del enlazador etilendiamina, mientras que el pico a 169 ppm es el carbono carbonilo de la cadena principal de PLA (Figura 1b).

El tamaño y la morfología de las NP usando nueve formulaciones de copolímeros de bloques Dex-*b*-PLA se muestran en la Figura 2. La variación en el MW del PLA y dextrano dio como resultado la creación de NP de diferentes tamaños comprendidos de 15 a 70 nm. Como se muestra en Figure 2a, el aumento del MW de PLA aumentó el tamaño de partícula, mientras que un aumento en el MW del dextrano disminuyó el tamaño de partícula. El núcleo de la NP, formado por PLA, se predijo que aumentaría de tamaño al aumentar los MW de las cadenas de PLA como se había demostrado anteriormente (Riley 1999; Riley 2001) y se confirmó en la presente memoria que las NP estaban compuestas de PLA con MW de 10 kDa, 20 kDa y 50 kDa. Los inventores teorizaron que el efecto del MW del dextrano sobre el tamaño de la NP era probablemente debido a la configuración del dextrano sobre la superficie de la NP. Zahr y col. descubrieron que las cadenas hidrófilas, tales como PEG, a un MW de 5 kDa o más podrían "replegarse" sobre la superficie de la partícula creando una conformación en champiñón (Zahr 2006). De forma análoga, este fenómeno puede explicar por qué las NP con cadenas de dextrano más largas conducen a diámetros hidrodinámicos más pequeños. La longitud de la cadena de dextrano más corta tiene un grado menor de libertad y queda confinada a la estructura lineal, en comparación con los de una longitud de la cadena mayor. La imagen TEM de las NP compuestas de PLA20-Dex6 ($MW_{\text{PLA}} \sim 20 \text{ kDa}$, $MW_{\text{dextrano}} \sim 6 \text{ kDa}$) confirmó que las partículas tenían una estructura esférica (Figura 2b).

Las NP Dex-*b*-PLA con tamaños menores de 50 nm se sintetizaron el sencillo procedimiento de nanoprecipitación a granel. El copolímero de bloques PLGA-PEG se usó como patrón comercial, que forma NP de tamaño $133,9 \pm 6,1 \text{ nm}$ según el mismo procedimiento. El tamaño de partícula de PLGA-PEG concuerda con los valores de las referencias anteriores (Dhar 2009). Las NP PLGA-PEG fueron capaces de alcanzar tamaños de partícula más pequeños, pero necesitó la ayuda de dispositivos de microfluidos para mejorar el control (Karnik 2008). El tamaño de partícula de las Dex-*b*-PLA, por otra parte, se puede controlar simplemente cabiendo la MW de los polímeros de la composición, como se ilustra en la Figura 2a.

Ejemplo 2. Encapsulación y in vitro de doxorubicina en las NP Dex-b-PLA mediante nanoprecipitación

La encapsulación de doxorubicina en las NP Dex-b-PLA se llevó a cabo usando el procedimiento de nanoprecipitación. Dex-b-PLA y doxorubicina se disolvieron en DMSO (Dex-b-PLA a concentración de 7 mg/ml, con concentraciones variables de fármaco). 1 ml de la solución de DMSO se añadió gota a gota a 10 ml de agua con agitación y se continuó con la agitación durante 30 minutos más. Las NP en agua se filtraron a través de un filtro con jeringuilla (tamaño de poro = 200 nm) para retirar los agregados de fármaco y posteriormente se filtró a través de tubos de filtración Amicon (MWCO = 10 kDa, Millipore) para eliminar adicionalmente el posible fármaco libre en la suspensión. Las NP filtradas que contenían doxorubicina encapsulada se resuspendieron y se diluyeron en DMSO. Por consiguiente, la carga de fármaco (%p) en la matriz polimérica se calculó midiendo la concentración de doxorubicina en la mezcla, obteniendo la absorbancia de la solución a 480 nm usando un sistema espectrofotómetro Epoch Multi-Volume (Biotek). Las mediciones se realizaron por triplicado (n = 3, promedio ± S.D). La absorbancia medida según el mismo procedimiento utilizando los polímeros sin el fármaco se utilizó como valor inicial. La absorbancia se correlacionó con la concentración de la doxorubicina en DMSO utilizando la calibración obtenida con el patrón. Se usó el mismo procedimiento con PLGA-PEG para encapsular doxorubicina para el análisis comparativo. La eficacia de encapsulación (%) y la carga de fármaco (%p) se calcularon usando las dos ecuaciones (Ec. 1 y Ec. 2).

$$\text{Eficacia de encapsulación (\%)} = \frac{\text{masa de fármaco encapsulado}}{\text{masa de alimentación de fármaco inicial}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Carga de fármaco (\%p)} = \frac{\text{masa de fármaco encapsulado}}{\text{masa de la nanopartícula}} \times 100 \quad (2)$$

Basándose en el ajuste del tamaño que se muestra en la Figura 2, PLA20-Dex10 (MWPLA ~ 20 kDa, MWDextran ~ 10 kDa) y PLA20-Dex6 se seleccionaron para analizar las eficacias de encapsulación y la carga de fármaco usando doxorubicina como modelo de fármaco hidrófobo (Figura 3). Los tamaños de partículas de PLA20-Dex10 y PLA20-Dex6 fueron 20,5 y 30,1 nm respectivamente. Los compuestos de doxorubicina se incorporaron a las NP mediante un procedimiento de nanoprecipitación. Tanto las NP basadas en dextrano, las NP PLA20-Dex10 y las NP PLA20-Dex6, resultaron encapsular grandes cantidades de doxorubicina con cargas máximas de 21,2 y 10,5 %p, respectivamente. Las cargas máximas se consiguieron a una carga inicial del 40% p. y un aumento adicional en la carga inicial no aumentó la carga de fármaco en las NP debido a la agregación de partículas. Se especula que PLA20-Dex10, con una cadena de dextrano más larga que PLA20-Dex6, probablemente tiene más doxorubicina débilmente asociada sobre la superficie de la NP o encapsulada cerca de la superficie de las NP durante la nanoprecipitación. Este efecto se minimizó realizando ultrafiltración (MWCO = 10 kDa) después de la nanoprecipitación para garantizar que ningún fármaco unido específicamente se había eliminado de la suspensión de NP. La carga máxima en las NP PLGA-PEG, usada como control, era un 7,1 %p. Se descubrió que un exceso de carga inicial producía más precipitación de fármaco y agregación de partículas durante la precipitación para las NP de PLGA-PEG, mientras que las NP de Dex-b-PLA mostraron aumentos de tamaño poco importantes incluso para su carga de fármaco máxima. La carga máxima de doxorubicina conseguida con las NP PLA20-Dex10 fue notablemente mayor que los valores más comunicados usando NP de tipo PEG en las referencias, comprendidos entre 4,3-11,2% para copolímeros de poli(ε-caprolactona)-PEG (Shuai 2004; He 2010), 8,7% para el sistema de poloxámero 407 e hidrogel (Missirlis 2006), y 18% para las NO tipo PEG-poli(β-bencil-L-aspartato) (Kataoka 2001). El aumento en la carga de fármaco es más probablemente debido a la mayor hidrofilia del dextrano comparado con PEG (Alpert 1990), que a su vez reduce la probabilidad de que las cadenas de dextrano de los copolímeros de bloques se asocien en el núcleo hidrófobo de las NP. La eficiencia de encapsulación y la carga total de fármaco usando el sistema Dex-b-PLA es comparable a los sistemas de liposomas comercialmente disponibles tales como el Doxil® autorizado por la FDA, que tiene una carga de fármaco del 12,5% y DaunoXome®, que tiene una carga de daunorubicina de 7,9% (Drummond 1999). La concentración de doxorubicina en la formulación de Doxil® se traduce en 6,25 mg/m² cuando Doxil® se administra a 50 mg/m² (Drummond 1999; Safra 2000). La misma concentración fisiológica de doxorubicina se puede conseguir teóricamente usando solamente 30 mg/m² de la formulación de doxorubicina en NP PLA20-Dex10.

Ejemplo 3. Liberación in vitro de doxorubicina desde las NP Dex-b-PLA

Usando el procedimiento descrito en el ejemplo anterior, las NP con fármaco encapsulado se prepararon y se filtraron para retirar agregados de fármacos no encapsulados. Una muestra purificada de suspensión NP-fármaco se recogió para medir la absorbancia máxima y este valor se usó como el punto de liberación del 100%. Posteriormente, la suspensión NP-fármaco se inyectó en un cursor de diálisis Slide-a-Lyzer (MWCO = 20 kDa, Fisher Scientific) y se dializó contra 200 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) a 37 °C con agitación suave. En intervalos de tiempo predeterminados, se extrajo 1 ml de medio de liberación, y el mismo volumen de PBS reciente se añadió al medio de liberación. El medio de liberación extraído se usó para realizar medidas de absorción UV-Vis a 480 nm por triplicado (n = 3, promedio ± S.D). El medio de liberación se sustituyó varias veces para mantener la concentración de doxorubicina en el medio por debajo de 3 µg/ml y para que

permaneciera por debajo del límite de solubilidad en PBS. También se esperaba que la sustitución del medio evitara la adhesión de la doxorubicina liberada a las paredes de vidrio del vaso de precipitados o la barrita agitadora magnética. La liberación de doxorubicina desde PLGA-PEG también se obtuvo mediante procedimientos análogos con fines comparativos. La doxorubicina libre, sin ningún polímero, liberada, también se observó usando el mismo procedimiento, y los tres perfiles de liberación de las NP se normalizaron usando los datos de liberación de doxorubicina libre junto con los datos de eficacia de encapsulación. Esta normalización dio como resultado una curva de liberación solamente para la doxorubicina encapsulada. Todos los experimentos se realizaron en un entorno oscuro, y los vasos de precipitados se sellaron con Parafilm para evitar la evaporación del PBS.

La liberación *in vitro* de doxorubicina a partir de las NP se realizó en un tampón PBS pH 7,4 a 37 °C. Como se muestra en la Figura 4, el perfil de liberación de la doxorubicina procedente de las NP se caracterizó como una ráfaga inicial seguida por una fase de liberación continua. Es posible que la región de liberación en estallido se corresponda con fármacos no específicamente unido a la superficie de las NP, o a fármacos encapsulados cerca de las superficies de las NP durante el procedimiento de nanoprecipitación (Magenheim 1993). Las NP LA20-Dex6 y PLA20-Dex10 mostraron una región tipo ráfaga en las 24 horas iniciales, liberando hasta 48% y 74% respectivamente. La posterior fase de liberación continua de doxorubicina desde las NP PLA20-Dex6 y PLA20-Dex10 continuó durante 192 horas con velocidad de liberación similar desde ambas NP. La fase de liberación sostenida puede corresponderse a la liberación por difusión de los fármacos desde el núcleo de las NP. En el estudio de control con las NP PLGA-PEG, la fase de tipo estallido de la doxorubicina estuvo comprendida en las primeras 6 horas de la fase de liberación continua y continuó hasta las 96 horas, análogamente a lo que se había comunicado anteriormente (Esmaeili 2008).

Ejemplo 4. Ensayo de hemolisis

Las NP Dex-b-PLA se purificaron usando tubos de filtración Amicon (MWCO = 10 kDa) y centrifugación a 4100 rpm durante 30 minutos. Mediante este procedimiento se obtuvo una gama de concentraciones de las NP. A continuación, estas NP se incubaron a 37°C durante una hora con 200 µl de eritrocitos de oveja, con una concentración de glóbulos rojos de 1×10^8 células/ml para obtener un volumen final de 1 ml por muestra. La hemolisis porcentual se calculó midiendo la absorbancia a 415 nm y usando la absorbancia a 500 nm como valor inicial. Las mediciones se realizaron por triplicado (promedio \pm S.D). En el presente documento, la solución VBS se usó como el control negativo, y el agua desionizada se usó como el control positivo. Las NP PLGA-PEG también se prepararon y analizaron de una forma similar para comparación.

Un trabajo anterior había considerado la hemolisis de las NP en menos del 5% para ser biocompatibles (Dobrovoiskaia 2008). Se ha demostrado que las NP PLGA estabilizadas mediante tensioactivos son fuertemente hemolíticas hasta el 80%, y la hemolisis se reduce notablemente usando una superficie PEG hidrófila en el caso de las NP PLGA-PEG (Kim 2005). Se esperaban los mismos resultados del uso de la formulación de NP basada en dextrano porque los derivados de dextrano tales como dietilaminoetil-dextrano tienen una baja (~ 5%) hemolisis (Fischer 2003). Las NP de copolímero de bloques anteriormente formuladas se analizaron para determinar la actividad hemolítica a diferentes concentraciones (1-10 mg/ml). Se demostró que todas las NP formuladas no eran significativamente hemolíticas (< 5%) hasta una concentración de 10 mg/ml en sangre (Figura 5). La hemolisis por PLA20-Dex6 y PLA20-Dex 10 fueron similares, porque tienen los mismos polímeros componentes. Para la comparación, Doxil® (una formulación liposomal de doxorubicina) se administra normalmente a la dosis de 50 mg/m² (Safra 2000). Esta dosis se traduce en una concentración de 0,018 mg/ml en sangre para un ser humano medio (área de la superficie corporal 1,79 m² (Sacco 2010), y volumen de sangre 5 l) (Kusnierz-Glaz 1997). La concentración hemocompatible estudiada (10 mg/ml) para las NP PLA-b-Dex es notablemente superior a la dosis administrada de Doxil®. Esto sugiere que las NP PLA-b-Dex son un sistema de administración intravenosa, seguro.

Ejemplo 5. Farmacocinética y biodistribución de las NP Dex-b-PLA

Para asegurar que toda la radiactividad administrada a las ratas estaba asociada con las partículas, nanocristales radiomarcados con tritio [³H]-PLA se lavaron y purificaron en metanol antes de la formación de NP. Ratas Wistar albinas, con un peso corporal entre 200 y 250 g, ayunaron durante una noche pero tuvieron acceso libre al agua. Se prepararon 200 µl de las formulaciones de NP en NaCl al 0,9% y se inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola a una dosis de aproximadamente 30 mg/kg. Se recogió sangre (aproximadamente 200 µl) en tubos de centrifuga heparinizados mediante sangrado controlado de las venas safenas de la pata trasera en los intervalos temporales indicados. Para caracterizar la biodistribución de las NP, las ratas se sometieron a eutanasia a las 24 h después de las inyecciones de NP. Se extrajeron aproximadamente 200 µl mediante punción cardiaca de cada ratón. Se extrajeron los órganos incluyendo el corazón, pulmones, hígado, el bazo y los riñones de cada animal como se ha descrito anteriormente (Gu 2008). El contenido de ³H en el tejido y la sangre se evaluaron en un contador por centelleo líquido Wallac 1414.

La semivida en circulación de las NP *in vivo* se caracterizó midiendo la cantidad de nanocristales radiomarcados con tritio [³H]-PLA que se incorporaron a las formulaciones de NP. La Figura 6 muestra la concentración de NP en la circulación sanguínea a los intervalos de tiempo predeterminados tras la administración intravenosa. Se indica que se caracterizaron las concentraciones de NP dependientes del tiempo en sangre en dos regiones de distintas pendientes. la primera región (primeras~18 h) corresponde al aclaramiento inicial de las NP de la circulación en

sangre, mientras que la segunda región indica el aclaramiento terminal de las NP. La región primera perfila el volumen de distribución de NP entre los tejidos vascular y extravascular, mientras que la semivida final se refiere a la fase de aclaramiento sistémico de las NP del cuerpo (Yang 2009). La semivida inicial ($t_{1/2}$), semivida final ($t_{z1/2}$), el tiempo de retención en sangre para el 90% de las NP ($t_{0,9}$), y la ABC (Gaucher 2009) de las tres NP se resumen en la Tabla 1. 24 horas después de la inyección, las ratas se sometieron a eutanasia, y se extrajeron los órganos mayores de los animales para evaluar la biodistribución de las NP (Figura 7). Se observó que las tres NP tuvieron una acumulación máxima en el hígado y el porcentaje de distribución fue similar para cada NP. Se observaron acumulaciones mayores en el bazo con las NP PLGA-PEG en comparación con las NP Dex-*b*-PLA ($p < 0,01$). La acumulación de las NP en los diferentes órganos estaba por debajo del 5% con una cantidad similar de acumulación entre las NP de cada órgano.

Aunque los tres tipos de NP mostraron valores de $t_{z1/2}$ similares, las NP PLA20-Dex10 y PLA20-Dex6 mostraron valores significativamente superiores de $t_{1/2}$, $t_{0,9}$, y ABC en comparación con los de las NP modelo compuestas por PLGA-PEG. Los estudios previos se centraron principalmente en los valores de $t_{z1/2}$ de las NP pero los presentes inventores extrajeron valores de $t_{0,9}$ a título comparativo. Se observó que los valores de $t_{0,9}$ eran solo de aproximadamente 2 h para las NP de PEG-*b*-PLA (Gaucher 2009), 6 h para las NP basadas en polivinilpirrolidona (Gaur 2000) y aproximadamente 8 h para las NP basadas en quitosán (He 2010). No solo las NP Dex-*b*-PLA superan estas NP con una $t_{0,9}$ de 38,3 h, también son comparables al sistema de liposomas de 60 nm de PEG-*b*-PCL (Lee 2010) y Stealth® (Allen 1991), teniendo ambos valores de $t_{0,9}$, para aproximadamente 48 horas. En este estudio, la circulación en sangre más prolongada observada en las NP Dex-*b*-PLA, en comparación con las NP PLGA-PEG, se cree que se debe parcialmente a la diferencia de tamaño. Un estudio reciente de Rehor y col. mostró que las NP con diámetro de 40 nm tenían una semivida en circulación más larga en comparación con las NP más grandes, con un diámetro de 100 nm (Rehor 2008). Se ha teorizado que las NP de Dex-*b*-PLA, que tienen tamaños más pequeños que las NP PLGA-PEG, tienen una curvatura mayor que reduce la adsorción de las proteínas, lo que a su vez da como resultado una velocidad de aclaramiento más lenta por RES. Esto está respaldado adicionalmente por el tiempo de circulación en sangre más largo de PLA20-Dex10 en comparación con PLA20-Dex6 debido a que el anterior tiene el tamaño de partícula más pequeño. Además de su efecto de tamaño sobre la absorción de las proteínas, se ha teorizado también que los abundantes grupos hidroxilo sobre la superficie del dextrano pueden inducir una capa de hidratación suficiente alrededor de las NP para limitar la adsorción de proteínas (Portet 2001). Se ha notificado que la velocidad de acumulación en tejidos tales como el bazo aumenta con el aumento en los tamaños de partículas (Li 2008) que es consistente con los hallazgos actuales. Se ha observado también que el revestimiento de PEG en las partículas PEGiladas puede aumentar la acumulación en el bazo (Peraccia 1999) mientras que la neutralidad (Chouly 1996) y la flexibilidad (Passirani 1998) de las cadenas de dextrano sobre la superficie de las NP puede producir una absorción de proteínas más baja que conduce a una acumulación menor en el bazo. Se espera que las NP de Dex-*b*-PLA se espera que tengan una baja activación del complemento como se observó para las NP del dextrano-poli(metil metacrilato), cuyo comportamiento fue similar al dextrano soluble (Passirani 1998). La menor acumulación de las NP del Dex-*b*-PLA en bazo junto con la activación del complemento más baja pueden atribuirse a su circulación en sangre más larga (Meerasa 2011). La semivida en circulación más larga de los transportadores de fármacos de NP es un parámetro crucial en el tratamiento del cáncer debido a que aumenta la probabilidad de acumulación en tejidos cancerosos debido al efecto EPR: tamaños de partículas por debajo de 100 nm promueven directamente la acumulación de las NP en los sitios del tumor debido a que los poros vasculares alrededor del tumor tienen al menos 100 nm de tamaño (Cho 2008). El sistema Dex-*b*-PLA ajustable por tamaño desarrollado en el presente documento presenta una plataforma polimérica para estudiar sistemáticamente el efecto del tamaño de las NP sobre diversas características *in vivo* como la biocompatibilidad, el aclaramiento en sangre, la acumulación y biodistribución del tumor y los candidatos a cribado para su evaluación clínica adicional.

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos en sangre para las NP de PLA20-Dex10, PLA20-Dex6, y PLGA-PEG

	$t_{1/2}$ (h)	$t_{z1/2}$ (h)	$t_{0,9}$ (h)	ABC
PLA20-Dex10	12,3 ± 2,2	29,8 ± 1,0	38,3 ± 21,5	1040
PLA20-Dex6	7,2 ± 0,4	26,6 ± 3,1	17,9 ± 8,6	691
PLGA-PEG	3,7 ± 0,6	27,0 ± 2,3	5,0 ± 2,4	287

$t_{1/2}$: semivida inicial; $t_{z1/2}$: semivida terminal; $t_{0,9}$, tiempo de retención de la sangre durante el 90% de las NP; ABC: Área bajo la curva (%dosis · h)

Se realizó el análisis estadístico usando el test de la t de Student t-y se evaluó la significancia estadística con $p < 0,01$.

Ejemplo 6. Síntesis y caracterización de las NP Dex-*b*-PLA-BLA

6.1 Síntesis de Dex-*b*-PLA

La síntesis de Dex-*b*-PLA se realizó como se describe en el Ejemplo 1 (véase también, Verma, 2012). En resumen, el procedimiento para la síntesis de Dex-*b*-PLA se divide en tres pasos: aminación reductora entre dextrano y N-Boc-

etilendiamina, desprotección del grupo Boc, y conjugación del extremo del dextrano modificado con amina con PLA con extremo carboxilo. La aminación reductora se realizó disolviendo Dex en tampón borato, y mezclándolo con N-Boc-etilendiamina y NaCNBH₃ en condiciones de oscuridad durante 72 h. Después de la reacción la mezcla se lava con metanol y se secó en un desecador de vacío. La muestra se disuelve a continuación en DI-H₂O y se trata con ácido clorhídrico y trietil amina para la desprotección del grupo Boc. La conjugación del dextrano con extremo amina y PLA se realiza en DMSO con EDC y Sulfo-NHS como catalizadores durante 4 h. El producto final se lavó varias veces con metanol. La muestra lavada se disolvió adicionalmente en acetona y se centrifugó. El sobrenadante se extrajo cuidadosamente para separar el dextrano sin reaccionar que había precipitado. Finalmente, el sobrenadante que contiene Dex-b-PLA se secó en un desecador a vacío.

6.2 Funcionalización superficial de las NP Dex-b-PLA con PBA

Dex-b-PLA se disolvió en DMSO (30 mg/ ml), y añadirse lentamente al agua con agitación suave. La oxidación con peryodato de la superficie de dextrano se realizó añadiendo 60 mg de NaIO₄ y agitando durante una hora. Posteriormente, se añadió glicerol para inactivar el NaIO₄ sin reaccionar. Se añadieron varias cantidades de PBA (es decir 40 mg para Dex-b-PLA_40PBA) a la mezcla, junto con NaCNBH₃, durante 24 horas. Todas las reacciones se realizaron en la oscuridad. La mezcla se dializó a continuación en agua durante 24 horas para retirar los posibles solutos sin reaccionar, a través de cambiar el medio de lavado 4 veces.

6.3 Caracterización de las NP Dex-b-PLA_PBA

La modificación de la superficie con PBA se verificó usando espectroscopía de RMN ¹H (Bruker 300 MHz). Los polímeros Dex-b-PLA_PBA se disolvieron en DMSO-d₆ (25 mg/ ml) para la caracterización por RMN ¹H. La medición de la absorción UV-Vis a 291 nm se realizó con un sistema espectrofotómetro Epoch Multi-Volume (Biotek, USA) en el Dex-b-PLA_PBA para cuantificar la cantidad de PBA unido a las cadenas de dextrano. La solución de Dex-b-PLA de la misma concentración se usó como valor inicial del estudio de absorción UV-Vis. Las NP de Dex-b-PLA_PBA preparadas usando nanoprecipitación también se analizaron usando el analizador del tamaño de partículas 90Plus (Brookhaven, λ = 659 nm a 90°) obteniendo un diámetro medio en distribución del tamaño multimodal promediado (MSD). El tamaño de partícula y la morfología de las NP de Dex-b-PLA_PBA se confirmaron adicionalmente usando TEM (Philips CM10) con una tensión de aceleración de 60 kV y filamento de hexaboruro de lantano (LaB₆). En este experimento se usaron rejillas de cobre revestidas de Formvar malla 300 (Canemco & Marivac). La suspensión de NP en agua se preparó usando el procedimiento de nanoprecipitación que se ha mencionado anteriormente. Una gota de la suspensión de NP se puso sobre la rejilla, y la rejilla se tiñó durante un corto plazo de tiempo con una solución de ácido fosfotúngstico (2% p/v en agua). La rejilla de cobre con la suspensión de NP se secó en condiciones ambientales durante una noche antes de obtener imágenes por TEM.

El espectro de RMN de Dex-b-PLA_PBA muestra picos correspondientes tanto a PLA (multipletes a 5,2 ppm) como a dextrano (multipletes a 4,86 ppm), pero también mostrando picos de multiplete a 6,6 ppm y 6,9 ppm, que corresponden a los protones de los átomos de carbono 2 a 6 del grupo fenilo del PBA (Fig. 12a). Se midió la absorción UV a 291 nm para cuantificar la cantidad de PBA en las NP con respecto a los monómeros de dextrano. Un aumento en la cantidad de PBA en la mezcla de reacción inicial aumento proporcionalmente la conjugación final de PBA sobre la superficie de dextrano (Tabla 2) con la mayor densidad de 34,6% en moles (equivalente a aproximadamente 3,5 PBA conjugado por 10 monómeros de dextrano) conseguida en las NP de Dex-b-PLA_320PBA.

La conjugación de cisteamina en la superficie de las NP Dex-b-PLA también se demostró usando el espectro de RMN ¹H (Fig. 13). Los picos que corresponden a los protones del carbono 1 y 2 de la cistamina se muestran como picos multiplete cerca de 2,7 ppm. Sin embargo, se requiere una caracterización con un RMN de mayor resolución en el futuro para diferenciar mejor los picos de otros picos de ruido del polímero.

Los tamaños y la morfología de las nanopartículas se analizaron usando el procedimiento ilustrado en el Ejemplo 1. Los tamaños de las NP estuvieron comprendidas en el intervalo de 25 a 28 nm, que es menor que el de las NP sin modificar de 47,9 nm. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, se postula que la reducción en el tamaño de partícula se puede atribuir a que las moléculas de PBA hacen que las cadenas de dextrano sean menos hidrófilas, lo que les lleva a formar envolturas más compactas alrededor del núcleo de la partícula PLA. Las imágenes TEM confirmaron una morfología esférica, debido a la formación de una estructura núcleo-envoltura de los copolímeros de bloques anfífilos (Fig. 12b). Los tamaños de las NP Dex-b-PLA_PBA obtenidos son menores que los que se consiguen normalmente con los copolímeros de bloques de tipo PEG tal como PLGA-PEG (Karnik, 2008). Los inventores teorizan que NP menores pueden ser más deseables para la mucoadhesión, ya que proporcionan mayor área superficial para interactuar con la membrana mucosa.

Ejemplo 7 Encapsulación de fármaco en las NP Dex-b-PLA_PBA

La encapsulación de ciclosporina A (CycA) en Dex-b-PLA y las NP Dex-b-PLA_PBA se midió usando el procedimiento descrito en 0. La encapsulación máxima de CycA se consiguió con una alimentación inicial del 40% p/p: las NP Dex-b-PLA encapsularon hasta 10,8%p/p, mientras que Dex-b-PLA_40PBA y Dex-b-PLA_320PBA encapsularon hasta 11,2 y 13,7%p/p, respectivamente (Fig. 15). La encapsulación 13,7%p/p es equivalente a la

formulación de 2,38 µg de CycA en 28 µl (que es la misma que el volumen de administración del RESTASIS® comercialmente disponible), mientras que el producto comercial contiene 14 µg. Por lo tanto, una dosis terapéuticamente relevante se puede conseguir simplemente ajustando la concentración de polímero y de fármaco en la formulación.

- 5 También se ha estudiado la encapsulación de otros tipos de agentes bioactivos en las NP Dex-b-PLA_PBA (Fig. 17). En una realización, el agente bioactivo es dorzolamida, que se utiliza habitualmente para tratar el glaucoma. En otra realización, el agente bioactivo es brinzolamida, que también se utiliza para tratar el glaucoma. Natamicina, que es un agente antifúngico, también se usa como agente bioactivo en la encapsulación en las Dex-b-PLA_NP. En otras realizaciones, doxorubicina, un agente anticanceroso, y olopatadina, antihistamina, también se estudiaron para su encapsulación en las NP PLA-Dex.

10 La encapsulación de Ciclosporina A (CycA) en las NP Dex-b-PLA se llevó a cabo usando el procedimiento de nanoprecipitación. Dex-b-PLA y CycA se disolvieron en DMSO (Dex-b-PLA a concentración de 7 mg/ml, con concentraciones variables de fármaco). 1 ml de la solución de DMSO se añadió gota a gota a 10 ml de DI-H₂O con agitación suave y se continuó con la agitación durante 30 minutos más. Las NP en agua se filtraron a través de un filtro con jeringuilla (tamaño de poro = 200 nm) para retirar los agregados de fármaco y posteriormente se centrifugaron con tubos de filtración Amicon (MWCO = 10 kDa, Millipore) para eliminar adicionalmente el posible fármaco libre en la suspensión. Las NP filtradas que contenían CycA encapsulada se resuspendieron y se diluyeron en acetonitrilo. Por consiguiente, la carga de fármaco (% p/p) en la matriz polimérica se calculó midiendo la concentración de CycA en la mezcla usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC, Thermo Scientific). Las mediciones se realizaron por triplicado (n = 3, promedio ± S.D). La absorbancia medida según el mismo procedimiento utilizando los polímeros sin el fármaco se utilizó como valor inicial. Las mediciones se convirtieron a concentración de CycA usando el patrón de calibración obtenido.

20 La encapsulación de dorzolamida, brinzolamida, y natamicina en las NP Dex-b-PLA se llevó a cabo usando el mismo procedimiento. La caracterización de estos fármacos se realizó usando un sistema espectrofotómetro Multi-Volume (Biotek, USA) en lugar de HPLC.

Ejemplo 8 Liberación de fármaco de las NP Dex-b-PLA_PBA *in vitro*

El fenómeno de liberación *in vitro* de CycA desde las NP Dex-b-PLA se analizó usando los procedimientos descritos en 0. Tanto Dex-b-PLA como las NP Dex-b-PLA_PBA (Dex-b-PLA_40PBA y Dex-b-PLA_320PBA) mostraron un punto de liberación total a aproximadamente 120 h (Fig. 16), que es significativamente más largo que los estudios anteriores que implicaban la liberación de CycA *in vitro* desde micropartículas o nanopartículas que mostraron hasta 48 horas de liberación sostenida (Li, 2012; Shen, 2010; Shen, 2010; Yuan, 2006). Además, la velocidad de liberación puede ser potencialmente una mejora significativa respecto del producto comercial, que requiere la administración dos veces a día. Aunque las NP Dex-b-PLA mostraron una velocidad de liberación sostenida de hasta 120 horas, las NP Dex-b-PLA_PBA mostraron dos regiones con velocidad de liberación significativamente diferente. En las primeras 48 h, las NP Dex-b-PLA_PBA liberaron CycA a una velocidad más rápida comparado con las NP Dex-b-PLA, lo que puede deberse a la liberación de CycA que estaba encapsulada cerca de la superficie algo más hidrófoba de las NP Dex-b-PLA_PBA. La velocidad de liberación posterior más lenta, comparado con las NP Dex-b-PLA, puede deberse a la liberación de fármacos desde el núcleo de las NP Dex-b-PLA_PBA, que debe difundirse a través de la superficie de dextrano más compacta. Cuando el volumen de la formulación de PBA modificado con las NP se escaló al volumen de administración de RESTASIS® (28 µl), las velocidades de liberación de CycA estuvieron en el intervalo de el intervalo de µg/día, que es similar al de la administración diaria de CycA en RESTASIS®. Por lo tanto, es posible optimizar la formulación cambiando la concentración del PBA modificado con las NP y/o la cantidad de CycA para conseguir una velocidad de liberación y una cantidad clínicamente eficaz.

45 El fenómeno de liberación *in vitro* de CycA para la PBA modificado y sin modificar en las NP Dex-b-PLA de STF a 35°C se analizó mediante cuantificación de CycA en el STF en intervalos de tiempo predeterminados, usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC). Usando el procedimiento descrito en la sección anterior, las NP que encapsulan fármaco, bien Dex-b-PLA o bien Dex-b-PLA_PBA, se prepararon y se filtraron para retirar los agregados de fármacos no encapsulados. Una muestra purificada de suspensión NP-fármaco se recogió para medir la absorbancia máxima y este valor se usó como el punto de liberación del 100%. Posteriormente, la suspensión NP-fármaco se inyectó en un cursor de diálisis Slide-a-Lyzer (corte de pesos moleculares = 20 kDa; Fisher Scientific, Canadá) y se dializó contra 200 ml de fluido lacrimal simulado (STF) a 35 °C con agitación. En intervalos de tiempo predeterminados, se extrajo 1 ml de medio de liberación, y el mismo volumen de STF reciente se añadió al medio de liberación. El medio de liberación extraído se caracterizó usando el procedimiento de HPLC (n = 3, promedio ± S.D). El medio de liberación se sustituyó varias veces para mantener la concentración de CycA en el medio para que permaneciera por debajo de su límite de solubilidad en agua. También se esperaba que la sustitución del medio evitara la adhesión de la CycA liberada a las paredes de vidrio del vaso de precipitados o la barrita agitadora magnética. Los matraces se sellaron con Parafilm para evitar la evaporación del agua.

60 El estudio de liberación *in vitro* de dorzolamida, brinzolamida, y natamicina en las NP Dex-b-PLA se llevó a cabo usando el mismo procedimiento. La caracterización de estos fármacos se realizó usando un sistema espectrofotómetro Multi-Volume (Biotek, USA) en lugar de HPLC.

Ejemplo 9 Ensayos de mucoadhesión

9.1 Ensayo del potencial Z de mucoadhesión *in vitro*

Se usaron mediciones del potencial zeta para analizar la interacción entre partículas de mucina y las NP usando los procedimientos descritos en 0. En el pasado, varios informes utilizaron el potencial zeta para evaluar las propiedades mucoadhesivas de los vehículos farmacológicos (Khutoryanskiy, 2011; Shaikh, 2011; Sogias, 2008; du Toit 2011; Takeuchi, 2005). A pH fisiológico, las partículas de mucina muestran una carga superficial negativa global debido a la presencia de grupos carboxilato (ácido siálico) y de éster sulfatos en el extremo de las unidades de azúcar (Khutoryanskiy, 2011). Mediante adhesión de los residuos de ácido siálico a las partículas de mucina, las NP Dex-b-PLA_PBA pueden apantallar las cargas negativas de la superficie de las partículas de mucina y causar, también, la agregación de partículas de mucina, aumentando de esta forma la carga superficial global. Solo Dex-b-PLA_160PBA (22,9% en moles PBA) y las NP Dex-b-PLA_320PBA 34,6% en moles) mostraron una interacción significativa con las partículas de mucina, en comparación con el estudio de control (Tabla 2). Bajas densidades de funcionalización no parecen suponer una diferencia en comparación con las NP sin modificar, en términos de interacción mucina-NP. Por tanto, es deseable usar NP que tengan gran cantidad de grupos funcionales en la superficie, tales como NP basadas en dextrano, para adaptar la densidad de funcionalización cuando se desea una mucoadhesión máxima. Si se desea funcionalizar la superficie de las NP PLGA-PEG, usando un grupo funcional por cada cadena de PEG, la modificación de PBA máxima que se puede conseguir es solo el 0,44% en moles (suponiendo el mismo MW de PEG, es decir 10 kDa). Un aumento en la funcionalización de PBA también aumentó la extensión de la interacción NP-mucina, que permite un aumento potencial de la interacción mucina-NP por saturación con PBA de la superficie. Sin embargo, la funcionalización con PBA convierte la superficie de dextrano en más hidrófoba, aumentando el potencial de agregación de las NP. Por tanto, es buena idea adaptar la cantidad de funcionalización con PBA para conseguir una interacción mucina-NP óptima sin alterar negativamente la estabilidad de las NP coloidales.

Tabla 2. Eficacia de conjugación de PBA y diámetros de las NP Dex-b-PLA modificadas y sin modificar

Formulación	PBA:Dex ^{a)} (mol%)	Diámetro (nm)	Potencial zeta ^{b)} (mV)
Mucina			-11,1 ± 0,1
Dex-b-PLA	0	47,9 ± 0,5	-10,7 ± 0,6
Dex-b-PLA_10PBA	2,85 ± 0,03	27,5 ± 0,9	-11,4 ± 0,2
Dex-b-PLA_40PBA	12,2 ± 0,2	26,7 ± 0,1	-10,8 ± 0,4
Dex-b-PLA_160PBA	22,9 ± 0,3	25,2 ± 1,0	-9,67 ± 0,76
Dex-b-PLA_320PBA	34,6 ± 0,2	28,1 ± 0,3	-8,32 ± 0,28

^{a)}% en moles de PBA respecto a los monómeros de dextrano; ^{b)}las suspensiones de NP se mezclan con una suspensión de mucina en PBS

Para evaluar las propiedades mucoadhesivas de Dex-b-PLA modificado con PBA, se midió el potencial zeta para análisis cuantitativo de la interacción entre las partículas de mucina y la suspensión de NP Dex-b-PLA_PBA. Se preparó una solución de mucina al 1% p/v en PBS pH 7,4 con agitación durante la noche y la solución posteriormente se sonicó durante 10 minutos (Branson Digital Sonifier 450, USA). A 700 µl de la solución de partículas de mucina se añadieron 200 µl de suspensión 0,7 mg/ml de Dex-b-PLA_PBA NP en PBS. También se realizó un estudio de control añadiendo 200 µl de PBS a la solución de partículas de mucina. El potencial zeta de las partículas de mucina con la suspensión de NP y el estudio de control se determinaron usando un Malvern ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

9.2 Ensayo de mucoadhesión *in vitro* - procedimiento de tinción PAS

La mucoadhesión de las NP se midió usando el procedimiento de tinción *in vitro* PAS como se ha descrito anteriormente. En comparación con las NP de Dex-b-PLA y PLGA-PEG, las NP Dex-b-PLA_PBA mostraron una mayor adsorción de mucina (Tabla 2). las NP de Dex-b-PLA_10PBA, Dex-b-PLA_40PBA, y Dex-b-PLA_160PBA mostraron un aumento lineal en la adsorción de mucina desde 0,575 hasta 0,605 mg/mg de NP según aumenta el grado de funcionalización de la superficie con PBA. Sin embargo, un aumento adicional en la funcionalización de la superficie con PBA (es decir Dex-b-PLA_320PBA) disminuyó la cantidad de mucina adsorbida. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, es posible que el exceso de funcionalización de las superficies de las NP con PBA convierte el dextrano en más hidrófobo. Esto aumentaría el potencial de autoagregación de las NP, reduciendo el área de la superficie disponible total para la adsorción de mucina. Por tanto, es buena idea adaptar la cantidad de funcionalización con PBA para conseguir una interacción mucina-NP óptima sin alterar negativamente la estabilidad de las NP coloidales. Es también posible que las NP más pequeñas proporcionan una adsorción de mucina más elevada debido a su mayor área de la superficie total, como se muestra mediante comparación de las NP de PLGA-

PEG, Dex-b-PLA, y Dex-b-PLA_PBA. Sin embargo, como cada tipo de NP presenta diferentes propiedades superficiales, la tendencia no lleva a conclusión alguna. Todas las NP Dex-b-PLA_PBA muestran una adsorción de mucina significativamente mayor en comparación con los estudios anteriores que implicaban NP basadas en quitosana y NP tioladas, que muestran aproximadamente 0,25 y 0,13 mg/mg de NP respectivamente tras 1 h de incubación (Lee, 2006).

La mucoadhesión se calculó como la cantidad de mucina adsorbida por mg de NP. La suspensión de NP (1 ml) se mezcló con 1 ml de solución de mucina (1 mg/ml en STF) y se incubó a 37°C durante 1 h. A continuación, la mezcla se centrifugó a 15.000 rpm durante 1 h y la mucina libre en el sobrenadante se cuantificó usando el procedimiento de tinción con ácido peryódico/Schiff (PAS) (Lee, 2006). La adsorción de mucina se calculó restando la concentración de mucina libre de la concentración de mucina inicial. Se determinaron patrones de mucina (0.1, 0.25 y 0.5 mg/ml) usando el mismo procedimiento para obtener una curva de calibración.

Ejemplo 10 Estudios *in vivo*

10.1 Estudio de respuesta aguda usando las NP de Dex-b-PLA_PBA

Para analizar la biocompatibilidad a corto plazo de la formulación de NP, Las formulaciones se administraron a ojos de conejos, teniendo a la vez los ojos contralaterales como control, y se realizó diariamente el examen con la lámpara de hendidura durante hasta 7 días para analizar la superficie ocular. Tras la graduación de las 7 categorías (incomodidad, hinchazón y enrojecimiento de la conjuntiva, hinchazón del párpado, descarga, opacificación de la córnea, e infiltraciones) desde 0 (ninguna) a 4 (grave), los ojos del control mostraron valores superiores globales en comparación con los ojos tratados con las NP correspondientes (Fig. 23). A lo largo de la duración del estudio, no se observaron hinchazón de la conjuntiva, opacificación de la córnea e infiltraciones en ninguno de los conejos.

Se utilizaron tres conejos hembras (Albinos New Zealand) para este estudio. Los conejos se aclimataron durante una semana antes del experimento. Se prepararon las nanopartículas usando el procedimiento de nanoprecipitación descrito en el Ejemplo 4 pero sin el fármaco. Las nanopartículas se filtraron usando una jeringa con filtro de 200 nm, y se esterilizaron adicionalmente usando irradiación UV en el interior de una campana de bioseguridad (BSC) durante 1 hora. Un ojo recibió las NP (28 µl; 19 µg de NP de Dex-b-PLA_PBA) a la vez que se utilizó el ojo contralateral como control. Se usó el examen con la lámpara de hendidura a las 0, 1, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, y 168 h después de la administración para evaluar 7 categorías diferentes (señalar que 0 h significa antes de la administración). Estas 7 categorías (incomodidad, enrojecimiento de la conjuntiva e hinchazón, hinchazón del párpado, descarga, opacificación de la córnea, e infiltraciones) se graduaron desde 0 (sin signos) a 4 (grave). Después de 168 h, los conejos se sometieron a eutanasia y se recogieron los tejidos oculares en formalina para el análisis de histopatología adicional.

10.2 Análisis de histopatología de los tejidos oculares

Después de la duración del examen de la lámpara de hendidura, los conejos se sometieron a eutanasia y se recogieron los tejidos celulares (el globo ocular completo, y los párpados superior e inferior) para el análisis de histopatología (0). Para examinar la córnea, las conjuntivas bulbar y tarsal de todos los ojos, las superficies de los tejidos oculares normales se observaron tanto en los ojos tratados con NP como en los ojos del control (Fig. 24). Todos los ojos mostraron el segmento anterior con arquitectura y morfología preservadas. No se detectaron signos de inflamación, integridad de la capa alterada, o presencia de partículas residuales en ninguno de los ojos. Se mostraron también un número adecuado de células calciformes con morfología preservada. Se descubrió la presencia ocasional de eosinófilos intraepiteliales y subepiteliales en la conjuntiva tarsal, para los ojos tanto tratados con NP como en los ojos del control, lo que sugiere que el fenómeno no está causado directamente por la administración de la formulación de NP.

Los ojos se enuclearon y se recogieron inmediatamente después de la eutanasia para evaluación histopatológica. La totalidad de los párpados superiores e inferiores también se disecaron y se recogieron para la evaluación de la conjuntiva tarsal y los tejidos blandos subyacentes. Secciones consecutivas de todo el globo ocular y los párpados se procesaron para su análisis microscópico: tras fijación inicial en formalina tamponada neutra al 10%, el tejido se incluyó en parafina, se seccionó en serie en secciones de 5 µm de espesor, y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Los portales histológicos se evaluaron usando microscopía de campo brillante (Leica DM1000, ICC50 HD, Leica Microsystems Inc, Concord, ON).

10.3 Estudio de respuesta crónica usando las NP de Dex-b-PLA_PBA

Para analizar la biocompatibilidad a largo plazo de la formulación de NP, las formulaciones se administraron a ojos de conejos una vez a la semana hasta 12 semanas, manteniendo los ojos contralaterales como control, y se realizó un control diario mediante la lámpara de hendidura de una forma similar a la de antes. Análogamente al estudio de respuesta aguda, no se observaron signos de hinchamiento de la conjuntiva, opacificación corneal ni de infiltrados en ninguno de los conejos en ningún punto temporal durante el estudio. En general, la diferencia en valor entre los ojos tratados con NP y de control fueron poco significativas para las 7 categorías durante la totalidad de la duración del estudio (12 semanas) (Fig. 25).

Se cinco conejos hembras (Albinos New Zealand) para este estudio. Los conejos se aclimataron durante una semana antes del experimento. Se prepararon las nanopartículas usando el procedimiento de nanoprecipitación descrito en el Ejemplo 4 pero sin el fármaco. Las nanopartículas se filtraron usando una jeringa con filtro de 200 nm, y se esterilizaron adicionalmente usando irradiación UV en el interior de una campana de bioseguridad (BSC) durante 1 hora. Un ojo recibió las NP (28 µl; 19 µg of las NP Dex-b-PLA_PBA) una vez a la semana durante 12 semanas, mientras que se usaba el ojo contralateral como control. Se usó el examen con la lámpara de hendidura a las 0, 1, 24, 48 h tras cada administración semanal para evaluar 7 categorías diferentes (señalar que 0 h significa antes de la administración). Estas 7 categorías (incomodidad, enrojecimiento de la conjuntiva e hinchazón, hinchazón del párpado, descarga, opacificación de la córnea, e infiltraciones) se graduaron desde 0 (sin signos) a 4 (grave). Después de 12 semanas, los conejos se sometieron a eutanasia y se recogieron los tejidos oculares para el análisis de histopatología adicional.

10.4 Estudio de respuesta crónica usando las NP Dex-b-PLA_PBA con Ciclosporina A encapsulada

De forma análoga, la biocompatibilidad a largo plazo de la formulación de NP con encapsulamiento de ciclosporina A también se estudió con la lámpara de hendidura. La formulación que contenía tanto las NP Dex-b-PLA_PBA y Ciclosporina A se administraron a ojos de conejos, manteniendo los ojos contralaterales como control. El examen con la lámpara de hendidura durante hasta 4 semanas no mostró diferencia significativa entre los ojos tratados con NO y los ojos del control para ninguna de las 7 categorías (Fig. 26).

Se usaron en este estudio cuatro conejos hembras (Albinos New Zealand) para este estudio. Los conejos se aclimataron durante una semana antes del experimento. Las nanopartículas se prepararon usando el procedimiento de nanoprecipitación descrito en el Ejemplo 4 con Ciclosporina A. Las nanopartículas se filtraron usando una jeringa con filtro de 200 nm, y se esterilizaron adicionalmente usando irradiación UV en el interior de una campana de bioseguridad (BSC) durante 1 hora. Un ojo recibió las NP (28 µl; 19 µg de las NP Dex-b-PLA_PBA y 8 µg de Ciclosporina A) una vez por semana durante 12 semanas, mientras que el ojo contralateral se usa como control. Se usó el examen con la lámpara de hendidura a las 0, 1, 24, 48 h tras cada administración semanal para evaluar 7 categorías diferentes (señalar que 0 h significa antes de la administración). Estas 7 categorías (incomodidad, enrojecimiento de la conjuntiva e hinchazón, hinchazón del párpado, descarga, opacificación de la córnea, e infiltraciones) se graduaron desde 0 (sin signos) a 4 (grave). Después de 12 semanas, los conejos se sometieron a eutanasia y se recogieron los tejidos oculares para el análisis de histopatología adicional.

Ejemplo 11 Reparto de nanopartículas *in vitro* a través de la capa lipídica de fluido lacrimal

La capacidad de los diferentes tipos de NP para repartirse en la membrana lipídica del fluido lacrimal se estudió usando un modelo *in vitro*. Los tipos de propiedades superficiales parecen tener muy poco efecto respecto al % de reparto de los complejos nanopartícula-fármaco a través de la membrana lipídica, que en su conjunto obtienen un reparto de aproximadamente un 70%. Sin embargo, se necesitan más estudio para simular mejor la estructura y el fenómeno de renovación de la capa lipídica en el fluido lacrimal.

Se preparó un fluido lacrimal artificial con una capa lipídica usando el procedimiento anteriormente notificado de preparar una solución salina de complejo (CSS) y una solución madre de lípido (LSS) (Lorentz, 2009). Añadir LSS a un volumen 2000 superior de LSS y sonicar en un baño a 37 °C durante 30 minutos. La mezcla se dejó reposar durante la noche para formar la capa lipídica. Se prepararon partículas de natamicina usando el procedimiento de nanoprecipitación anteriormente descrito. 1 ml de la formulación de NP-natamicina se añadió a 2 ml de mezcla CSS/LSS. La mezcla se incubó a continuación a 37 °C durante 10 minutos. Los 1,5 ml finales de la mezcla se extrajeron sin perturbar la capa superior, y se secaron durante la noche en un desecador al vacío. Los precipitados se disolvieron en DMSO de nuevo, y se realizó absorción UV-Vis para calcular la concentración de natamicina.

DISCUSIÓN

Los presentes inventores sintetizaron un copolímero de bloques lineal como modelo usando PLA y dextrano (Dex-b-PLA), y demostraron que las NP compuestas de Dex-b-PLA se pueden autoensamblar a NP de estructura núcleo-envoltura de pequeño tamaño de partículas, por ejemplo tamaños inferiores a 40 nm, sin usar ningún dispositivo de enfoque de flujo. Demostraron además que el tamaño de las NP Dex-b-PLA se puede adaptar con precisión, por ejemplo entre 15-70 nm alterando el peso molecular de los bloques componentes (Verma, 2012). Dextrano, un polisacárido natural compuesto de unidades de α-D-glucopiranosilo con enlace 1→6, se seleccionó como un modelo de bloques hidrófilo debido a su elevada hidrofilia y compatibilidad. El dextrano tiene gran cantidad de grupos hidroxilo funcionales en su cadena principal. Cuando mayor sea la densidad de los grupos funcionales de la superficie (a diferencia de PEG, que tiene un grupo funcional por cadena) puede mejorar la eficacia de la funcionalización de la superficie, y por tanto, se pueden conseguir con más facilidad propiedades de la superficie deseables con NP de tipo dextrano. Las NP revestidas con dextrano mostraron una excelente estabilidad coloidal en medio fisiológico *in vitro* y una retención prolongada en la circulación sistémica *in vivo* (Verma, 2012; Albert, 1990).

Existe otra diferencia importante en la estructura de las NP compuestas de partículas de dextrano-PLA y partículas de PEG-PLA, que se debe a la mayor hidrofilia de los dextranos, en comparación con PEG. El dextrano, más hidrófilo, está menos asociado aleatoriamente al núcleo hidrófobo de las NP, comparado con PEG, lo que podría

también explicar la mayor cantidad de fármaco encapsulado en las NO de dextrano-PLA en comparación con las NP de PLGA-PEG (Verma, 2012).

REFERENCIAS NO DE PATENTE

1. Allen, T. M. and Hansen, C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes - effect of dose. *Biochim. Biophys. Acta* 1991, 2, 133-141.
2. Allison Dev. Biol. Stand. 92:3-11, 1998.
3. A. J. Alpert. *J. Chromatogr.* 1990, 499, 177.
4. Bazile, D.; Prudhomme, C.; Bassoullet, M. T.; Marlard, M.; Spenlehauer, G.; Veillard, M. Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J. Pharm. Sci.* 1995, 4, 493-498.
5. Bernkop-Schnurch, A., Improvement in the mucoadhesive properties of alginate by the covalent attachment of cysteine. *Journal of Controlled Release* 71 2001, 277-285.
6. Davidovich-Pinhas and Bianco-Peled. Novel mucoadhesive system based on sulfhydryl-acrylate interactions. *J. Mater Sci: Mater Med* 2010 21:2027-2034.
7. Chittasupho, C.; Xie, S.; Baoum, A.; Yakovleva, T.; Siahaan, T. J.; Berkland, C. J. ICAM-1 targeting of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles to lung epithelial cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009, 2, 141-150.
8. Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z.; Shin, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer. Res.* 2008, 5, 1310-1316.
9. Chouly, C.; Pouliquen, D.; Lucet, I.; Jeune, J. J.; Jallet, P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: Effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J. Microencapsul.* 1996, 3, 245-255.
10. Dhar, S.; Gu, F. X.; Langer, R.; Farokhzad, O. C.; Lippard, S. J. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, 45, 17356-17361.
11. Diebold, Y. and Calonge. Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Progress in Retinal and Eye Research* 29 2010, 596-609.
12. Dobrovoiskaia, M. A.; Clogston, J. D.; Neun, B. W.; Hall, J. B.; Patri, A. K.; McNeil, S. E. Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Nano Lett.* 2008, 8, 2180-2187.
13. Dong, Y. and Feng, S. In vitro and in vivo evaluation of methoxy polyethylene glycol-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for small-molecule drug chemotherapy. *Biomaterials* 2007, 28, 4154-4160.
14. Drummond, D. C.; Meter, O.; Hong, K. L.; Kirpotin, D. B.; Papahadjopoulos, D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol. Rev.* 1999, 4, 691-743.
15. L. C. du Toit, V. Pillay, Y. E. Choonara, T. Govender, T. Carmichael. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2011, 8, 71.
16. Esmaili, F.; Ghahremani, M. H.; Ostad, S. N.; Atyabi, F.; Seyyedabadi, M.; Malekshahi, M. R.; Amini, M.; Dinarvand, R. Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate. *J. Drug Target.* 2008, 5, 415-423.
17. Fischer, D.; Li, Y. X.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Kissel, T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 2003, 7, 1121-1131.
18. Gaucher, G.; Asahina, K.; Wang, J.; Leroux, J. Effect of Poly(N-vinyl-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as coating agent on the opsonization, phagocytosis, and pharmacokinetics of biodegradable nanoparticles. *Biomacromolecules* 2009, 2, 408-416.
19. Gaur, U.; Sahoo, S. K.; De, T. K.; Ghosh, P. C.; Maitra, A.; Ghosh, P. K. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. *Int. J. Pharm.* 2000, 1-2, 1-10.
20. Goodwin, A. P.; Tabakman, S. M.; Welsher, K.; Sherlock, S. P.; Prencipe, G.; Dai, H. Phospholipid-dextran with a single coupling point: a useful amphiphile for functionalization of nanomaterials. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 1, 289-296.
21. Gu, F.; Zhang, L.; Teply, B. A.; Mann, N.; Wang, A.; Radovic-Moreno, A. F.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, 7, 2586-2591.
22. Guggi, y col., Matrix tablets based on thiolated poly(acrylic acid): pH-dependent variation in disintegration and mucoadhesion. *International Journal of Pharmaceutics* 274 2004 97-105.
23. He, C.; Hu, Y.; Yin, L.; Tang, C.; Yin, C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 2010, 13, 3657-3666.
24. Kafedjiiski, y col., Improved synthesis and in vitro characterization of chitosan-thioethylamidine conjugate. *Biomaterials* 27, 2006, 127-135.
25. Karnik, R.; Gu, F.; Basto, P.; Cannizzaro, C.; Dean, L.; Kyei-Manu, W.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. Microfluidic platform for controlled synthesis of polymeric nanoparticles. *Nano Lett.* 2008, 9, 2906-2912.
26. Khutoryanskiy, V.V., *Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. Macromol. Biosci.* 2011, 11, 748-764.
27. V. V. Khutoryanskiy. *Macromolecular Bioscience* 2011, 11, 748.
28. Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, 1, 113-131.
29. Kim, D.; El-Shall, H.; Dennis, D.; Morey, T. Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2005, 2, 83-91.
30. Kusnierz Glaz, C. R.; Still, B. J.; Amano, M.; Zukor, J. D.; Negrin, R. S.; Blume, K. G.; Strober, S. Granulocyte colony-stimulating factor-induced comobilization of CD4(-)CD8(-) T cells and hematopoietic progenitor cells

- (CD34(+)) in the blood of normal donors. *Blood* 1997, 7, 2586-2595.
31. Lee,H.; Fonge,H.; Hoang,B.; Reilly,R. M.; Allen,C. The effects of particle size and molecular targeting on the intratumoral and subcellular distribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* 2010, 4, 1195-1208.
32. Li,S. and Huang,L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol. Pharm.* 2008, 4, 496-504.
- 5 33. D. Lee, S. A. Shirley, R. F. Lockey, S. S. Mohapatra, *Resp. Res.* 2006, 7, 112.
34. N. Li, C. Zhuang, M. Wang, C. Sui, W. Pan. *Drug Deliv.* 2012, 19, 28.
35. S. Liu, L. Jones, F. X. Gu. *Macromolecular Bioscience* 2012, 12, 608.
36. Lorentz, y col. Contact lens physical properties and lipid deposition in a novel characterized artificial tear solution. *Molecular Vision* 2011: 17:3392-3405.
- 10 37. A. Ludwig. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005, 57, 1595.
38. A. Matsumoto, H. Cabral, N. Sato, K. Kataoka, Y. Miyahara. *Angewandte Chemie-International Edition* 2010, 49, 5494.
39. A. Matsumoto, N. Sato, K. Kataoka, Y. Miyahara. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 12022.
40. Missirlis,D.; Kawamura,R.; Tirelli,N.; Hubbell,J. A. Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006, 2, 120-129.
- 15 41. Magenheimer,B.; Levy, M. Y.; Benita,S. A new in-vitro technique for the evaluation of drug-release profile from colloidal carriers - ultrafiltration technique at low-pressure. *Int. J. Pharm.* 1993, 1-3, 115-123.
42. Meerasa,A.; Huang,J. G.; Gu,F. X. CH(50): A revisited hemolytic complement consumption assay for evaluation of nanoparticles and blood plasma protein interaction. *Curr. Drug Deliv.* 2011, 3, 290-298.
- 20 43. Missirlis,D.; Kawamura,R.; Tirelli,N.; Hubbell,J. A. Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006, 2, 120-129.
44. Naganival, S. Kant, P. N. Singh, P. Maiti, J. K. Pandit. *J. Controlled Release* 2009, 136, 2.
45. Passirani,C.; Barratt,G.; Devissaguet,J. P.; Labarre,D. Long-circulating nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate). *Pharm. Res.* 1998, 7, 1046-1050.
- 25 46. Peracchia,M. T.; Fattal,E.; Desmaele,D.; Besnard,M.; Noel,J. P.; Gomis,J. M.; Appel, M.; d'Angelo,J.; Couvreur,P. Stealth (R) PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J. Control. Release* 1999, 1, 121-128.
47. Phillips y col. *Vaccine* 10:151-158, 1992.
48. Portet,D.; Denizot,B.; Rump,E.; Hindre,F.; Le Jeune,J. J.; Jallet,P. Comparative biodistribution of thin-coated iron oxide nanoparticles TCION: Effect of different bisphosphonate coatings. *Drug Dev. Res.* 2001, 4, 173-181.
- 30 49. Rehor,A.; Schmoekel,H.; Tirelli,N.; Hubbell,J. A. Functionalization of polysulfide nanoparticles and their performance as circulating carriers. *Biomaterials* 2008, 12, 1958-1966.
50. Riley,T.; Govender,T.; Stolnik,S.; Xiong,C. D.; Garnett,M. C.; Illum,L.; Davis,S. S. Colloidal stability and drug incorporation aspects of micellar-like PLA-PEG nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 1999, 1-4, 147-159.
- 35 51. Riley,T.; Stolnik,S.; Heald,C. R.; Xiong,C. D.; Garnett,M. C.; Illum,L.; Davis,S. S.; Purkiss,S. C.; Barlow,R. J.; Gellert,P. R. Physicochemical evaluation of nanoparticles assembled from poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) block copolymers as drug delivery vehicles. *Langmuir* 2001, 11, 3168-3174.
52. Sacco,J. J.; Botten,J.; Macbeth,F.; Bagust,A.; Clark,P. The Average Body Surface Area of Adult Cancer Patients in the UK: A Multicentre Retrospective Study. *Plos One* 2010, 1, e8933-e8933.
- 40 53. Safra,T.; Muggia,F.; Jeffers,S.; Tsao-Wei,D. D.; Groshen,S.; Lass,O.; Henderson,R.; Berry,G.; Gabizon,A. Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): Reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m(2). *Ann. Oncol.* 2000, 8, 1029-1033.
54. R. Shaikh, T. R. Raj Singh, M. J. Garland, A. D. Woolfson, R. F. Donnelly. *Journal of pharmacy & bioallied sciences* 2011, 3, 89.
- 45 55. Shuai,X. T.; Ai,H.; Nasongkla,N.; Kim,S.; Gao,J. M. Micellar carriers based on block copolymers of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery. *J. Control. Release* 2004, 3, 415-426.
56. Sakloetsakun, y col., In situ gelling properties of chitosan-thioglycolic acid conjugate in the presence of oxidizing agents. *Biomaterials* 30, 2009, 6151-6157.
57. Schmitz, y col., Synthesis and characterization of chitosan-N-acetyl cysteine conjugate. *International Journal of Pharmaceutics* 347 2008, 79-85.
- 50 58. Shuai,X. T.; Ai,H.; Nasongkla,N.; Kim,S.; Gao,J. M. Micellar carriers based on block copolymers of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery. *J. Control. Release* 2004, 3, 415-426.
59. R. Shaikh, T. R. Raj Singh, M. J. Garland, A. D. Woolfson, R. F. Donnelly. *Journal of pharmacy & bioallied sciences* 2011, 3, 89.
- 55 60. I. A. Sogias, A. C. Williams, V. V. Khutoryanskiy. *Biomacromolecules* 2008, 9, 1837.
61. J. Shen, Y. Deng, X. Jin, Q. Ping, Z. Su, L. Li. *Int. J. Pharm.* 2010, 402, 248.
62. Takeuchi, y col., Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 2005, 1583-1594.
63. Unkeless y col. *Annu. Rev. Immunol.* 6:251-281, 1998.
- 60 64. M. S. Verma, S. Liu, Y. Y. Chen, A. Meerasa, F. X. Gu. *Nano Research* 2012, 5, 49.
65. M. S. Verma, S. Liu, Y. Y. Chen, A. Meerasa, F. X. Gu. *Nano Research* 2012.
66. X. Yuan, H. Li, Y. Yuan. *Carbohydr. Polym.* 2006, 65, 337.
67. Yang,Z.; Leon,J.; Martin,M.; Harder,J. W.; Zhang,R.; Liang,D.; Lu,W.; Tian,M.; Gelovani,J. G.; Qiao,A., y col. Pharmacokinetics and biodistribution of near-infrared fluorescence polymeric nanoparticles. *Nanotechnology* 2009, 16, 165101-165101.
- 65 68. Zahr,A. S.; Davis,C. A.; Pishko,M. V. Macrophage uptake of core-shell nanoparticles surface modified with

poly(ethylene glycol). Langmuir 2006, 19, 8178-8185.

69. A. Zimmer, J. Kreuter, Adv. Drug Deliv. Rev. 1995, 16, 61.

5 Se pretende que las realizaciones anteriormente descritas sean solo ejemplos. Alteraciones, modificaciones y variaciones se pueden realizar en las realizaciones particulares por los expertos en la materia sin separarse del ámbito de la divulgación, que se define solamente por las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de nanopartículas para su uso en la administración de una carga en un sitio de la mucosa, comprendiendo las nanopartículas una pluralidad de macromoléculas anfifílicas, comprendiendo las macromoléculas:
- 5 una porción hidrófoba que comprende un polímero biocompatible seleccionado entre poliláctido, poliglicólido, poli(láctido-co-glicólido), poli(ε-caprolactona), o una combinación de los mismos; una porción hidrófila que comprende múltiples residuos funcionales, la porción hidrófila comprende un polisacárido, siendo el polisacárido dextrano; y
- 10 un residuo de direccionamiento a la mucosa, siendo el residuo de direccionamiento a la mucosa un derivado de ácido fenilborónico (PBA) capaz de unirse a grupos diol en cis de residuos de ácido siálico, en el que al menos una porción de dichos residuos funcionales de la porción hidrófila se conjugan con el residuo de direccionamiento a la mucosa.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la porción hidrófoba comprende un polímero de poliláctido.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el tamaño de partícula promedio de las nanopartículas es menor de aproximadamente 500 nm, menor de aproximadamente 300 nm, menor de aproximadamente 200 nm, menor de aproximadamente 150 nm, menor de aproximadamente 100 nm, menor de aproximadamente 50 nm, menor de aproximadamente 30 nm, menor de aproximadamente 10 nm, menor de aproximadamente 3 nm, o menor de aproximadamente 1 nm.
- 15 4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que sustancialmente todos los residuos de direccionamiento de la mucosa se localizan en la superficie de la nanopartícula.
- 20 5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una carga, en la que la carga es un agente terapéutico hidrófobo, un agente de diagnóstico, un agente profiláctico o un agente de formación de imágenes.
- 25 6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la carga es un agente terapéutico.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la carga es un agente oftálmico.
8. Una composición farmacéutica que comprende una composición de nanopartículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 9. Una composición de nanopartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición farmacéutica de la reivindicación 8, para su uso en el tratamiento de una enfermedad que se puede tratar mediante la administración de un agente terapéutico al sitio de la mucosa.

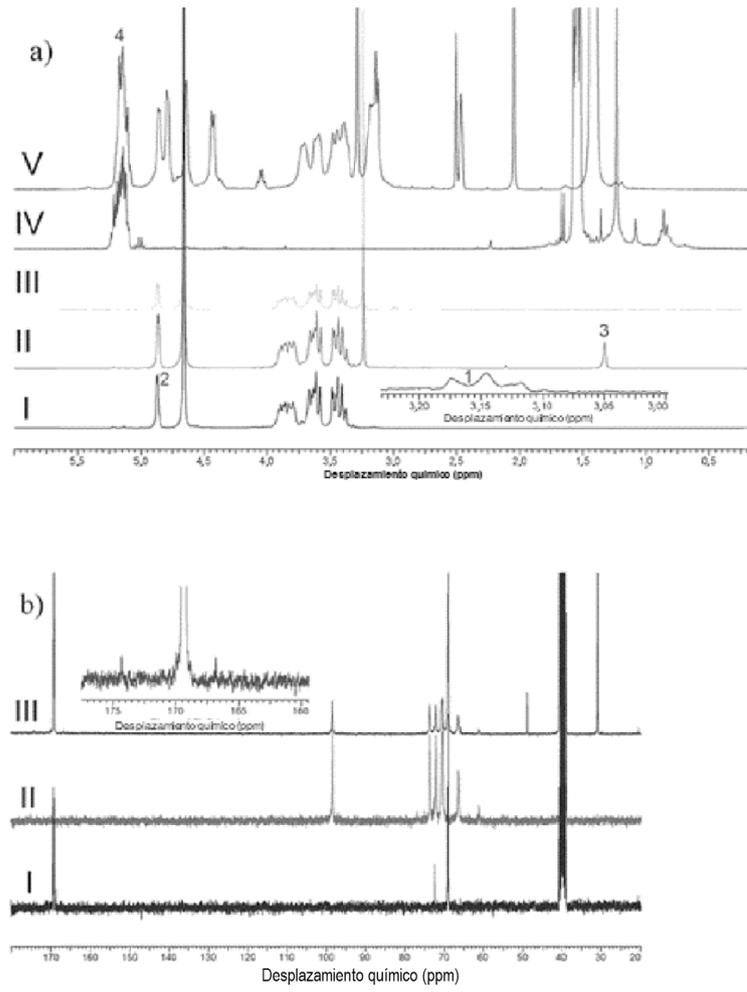


Fig. 1

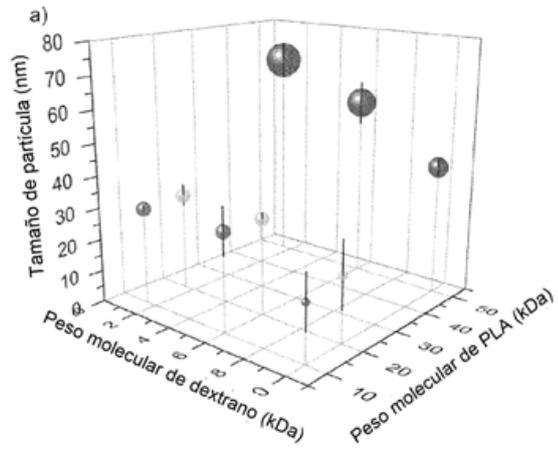


Fig. 2a

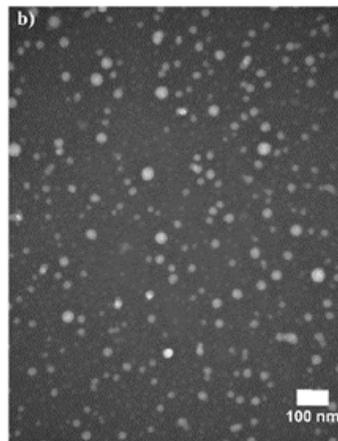


Fig 2b

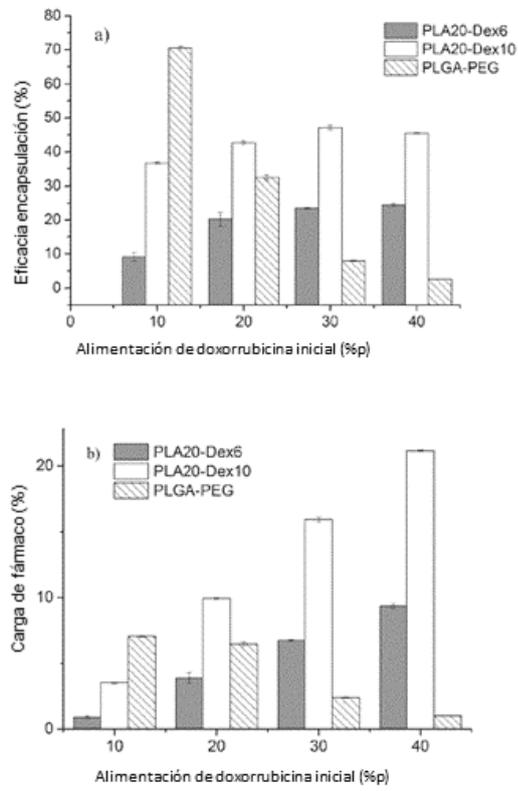


Fig. 3

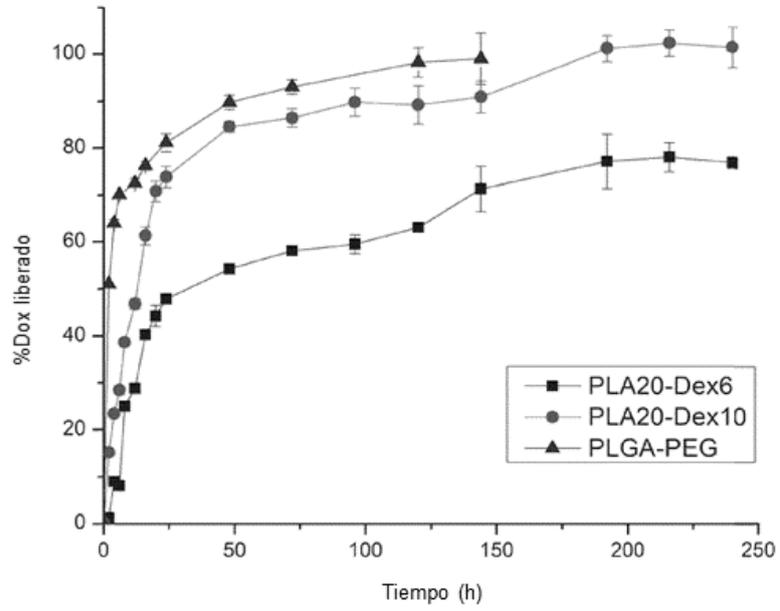


Fig. 4

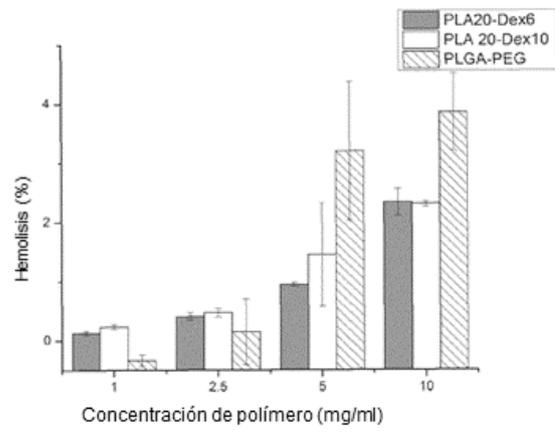


Fig. 5

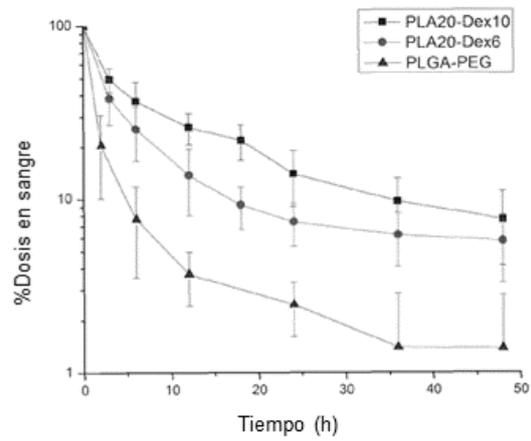


Fig. 6

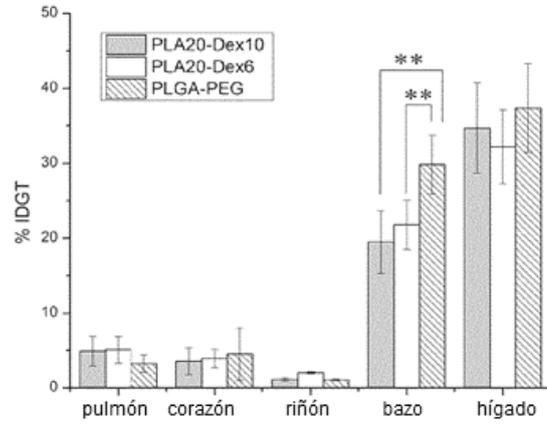


Fig. 7

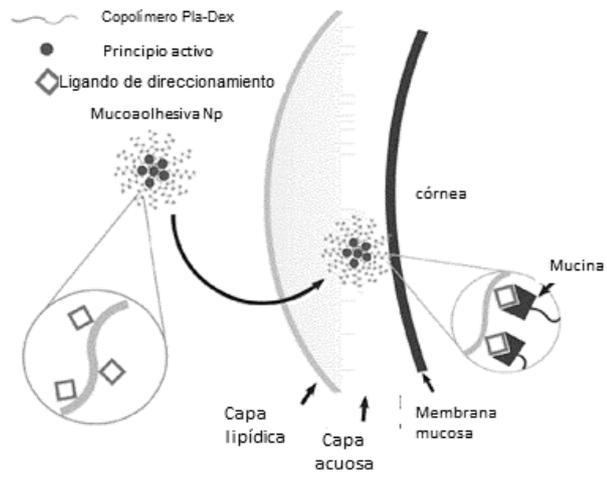


Fig. 8

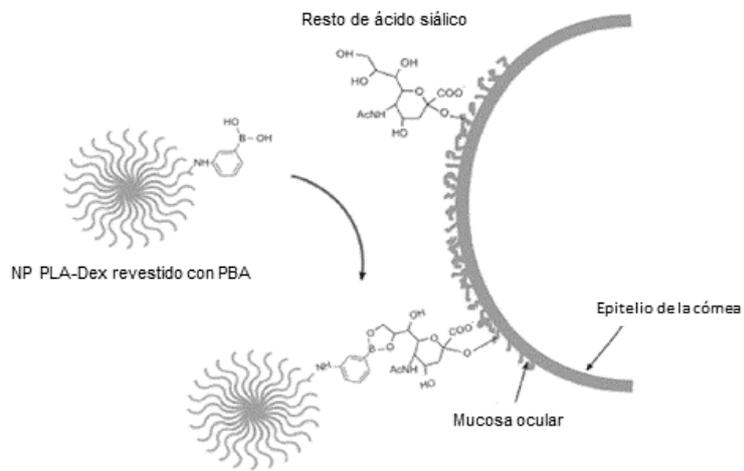


Fig. 9

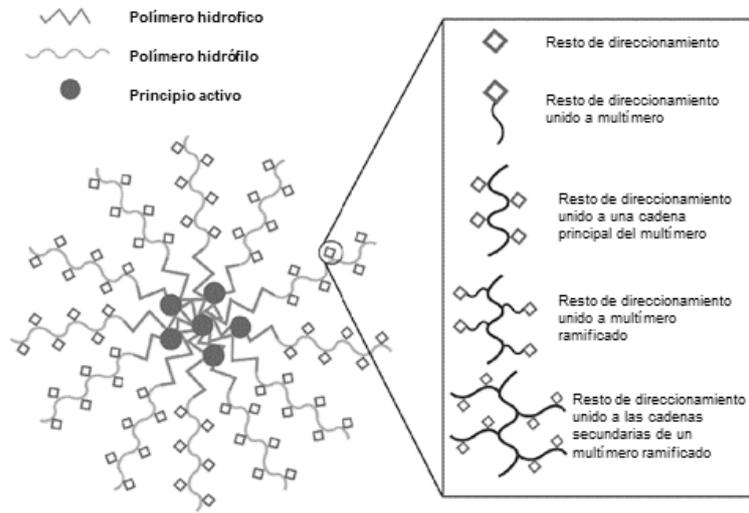


Fig. 10

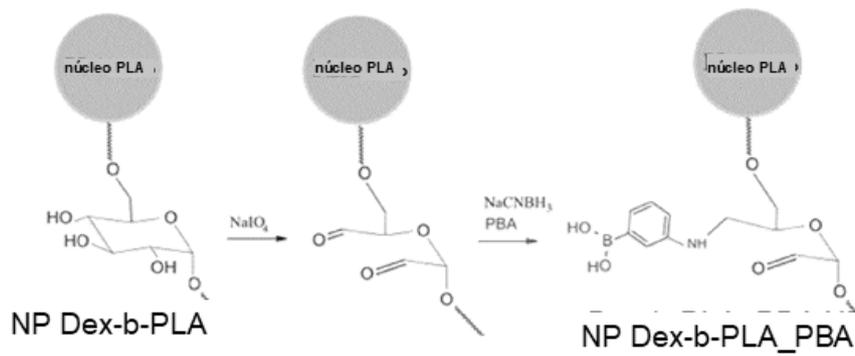


Fig. 11

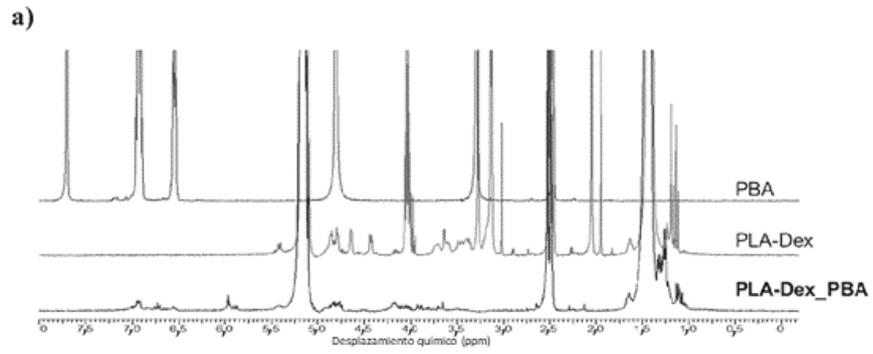


Fig. 12a

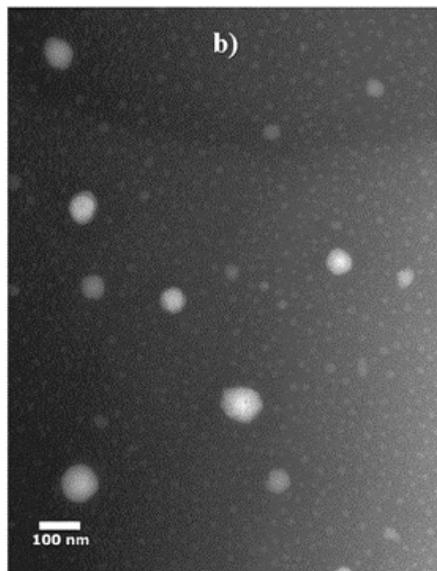


Fig. 12b

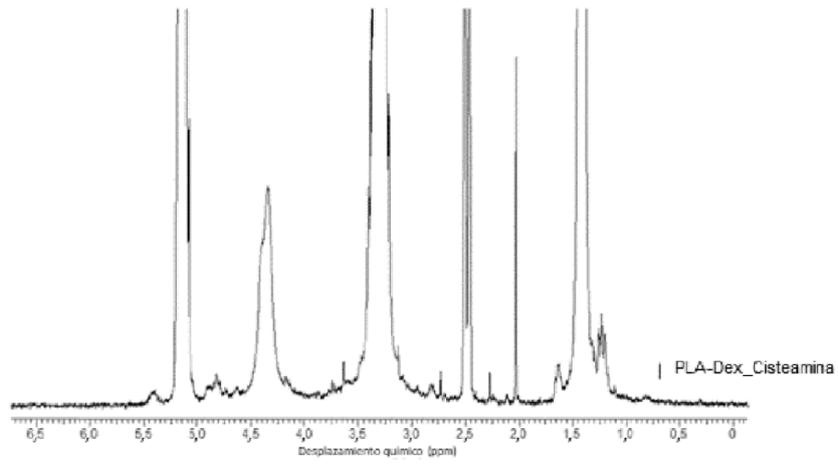


Fig. 13

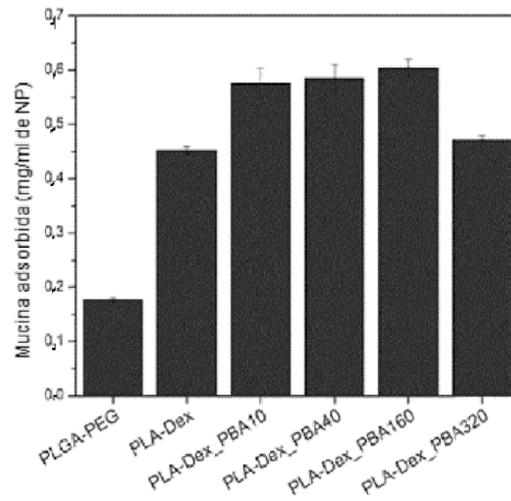


Fig. 14

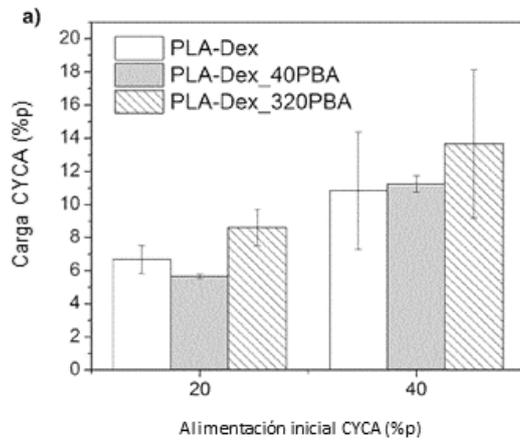


Fig. 15

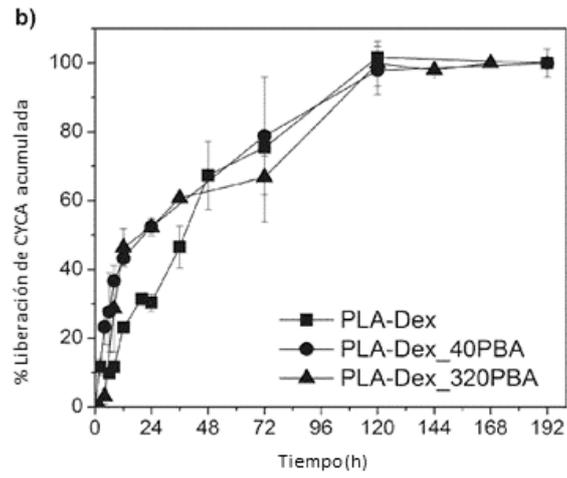
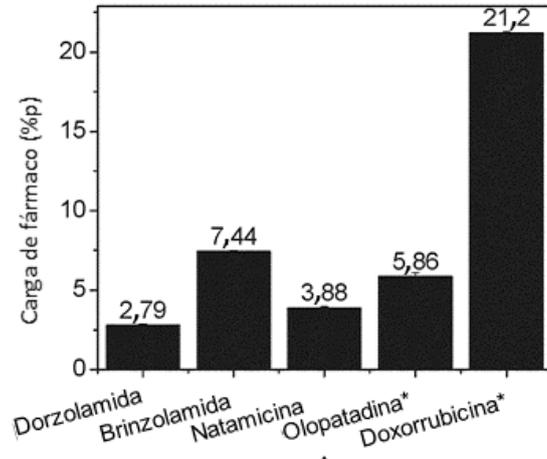


Fig. 16



A
Fig. 17

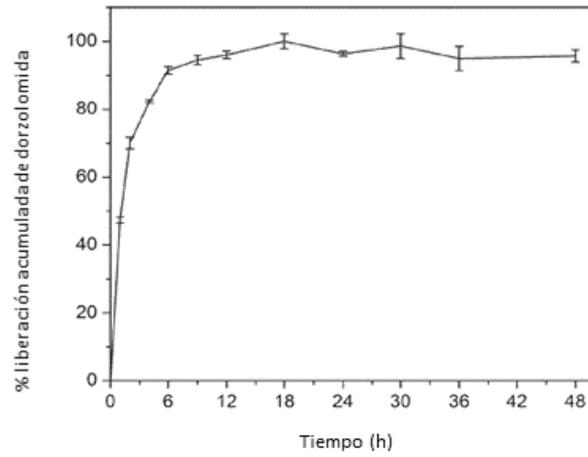


Fig. 18

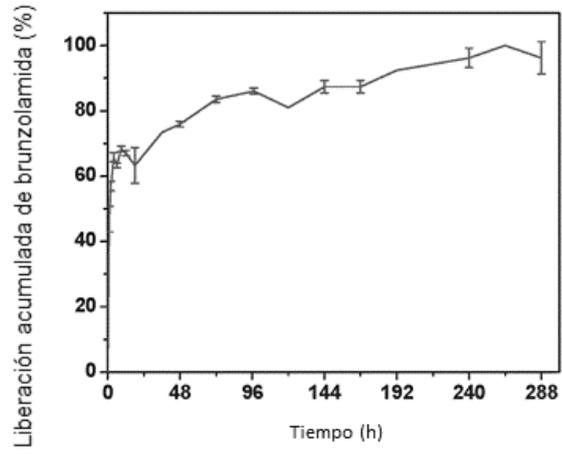


Fig. 19

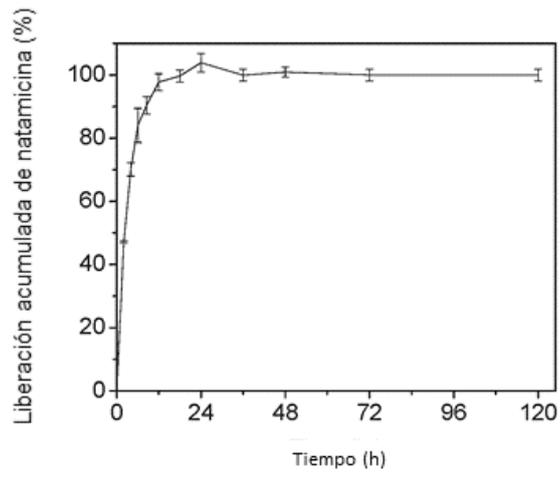


Fig. 20

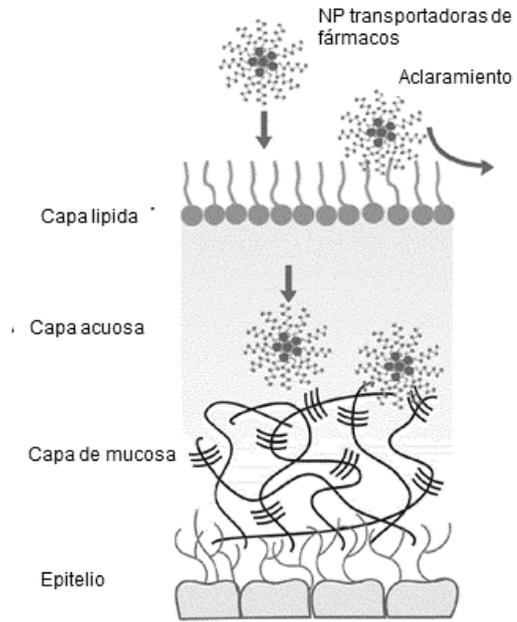


Fig. 21

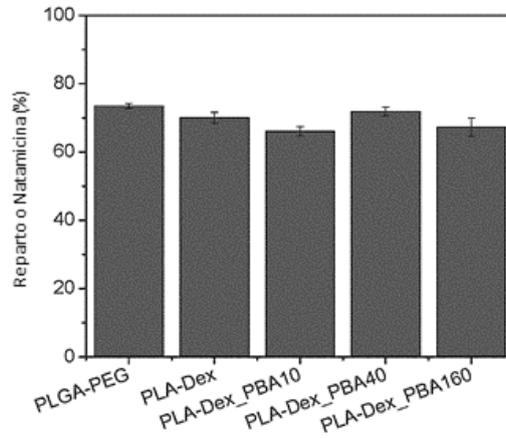


Fig. 22

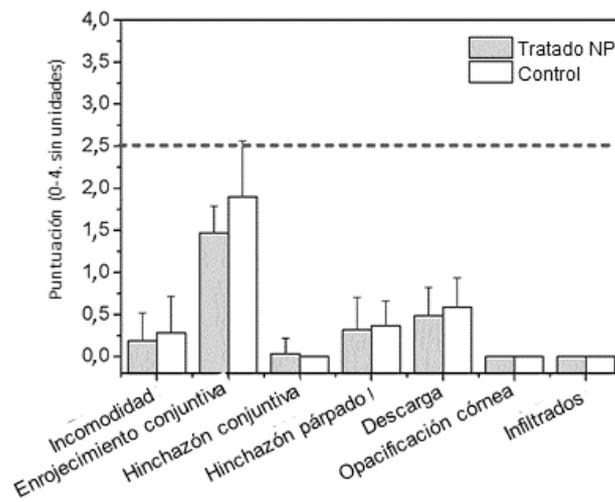


Fig. 23

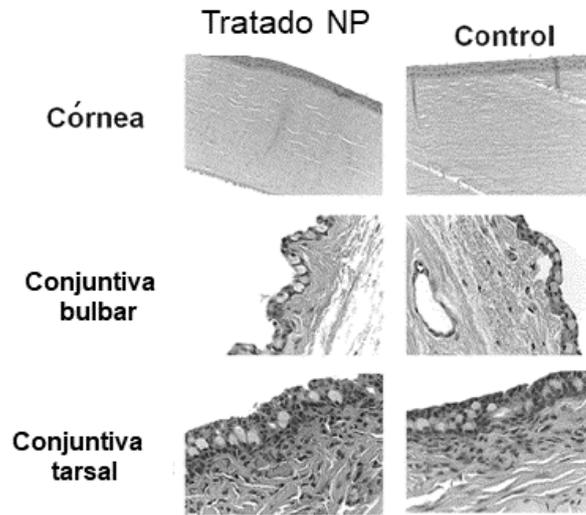


Fig. 24

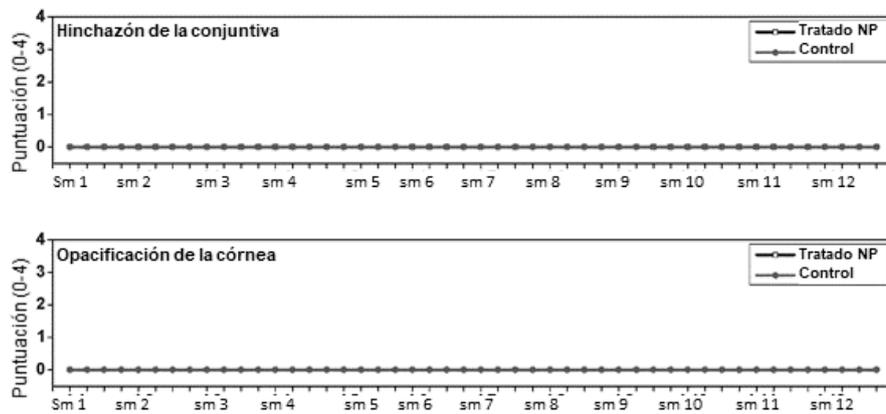


Fig. 25

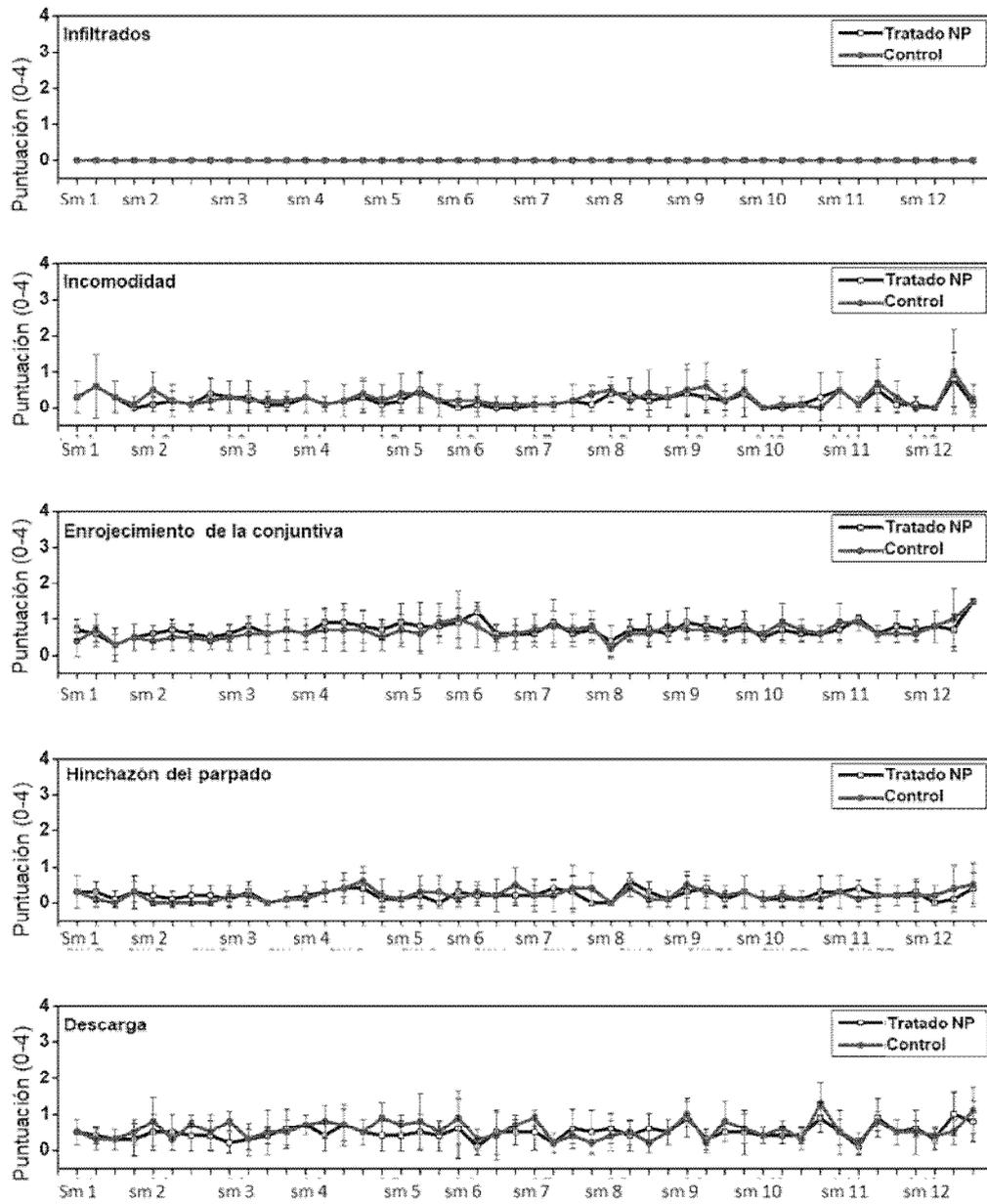


Fig. 25 Cont.

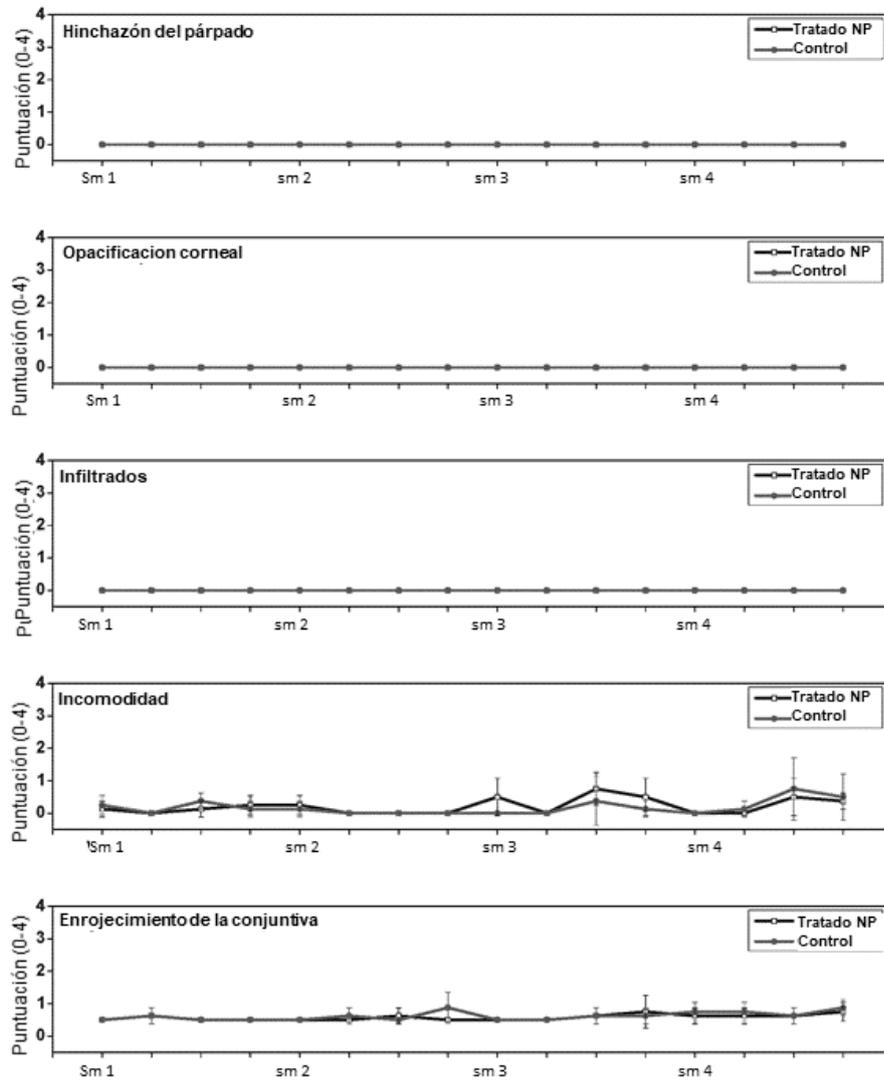


Fig. 26

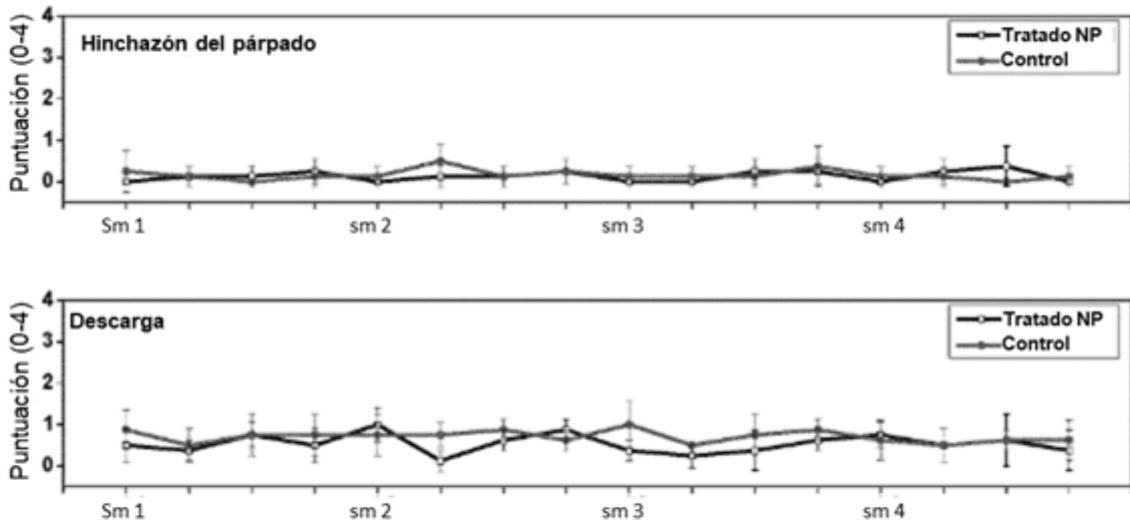


Fig. 26 Cont.