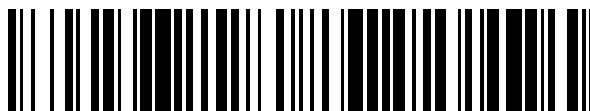


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 035**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)
A61K 47/69 (2007.01)
A61K 31/704 (2006.01)
B82B 1/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.12.2014** **PCT/KR2014/012912**
87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015** **WO15099492**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2014** **E 14875349 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019** **EP 3088353**

54 Título: **Partículas de bilirrubina y su preparación para uso en terapia**

30 Prioridad:

27.12.2013 KR 20130165718

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
16.07.2020

73 Titular/es:

BILIX CO., LTD. (100.0%)
1201, MeeWang Bd., 364, Gangnam-daero,
Gangnam-gu
Seoul 06241, KR

72 Inventor/es:

JON, SANG YONG y
LEE, YONG HYUN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 774 035 T3

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

DESCRIPCIÓN

Partículas de bilirrubina y su preparación para uso en terapia

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a partículas de bilirrubina, a una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad relacionada con la angiogénesis, a un método de preparación de la misma y a una composición antioxidante.

Técnica anterior

10 Con el rápido progreso de la nanotecnología en la última década, existe un creciente interés en los biomateriales poliméricos que se pueden descomponer con un estímulo externo o interno, pero que de otro modo son estables en condiciones fisiológicas. Se están explorando diversos estímulos internos y externos, como el pH, enzimas específicas, la temperatura, ultrasonidos, especies reactivas de oxígeno y la luz. Entre todos ellos, un estímulo óptico es especialmente atractivo, ya que se puede aplicar de forma remota durante un corto período de tiempo con una precisión espacial y temporal elevada, de una forma controlada. Además, niveles anormales de especies reactivas de oxígeno en los sitios de una inflamación se pueden usar como un estímulo desencadenante, específico de un sitio de inflamación.

15 Además, existe un creciente interés en la terapia de enfermedades, tales como las enfermedades inflamatorias, con el empleo de nanopartículas. Las ROS están presentes en el sitio del brote de una enfermedad inflamatoria y están estrechamente asociadas con el progreso de la enfermedad. Por lo tanto, se han desarrollado diversas nanopartículas terapéuticas que tienen un efecto inflamatorio para la terapia de diversas enfermedades, tales como trastornos cardiovasculares, ictus y EII. Además, se ha desarrollado un método de terapia contra el cáncer utilizando nanopartículas que tienen un efecto fotosensibilizante. Adicionalmente, la teragnosis capaz de realizar simultáneamente imágenes y una terapia usando nanopartículas, está llamando la atención como una medida de terapia óptima a través de la medicina personalizada.

20 La bilirrubina es un metabolito final amarillento formado a partir del grupo hemo. La estructura de la bilirrubina tiene muchos grupos hidrófilos, pero es muy hidrófoba debido a sus enlaces de hidrógeno intramoleculares. Los disolventes orgánicos, excepto el cloroformo y el dimetilsulfóxido, no pueden disolver la bilirrubina. El agua tampoco.

25 Si la bilirrubina no se metaboliza en el hígado, la bilirrubina no se puede excretar y a continuación se acumula en nuestro organismo, por ejemplo en la piel. Este fenómeno se denomina ictericia. Se puede diagnosticar una función anormal del hígado en adultos o una inmadurez del hígado en los recién nacidos por la ictericia. A diferencia de la ictericia de adultos, la ictericia neonatal es perjudicial para el cerebro del recién nacido porque un alto nivel de bilirrubina puede dificultar el desarrollo del cerebro. En esa situación, se puede usar la fototerapia para disminuir la concentración de bilirrubina en el cuerpo. Una vez que se expone nuestro cuerpo a la luz, la bilirrubina se puede fotoisomerizar, lo que da como resultado la ruptura de los enlaces de hidrógeno intramoleculares de la bilirrubina y, en consecuencia, la bilirrubina puede ser un fotoisómero hidrófilo que se puede excretar con la bilis o la propia orina.

30 Además, la bilirrubina puede generar especies reactivas de oxígeno a partir de oxígeno durante una fototerapia y posteriormente las especies reactivas de oxígeno pueden oxidar la bilirrubina en productos de oxidación incoloros que se pueden excretar en la propia orina.

35 Además, la bilirrubina es un potente antioxidante. Cuando la bilirrubina secuestra las ROS, la bilirrubina hidrófoba se puede oxidar en biliverdina hidrófila, la cual se puede oxidar adicionalmente en un compuesto más hidrófilo.

40 Por lo tanto, la bilirrubina tiene varias propiedades muy interesantes, la primera de las cuales es la fotoisomerización. Cuando se expone a luz azul, la bilirrubina se puede fotoisomerizar, lo que da como resultado la ruptura los enlaces de hidrógeno intramoleculares de la bilirrubina y, en consecuencia, la bilirrubina puede ser un fotoisómero hidrófilo. En segundo lugar, la bilirrubina tiene un efecto fotodinámico cuando es estimulada por luz azul más fuerte, lo que genera especies reactivas de oxígeno. Además, la bilirrubina puede emitir fluorescencia mientras está unida a BSA. Finalmente, la bilirrubina tiene poderosos efectos antioxidantes que pueden secuestrar las especies reactivas de oxígeno, incluidos los radicales peroxi, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y ácido hipocloroso.

45 El artículo científico de STEFAN E. BOIADJIEV et al., "PKa and Aggregation of Bilirubin: Titrimetric and Ultracentrifugation Studies on Water-Soluble Pegylated Conjugates of Bilirubin and Fatty Acids, BIOCHEMISTRY, vol. 43, nº 49, (2004-11-18)", describe conjugados pegilados de bilirrubina, pero no describe una bilirrubina modificada cuyo polímero hidrófilo está unido a su ácido carboxílico y además no describe nanopartículas formadas por la bilirrubina modificada.

Descripción detallada de la invención

Problema técnico

La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier contenido que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento, se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante una terapia. Los presentes inventores han investigado y se han esforzado en desarrollar partículas que tienen características fluorescentes, fotosensibilizantes y antioxidantes, y que responden a estímulos tales como la luz o a especies reactivas de oxígeno. Como resultado, los presentes inventores han formado un autoensamblaje de bilirrubina en un sistema de agua mediante la introducción de un bloque hidrófilo en una bilirrubina hidrófoba, y han verificado que el autoensamblaje tenía: capacidad para encapsular un fármaco, capacidad antioxidante y capacidad antiangiogénica; capacidad de generar especies reactivas de oxígeno a través de la exposición a la luz; capacidad de liberación de fármacos a través de la rotura del autoensamblaje causada por la exposición a la luz o a especies reactivas de oxígeno; y actividades anticancerígenas y antiinflamatorias, completando de este modo la presente invención.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención es proporcionar una partícula de bilirrubina que tiene un tamaño de 1-1.000 nm, formada mediante el autoensamblaje de un material compuesto que contiene bilirrubina y un polímero hidrófilo unido a la bilirrubina, en donde el polímero hidrófilo está unido a un grupo carboxilo de la bilirrubina.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de un cáncer.

Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad relacionada con la angiogénesis.

Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición antioxidante.

Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar un método para preparar una partícula de bilirrubina, comprendiendo el método:

- (a) preparar un material compuesto de bilirrubina-polímero hidrófilo uniendo un polímero hidrófilo a la bilirrubina;
- (b) disolver el material compuesto de bilirrubina-polímero hidrófilo en cloroformo o dimetilsulfóxido;
- (c) eliminar el cloroformo o el dimetilsulfóxido para formar una película de material compuesto a base de bilirrubina-polímero hidrófilo; y
- (d) tratar la película con un disolvente hidrófilo para autoensamblar las partículas de bilirrubina.

Otros fines y ventajas de la presente descripción se aclararán a través de la siguiente descripción detallada de la invención, las reivindicaciones y los dibujos.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una partícula de bilirrubina formada mediante el autoensamblaje de un material compuesto que contiene bilirrubina y un polímero hidrófilo unido a la bilirrubina.

Los presentes inventores han investigado y se han esforzado en desarrollar partículas que tienen características fluorescentes, fotosensibilizantes y antioxidantes, y que responden a la luz o a especies reactivas de oxígeno como estímulos. Como resultado, los presentes inventores han formado un autoensamblaje de bilirrubina en un sistema de agua mediante la introducción de un bloque hidrófilo en una bilirrubina hidrófoba y han verificado que el autoensamblaje tenía: capacidad para encapsular un fármaco, capacidad antioxidante y capacidad antiangiogénica; capacidad para generar especies reactivas de oxígeno debido a una exposición a la luz; capacidad de liberación de fármacos a través de una rotura del autoensamblaje causada por la exposición a la luz o a especies reactivas de oxígeno; y actividades anticancerígenas y antiinflamatorias.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la partícula de bilirrubina de la presente invención se forma mediante el autoensamblaje de un material compuesto, que contiene bilirrubina y un polímero hidrófilo unido a la misma, y se puede formar mediante el autoensamblaje en un sistema de agua.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la partícula de bilirrubina tiene un tamaño de 1-1.000 nm. En una realización específica, el tamaño de la partícula de bilirrubina es 50-1.000 nm, y de 50-500 nm en otra realización particular, y de 50-300 nm en otra realización particular adicional.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la partícula de bilirrubina de la presente invención encapsula una carga. Una carga de un material hidrófilo se puede encapsular dentro de la partícula, y una carga de

un material hidrófobo se puede integrar en una membrana hidrófoba formada por bilirrubina. Por lo tanto, el término "encapsulación" en el presente documento se usa como un concepto amplio, que incluye la integración de una carga.

5 En una realización específica, la carga es un fármaco. El fármaco incluye fármacos hidrófilos, fármacos hidrófobos, fármacos químicos y biofármacos. Ejemplos de estos fármacos pueden ser agentes anticancerígenos, antioxidantes, agentes antiinflamatorios, analgésicos, agentes antiartríticos, sedantes, antidepresivos, antipsicóticos, tranquilizantes, agentes ansiolíticos, inhibidores antiangiogénicos, inmunosupresores, agentes antivirales, antibióticos, agente anorexigénico, antihistamínicos, preparaciones hormonales, agentes antitrombóticos, diuréticos, agentes antihipertensivos, agentes terapéuticos cardiovasculares, vasodilatadores y similares.

10 De acuerdo con una realización de la presente descripción, la partícula de bilirrubina de la presente invención puede secuestrar especies reactivas de oxígeno. Como se verifica en los ejemplos a continuación, las partículas de bilirrubina de la presente invención se pueden acumular selectivamente en un tejido inflamatorio y, por lo tanto, las partículas de bilirrubina se pueden usar en el tratamiento de una inflamación, mediante el secuestro de especies reactivas de oxígeno en el tejido inflamatorio.

15 De acuerdo con una realización de la presente invención, las partículas de bilirrubina de la presente invención se descomponen o se rompen con luz, liberando de este modo la carga encapsulada en la periferia de las mismas.

20 Cuando las partículas de la presente invención encapsulan un agente anticancerígeno, las partículas de bilirrubina se pueden acumular selectivamente en el tejido tumoral y, por lo tanto, las partículas se descomponen o se rompen con luz (por ejemplo, luz de longitud de onda azul) irradiada desde el exterior, liberando de este modo el agente anticancerígeno en el tejido canceroso y obteniendo un efecto de tratamiento contra el cáncer a través del agente anticancerígeno liberado.

De acuerdo con una realización de la presente descripción, las partículas de bilirrubina de la presente invención se pueden descomponer o romper con luz de una longitud de onda de 430 nm a 480 nm.

25 De acuerdo con otra realización de la descripción, las partículas de bilirrubina de la presente invención se pueden descomponer o romper con luz de una longitud de onda de 620 nm a 680 nm.

De acuerdo con una realización de la presente invención, las partículas de bilirrubina de la presente invención se descomponen o se rompen a través de especies reactivas de oxígeno, liberando de este modo la carga encapsulada en la periferia de las mismas.

30 En una realización específica, las especies reactivas de oxígeno son las que están presentes en un sitio inflamatorio. Por lo tanto, en los casos en los que las partículas de la presente invención encapsulan un agente anticancerígeno (o un agente antiinflamatorio), las partículas se descomponen o se rompen debido a las especies reactivas de oxígeno presentes en el sitio del cáncer (o la inflamación), liberando de este modo el agente anticancerígeno (o el agente antiinflamatorio) y obteniendo un efecto de tratamiento del cáncer (enfermedad inflamatoria) a través del agente anticancerígeno liberado (o el agente antiinflamatorio).

35 De acuerdo con una realización de la presente invención, las partículas de bilirrubina de la presente invención pueden generar especies reactivas de oxígeno mediante luz. Por lo tanto, las partículas de bilirrubina de la presente invención se pueden acumular selectivamente en el tejido tumoral y, por lo tanto, las especies reactivas de oxígeno son generadas por la luz (por ejemplo, luz de longitud de onda azul) irradiada desde el exterior, obteniendo de este modo un efecto de tratamiento contra el cáncer.

40 De acuerdo con una realización de la presente invención, las partículas de bilirrubina de la presente invención pueden mostrar una actividad antiangiogénica.

De acuerdo con la presente invención, el polímero hidrófilo se une a la bilirrubina para formar un material compuesto, que actúa como un componente constituyente de las partículas de bilirrubina. Ya que las partículas de bilirrubina de la presente invención se aplican en el cuerpo, el polímero hidrófilo es preferiblemente biocompatible.

45 Ejemplos del polímero hidrófilo que se puede usar en la presente invención, pueden incluir polietilenglicol (PEG), poli(ácido acrílico), poli(acrilato), poli(acrilamida), poli(éster vinílico), poli(alcohol vinílico), poliestireno, polióxido, celulosa, almidón, polisacáridos, polielectrolito, poli(1-nitropropileno), poli(N-vinilpirrolidona), poli(vinilamina), poli(metacrilato de beta-hidroxietilo), poli(óxido de etileno), poli(óxido de etileno-óxido de b-propileno) y polilisina.

50 Todavía otro ejemplo del polímero hidrófilo que se puede usar en la presente invención puede incluir colágeno, quitosano, gelatina, goma de acacia, dextrano, fibrina, ácido hialurónico, pectina, agar, galactomanano, xantano y alginato.

Todavía otro ejemplo del polímero hidrófilo que se puede usar en la presente invención puede incluir un péptido compuesto por dos o más aminoácidos (por ejemplo, 2-50). Los aminoácidos pueden incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. Los aminoácidos hidrófilos incluyen glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, treonina,

asparagina, arginina, serina y similares, y los aminoácidos hidrófobos incluyen fenilalanina, triptófano, isoleucina, leucina, prolina, metionina, valina, alanina y similares. Ejemplos de un aminoácido hidrófilo no codificado pueden incluir Cit y hCys. Una persona experta en la técnica podría sintetizar fácilmente los péptidos hidrófilos basándose en esta información y técnicas de síntesis de péptidos, preparando de este modo partículas de bilirrubina.

- 5 El polímero hidrófilo incluye no solo los polímeros mencionados anteriormente sino también derivados de los mismos.

De acuerdo con una realización de la presente descripción, el polímero hidrófilo es un polietilenglicol o un derivado del mismo. Ejemplos del derivado de polietilenglicol pueden incluir metoxipolietilenglicol (PEG), succinimida de ácido propiónico de PEG, succinimida de ácido butanoico de PEG, PEG-NHS ramificado, succinato de succinimidilo de PEG, succinimida de PEG carboximetilado, carbonato de benzotriazol de PEG, éter glicídico de PEG, PEG-oxycarbonilimidazol, carbonatos de nitrofenilo de PEG, aldehído de PEG, éster succinimidil carboximetílico de PEG y éster succinimidílico de PEG.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el polímero hidrófilo se une a un grupo carboxilo de la bilirrubina para formar un material compuesto anfipático.

- 15 De acuerdo con una realización de la presente descripción, el polímero hidrófilo tiene un grupo amino en una cadena lateral o en un extremo terminal de la misma.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de un cáncer, en donde la composición farmacéutica contiene: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz de la partícula de bilirrubina de la presente invención; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Las partículas de bilirrubina de la presente invención muestran actividad antiangiogénica y, por lo tanto, se pueden emplear en la prevención y el tratamiento del cáncer.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la composición de la presente invención está dirigida a una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de cánceres mediante fotoestimulación (composición farmacéutica para terapia fotodinámica). Las partículas de bilirrubina de la presente invención, como un vehículo de fármacos fotosensibles que tienen efectos fluorescentes y fotodinámicos, se pueden utilizar en el tratamiento del cáncer. Específicamente, cuando las partículas de bilirrubina cargadas con un agente contra el cáncer se administran parenteralmente en el cuerpo, las partículas de bilirrubina se acumulan en el tejido tumoral por un efecto EPR (siglas del inglés "enhanced permeability and retention"). En este caso, cuando la luz se irradia desde el exterior sobre el tejido tumoral, una capa hidrófoba de bilirrubina se convierte en una capa hidrófila que contiene un fotoisómero hidrófilo, descomponiendo (rompiendo) de este modo las partículas y, por lo tanto, liberando el fármaco anticancerígeno contenido en las partículas en el tejido tumoral, lo que permite el tratamiento de un cáncer. Al mismo tiempo, los monómeros aislados a partir de las partículas se unen a la albúmina y, de este modo se libera fluorescencia desde el tejido tumoral, lo que permite obtener imágenes del tejido tumoral utilizando la fluorescencia.

- 35 Además, cuando se irradia con una luz de longitud de onda azul más fuerte, las partículas de bilirrubina de la presente invención generan especies reactivas de oxígeno, obteniendo de este modo un efecto anticancerígeno incluso a través de las especies reactivas de oxígeno generadas. Por lo tanto, las partículas de bilirrubina por sí mismas, de la presente invención se pueden usar en el tratamiento fotodinámico.

Ejemplos de cáncer al que se puede aplicar la presente invención, pueden incluir cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de vías biliares, tumor neuroendocrino, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer bronquial, cáncer de nasofaringe, cáncer de laringe, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, cáncer de huesos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer de uréter y similares.

De acuerdo con una realización de la presente descripción, el sujeto es un mamífero incluyendo un ser humano.

- 45 De acuerdo con una realización de la presente invención, las partículas de bilirrubina encapsulan un agente anticancerígeno.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, en donde la composición farmacéutica contiene: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz de la partícula de bilirrubina de la presente invención; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 Las partículas de bilirrubina de la presente invención se pueden utilizar como material sensible a ROS para tratar enfermedades inflamatorias. Específicamente, las partículas de bilirrubina cargadas con un fármaco antiinflamatorio, que se administran por vía parenteral en el cuerpo, se pueden dirigir al sitio inflamatorio mediante un efecto EPR. En el sitio de la inflamación, las partículas pueden mostrar una actividad antiinflamatoria secuestrando un nivel anormal de especies reactivas de oxígeno. Al mismo tiempo, la bilirrubina hidrófoba se oxida a un óxido de biliverdina

hidrófilo y, por lo tanto, las partículas se descomponen (o se rompen), o la bilirrubina se degrada en compuestos más pequeños mediante una oxidación adicional, y por lo tanto las partículas se descomponen (o se rompen), de modo que el fármaco contenido en las partículas se libera en el sitio inflamatorio, lo que permite el tratamiento de una inflamación. Además, la liberación del fármaco desde las partículas puede tener lugar mediante una captación de macrófagos.

De acuerdo con una realización de la presente invención, las partículas de bilirrubina encapsulan un agente terapéutico para enfermedades inflamatorias.

Ejemplos de las enfermedades inflamatorias, a las que se puede aplicar la presente invención, pueden incluir enfermedad inflamatoria intestinal, dermatitis atópica, edema, dermatitis, alergias, asma, conjuntivitis, periodontitis, rinitis, otitis media, aterosclerosis, faringolaringitis, amigdalitis, neumonía, úlceras gástricas, gastritis, enfermedad de Crohn, colitis, hemorroides, gota, espondilitis anquilosante, fiebre reumática, lupus, fibromialgia, artritis psoriásica, osteoartritis, artritis reumatoide, periartritis de hombro, tendinitis, tenosinovitis, miositis, hepatitis, cistitis, nefritis, síndrome de Sjogren y esclerosis múltiple.

De acuerdo con una realización de la presente descripción, las partículas de bilirrubina inhiben una actividad mieloperoxidasa (MPO).

De acuerdo con una realización de la presente descripción, las partículas de bilirrubina reducen los niveles de citocinas proinflamatorias.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad relacionada con la angiogénesis, en donde la composición farmacéutica contiene: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz de la partícula de bilirrubina de la presente invención; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedades relacionadas con la angiogénesis" se refiere a enfermedades causadas por una angiogénesis de vasos capilares estirados de manera que las células endoteliales vasculares emergen desde el vaso sanguíneo existente y se infiltran en los tejidos.

De acuerdo con una realización de la presente descripción, la enfermedad relacionada con la angiogénesis es cáncer, retinosis diabética, degeneración macular relacionada con la edad, artritis reumatoide, endometriosis, psoriasis o inflamación crónica.

De acuerdo con todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición antioxidante que contiene la partícula de bilirrubina de la presente invención.

De acuerdo con una realización, la composición antioxidante de la presente invención se puede implementar como una composición farmacéutica o una composición cosmética.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es suficiente para lograr el efecto farmacéutico descrito anteriormente.

Cuando la composición de esta invención se prepara como una composición farmacéutica, la composición farmacéutica de esta invención contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser uno convencional para formulación, que incluye lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, caucho cultivado, fosfato de potasio, arginato, gelatina, silicato de potasio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabes, metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceites minerales, pero no se limita a los mismos. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede incluir además un agente lubricante, un agente humectante, un edulcorante, un agente aromatizante, un agente emulsionante, un agente de suspensión y un conservante.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede usar mediante administración parenteral, que puede ser, por ejemplo, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración intramuscular, administración subcutánea o administración local. Además, también puede ser posible una administración oral, administración rectal, administración por inhalación, administración intranasal o similares.

La dosis apropiada de la composición farmacéutica de la presente invención varía dependiendo de factores, tales como el método de formulación, la forma de administración, la edad del paciente, el peso corporal o el sexo, la gravedad de la enfermedad, la alimentación, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción y la sensibilidad de la respuesta, y un profesional normal capacitado puede juzgar y prescribir fácilmente la dosis eficaz para el tratamiento o la prevención deseados.

La composición farmacéutica de la presente invención se formula usando un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable, de acuerdo con el método que lo lleva a cabo fácilmente una persona con habilidades ordinarias en la técnica a la que pertenece la presente invención, y la composición farmacéutica se puede preparar en una forma de dosificación unitaria o se puede insertar en un recipiente multidosis. En este caso, la forma de

dosificación puede ser una solución en un medio aceitoso o acuoso, una suspensión o una emulsión, y puede incluir además un agente dispersante o un estabilizador.

De acuerdo con todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar partículas de bilirrubina, en donde el método incluye: (a) preparar un material compuesto de bilirrubina-polímero hidrófilo uniendo un polímero hidrófilo a la bilirrubina; (b) disolver el material compuesto de bilirrubina-polímero hidrófilo en cloroformo o dimetilsulfóxido; (c) eliminar el cloroformo o el dimetilsulfóxido para formar una película de material compuesto de bilirrubina-polímero hidrófilo; y (d) tratar la película con un disolvente hidrófilo para autoensamblar las partículas de bilirrubina.

Las respectivas etapas del método de preparación se muestran en la Fig. 4.

Efectos ventajosos

Las características y las ventajas de esta invención se resumen de la siguiente manera:

(i) La presente invención proporciona partículas de bilirrubina formadas mediante un autoensamblaje de un material compuesto anfipático que contiene bilirrubina y un polímero hidrófilo, un uso de las mismas y un método de preparación de las mismas.

(ii) Las partículas de bilirrubina de la presente invención se descomponen o se rompen mediante una estimulación con luz o especies reactivas de oxígeno, liberando de este modo al exterior el fármaco encapsulado en las mismas.

(iii) Las partículas de bilirrubina de la presente invención muestran actividad antioxidante, actividad antiangiogénica, actividad anticancerígena y actividad antiinflamatoria.

(iv) Las partículas de bilirrubina de la presente invención tienen fluorescencia.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra los resultados de un MALDI-TOF de PEG-BR.

La Fig. 2 muestra los resultados de un espectro UV de PEG-BR.

La Fig. 3 muestra los resultados de una ¹H-RMN de PEG-BR.

La Fig. 4 muestra un procedimiento sintético de partículas de bilirrubina (BRNVs) de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 5 muestra el tamaño de las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 6 muestra el potencial zeta de las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 7 muestra imágenes SEM y TEM de partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 8 muestra la concentración crítica de micelas de partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 9 muestra la estabilidad de las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 10 muestra una actividad antioxidante de las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 11 muestra la rotura de las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención mediante una reacción con ROS.

La Fig. 12 muestra la rotura de las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención mediante una reacción luminosa.

La Fig. 13 muestra la eficacia de la encapsulación de fármacos hidrófilos y la eficacia de la carga de fármacos de las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 14 muestra la eficacia de la encapsulación de fármacos hidrófobos y la eficacia de la carga de fármacos de las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 15 muestra la liberación de un fármaco (doxorubicina) desde las partículas de bilirrubina mediante una radiación luminosa.

La Fig. 16 muestra la liberación de un fármaco (docetaxel) desde las partículas de bilirrubina mediante una radiación luminosa.

La Fig. 17a a 17d muestran características fluorescentes en el momento de la formación y la rotura de las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 18 muestra la capacidad de generación de ROS de las partículas de bilirrubina mediante una radiación luminosa (450 nm).

5 La Fig. 19 muestra la captación intracelular de partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 20 muestra la captación intracelular, en el momento de una radiación con láser, de las partículas de bilirrubina cargadas con doxorubicina de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 21 muestra los resultados de una evaluación de la toxicidad de las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención.

10 La Fig. 22 es un gráfico de la viabilidad celular que muestra que las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención pueden proteger a las células frente a especies reactivas de oxígeno.

La Fig. 23 ilustra imágenes en forma de células que muestran que las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención pueden proteger a las células frente a especies reactivas de oxígeno.

15 La Fig. 24 muestra que las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención se rompen al mismo tiempo que cuando secuestran ROS.

La Fig. 25a muestra la actividad anticancerígena de las partículas de bilirrubina cargadas con doxorubicina de acuerdo con la presente invención y una diferencia en la actividad anticancerígena dependiendo de la presencia o ausencia de láser.

20 La Fig. 25b muestra la actividad anticancerígena de las partículas de bilirrubina cargadas con docetaxel de acuerdo con la presente invención y una diferencia en la actividad anticancerígena dependiendo de la presencia o ausencia de láser.

La Fig. 26 muestra actividad antiangiogénica de las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 27 muestra un perfil PK de las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención.

25 La Fig. 28 ilustra un gráfico que muestra un cambio en el peso corporal de un grupo de control normal, un grupo de control con inflamación y un grupo con administración de partículas de bilirrubina, en una prueba que emplea un modelo animal de EII.

La Fig. 29 ilustra una imagen y un gráfico que muestran la longitud del colon de un grupo de control normal, un grupo de control con inflamación y un grupo con administración de partículas de bilirrubina, en una prueba que emplea un modelo animal de EII.

30 La Fig. 30 ilustra una imagen de tejido de colon y un gráfico de la inflamación de un grupo de control normal, un grupo de control con inflamación y un grupo con administración de partículas de bilirrubina, en una prueba que emplea un modelo animal de EII.

35 La Fig. 31a ilustra un gráfico que muestra la actividad MPO de un grupo de control normal, un grupo de control con inflamación y un grupo con administración de partículas de bilirrubina, en una prueba que emplea un modelo animal de EII.

La Fig. 31b y la Fig. 31c ilustran gráficos que muestran los niveles de citocinas proinflamatorias de un grupo de control normal, un grupo de control con inflamación y un grupo con administración de partículas de bilirrubina, en una prueba usando un modelo animal de EII.

40 La Fig. 32a muestra que un modelo animal sin inflamación tenía un valor de fluorescencia más bajo en el hígado que un modelo animal con EII. Además, la imagen muestra que las partículas de bilirrubina se acumulan selectivamente en la inflamación de la EII y luego se libera ICG mediante ROS.

La Fig. 32b muestra imágenes con H&E del hígado de un modelo animal con EII y de un grupo normal.

La Fig. 33 muestra actividades anticancerígenas de partículas de bilirrubina y las partículas de bilirrubina cargadas con doxorubicina de acuerdo con la presente invención.

45 La Fig. 34 muestra un cambio en el peso corporal mediante la administración de partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 35 muestra imágenes con H&E de órganos principales mediante la administración las partículas de bilirrubina de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 36 muestra que las partículas de bilirrubina se acumulaban selectivamente en el tejido tumoral.

Modo para llevar a cabo la invención

La presente invención se describirá ahora con más detalle mediante los ejemplos.

Ejemplos

5 Materiales y métodos

Síntesis de bilirrubina PEGilada (PEG-BR)

La bilirrubina y mPEG2000-NH₂ se utilizaron para la pegilación de bilirrubina. La bilirrubina (292 mg, 0,5 mmol) y EDC (95,5 mg, 0,6 mmol) se disolvieron en DMSO (5 ml). Después de agitar durante 10 minutos a temperatura ambiente, mPEG2000-NH₂ (400 mg, 0,2 mmol) y TEA (150 µl) se añadieron a esta mezcla y luego la reacción se dejó agitando durante 4 horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Para eliminar la bilirrubina libre, se añadieron 45 ml de metanol a la mezcla de reacción y después de centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos, se descartó el precipitado y se evaporó el material sobrenadante. Se añadió éter a la mezcla de reacción concentrada para preparar el precipitado. El precipitado resultante se disolvió en cloroformo para una purificación usando cromatografía en columna. Después de la cromatografía en columna sobre sílice con cloroformo/metanol (85:1) como fase móvil, los disolventes se evaporaron para obtener bilirrubina PEGilada. La PEG-BR se analizó mediante ¹H-RMN, UV y MALDI-TOF.

Preparación de nanovesículas de bilirrubina PEGilada (BRNVs)

Se disolvió la PEG-BR (5 mg) en cloroformo (200 µl) y luego se secó bajo una corriente de gas nitrógeno y se secó adicionalmente al vacío para preparar la película. Se añadió PBS fosfato (NaCl 150 mM, fosfato 10 mM, pH 7,4) a la película para la formulación de las partículas. Después de someter a ultrasonidos durante 10 min, se obtuvieron *nanopartículas de bilirrubina PEGiladas* (BRNVs) de tamaño uniforme. Las BRNVs recién preparadas se caracterizaron mediante una detección con dispersión dinámica de luz (DLS), análisis de potencial zeta y se obtuvo una evidencia visual de la formación de partículas a través de un microscopio electrónico de transmisión (TEM) y un microscopio electrónico de barrido (SEM).

25 *Concentración crítica de micelas de BRNVs*

Se midió la concentración crítica de vesículas de las partículas. Brevemente, se preparó la película formada a partir de diversas cantidades de PEG-BR, y se añadió 1 ml de PBS fosfato (NaCl 150 mM, fosfato 10 mM, pH 7,4) a la película para la formulación de las partículas. A continuación, la formación de partículas en cada grupo se determinó mediante una dispersión dinámica de la luz (DLS).

30 *Estabilidad de BRNVs*

Para determinar la estabilidad de las BRNVs a T.A., se midió el tamaño de las BRNVs mediante un aparato Zetasizer DLS, todos los días durante 8 días.

Efecto secuestrante del peróxido de hidrógeno de las BRNVs (actividad antioxidante)

Las actividades de enfriamiento rápido del peróxido de hidrógeno se cuantificaron usando el kit de ensayo con catalasa EnzyChrom™ (MEDIBENA Life Science & Diagnostic Solutions). Brevemente, el peróxido de hidrógeno (50 µM, 90 µl) se trató con diferentes concentraciones de BRNVs (10 µl). Después de una incubación durante 30 minutos, se determinaron las concentraciones restantes de peróxido de hidrógeno en cada grupo, incubando cada muestra con 100 µl de un reactivo de detección de HRP/colorante durante 10 minutos y luego verificando la intensidad de la fluorescencia (λ_{em}/ex = 585/530 nm).

40 *Rotura con ROS y sensible a la luz de las BRNVs*

Se examinó la rotura de las BRNVs como respuesta al radical peroxi. Las BRNVs (45 µg/ml) en DPBS se incubaron con un reactivo generador de radicales peroxi 100 mM, diclorohidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), a 37°C. Los espectros UV/VIS o el tamaño de las BRNVs después de una exposición a diversas concentraciones de radicales peroxi, se controlaron mediante un espectrómetro de UV/Vis o DLS en un momento predeterminado (0, 10, 60 min). La reacción también se controló a 37°C en un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 453 y 650 nm en el espectrofotómetro.

Encapsulación de fármacos

Para la carga de fármacos hidrófilos (DOX), se hidrataron 3 mg de película de PEG-BR con 300 µg de doxorubicina (DOX) y PBS fosfato (NaCl 150 mM, fosfato 10 mM, pH 7,4). Después de someter a ultrasonidos durante 10 minutos e incubar durante 2 horas a 30°C, se eliminó la DOX libre mediante filtración en gel usando una columna Sephadex CL-4B (Sigma-Aldrich) equilibrada con glucosa al 5% tamponada con HEPES 20 mM (HBG). Se recogió un total de

20 fracciones de 2 ml y para cada fracción, cada solución se secó mediante liofilización y luego se añadieron 200 µl de acetonitrilo a los residuos. La fluorescencia de la doxorubicina en cada fracción se midió posteriormente con un fluorómetro.

Para la carga de fármacos hidrófobos (Docetaxel, DTX), se disolvieron 400 µg de DTX y 3 mg de PEG-BR en cloroformo, y luego se secaron bajo una corriente de gas nitrógeno y se secaron adicionalmente al vacío para preparar la película compuesta de PEG-BR y DTX. La película se hidrató con PBS fosfato (NaCl 150 mM, fosfato 10 mM, pH 7,4). El DTX libre se eliminó fácilmente mediante un método de precipitación usando centrifugación (8.000 rpm, 5 min) y un método de filtración, usando un filtro de membrana (0,45 µm), y luego se usó el material sobrenadante que contenía las BRNVs cargadas con DTX. Para determinar la cantidad de carga de DTX en las BRNVs cargadas con DTX (DTX/BRNVs), se liofilizaron 100 µl de suspensión de BRNVs cargadas con DTX y se añadieron 100 µl de ACN a estos residuos, y después se filtraron a través de un filtro de membrana (0,45 µm). La concentración de DTX en una porción de 10 µl del material filtrado, se determinó por HPLC.

La eficacia de la encapsulación y la eficacia de la carga del fármaco se calcularon a partir de las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1

Eficacia de la encapsulación (%) = peso del fármaco en las BRNVs / peso del fármaco añadido adicionalmente x 100%

Ecuación 2

Eficacia de la carga de fármaco (%) = (peso del fármaco en las BRNVs / peso del fármaco en la vesícula + peso de la PEG-BR añadida adicionalmente) x 100%

Liberación del fármaco mediante exposición a la luz

La liberación del fármaco integrado (DTX) desde las DTX/BRNVs se realizó en tampón PBS utilizando un método de extracción. Para medir el perfil de liberación de fármaco, las DTX/BRNVs (1 mg/ml, 10% de porcentaje de carga de DTX) se dividieron por igual en 4 microtubos. Estos microtubos se irradiaron con luz de 450 nm (10 mW/cm², 10 hz) o luz de 650 nm (80 mW/cm²). En cada punto de tiempo (0, 1, 5 y 10 min), se tomó uno de los 4 microtubos y se extrajo con el mismo volumen de cloroformo durante 10 segundos y a continuación se liofilizó y se añadieron 100 µl de ACN a ese residuo y posteriormente, se filtró a través de un filtro de membrana (0,45 µm). La concentración de DTX en una porción de 10 µl de material filtrado se determinó mediante HPLC.

La liberación del fármaco encapsulado (DOX) desde las BRNVs cargadas con DOX (DOX@BRNVs) a través de un estímulo luminoso, se realizó en tampón PBS a 37°C. Para medir el perfil de liberación de fármaco, se prepararon DOX@BRNVs (1 mg/ml, 10% de porcentaje de carga de DOX). Las DOX@BRNVs se irradiaron con luz de 450 nm (10 mW/cm², 10 hz) o luz de 650 nm (80 mW/cm²). En cada punto de tiempo (0, 1, 5 y 10 min), la cantidad de DOX liberada en la solución resultante se controló a través de la emisión de fluorescencia con λ_{máx} 550 nm con excitación a 480 nm.

Medición de la fluorescencia de las BRNVs

Las soluciones de BRNVs (2 mg/ml) con o sin 0,5% de Triton-X, se prepararon y se cargaron en una placa negra de 96 pocillos. Los espectros de emisión se registraron con un fluorómetro Fluoromax. Las soluciones se excitaron a 450 nm y la emisión se midió y se integró desde 530 nm a 800 nm (punto de corte: 515 nm). Las soluciones se excitaron a 650 nm y la emisión se midió y se integró desde 680 a 800 nm (punto de corte: 690 nm).

Cultivo celular

Células CHO-K1 de mamífero se cultivaron en medio RPMI1940 con suero fetal bovino (FBS) termoinactivado al 10% (v/v), 100 UI/ml de penicilina y L-glutamina en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% a 37°C, y las células A549 se incubaron en medio F-12K de Ham complementado con FBS al 10% en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% a 37°C. Se cultivaron células endoteliales vasculares humanas (HUVECs) de una línea celular endotelial en medio EGM2 (Lonza) en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% a 37°C.

Microscopía confocal

Se obtuvieron imágenes con microscopía confocal para determinar la captación intracelular de BRNVs y DOX@BRNVs con o sin láser a 650 nm (5 min, 90 mW/cm²). Se cultivaron células A549 (1×10⁴/ pocillo, placa de 24 pocillos) sobre un cubreobjetos en medio de cultivo durante 24 horas a 37°C. Las células se trataron con medio de cultivo, DOX (5 µg/ml), BRNVs (20 µg/ml), DOX@BRNVs (DOX; 5 µg/ml, BRNVs; 20 µg/ml) o DOX@BRNVs (DOX; 5 µg/ml, BRNVs; 20 µg/ml) + luz de 650 nm (5 min, 90 mW/cm²) a 37°C durante 4 h. A continuación, las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se tiñeron con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich), se montaron con medio de montaje con fluorescencia (Dako, Carpintería, CA), y se visualizaron mediante un microscopio confocal de barrido láser (LSM 710; Carl Zeiss Microimaging, Jena, Alemania; longitud de onda de excitación: 480 nm,

longitud de onda de emisión: 530 - 670 nm).

Ensayo MTT

Se empleó un ensayo de reducción de MTT bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] para demostrar los efectos citoprotectores de las BRNVs y los efectos de la exposición a la luz (450 nm) sobre los efectos anticancerígenos de DOX@BRNVs. Se cultivaron células CHO-K1 con una densidad de 7.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y crecieron en medio de cultivo durante 24 horas a 37°C. Después de eliminar el medio, se trató cada pocillo con medio de nuevo aporte, 500 µM de peróxido de hidrógeno, o diversas concentraciones de BRNVs complementadas con o sin 500 µM de peróxido de hidrógeno en cada pocillo, durante 8 horas. Las células A549 ($0,7 \cdot 10^3$ /pocillo, placa de 96 pocillos) se cultivaron en medio de cultivo durante 24 horas a 37°C. Después de eliminar el medio, las células se incubaron con medio de nuevo aporte como control, DOX (5 µg/ml), DOX@BRNVs (DOX; 5 µg/ml, BRNVs; 20 µg/ml), DOX@BRNVs (DOX; 5 µg/ml, BRNVs; 20 µg/ml) + luz de 650 nm (5 min, 90 mW/cm²) o BRNVs (20 µg/ml) durante 15 h. Después de eso, las células se lavaron con DPBS y se incubaron adicionalmente con medio de nuevo aporte durante 20 h. A continuación, después de lavar las células, se añadieron 100 µl de medio de cultivo de nuevo aporte a cada pocillo, seguidos de 20 µl de solución de MTT (5 mg/ml en PBS) antes de 200 µl de DMSO a cada pocillo para disolver los cristales de formazán resultantes. Después de pipetear cada pocillo para disolver completamente el cristal de formazán, se midió la absorbancia a 540 nm usando un lector de placas de 96 pocillos.

Estudio de formación de tubos usando líneas celulares HUVEC

Se extendieron en placas 50 µl de Matrigel con factor de crecimiento reducido (BD bioscience) en una placa de 96 pocillos a nivel horizontal que permitía que el Matrigel se distribuyera uniformemente, y se incubaron durante 30 minutos a 37°C para formar un gel que ofrecía un entorno para HUVECs a partir de estructuras de tipo capilar no observadas normalmente en placas de cultivos celulares normales. Células HUVEC ($7,5 \cdot 10^4$ / pocillo) en medio de cultivo EBM-2 complementado con VEGF (20 ng/ml), BRNVs (2,5 µg/ml o 25 µg/ml) o VEGF (20 ng/ml) + BRNVs (2,5 µg/ml o 25 µg/ml) se cargaron en la parte superior del Matrigel. Después de una incubación a 37°C durante la noche, las células se lavaron con DPBS y se visualizaron con un microscopio de fluorescencia.

Alojamiento de los animales

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo con ratones C57BL/6 hembras (6 semanas, 17-20 g, Orient bio, Seúl, Corea), ratones ICR (6 semanas, 20-25 g) o ratones Balb/c sin pelo (6 semanas, 20-25 g, Orient bio). Los ratones se alojaron en condiciones exentas de agentes patógenos (25°C). El cuidado de los animales se proporcionó de acuerdo con las pautas para instalaciones de cuidado de animales en el instituto avanzado de Ciencia y Tecnología de Corea. Todas las operaciones quirúrgicas se realizaron con isoflurano.

Perfil PK de las BRNVs

A ratones ICR (6 semanas, 20-25 g) se les inyectó por vía intravenosa a través de la vena de la cola, DOX (4 mg/ml), BRNVs (40 mg/kg) o DOX@BRNVs (DOX; 4 mg/kg, BRNVs; 40 mg/kg) y se sacrificaron en diferentes momentos (0,0167, 0,5, 1, 4, 8, 12, 24 h) después de la inyección. Se recogió sangre (450 µL) a través del plexo orbital y se mezcló con tubos Microtainer® de BD (BD Biosciences), después de lo cual la muestra se centrifugó inmediatamente a 13.000 rpm durante 5 min. Se añadió MeOH (100 µL) al suero y la centrifugación se realizó a 12.000 rpm durante 10 minutos. El DOX libre en las muestras se determinó por HPLC. Las BRNVs se determinaron mediante espectroscopía UV/VIS a una longitud de onda de 450 nm.

Evaluación de los efectos antiinflamatorios

Los ratones C57BL/6 se alojaron en grupos de 5 ratones por jaula y se aclimataron durante 1 semana antes de entrar en el estudio. Los ratones recibieron 3,5% (p/v) de DSS (25.000 Dalton; Tokyo Industry Chemicals, Tokio) añadido al agua potable durante 5 días, seguido de un régimen de 10 días de agua. A los ratones de control sanos se les permitió beber solo agua. El día 1, se inyectaron 100 µl de BRNVs (125 mg/kg) o PBS en los ratones mediante una inyección intravenosa. El último día del experimento, se sacrificaron los ratones y se extirpó todo el colon. La longitud del colon se determinó y se lavó con PBS.

Se fijó 1 cm de los colones distales con formalina tamponada al 4% (v/v) y alcohol al 70% (v/v) y se embebió en parafina. Después, se prepararon secciones del colon distal y se tiñeron con H&E. La histología del colon se analizó con un microscopio. La gravedad se puntuó como se ha descrito anteriormente [Garrett WS et al. (Cell 2010), Xiao-Dong Li et al (PNAS 2011)]. Brevemente, a un daño epitelial del colon se le asignaron puntuaciones de la siguiente manera: 0 = normal; 1 = hiperproliferación, criptas irregulares y pérdida de criptas; 2 = pérdida de criptas de leve a moderada (10-50%); 3 = pérdida grave de criptas (50-90%); 4 = pérdida completa de criptas, superficie del epitelio intacta; 5 = úlcera de tamaño pequeño a mediano (<10 diámetros de criptas); 6 = úlcera grande (≥10 diámetros de criptas). A la infiltración con células inflamatorias se le asignó puntuaciones de forma separada para la capa mucosa (0 = normal, 1 = leve, 2 = moderada, 3 = grave), la submucosa (0 = normal, 1 = leve a moderada, 2 = grave) y la músculo/serosa (0 = normal, 1 = moderada a grave). Se añadieron puntuaciones para el daño epitelial y la infiltración de células inflamatorias, lo que daba como resultado un intervalo de puntuación total de 0 a 12.

Actividad MPO y medición de las citocinas inflamatorias

Utilizando las muestras restantes de tejido de colon, se determinó la actividad mieloperoxidasa (MPO) y las concentraciones de TNF-alfa, IL-1-Beta, IL-6 e IFN-Gamma. La actividad MPO se midió de acuerdo con el método anterior (Wilson et al. Nature Materials 2010). Brevemente, para verificar la actividad MPO, el segmento de colon se homogeneizó en 1:10 (p/v) de tampón fosfato 50 mM (pH 6,0) que contenía bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0,5% usando un homogeneizador (Polytron) a 4°C. Después de someter a ultrasonidos durante 10 segundos, congelar y descongelar tres veces, cada muestra se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos. Se añadieron 10 µl de material sobrenadante a 290 µl de tampón fosfato 50 mM (pH 6,0) que contenía 0,167 mg/ml de clorhidrato de o-dianisidina y peróxido de hidrógeno al 0,0005%, y se midió el cambio en la absorbancia a 460 nm durante 5 minutos.

Una unidad de actividad MPO se define como la que degrada 1 µmol de peróxido por minuto a 25°C. Las concentraciones de IL-1β, IL-6, IFN-γ y TNF-α se midieron utilizando un kit de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas para ratones (R&D) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Evaluación de la capacidad de las BRNVs para dirigirse a un sitio de inflamación

Un modelo de colitis murina inducida con DSS (ratones C57BL/6) y ratones sanos de control se preparó como se ha descrito en la sección anterior. ICG se cargó en las BRNVs. Brevemente, el día 5, se inyectaron 100 µl de ICG@BRNVs (ICG; 17 µg, BRNVs; 340 µg) en los ratones mediante inyección intravenosa. Después de 6 horas, se sacrificaron los ratones y se extirparon los órganos principales (colon, riñón, hígado, bazo, pulmón, corazón). Las intensidades de la fluorescencia de los órganos principales en cada grupo se visualizaron mediante un sistema de formación de imágenes *in vivo*, utilizando un tiempo de exposición de 5 s y a través del canal de filtro de ICG.

Capacidad anticancerígena de las BRNVs

Se preparó un modelo de ratón con xenoinjerto tumoral mediante una inyección S.C. de la línea celular tumoral A549 (1×10^6) en los flancos dorsales de ratones BALB/c hembra sin pelo de seis semanas de edad, hasta que el volumen tumoral era de al menos 80-120 mm³ usando ratones Balb/c sin pelo. Los ratones portadores de tumores se dividieron aleatoriamente en grupos de cuatro (día 0), minimizando las diferencias de peso y tamaño tumoral, y después se les inyectó DOX (2 mg/kg), BRNVs (20 mg/kg), DOX@BRNVs (DOX; 2 mg/kg, BRNVs; 20 mg/kg), DOX@BRNVs (DOX; 2 mg/kg, BRNVs; 20 mg/kg) + luz de 650 nm (30 min después de la inyección durante 5 min, 200 mW/cm²), DPBS como control, mediante una inyección I.V. cinco veces en un día predeterminado (día 0, 3, 6, 9, 12). Cada día se midió el volumen del tumor en cada grupo usando calibradores de Vernier. El volumen tumoral se calculó utilizando la fórmula, (largo × ancho × alto) / 2.

Evaluación de la toxicidad de las BRNVs

Se realizaron experimentos de toxicidad con ratones sanos o ratones con colitis inducida con DSS (6 semanas, ratones C57/BL6 hembra). A los ratones se les inyectó a través de la vena de la cola BRNVs (150 mg/ml) o un volumen igual de PBS. Durante un período de una semana, se observó a los ratones en busca de cambios de comportamiento y se controló el peso. Posteriormente se sacrificaron los ratones y después se extirparon los órganos principales (hígado, pulmón, riñón, bazo) para analizar la toxicidad de los órganos.

Evaluación del efecto EPR

Para esta evaluación, se preparó un modelo tumoral portado por ratones sin pelo mediante una inyección S.C. de la línea celular tumoral A549 (1×10^6) en los flancos dorsales de ratones BALB/c hembra sin pelo de seis semanas de edad. Después de 3 semanas, las BRNVs (25 mg/kg) o PBS (100 µl) como control, se administraron mediante inyección I.V. a través de la vena de la cola de los ratones sin pelo. Después de 24 horas, se sacrificó cada grupo de ratones sin pelo y después se extirparon los órganos principales (hígado, corazón, bazo, riñón y pulmón) y el tumor, y se obtuvo una imagen óptica de los órganos principales y el tumor en cada grupo mediante un sistema de formación de imágenes *in vivo* (IVIS). Las imágenes ópticas se obtuvieron utilizando un tiempo de exposición de 5 segundos y a través del canal de filtro de GFP.

*Resultados**Síntesis de bilirrubina PEGilada*

Para la conjugación de uno de los dos grupos carboxílicos de la bilirrubina con mPEG2000-NH₂, se usó metoxipoli(etilenglicol) 2000 que tenía un grupo amino terminal. (Esquema I). Después de la activación de la bilirrubina con EDC en cloroformo, se añadió TEA y mPEG2000-NH₂ a esta solución para obtener PEG-BR y después se produjeron las PEG-BR a través de un procedimiento de purificación. Se confirmó que PEG-BR se había sintetizado correctamente a través de MALDI-TOF (Fig. 1), espectros UV (Fig. 2) y ¹H-RMN (Fig. 3).

Preparación de las BRNVs

Las BRNVs se prepararon usando el método de película usando el conjugado PEG-BR obtenido. PEG-BR se disolvió en el cloroformo y luego se secó bajo una corriente de gas nitrógeno y se secó adicionalmente al vacío para

preparar la película, se añadió algo de tampón fosfato a la película y después se sometió a ultrasonidos durante 10 minutos. Finalmente, se obtuvieron las BRNVs (Fig. 4).

Para confirmar la formación de partículas de PEG-BR, se obtuvo el tamaño y potencial zeta, SEM y TEM de las BRNVs en PBS. Tenía aproximadamente 300 nm (Fig. 5) y - 30 mv (Fig. 6), respectivamente. La imagen de las BRNVs se ha mostrado en la Fig. 7. Estos resultados demuestran que la naturaleza anfipática de PEG-BR permite la formación de la partícula.

Concentración crítica de micelas de BRNVs

Verificamos la concentración crítica de micelas de BRNVs. Como se muestra en la Fig. 8, la partícula se formaba con una concentración de 100 nM (0,5 µg/ml) o más de PEG-BR.

Estabilidad de las BRNVs

Para demostrar la estabilidad de las BRNVs en PBS durante el almacenamiento a temperatura ambiente, se realizó un seguimiento del tamaño de las BRNVs durante 8 días. Se observó que la tendencia a la agregación de las partículas era extremadamente baja y que no se produjeron cambios en su tamaño (Fig. 9), lo que indicaba que las partículas son muy estables durante el almacenamiento.

Acción secuestrante de peróxido de hidrógeno de las BRNVs (efecto antioxidante)

Para investigar un efecto antioxidante de PEG-BR, se trató peróxido de hidrógeno con diversas concentraciones de partículas de bilirrubina, y luego se incubó durante 40 minutos y después se determinó la concentración restante de peróxido de hidrógeno usando sistemas de HRP/colorante mediante la intensidad de la fluorescencia. Como se muestra en la Fig. 10, niveles bajos de PEG-BR pueden secuestrar concentraciones elevadas de peróxido de hidrógeno, lo que indica que las BRNVs tienen fuertes efectos antioxidantes.

Rotura de las BRNVs sensible a ROS y a la luz

Como se muestra en las Figs. 11 y 12, se observó que las partículas se rompían al cabo de 1 minuto, lo que corresponde a un tiempo muy rápido, con ROS y radiación láser a 650 nm y 450 nm.

Capacidad de encapsulación de fármacos

Antes de evaluar la capacidad de las BRNVs para liberar el fármaco encapsulado mediante un estímulo luminoso, se investigó la capacidad de PEG-BR para la encapsulación de fármacos hidrófilos e hidrófobos. Para cargar un fármaco hidrófilo, el fármaco hidrófilo se disolvió primero en agua, y luego esta solución se puso en un vial que contenía una película de PEG-BR. Después de la formación de partículas, los fármacos hidrófilos libres y el PEG se eliminaron mediante una separación en columna. Como resultado, la eficacia de la encapsulación y la eficacia de la carga de fármacos eran del 100% y del 9,09%, respectivamente (Fig. 13).

Para cargar fármacos hidrófobos, los fármacos hidrófobos y PEG-BR se disolvieron en cloroformo, y después el cloroformo se evaporó para obtener la película compuesta por PEG-BR y el fármaco hidrófobo, y finalmente, se vertió agua en esta película, lo que dio como resultado una ligera encapsulación de fármacos hidrófobos en las partículas. El fármaco no encapsulado se eliminó por un método de precipitación. Como resultado, la eficacia de la encapsulación y la eficacia de la carga eran del 69,8% y 8,5%, respectivamente (Fig. 14).

Liberación de fármacos mediante luz

Para investigar la capacidad de descomposición sensible a la luz de las partículas, se midió el porcentaje de fármaco liberado desde las BRNVs utilizando un método de extracción durante la radiación con láser a 450 nm. Después de la radiación con láser, se mostró que el fármaco aparecía al cabo de 1 minuto y aproximadamente el 100% del fármaco se liberaba en solo 5 minutos (Figs. 15 y 16). Además, planteamos la hipótesis de que las BRNVs se pueden disolver no solo a 450 nm (luz azul) sino también a 650 nm (luz roja) y, por lo tanto, para someter a ensayo esa hipótesis, se midió el porcentaje de fármaco liberado desde las BRNVs utilizando un método de extracción durante una radiación con láser a 650 nm. Como resultado, después de la radiación con láser, se observó que el fármaco aparecía al cabo de 1 minuto y aproximadamente el 100% del fármaco se liberaba en solo 5 minutos (Figuras 15 y 16). Estos resultados demuestran que las BRNVs se pueden descomponer tanto con luz azul como con luz roja, y pueden liberar el fármaco encapsulado.

Medición de la fluorescencia de las BRNVs

Se midió la fluorescencia de las BRNVs. Si se forman partículas, la fluorescencia de la capa de bilirrubina de las BRNVs se autodesactiva. Como resultado de una medición, como se muestra en las Figs. 17a a 17d, había fluorescencia a longitudes de onda de excitación de 450 nm y 650 nm cuando se formaban las partículas y cuando se rompían las partículas, respectivamente.

Capacidad de generación de ROS de las BRNVs mediante luz

Para verificar si las partículas pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante luz azul, se evaluó la capacidad de generación de ROS. Como se muestra en la Fig. 18, el color de las BRNVs se volvió transparente durante la radiación con láser, lo que indicaba que el núcleo de bilirrubina de las BRNVs se había convertido en productos oxidados incoloros mediante ROS que se generaba a partir de oxígeno por el efecto fotosensibilizador de la bilirrubina durante la radiación con láser. Estos resultados nos indican indirectamente que las BRNVs pueden generar ROS durante una radiación con láser.

Captación intracelular de BRNVs (microscopía confocal)

Como se muestra en la Fig. 19, se producía una captación intracelular de las BRNVs y, como se muestra en la Fig. 20, la doxorrubicina se liberaba eficazmente en el momento de la radiación con láser y, por lo tanto, se mostraba que las DOX@BRNVs suministraban doxorrubicina al núcleo de la célula, a medida que la doxorrubicina libre entraba en el núcleo celular. Se observó que esta tendencia disminuía cuando las DOX@BRNVs no se radiaban con láser.

Resultados del ensayo MTT

Como se muestra en la Fig. 21, las BRNVs no mostraban toxicidad.

Como se muestra en las Figs. 22 y 23, las BRNVs secuestraban eficazmente ROS, mostrando de este modo un efecto citoprotector. La Fig. 24 muestra que las partículas se rompían junto con el secuestro de ROS, debido al hecho de que el color de las BRNVs se volvía transparente cuando las BRNVs secuestraban ROS para proteger las células. Esto muestra que el fármaco se puede liberar si las partículas contienen el fármaco.

Como se muestra en la Fig. 25a, las DOX@BRNVs mostraban actividad anticancerígena. Dado que las DOX@BRNVs sin láser a 650 nm no conducían a una captación eficaz de las partículas por sí mismas, la administración de doxorrubicina era lenta y, por lo tanto, las DOX@BRNVs no mostraban una actividad anticancerígena como con la DOX libre. Sin embargo, la radiación con láser a 650 nm durante 5 minutos, inmediatamente después del tratamiento con DOX@BRNVs, liberaba eficazmente DOX y, por lo tanto, las DOX@BRNVs mostraban actividad anticancerígena tanto como la DOX libre.

Como se muestra en la Fig. 25b, las DTX@BRNVs mostraban actividad anticancerígena. Dado que las DTX@BRNVs sin láser a 650 nm no conducían a una captación eficaz de las partículas por sí mismas, la administración de docetaxel era lenta y, por lo tanto, las DTX@BRNVs no mostraban actividad anticancerígena tanto como con la DOX libre. Sin embargo, la radiación con láser a 650 nm durante 5 minutos inmediatamente después del tratamiento con DTX@BRNVs, liberaba eficazmente DTX y, por lo tanto, las DTX@BRNVs mostraban actividad anticancerígena tanto como la DOX libre.

Actividad antiangiogénica de las BRNVs

Como se muestra en la Fig. 26, la formación de tubos era menor en el tratamiento con VEGF que con el tratamiento con VEGF + BRNVs, y estos resultados muestran que las BRNVs tienen un efecto antiangiogénico.

Perfil PK de las BRNVs

Como se muestra en la Fig. 27, las DOX@BRNVs estaban más presentes en la sangre que DOX, y por lo tanto se verificó que las partículas circulaban bien por la sangre a pesar de que contenían doxorrubicina. Además, como resultado de investigar el perfil pK de las BRNVs, por sí mismas, a partir de la absorbancia a 450 nm en la sangre después de perforar las BRNVs, se verificó que las BRNVs circulaban durante un largo período de tiempo.

Efecto antiinflamatorio de las BRNVs

Como resultado, apareció una importante disminución del peso corporal a los 5 días en el grupo de control de la inflamación, mientras que no había una disminución del peso corporal durante 10 días en el grupo de las BRNVs de forma similar al grupo sano (Fig. 28). Además, en el grupo con inflamación, la longitud del colon era corta, pero la longitud del colon con las BRNVs se normalizó hasta como en el grupo normal (Fig. 29). Como se muestra en las imágenes de H&E de la Fig. 30, en el grupo normal, la estructura del epitelio del colon está bien organizada y se pudieron observar criptas en la capa mucosa y, además, no había una infiltración de células inmunes en la mucosa, la submucosa, el músculo y la serosa, pero en el grupo con inflamación, había una lesión del colon extraordinaria, ulceración e infiltración excesiva de células inmunes en la mucosa, la submucosa, el músculo y la serosa. Sin embargo, el grupo de las BRNVs, parecía un grupo normal (capa mucosa bien organizada, sin infiltración de células inmunes). Además, la lesión del colon se puntuó como se indica con el siguiente método. La puntuación de la lesión epitelial del colon es de 6 puntos en total, y la infiltración de células inmunes en la mucosa es de 3 puntos en total, la infiltración de células inmunes en la submucosa es de 2 puntos, en el músculo/serosa de 1 punto (12 puntos en total). Se confirmó que la puntuación de la inflamación en los tejidos intestinales en el grupo de BRNVs era significativamente menor que en el grupo de control con inflamación (Fig. 30).

También se evaluó la actividad MPO y las citocinas asociadas con la inflamación. Como resultado, en el grupo de las BRNVs, la actividad MPO y los niveles de IL-1 beta, IL-6, TNF-alfa, IFN-gamma se normalizaron como en los

tejidos normales, mientras que los del grupo de control con inflamación eran altos (Figs. 31a-31c).

Estos resultados demuestran que las BRNVs pueden proteger contra una colitis inducida por DSS.

Capacidad de las BRNVs para dirigirse a sitios de inflamación

Se pueden distinguir cuatro posibilidades a partir del valor de la fluorescencia de ICG. La primera posibilidad es la captación de partículas, por sí mismas, en el hígado. La segunda posibilidad es que ICG se libera desde las partículas hasta el hígado mientras que circula por la sangre, teniendo en cuenta que ICG se excreta principalmente en el hígado cuando se inyecta ICG en la sangre. La tercera posibilidad es que la inflamación se produce por DSS en el hígado. La cuarta posibilidad es que las partículas cargadas con ICG llegan al sitio de inflamación del colon a través de vasos capilares del colon permeable, y ahí se libera rápidamente el ICG rápidamente a través de las ROS que están presentes en la capa submucosa del colon, y el ICG nuevamente llega al hígado a través de la vena porta hepática y posteriormente se libera desde el hígado.

La primera y la segunda posibilidades no son teóricamente correctas ya que se observa un bajo valor de la fluorescencia en el hígado de un modelo animal sin inflamación (Fig. 32a). La tercera posibilidad no es correcta ya que, como se muestra en la imagen con H&E, no se producía una inflamación en el hígado en el modelo animal de inflamación por DSS (Fig. 32b). Por lo tanto, es preferible una interpretación que emplea la cuarta posibilidad. Es decir, los resultados de la presente prueba muestran que las BRNVs llegan selectivamente al tejido inflamatorio y luego liberan ICG a través de ROS.

Actividad anticancerígena de las BRNVs

A partir de los resultados de la Fig. 33 se puede observar que las partículas cargadas o no cargadas con doxorrubicina tenían una eficacia mucho mejor en la capacidad anticancerígena, que la doxorrubicina libre. Además, se podía observar que el grupo de DOX@BRNVs con láser inhibía estadísticamente de forma más significativa el crecimiento del cáncer que el grupo de DOX@BRNVs sin láser. Las partículas permanecen en la sangre y luego llegan al tejido canceroso mediante los efectos de EPR, y no todas las partículas seguían liberando el fármaco, sino solo algunas de las partículas permanecen en el tejido canceroso y las otras partículas vuelven a escapar por la corriente sanguínea rápida. En este caso, las partículas liberan el fármaco mediante la radiación con láser antes de que las partículas vuelvan a escapar inmediatamente a la sangre, permitiendo de este modo un suministro de doxorrubicina con una concentración significativamente más elevada en el tejido canceroso. De este modo, se supone que la radiación con láser producirá una capacidad anticancerígena más eficaz. Además, se podrán obtener resultados interesantes como que solo las BRNVs, por sí mismas, tenían una actividad anticancerígena, y esto se determina que es debido a la actividad antiangiogénica resultante de la actividad secuestrante de ROS.

Evaluación de la toxicidad de las BRNVs

Como se muestra en la Fig. 34, no se observó ningún cambio grave en el peso corporal, durante los 7 días posteriores a la inyección de un gran volumen de partículas. Después de 7 días, se extirparon los órganos principales, y después se obtuvieron imágenes con H&E. Como resultado, como se muestra en la Fig. 35, no se observó ninguna indicación distintiva de inflamación. Esto establecía que las BRNVs eran seguras en el cuerpo.

Efecto EPR de las BRNVs

Se examinó la capacidad de PEG-BR de localizar un tejido tumoral mediante el efecto EPR debido a interacciones entre las propiedades fisicoquímicas de las partículas y la anatomía y la fisiología del entorno del tumor. Como se muestra en la Fig. 36, la intensidad de la fluorescencia del grupo de tratamiento con BRNVs en el tejido tumoral era mucho más fuerte que en comparación con el grupo control. Estos resultados muestran que las BRNVs se pueden acumular selectivamente en el tejido tumoral.

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de bilirrubina que tiene un tamaño de 1-1.000 nm formada mediante autoensamblaje de un material compuesto que contiene bilirrubina y un polímero hidrófilo unido a la bilirrubina, en donde el polímero hidrófilo está unido a un grupo carboxilo de la bilirrubina.
- 5 2. La partícula de bilirrubina según la reivindicación 1, en donde la partícula de bilirrubina se forma mediante autoensamblaje en un sistema de agua.
3. La partícula de bilirrubina según la reivindicación 1, en donde la partícula de bilirrubina encapsula una carga.
4. La partícula de bilirrubina según la reivindicación 3, en donde la partícula de bilirrubina se descompone o se rompe por medio de la luz para liberar la carga encapsulada a la periferia de la misma.
- 10 5. La partícula de bilirrubina según la reivindicación 3, en donde la partícula de bilirrubina se descompone o se rompe a través de especies reactivas de oxígeno para liberar la carga encapsulada a la periferia de la misma.
6. La partícula de bilirrubina según la reivindicación 1, en donde la partícula de bilirrubina genera especies reactivas de oxígeno por medio de la luz.
- 15 7. La partícula de bilirrubina según la reivindicación 1, en donde la partícula de bilirrubina muestra una actividad antioxidante.
8. La partícula de bilirrubina según la reivindicación 1, en donde la partícula de bilirrubina muestra una actividad antiangiogénica.
9. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer, en donde la composición farmacéutica contiene: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz de la partícula de bilirrubina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 10. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 9, en donde la composición farmacéutica es una composición farmacéutica para tratar un cáncer mediante fotoestimulación.
11. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria, en donde la composición farmacéutica contiene: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz de la partícula de bilirrubina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 12. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 11, en donde la partícula de bilirrubina encapsula un agente terapéutico para enfermedades inflamatorias.
13. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad relacionada con la angiogénesis, en donde la composición farmacéutica contiene: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz de la partícula de bilirrubina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 14. Una composición antioxidante que contiene la partícula de bilirrubina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
15. Un método para preparar una partícula de bilirrubina, comprendiendo el método:- 35 (a) preparar un material compuesto de bilirrubina-polímero hidrófilo uniendo un polímero hidrófilo a bilirrubina;
- (b) disolver el material compuesto de bilirrubina-polímero hidrófilo en cloroformo o dimetilsulfóxido;
- (c) eliminar el cloroformo o el dimetilsulfóxido para formar una película de material compuesto de bilirrubina-polímero hidrófilo; y
- (d) tratar la película con un disolvente hidrófilo para autoensamblar las partículas de bilirrubina.

40

Fig. 1

2547(P.M. medido) – P.M. calculado = 2548 – PEG-BR

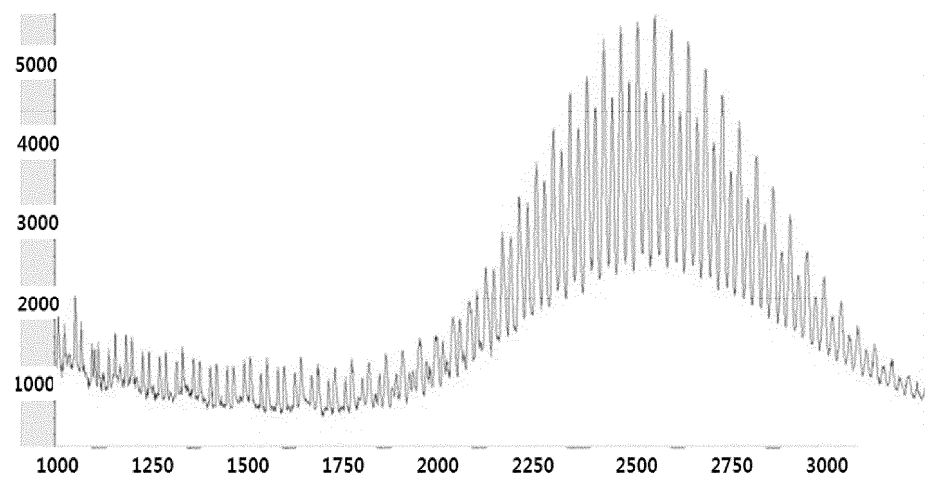


Fig. 2

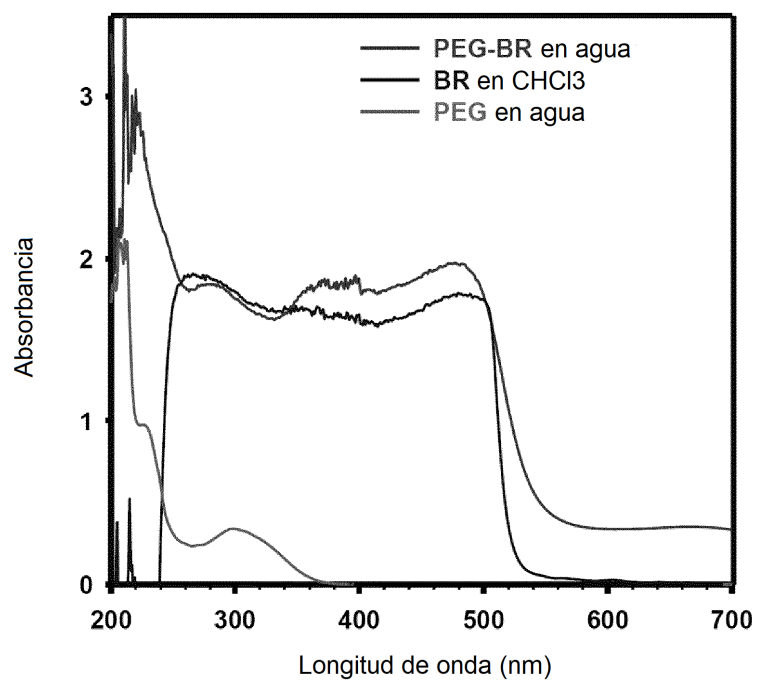


Fig. 3

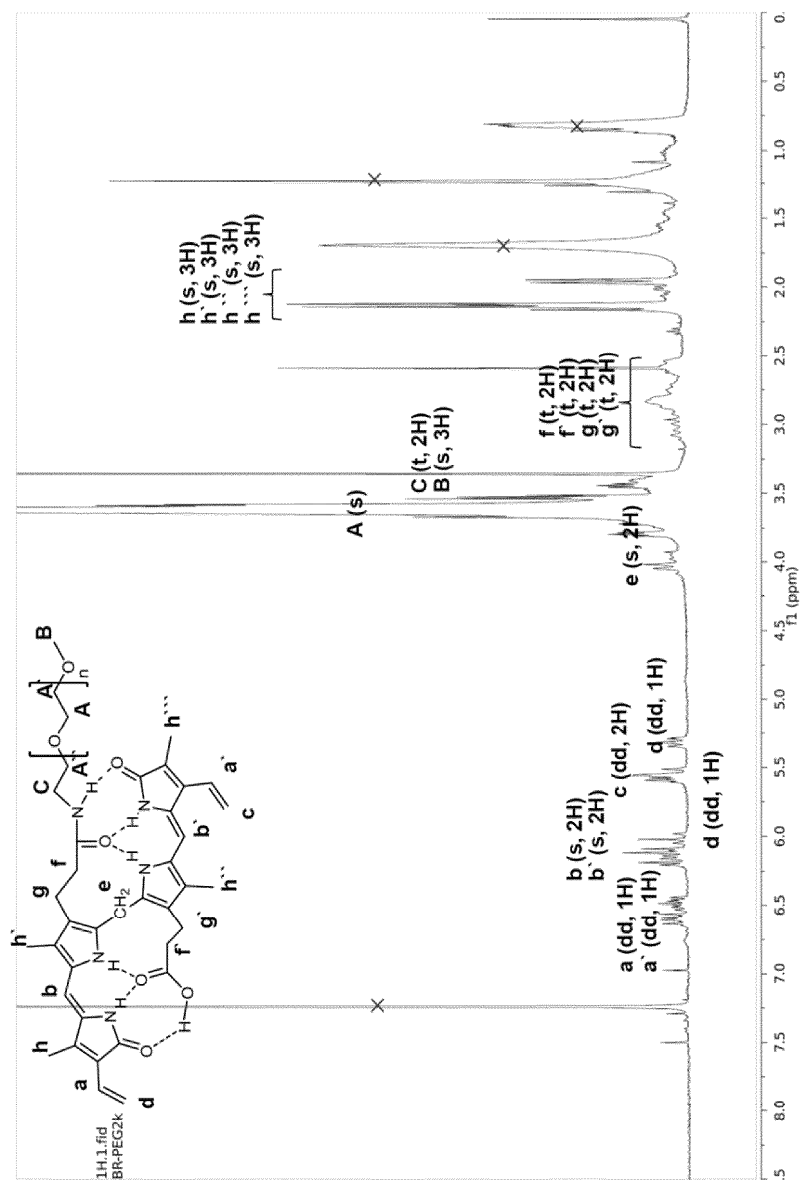


Fig. 4

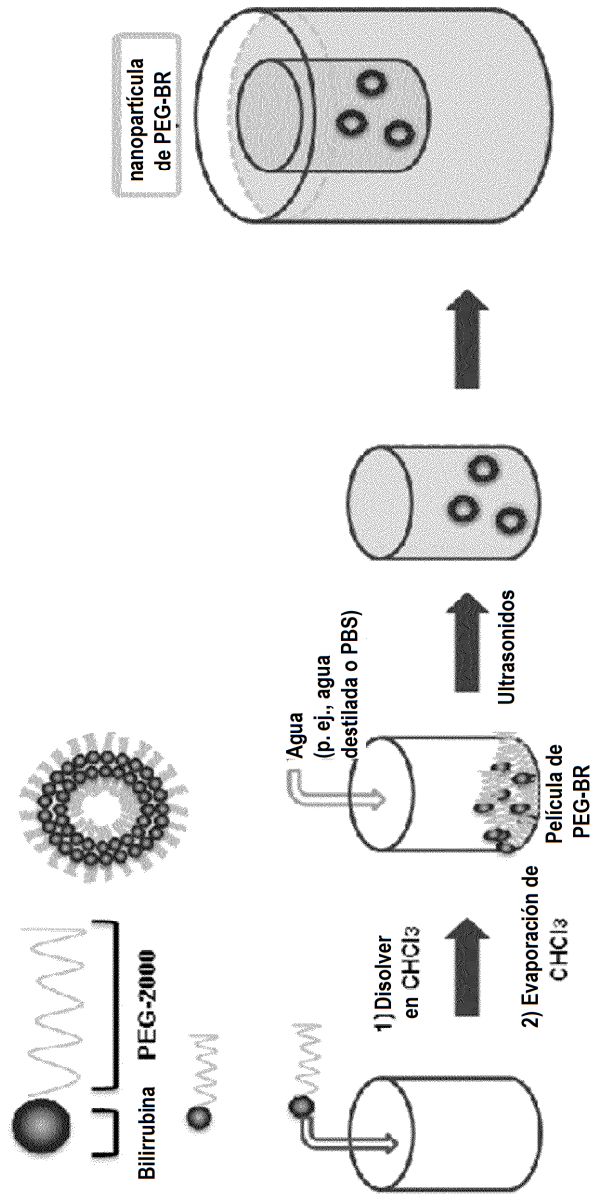


Fig. 5

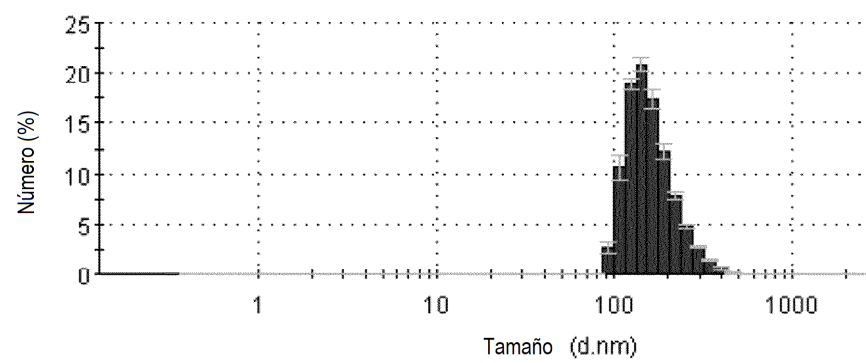


Fig. 6

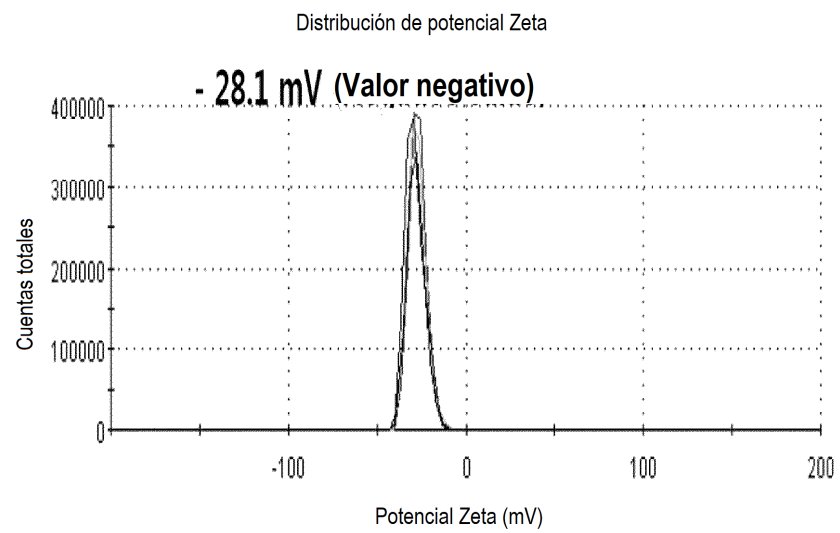


Fig. 7

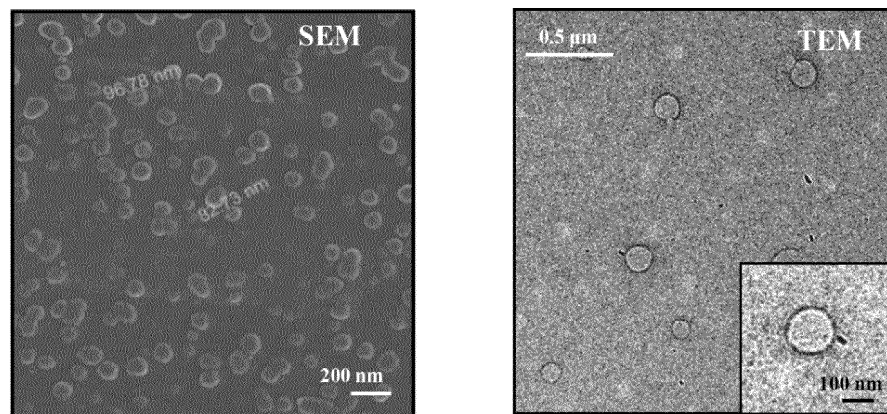


Fig. 8

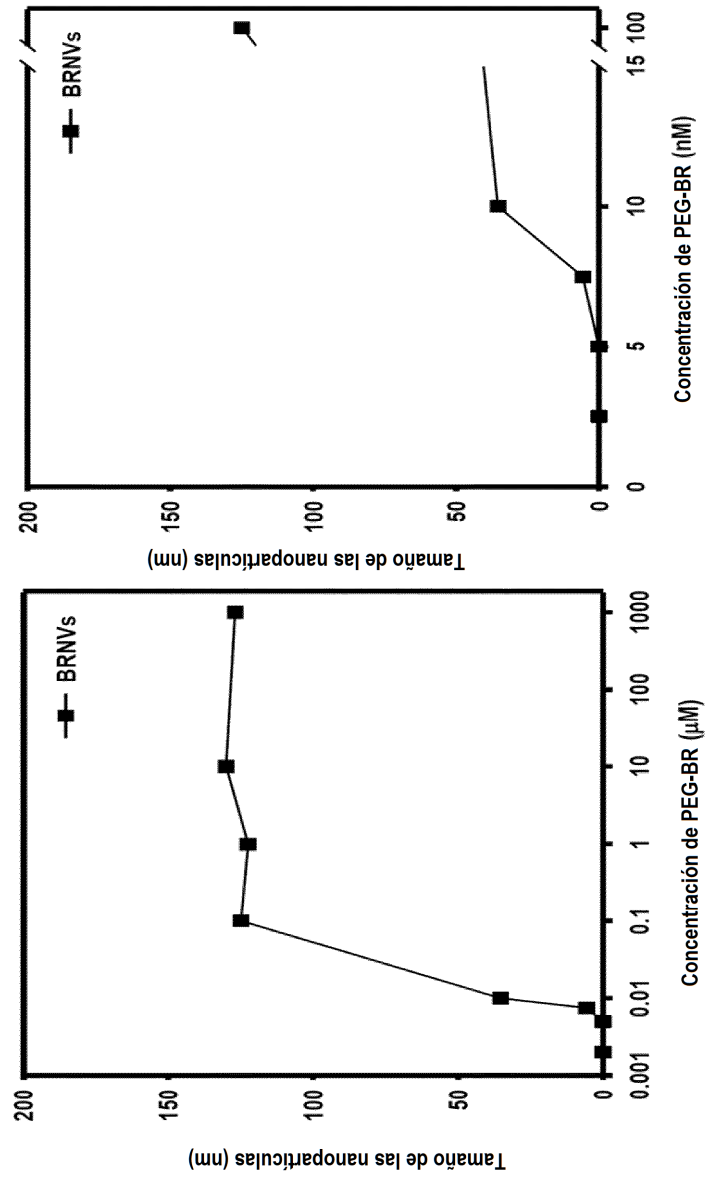


Fig. 9

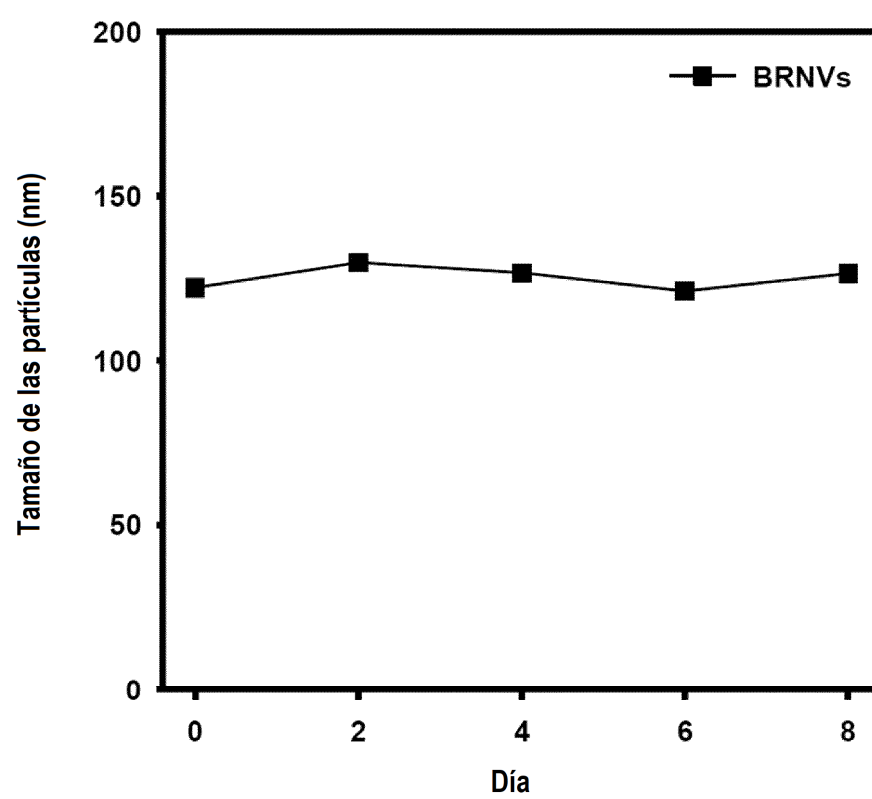


Fig. 10

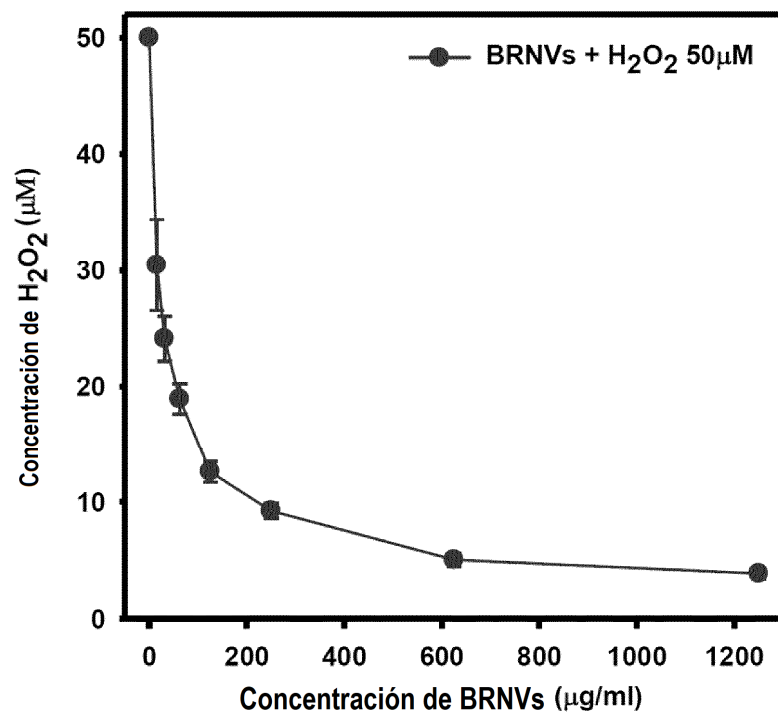


Fig. 11

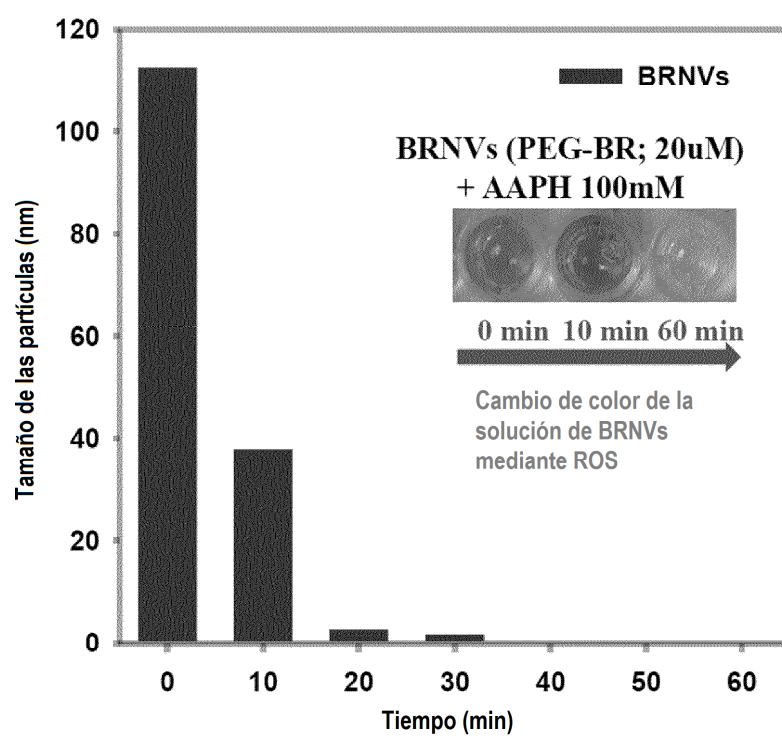


Fig. 12

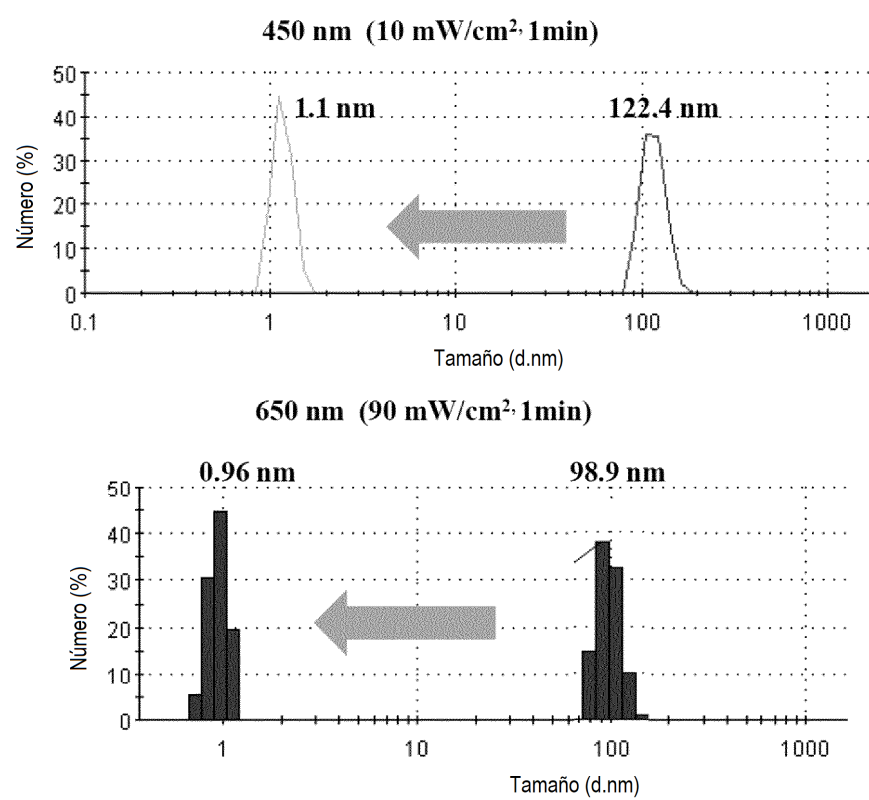


Fig. 13

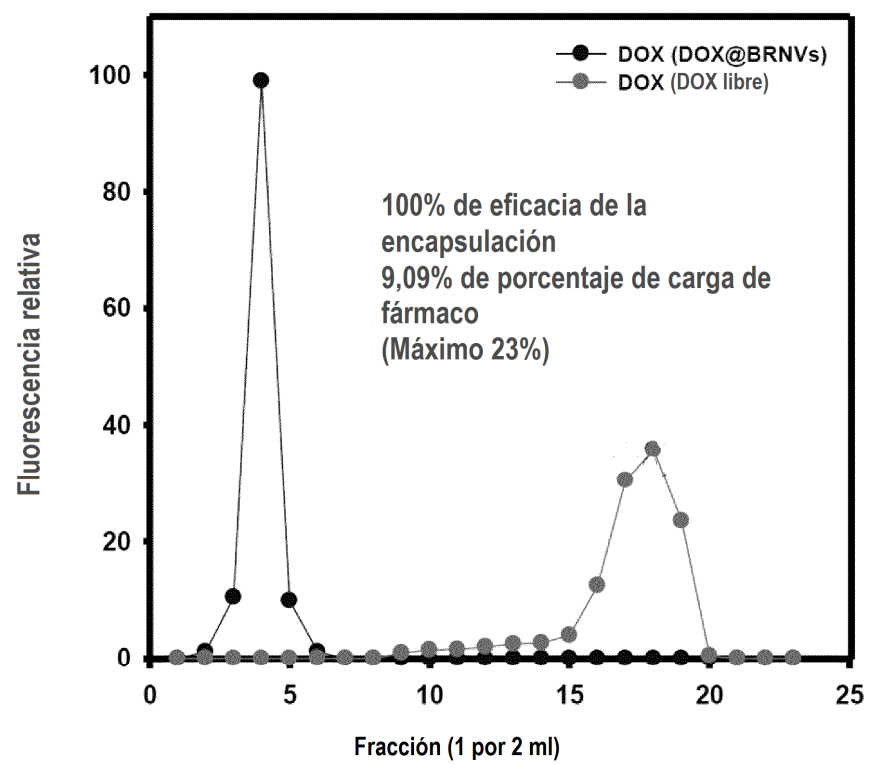


Fig. 14

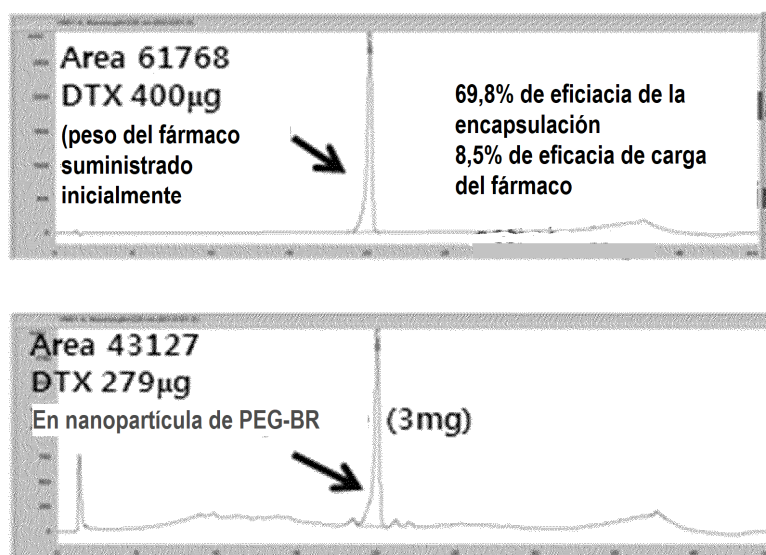


Fig. 15

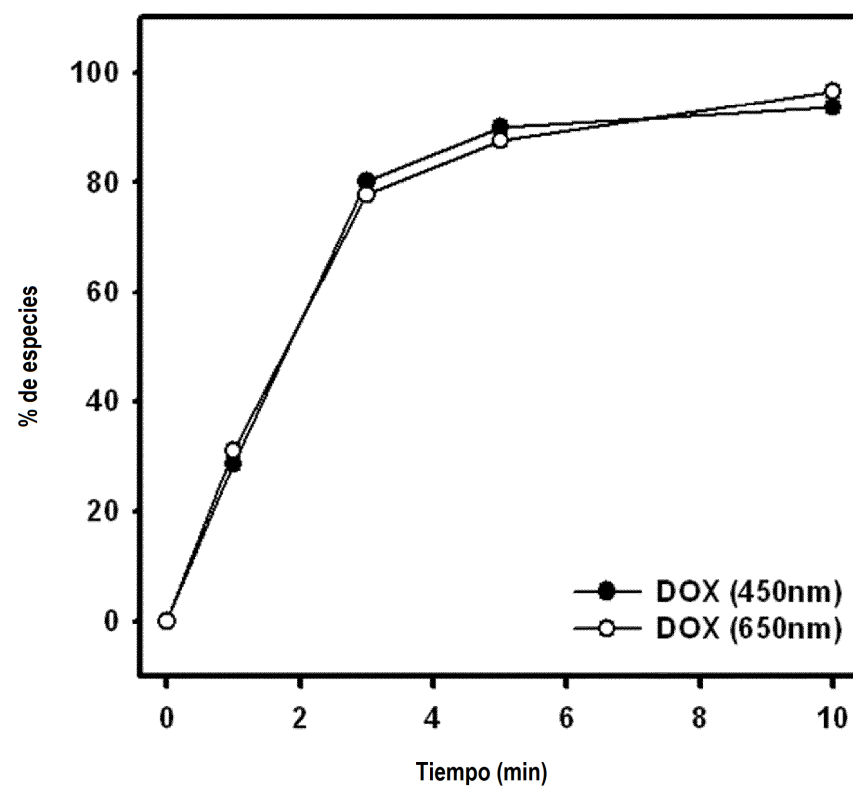


Fig. 16

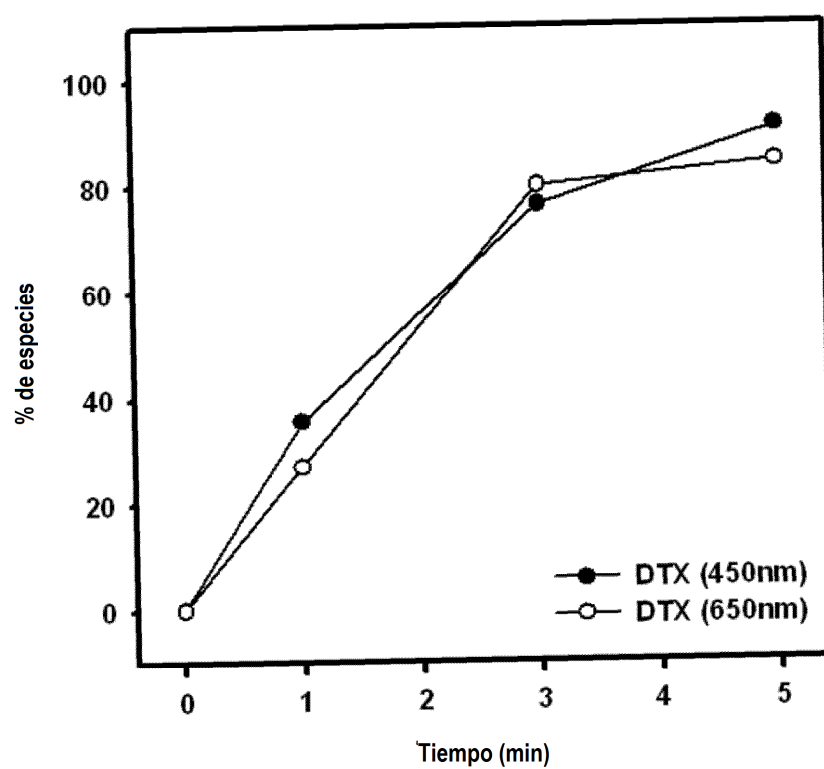


Fig. 17a

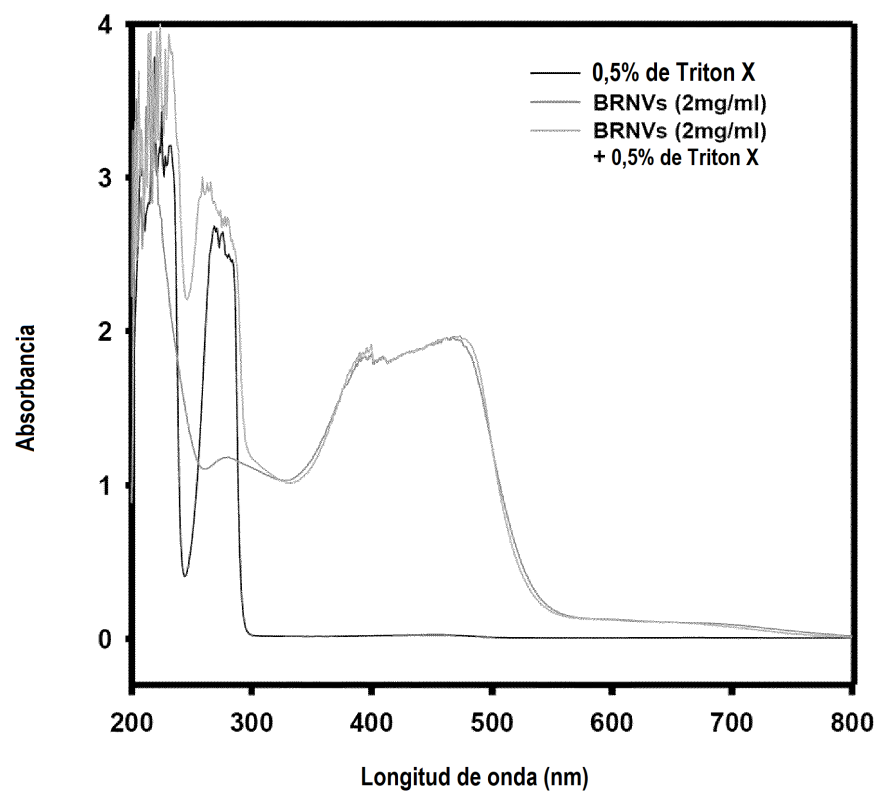


Fig. 17b

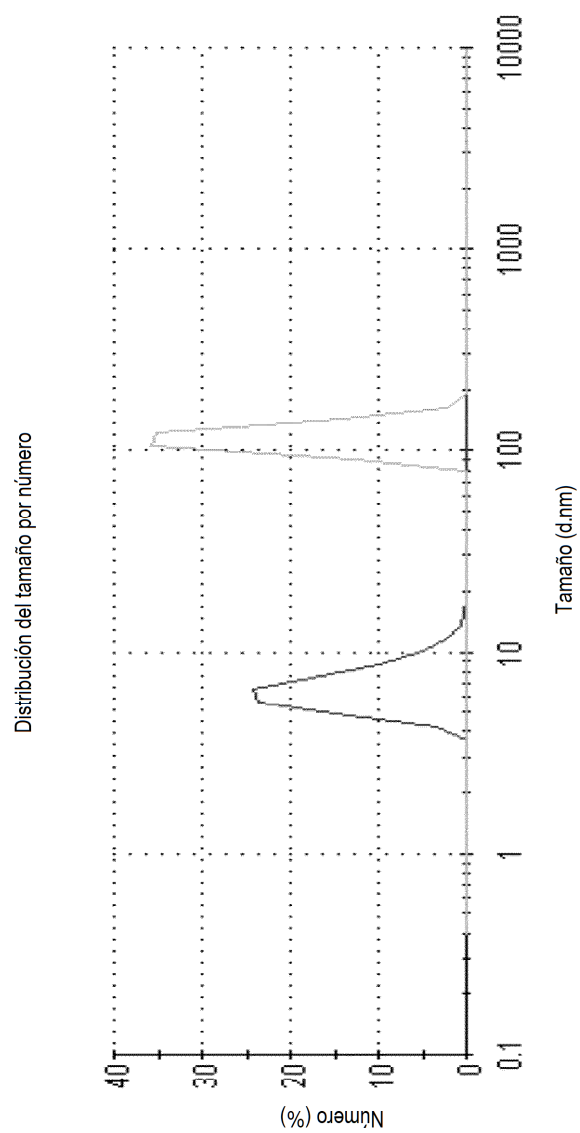


Fig. 17c

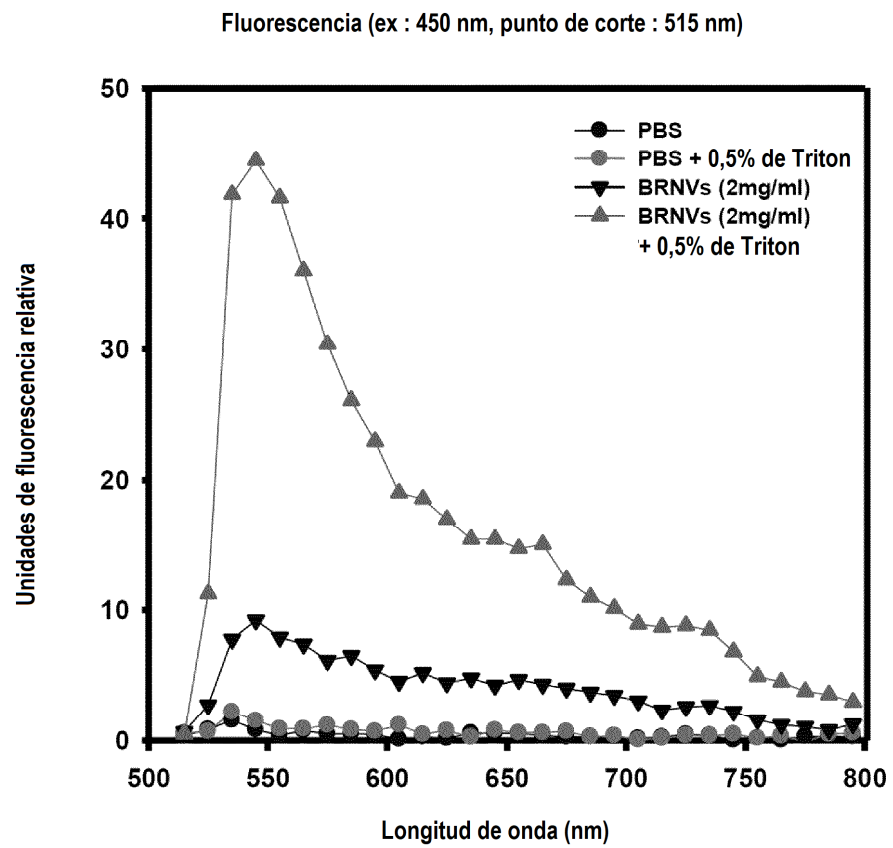


Fig. 17d

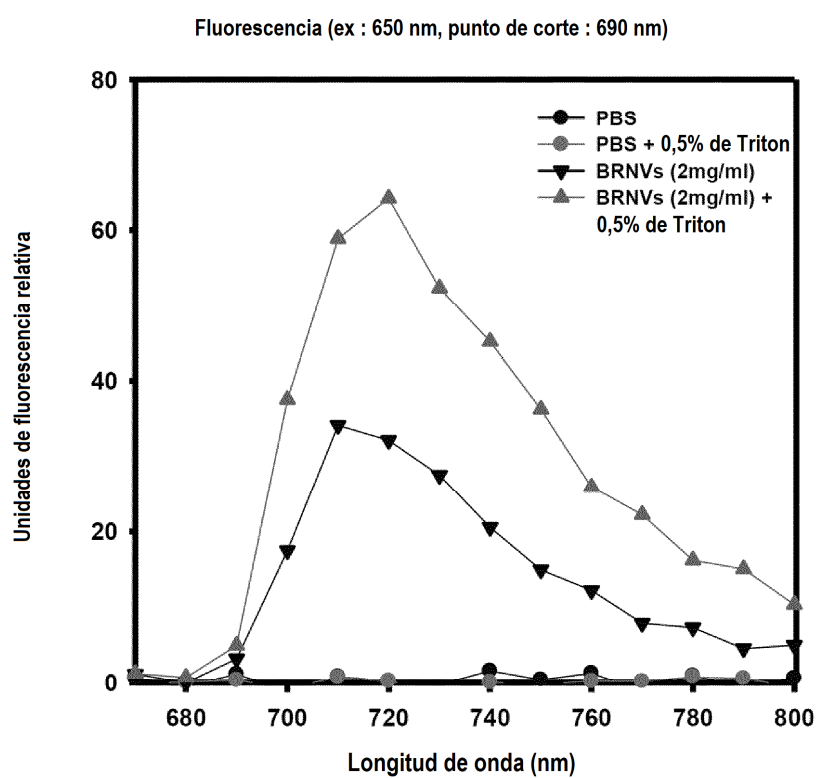
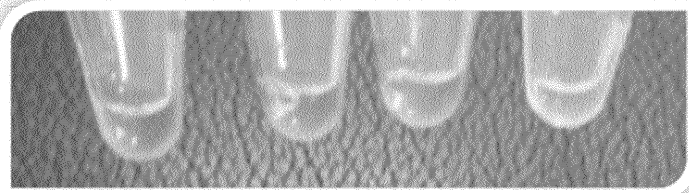


Fig. 18

láser a 450 nm ($200\text{mW}/\text{cm}^2$, 10Hz)



0min

1min

5min

10min

Fig. 19

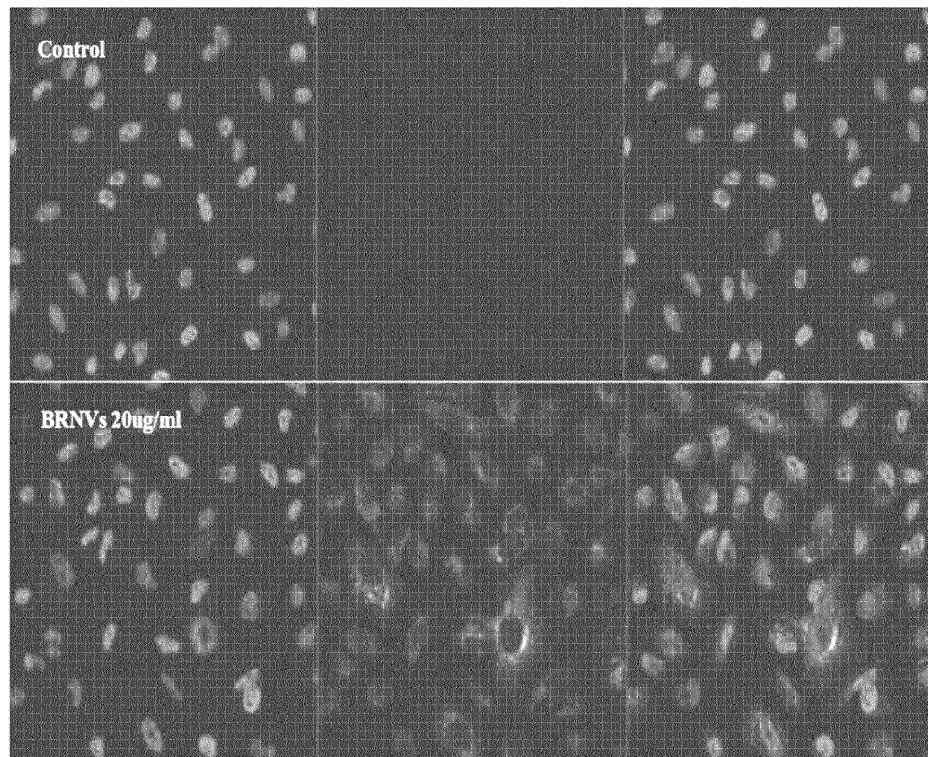


Fig. 20

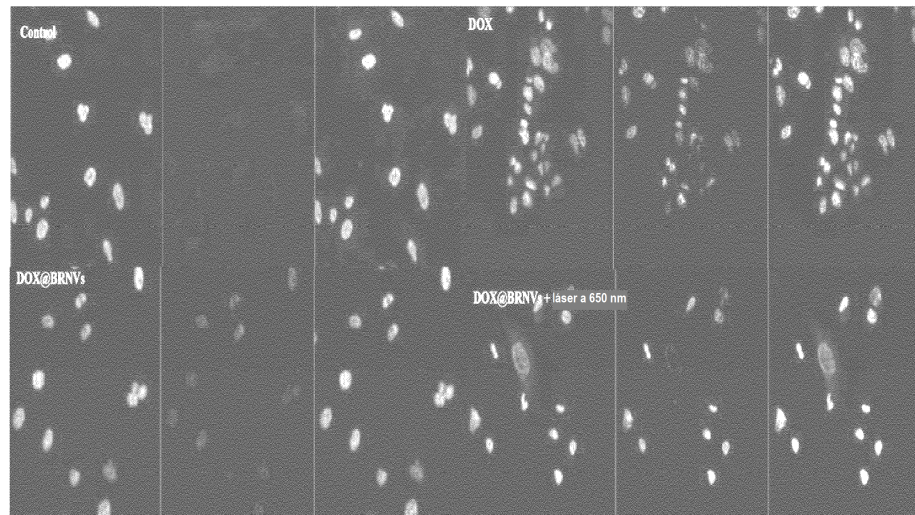


Fig. 21

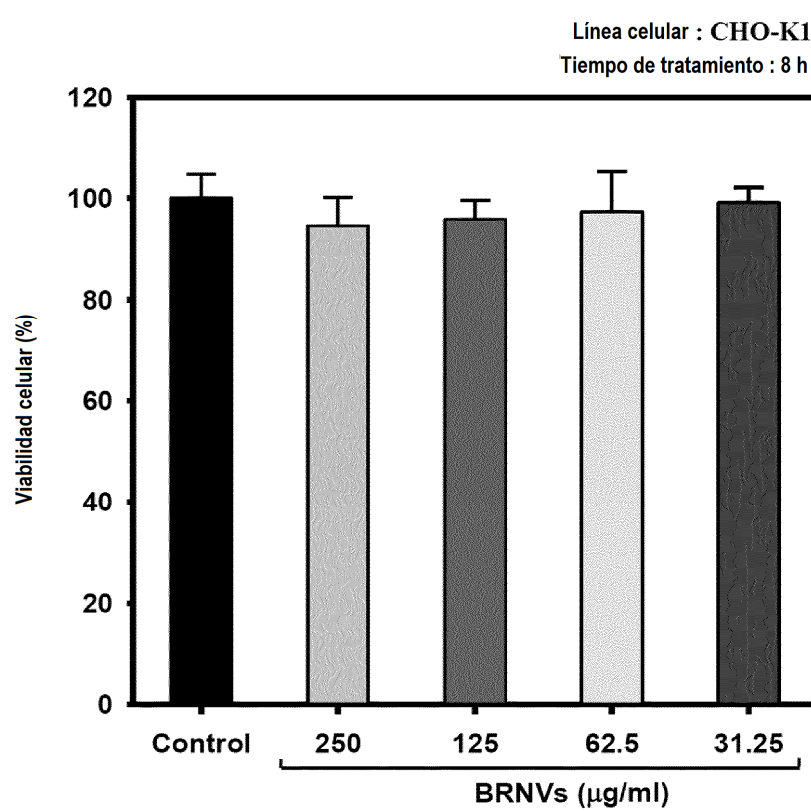


Fig. 22

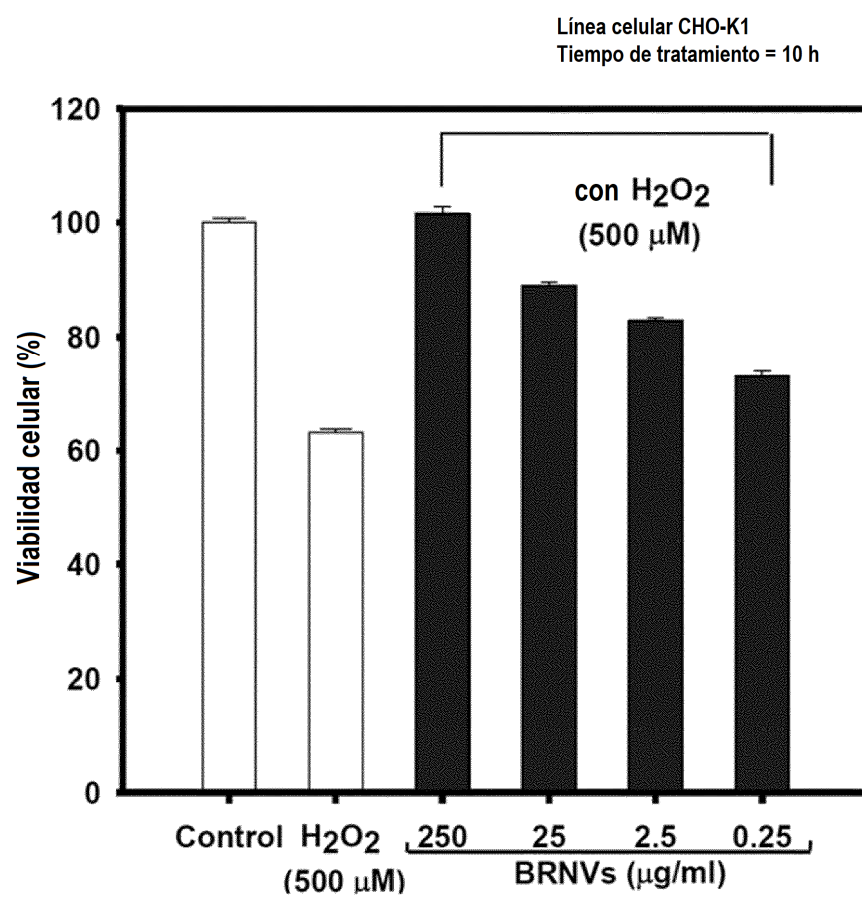


Fig. 23

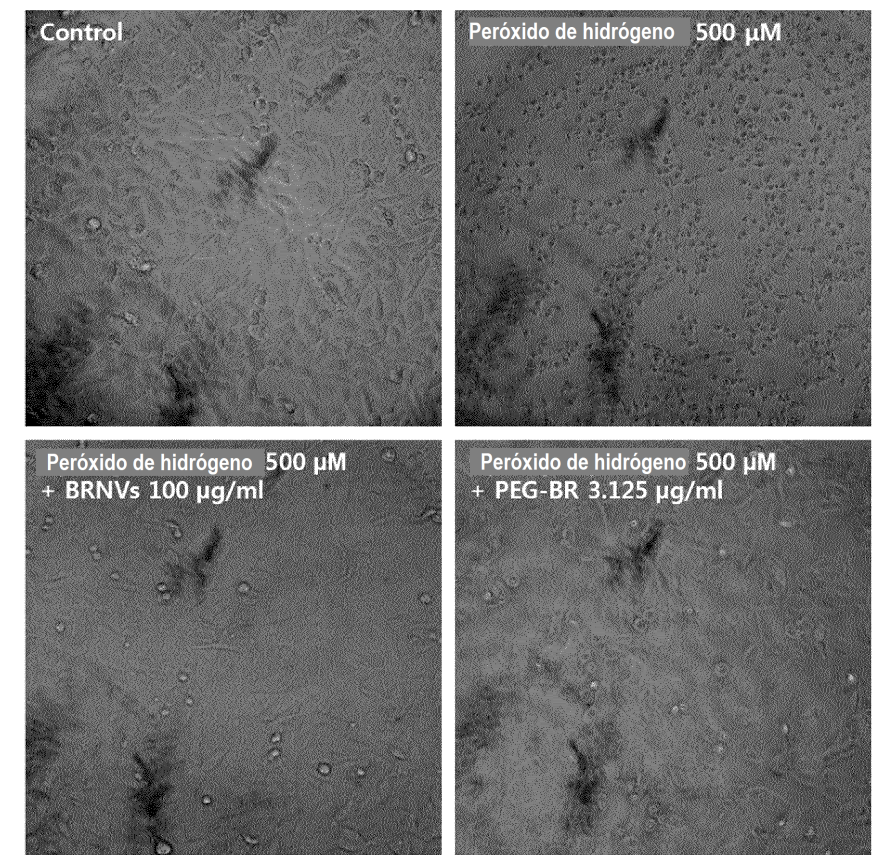


Fig. 24

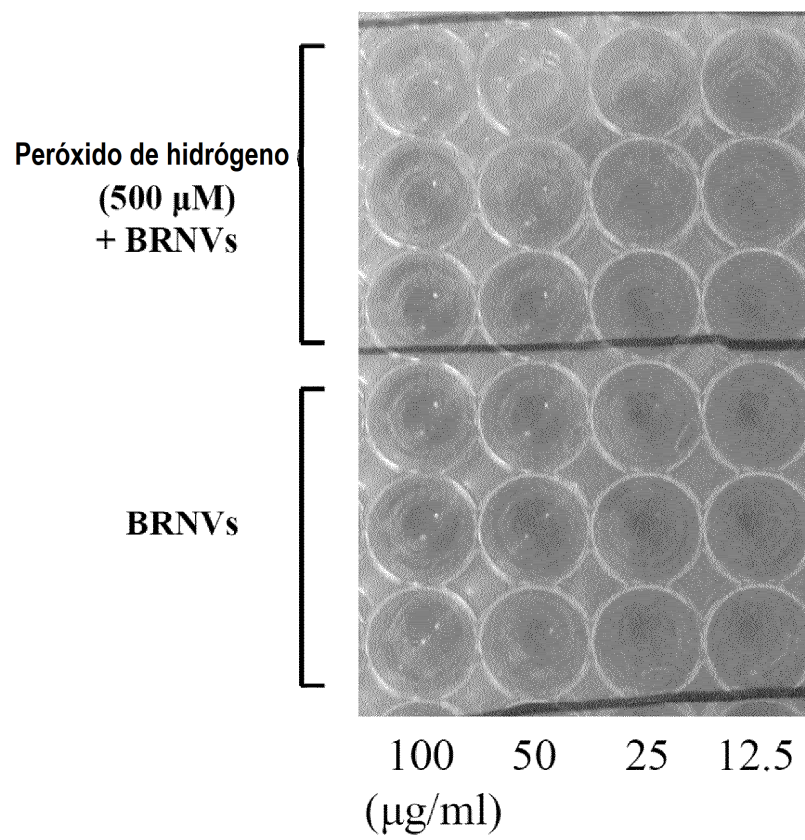


Fig. 25a

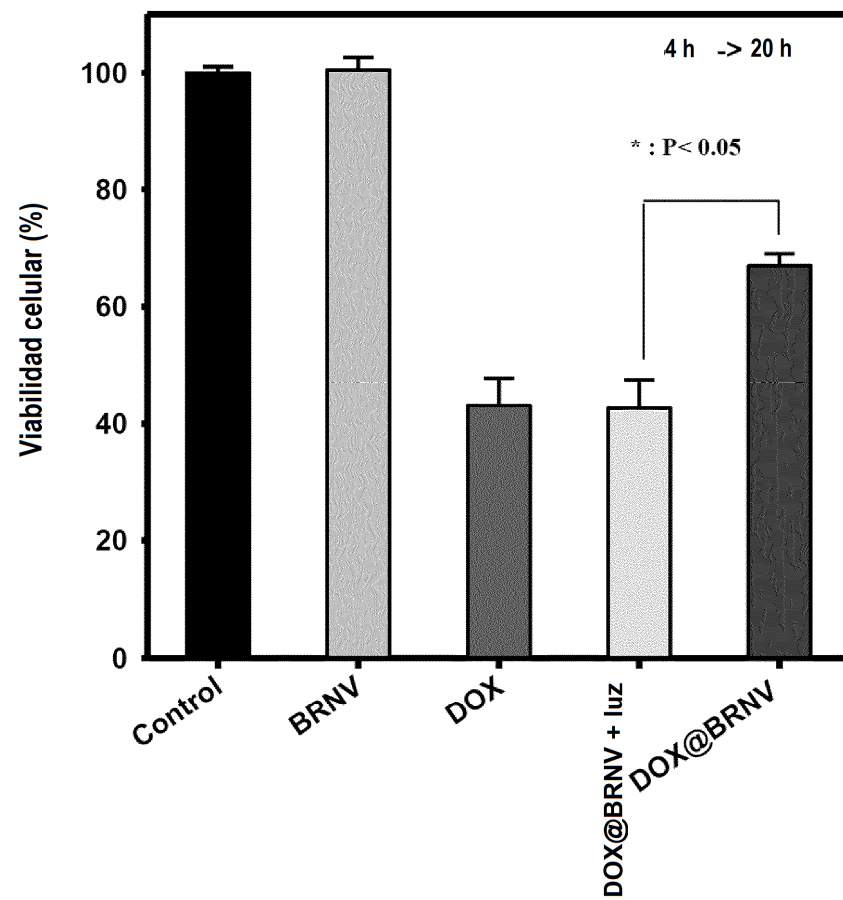


Fig. 25b

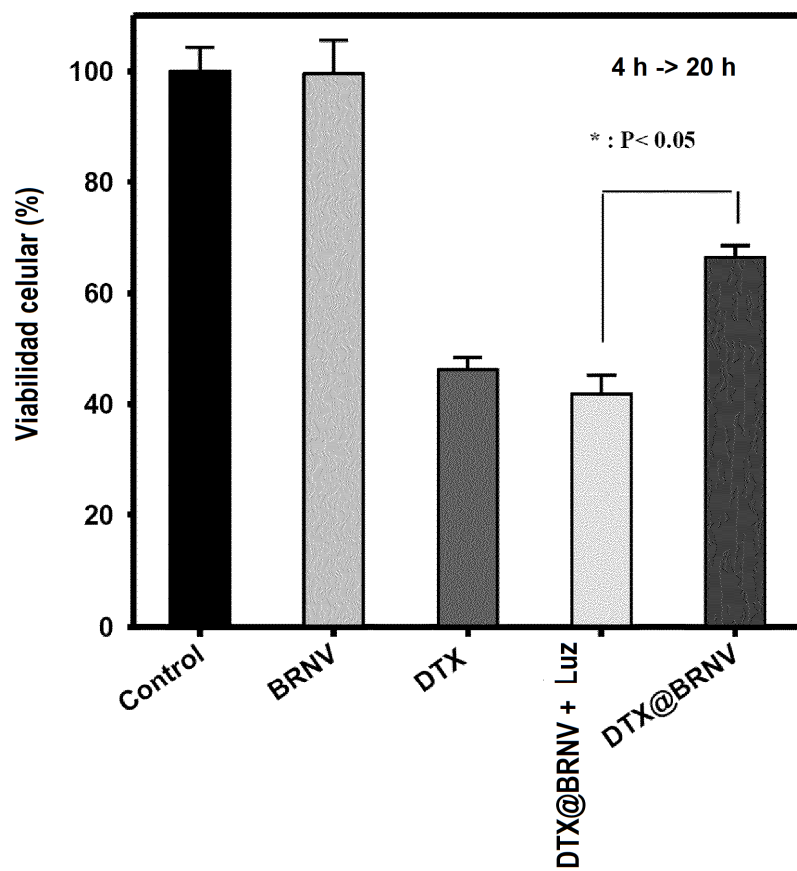


Fig. 26

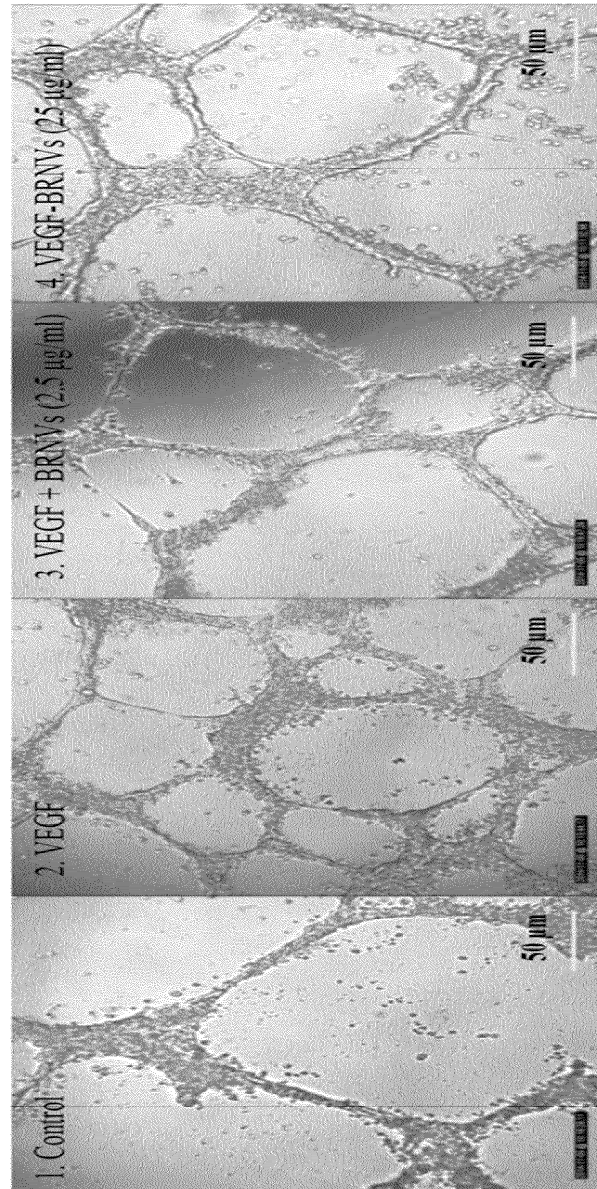


Fig. 27

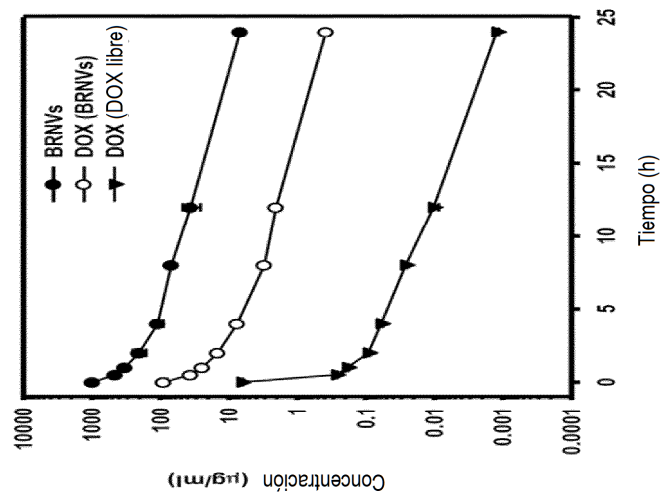
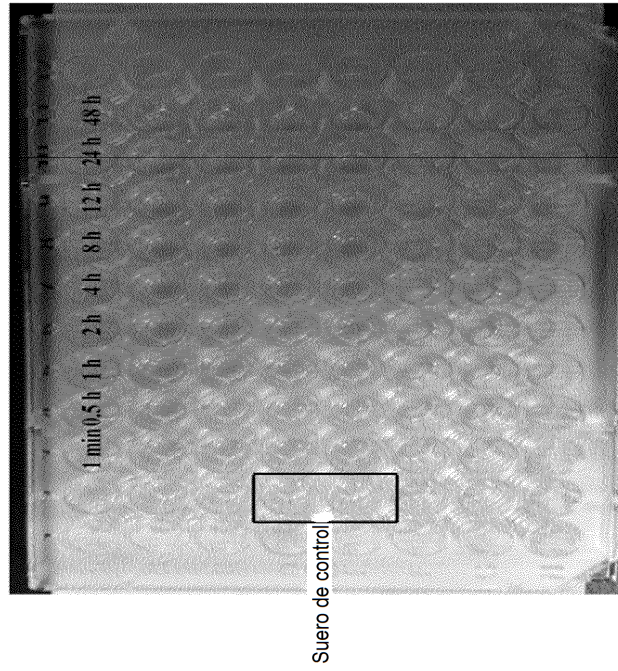


Fig. 28

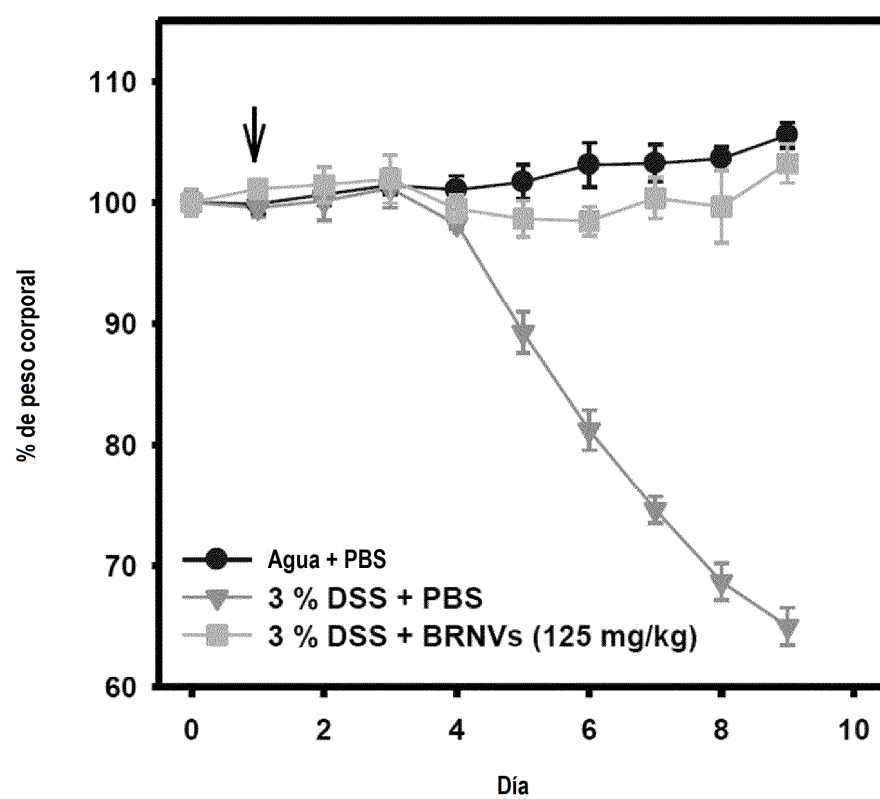
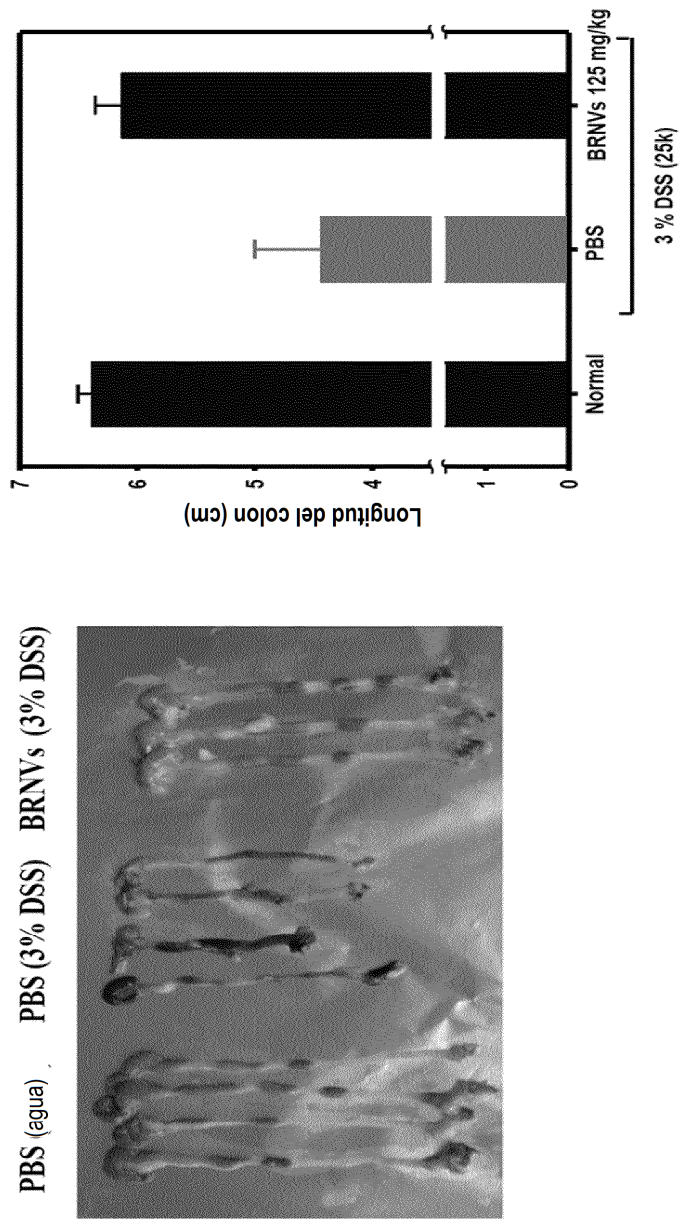


Fig. 29



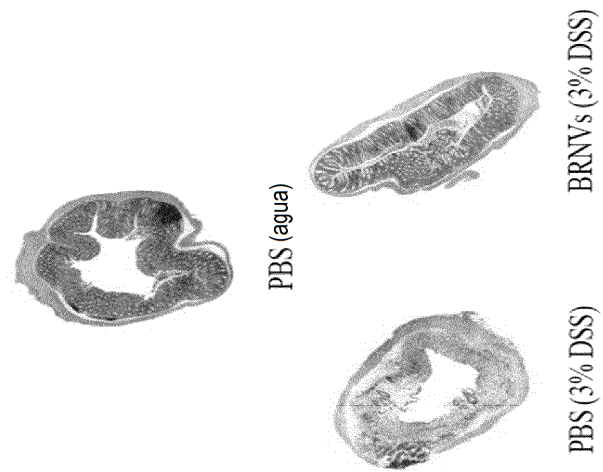


Fig. 30

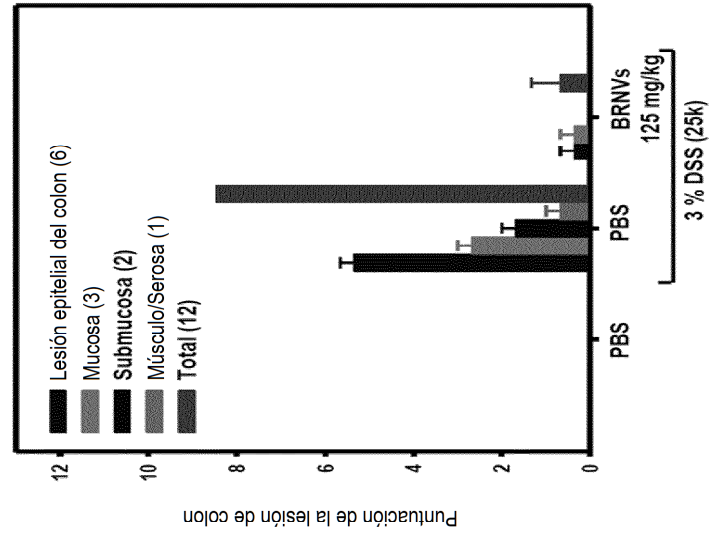


Fig. 31a

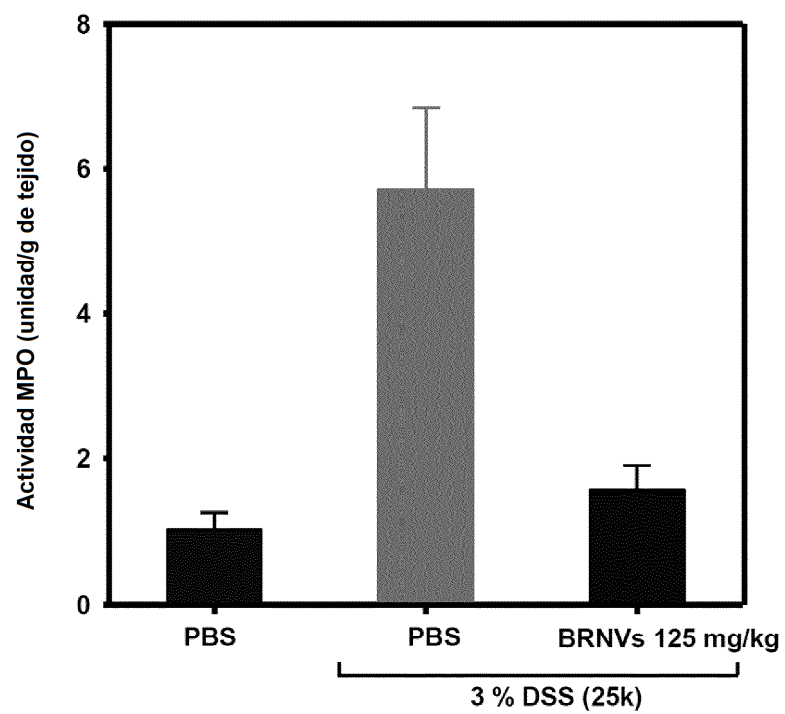


Fig. 31b

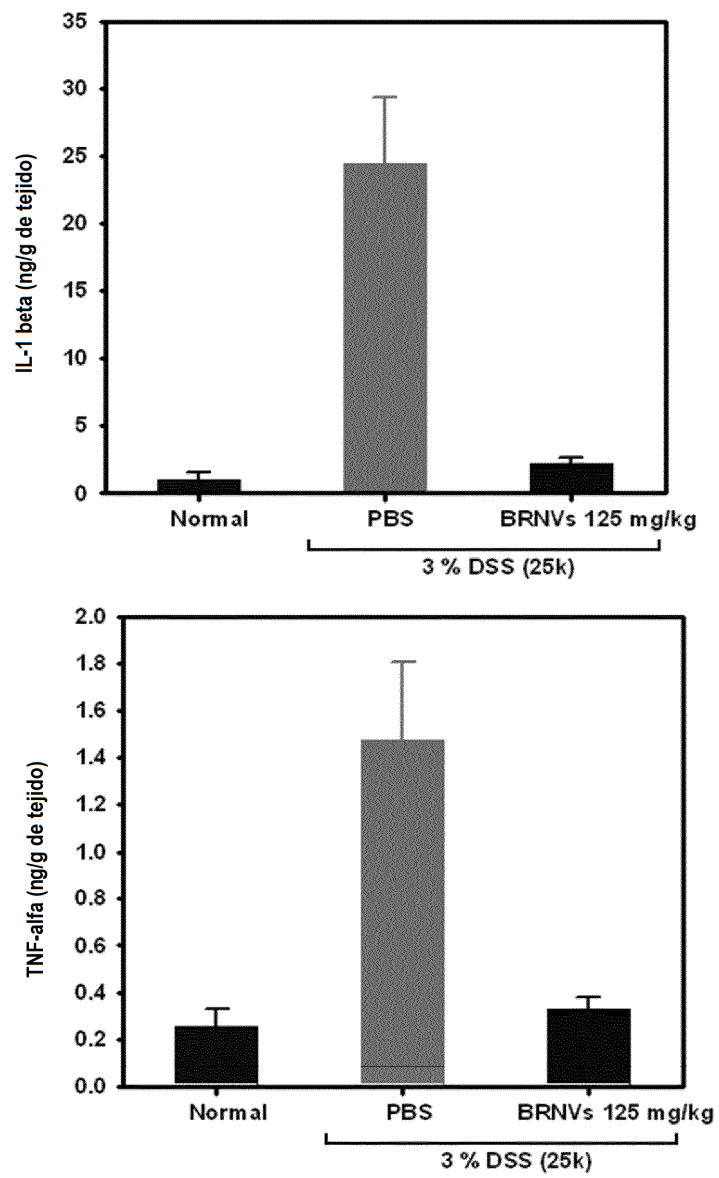


Fig. 31c

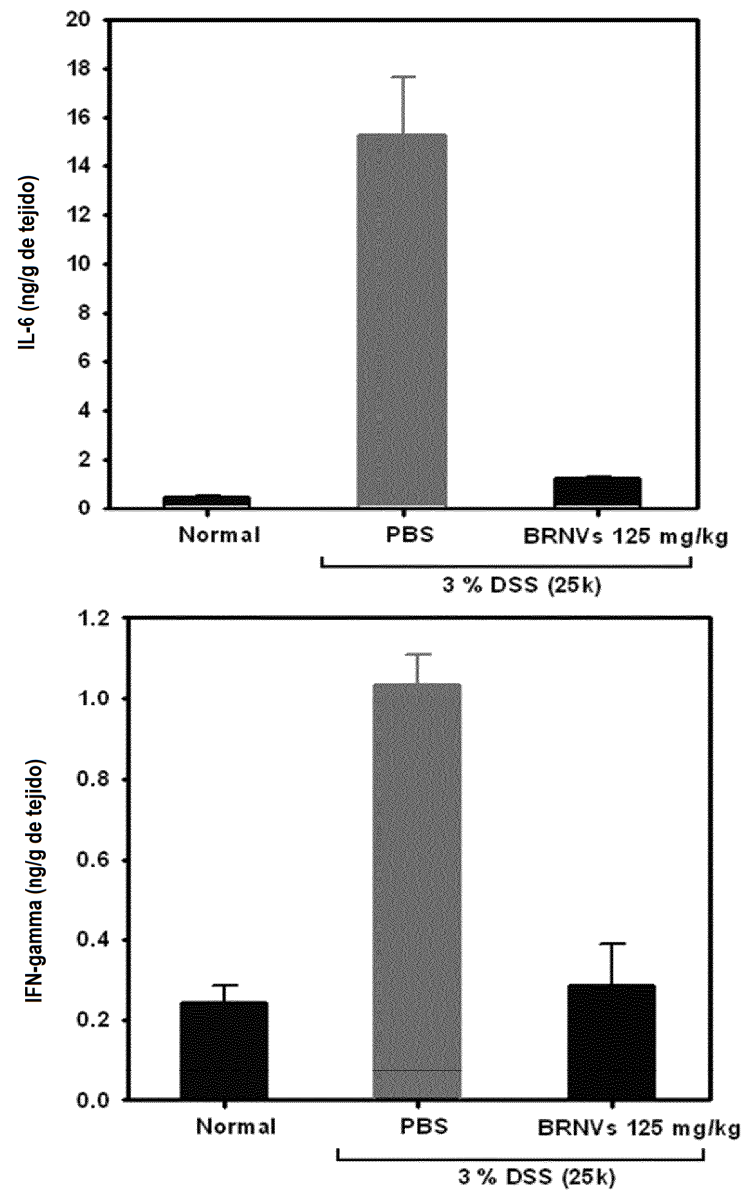


Fig. 32a

A.

Grupo normal
(Agua)
- ICG 17 ug/340 µg BRNVs
(100 ul de agua)

Grupo modelo de IBD
(3% de DSS 5 días)
- ICG 17 ug/340 µg BRNVs
(100 ul de agua)

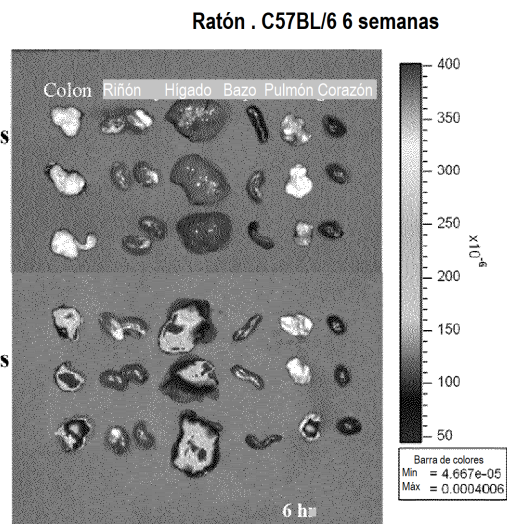
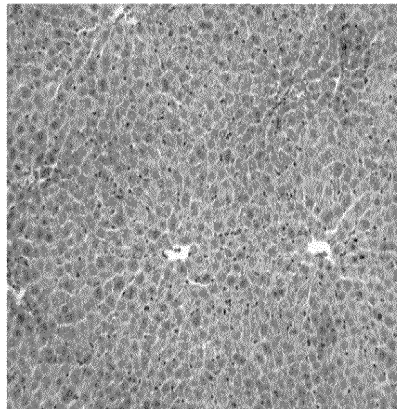


Fig. 32b

Grupo modelo de colitis



Grupo normal

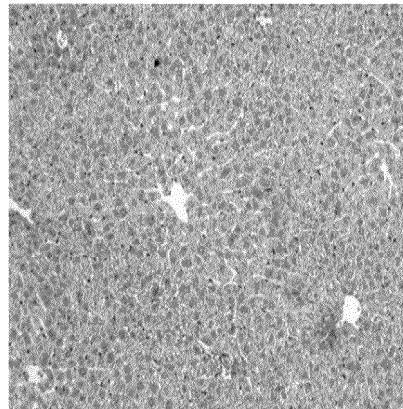


Fig. 33

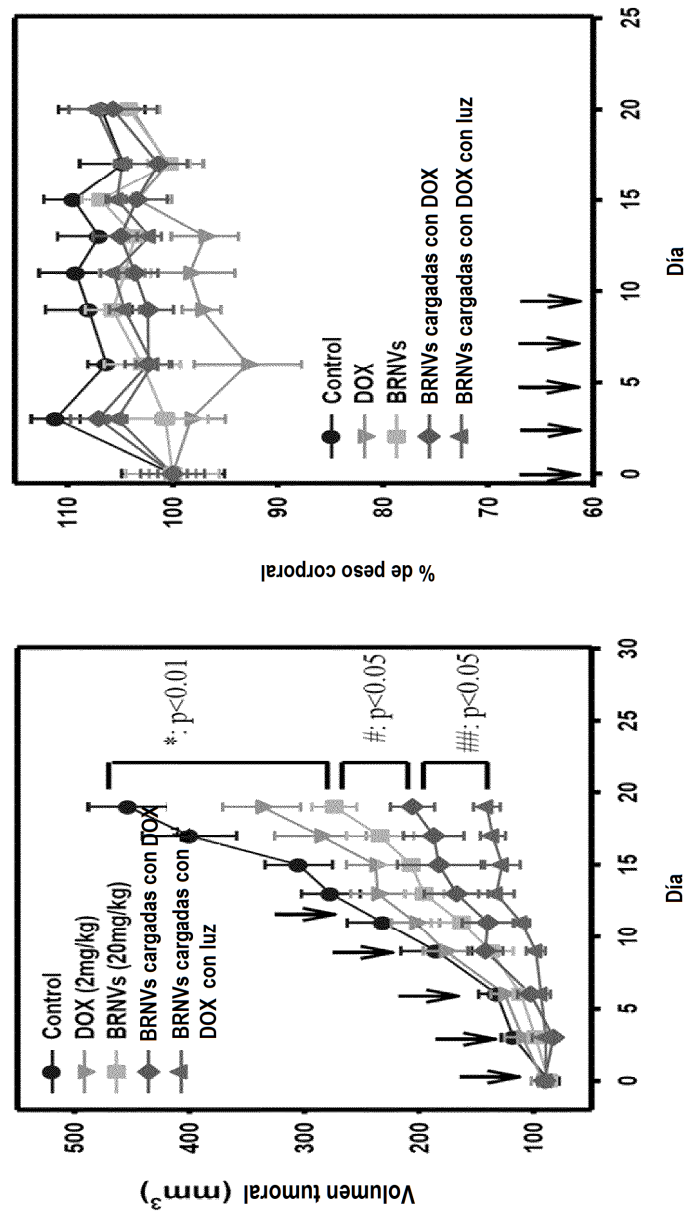


Fig. 34

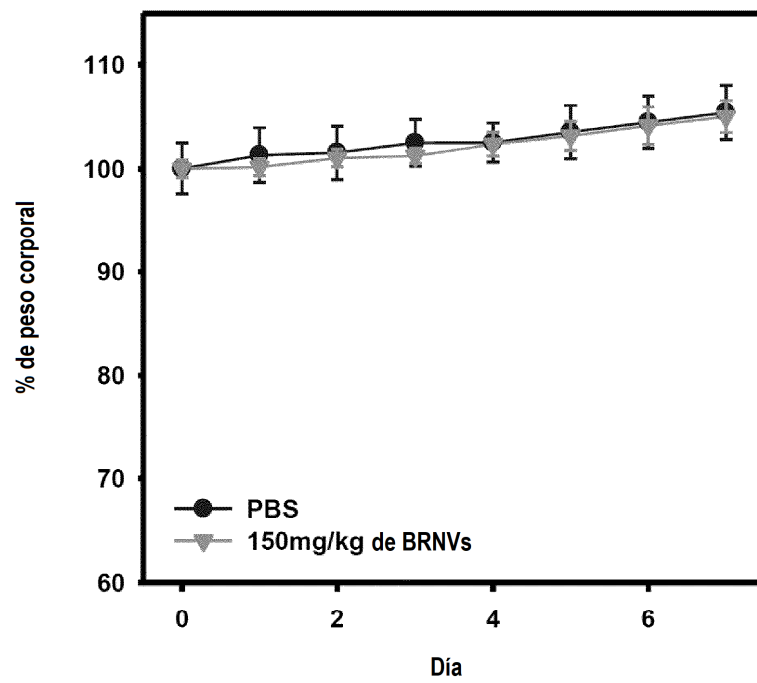


Fig. 35

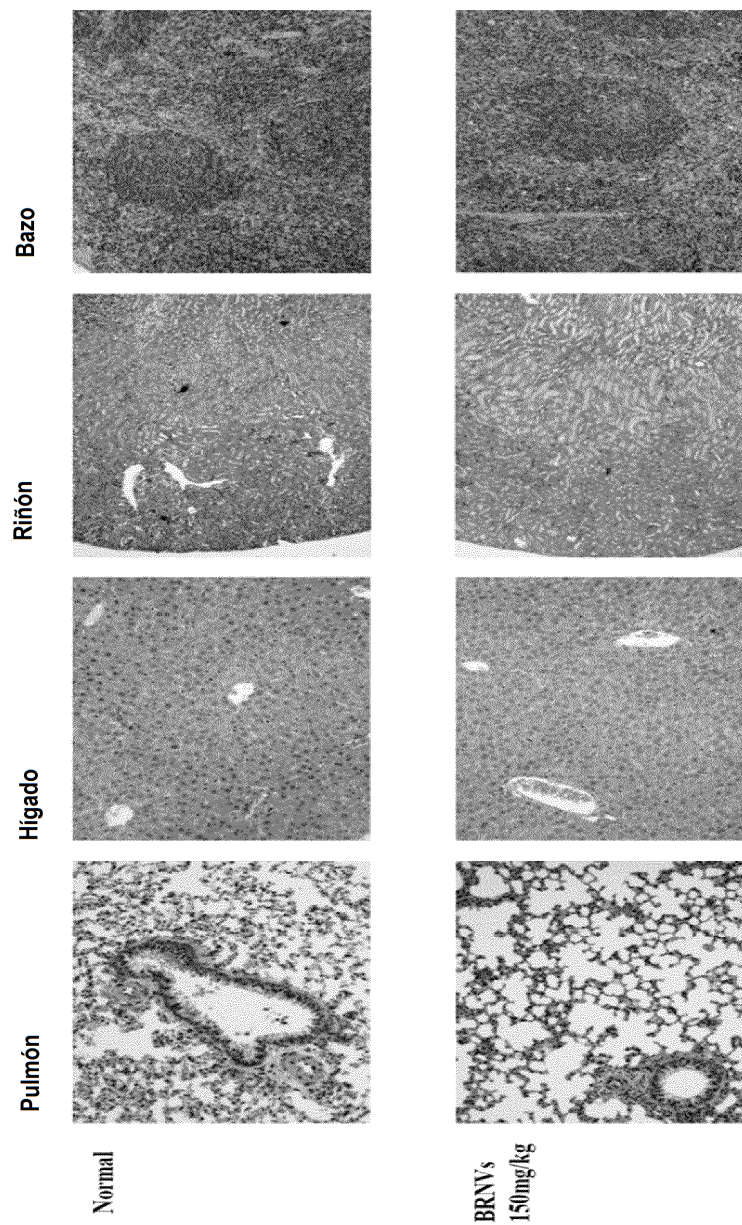


Fig. 36

