

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/075203 A1

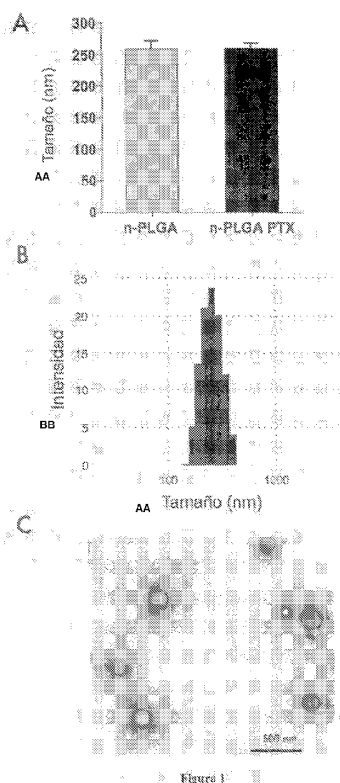
(43) Fecha de publicación internacional
22 de mayo de 2014 (22.05.2014) **WIPO | PCT**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 31/522 (2006.01) *A61K 47/34* (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01) *A61P 25/04* (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CL2013/000084
- (22) Fecha de presentación internacional:
15 de noviembre de 2013 (15.11.2013)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
3209-2012
16 de noviembre de 2012 (16.11.2012) CL
- (71) Solicitante: **UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE** [CL/CL]; Av. Libertador Bernardo O'Higgins 3363, Estacion Central, Santiago, 9170022 (CL).
- (72) Inventores: **CONSTANDIL CÓRDOVA, Luis Ernesto**; Avenida Suecia 1929, Providencia - Santiago (CL). **IBARRA DURÁN, Paula Soledad**; Pasaje Pillán 1573, La Florida - Santiago (CL). **VILOS ORTÍZ, Cristian Andrés**; Vicuña MacKenna 563, Depto. 2007, Santiago (CL). **VELÁSQUEZ CUMPLIDO, Luis**; Brabanzon 2717, Providencia - Santiago (CL). **PELISSIER SERRANO, Teresa**; Cerro Litoria 12038, Las Condes - Santiago (CL). **LAURIDO FUENZALIDA, Claudio Aurelio**; Uno Oriente 833, Casa 10, Lo Barnechea - Santiago (CL). **HERNÁNDEZ KUNSTMANN, Alejandro**; Domingom Faustino Sarmiento, 180, Nuñoa - Santiago (CL).
- (74) Mandatario: **MOLINA VILLASECA, Eduardo**; Estudio Federico Villaseca y Cia., Av. Alonso de Cordova 5151, Piso 8, Las Condes, 7560873 Santiago (CL).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: NANOPARTICLES WITH BIODEGRADABLE AND BIOCOMPATIBLE POLYMER PLGA, LOADED WITH THE DRUG FOR HUMAN USE PENTOXIFYLLINE

(54) Título : NANOPARTÍCULAS CON POLÍMERO BIODEGRADABLE Y BIOCOMPATIBLE PLGA CARGADAS CON EL FÁRMACO DE USO HUMANO PENTOXIFILINA



(57) Abstract: The invention relates to a novel pharmaceutical formulation comprising polymer nanoparticles of the biodegradable and biocompatible polymer poly (lactic-glycolic acid) (PLGA), loaded with the drug pentoxifylline, the method for the synthesis of the PLGA nanoparticles loaded with pentoxifylline, and to the use thereof in the effective treatment for the relief of chronic pain and for the prevention of chronic pain via the administration of a single dose.

(57) Resumen: La presente invención describe una nueva formulación farmacéutica, que comprende nanopartículas poliméricas del polímero biodegradable y biocompatible ácido (láctico glicólico) (PLGA) cargados con la droga pentoxifilina el método de síntesis de las nanopartículas de (PLGA) cargadas con pentoxifilina y el uso de ellas en el tratamiento efectivo del alivio del dolor crónico y para la prevención del dolor crónico mediante la administración de una dosis única.

WO 2014/075203 A1



(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

NANOPARTÍCULAS CON POLÍMERO BIODEGRADABLE Y BIOCOMPATIBLE PLGA CARGADAS CON EL FÁRMACO DE USO HUMANO PENTOXIFILINA.

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con la industria farmacéutica y de nanotecnología, en particular con la utilización del polímero biodegradable y biocompatible ácido poli (láctico - glicólico) (PLGA por sus siglas en inglés "poly (lactic-glycolic) acid") y la droga pentoxifilina para generar una nueva forma farmacéutica (nanopartícula-fármaco) que permite la reducción a una sola dosis para obtener un tratamiento efectivo del dolor crónico y para prevenir la aparición del dolor crónico.

10 Antecedentes de la invención

El "dolor" o nocicepción (denominada así por la palabra en latín "nocere" que significa daño) es una sensación desagradable experimentada cuando los tejidos sufren una lesión. Es así como la sensación de dolor protege al cuerpo ante una amenaza inminente o potenciales lesiones. Para muchos, el "dolor" o experiencia nociceptiva ha sido temporal (o aguda). Sin embargo, para otros esta experiencia no tiene fin, transformándose en un dolor crónico (o patológico).

Según la Asociación Internacional para el Estudio de Dolor (IASP, por sus siglas en inglés "International Association for the Study of Pain"), el dolor agudo es aquel que permanece el tiempo necesario para que los tejidos dañados se recuperen. Este tipo de dolor se describe como un dolor intenso, punzante, eléctrico y que desaparece cuando el daño a los tejidos ha sido reparado. Sin embargo en algunas ocasiones el dolor puede perdurar en el tiempo, transformándose en un dolor de tipo crónico (Pasile y Bilbeny, 2005). Desde el punto de vista farmacológico y de tratamiento, existen diversos fármacos, como los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) (ibuprofeno, naproxeno) u opioides (demerol, tramadol, oxycodona, etc.) para mitigar el dolor agudo con buena eficacia. Sin embargo en el dolor crónico, como el que se presenta en algunos cánceres, neuralgias, neuropatías y artritis, su efectividad es limitada (Mantyh

y col., 2002; Coutaux y col, 2005). Por lo tanto, no existe un tratamiento farmacológico eficaz para el dolor crónico, afectando la calidad de vida de las personas y su entorno familiar. En la actualidad representa un problema de salud pública con una prevalencia cercana al 20% de la población.

- 5 Diversos fármacos han sido probados en investigaciones pre-clínicas para aliviar el dolor crónico, pero en general han mostrado un pobre efecto (Chou R y col, 2007). Una de las características del dolor crónico es su mantención en el tiempo, por lo tanto resulta terapéuticamente prometedor utilizar técnicas que permitan administrar los analgésicos en forma continua. Una aproximación al problema es utilizar sistemas
- 10 farmacológicos de liberación lenta, con el fin de liberar localizadamente pequeñas cantidades de fármacos (analgésicos conocidos) en forma prolongada en el tiempo y de esa forma prevenir y/o revertir los dolores crónicos.

Dolor y nocicepción: conceptos básicos

- El dolor es iniciado por lo general en la periferia, principalmente por la estimulación de
- 15 las terminales nerviosas libres. Estas terminaciones nerviosas libres son estimuladas directamente por estímulos nociceptivos, como la capsaicina (sustancia que da el picor al ají), ATP, protones y proteasas (liberadas cuando las células son lesionadas). Además las terminaciones libres pueden ser activadas por mediadores de la inflamación, como la histamina, bradicinina, óxido nítrico y citoquinas (Livingston A,
- 20 1999; Lipton y col., 1994). Cuando las terminaciones libres son activadas por los estímulos antes mencionados, liberan neuropéptidos como sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP por sus siglas en inglés "calcitonin gene related peptide") (Chizh BA, 2002), los cuales actúan sobre las mismas terminaciones libres o sobre aquellas más lejanas y que no fueron activadas
- 25 inicialmente. Este fenómeno en donde el sistema nervioso participa en los procesos de inflamación se conoce como inflamación neurogénica (Richardson y Vasko, 2002).
- Cualquiera sea la forma de estimulación de las terminales nerviosas nociceptivas,

éstas generan una despolarización de la membrana y un potencial de acción que conduce la información nociceptiva hacia la médula espinal. El soma de esta primera neurona de la vía nociceptiva, se ubica en el ganglio dorsal espinal y su axón se divide en forma de T, dirigiendo una rama hacia la superficie del cuerpo y la otra hacia la médula espinal. Los axones que conducen la información de tipo nociceptiva se clasifican en fibras A β y fibras C. Las fibras A β se caracterizan por estar mielinizadas y conducen el impulso entre 4 a 30 metros por segundo, mientras que las fibras C son amielínicas y conducen la información entre 0,4 a 2 metros por segundo. La prolongación del axón de la neurona nociceptiva que se dirige hacia el asta posterior de la médula espinal, hace sinapsis con una neurona de segundo orden de la vía del dolor, que proyecta su axón hacia los centros superiores donde se produce la evaluación e interpretación de la información nociceptiva. Las cortezas sensorial, insular y prefrontal participan en la percepción y median las respuestas emocionales, reflejas somáticas, reflejas autonómicas, endocrinas, de aprendizaje y memoria (Codere y col, 1993; Scholtz y Woolf, 2002).

La transferencia sináptica de la información nociceptiva a nivel espinal, se realiza gracias a la liberación de mediadores excitatorios como glutamato, SP, CGRP, óxido nítrico, y neurotrofinas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en inglés, "brain derived neurotrophic factor"). La mayoría de estos neurotransmisores/neuromoduladores liberados por los nociceptores presentan acciones excitatorias en las neuronas de segundo orden de la médula espinal, a través de la apertura de canales permeables a cationes y/o a través de cascadas de señales intracelulares gatilladas por la activación de la fosfolipasa C y adenilciclase o por la activación de receptores tipo tirosina quinasa. La médula espinal es el primer punto de relevo de la información nociceptiva y de modulación endógena, lo cual implica que la médula espinal califica como un importante punto de modificación farmacológica.

Dolor crónico y sensibilización central

Cuando una sensación nociceptiva se prolonga en el tiempo y se excede en el tiempo de reparación del tejido, el dolor comienza a ser patológico o crónico. Cuando un dolor se transforma en crónico, se caracteriza porque existe un aumento de la excitabilidad de las neuronas de la vía nociceptiva (espinales y supraespinales), respecto a un estímulo nociceptivo. Esta respuesta exagerada se reconoce en estudios conductuales como alodinia (respuesta dolorosa o de aversión causada por un estímulo no nociceptivo) e hiperalgesia (respuesta dolorosa o de aversión exagerada causada por una estímulo nociceptivo). La alteración en la percepción dolorosa de estímulos se correlaciona con cambios o alteraciones plásticas en el sustrato neural relacionado con las vías nociceptivas, las que en su conjunto se conocen como sensibilización central. (Haydon P, 2001). Entre las alteraciones que se producen en el dolor crónico se han descrito:

1. Un incremento en la liberación de glutamato que se une a los receptores de N-metil D-aspartato (NMDAR) y a los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), lo cual produce cambios en la expresión de oncogenes (como por ejemplo: src, abi), síntesis de proteínas (GluR1-5, NK, NR1, NR2A-B, entre otros), activación enzimática (proteínquinasas y ciclooxigenasa (COX), entre otros); permitiendo una facilitación neuronal (Góicoachea y Martín, 2008).
2. Un aumento en la expresión de COX y óxido nítrico en la neurona post-sináptica. Ambas sustancias son capaces de difundir hacia la neurona pre-sináptica, donde NO estimula la liberación de SP, mientras que COX favorece la síntesis de prostaglandina E (PGE) (Turk y Okifuji, 2001).
3. Fosforilación de proteínas como receptores-canales iónicos, o asociados a proteínas reguladoras, alterando las propiedades intrínsecas funcionales o de la expresión en la superficie celular de los canales, tanto en neuronas sensoriales primarias como en neuronas del asta dorsal. A nivel intracelular se ven afectadas las

cascadas de señalización implicadas en las interacciones de serina-treonina y tirosina quinasa (Woolf y Salter, 2000).

4. Cambios a nivel de las neuronas del asta dorsal, mediado por la activación de la cascada de MAPK-pCREB (por sus siglas en inglés "mitogen-activated protein kinases – cAMP response element binding protein"). Estos incluyen: cambios en los receptores (neuroquinina 1 (NK1), TrkB (por sus siglas en inglés "tyrosine-related kinase B"), receptor de ácido gamma aminobutírico (GABA)), cambios en neurotransmisores (dinorfina, encefalina, GABA) (Nogushi y col, 1992).
5. Una reorganización de la estructura neuronal, traducido en la aparición de ramificaciones colaterales axónicas que aumentan la superficie o campo nociceptivo aferente, aumentando a su vez la liberación de glutamato al espacio sináptico. (Terman y Bonica, 2001).
6. La pérdida de eficacia de la inhibición producida por las vías descendentes, con una disminución de la liberación de opioides endógenos, e incluso degeneración celular de las neuronas descendentes, lo que de forma indirecta aumenta también la frecuencia de la señal que se envía a los centros superiores (Doubell y col, 2003).
7. Activación de la glía, tanto microglia como astrocitos se encuentran activados observados en: un reclutamiento de microglia y astrocito a nivel del asta dorsal, un aumento a nivel celular en la expresión y liberación de citoquinas proinflamatorias (interleucina 1(IL1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)), aumento en el número de receptores en la superficie de la célula (receptores para citoquinas, NMDAR, APMPAR (por sus siglas en inglés " α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor"), mGluR, entre otros), desregulación en la recaptación de glutamato por parte del astrocito (mediada por glutamato sintasa 1 (GLU1) y el transportador de glutamato-aspartato (GLAST por sus siglas en inglés "glutamate aspartate transporter")) y un aumento en la proliferación celular de microglia y astrocitos (Watkins y col, 2001).

Las alteraciones en los circuitos neuronales y moleculares son responsables en gran medida del porqué fármacos que clásicamente inhiben el dolor agudo tienen una reducida eficacia en el tratamiento del dolor crónico (Paele y Bilbeny, 2005).

Rol de la glía en el dolor crónico

- 5 En la última década, numerosas investigaciones han puesto en evidencia que la noción clásica que "el dolor es producido y mantenido sólo por neuronas" es una noción errada, ya que las células de la glía en la médula espinal (astrocitos y microglía) tendrían un rol crucial en el desarrollo y persistencia del dolor crónico (Meller y col, 1994; Milligan y Watkins L, 2009).
- 10 La asociación entre la glía y el dolor crónico, queda de manifiesto en las siguientes evidencias experimentales:
1. Los astrocitos y microglía del asta dorsal de la médula espinal se activan frente a una variedad de condiciones que producen dolor crónico e hiperalgesia, tales como: inflamación subcutánea (Fu y col, 1999), administración subcutánea de micobacterias inactivadas (Sweitzer y col, 1999), trauma de nervios periféricos (DeLeo y col, 1998; Hains y Waxman; 2006), entre otros (Garrison y col, 1991).
 - 15 2. La activación de la glía se produce por moléculas provenientes de las terminaciones nerviosas nociceptivas aferentes (aminoácidos excitatorios, SP, ATP), así como de las neuronas de segundo orden (óxido nítrico, NO; prostaglandinas; fractalinas) (Carnignoto y col, 2000).
 - 20 3. Las células gliales activadas liberan diferentes moléculas neuroactivas capaces de inducir o magnificar el dolor, tales como: NO, prostaglandinas, leucotrienos, ácido araquidónico, aminoácidos excitatorios (glutamato, aspartato, cisteína, ácido quinolínico), factores de crecimiento, y encefalinas, así como una variedad de citocinas proinflamatorias tales como: interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Kreutzberg GW, 1996; Watkins y col, 2002).
 - 25 4. Las células gliales y las neuronas poseen receptores para citoquinas. En efecto,

5 hoy se acepta que las citoquinas tienen un rol como neuromodulador en el sistema nervioso central. A nivel de las neuronas nociceptivas de segundo orden, IL-1 β es capaz de aumentar la respuesta por estimulación de fibras C, así como la sensibilización central o *Wind-up* espinal (Constandil y col, 2003), a nivel de las terminaciones aferentes nociceptivas, IL-1 β aumenta la liberación de SP y probablemente la de glutamato (Inoue y col, 1999).

5. El efecto algésico de las citoquinas proinflamatorias sobre neuronas y la glía se bloquea con antagonistas o anticuerpos específicos (Sweitzer y col, 2001).

5. Y adicionalmente a los clásicos neurotransmisores liberados por la glía, ya mencionados anteriormente, la glía libera moléculas conocidas como gliotransmisores como la D-serina (Ds). La Ds es un aminoácido del tipo dextrógiro (D) que actúa sobre el receptor de glutamato (NMDA, sitio de glicina), sugiriendo un posible rol de este gliotransmisor en la transmisión de las señales dolorosas (Miller, 2004)

15 Todos los antecedentes antes mencionados hacen de las células gliales un importante modulador de la nocicepción y por lo tanto un potencial blanco en las terapias farmacológicas para el manejo del dolor crónico. Es en este contexto, que aparece la estrategia de suprimir la actividad de la glía a nivel espinal (DeLeo y col, 1999) y con esto suprimir la liberación de citoquinas y restaurar el nivel normal de excitabilidad neuronal.

20 En la literatura se han descrito varios fármacos capaces de inhibir la actividad de la glía con efectos analgésicos. El efecto analgésico de los inhibidores de las células de la glía se ha observado en diferentes modelos de dolor crónico neuropático e inflamatorio. Entre estos fármacos podemos encontrar a: minociclina (Amin y col, 1996; Tikka y col, 2001), fluorocitrato (Hassel y col, 1992; Fonnum y col, 1997),
25 ibudilast (AV411) (Ledebocq y col, 2007) y metilxantinas como PPT (3-metil-1-(5-oxo-hexil)-7-propilxantina o propentofilina); (Si y col, 1998; Tawfik y col, 2008) y PTX (3,7-dimetil-1-(5-oxo-hexil) xantina o pentoxifilina); (Liu y col, 2007; Mika y col, 2007; Mika,

2008).

Entre estos inhibidores las metilxantinas como propentofilina (PPT) y pentoxifilina (PTX) son las más estudiadas en relación al tratamiento del dolor crónico, debido a que cruzan fácilmente la barrera hematoencefálica e inhiben tanto a los astrocitos como a la microglia.

Pentoxifilina (PTX) o su nombre de fantasía, Trental (Aventis) es un fármaco aprobado por la FDA y ha sido utilizado para el tratamiento de enfermedades vasculares periféricas, cardíaco-congestivas, insuficiencias cerebrovasculares, anemia falciforme y neuropatías diabéticas (Porter J y col, 1982; Frampton, 1995; Shen y col, 1991).

A nivel celular PTX y PPT bloquean la recaptación de adenosina (Parkinson y col, 1991 y 1993; Tawfik y col, 2008) e inhiben la enzima fosfodiesterasa tipo I a IV en forma no específica (Sweitzer y col, 2001).

Por otro lado, la propentofilina (PPT) ha sido utilizada experimentalmente en pruebas para tratamiento de la demencia, en Alzheimer (Schubert P y col, 1998; Chauhan y col, 2005) y algunos casos de dolor crónico (Sweitzer y DeLeo, 2011).

Tanto in vitro (Schubert y col, 2000) como in vivo (DeLeo y col, 1987) el mecanismo de propentofilina (PPT) parece ser variado, ya que también se ha demostrado que inhibe la producción de radicales libres (Rother My col, 1996) y reduce la activación de las células gliales como los astrocitos mediante la inhibición de la liberación de glutamato (Andine y col, 1990) y el aumento de la secreción de neurotrofinas como el factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés "nerve growth factor") (Shinoda y col, 1990).

Específicamente en el campo del dolor, el grupo de Schubert reportó que cultivos primarios de microglías activadas mediante lipopolisacáridos (LPS) y tratados con propentofilina, muestran una inhibición de la producción del factor de necrosis tumoral (TNF α), de IL-1 β y de radicales de oxígeno (Schubert y Rudolphi, 1998).

Además, se ha observado un aumento concomitante de AMPc e interleucina 10, una

citoquinas con propiedades antiinflamatorias. (Platzer y col, 1999; Detloff y col, 2008).

La mayor desventaja de utilizar inhibidores de la glia como analgésicos es que para obtener elevados niveles de analgesia, estos deben ser administrados en forma continua durante varios días.

5 Datos de nuestro laboratorio muestran que la administración de PTX durante 10 días disminuye el umbral de dolor, en el test de presión de la pata, de ratas sometidas a un modelo de monoartritis, hasta por 21 días. En resumen la inhibición de la glia producida por pentoxifilina, la hace un fármaco ideal para ser administrada en un sistema de liberación sostenida en el tiempo.

10 En conjunto los datos mostrados sugieren que la activación de las células de la glia, en respuesta a estímulos dolorosos intensos, es responsable de las modificaciones funcionales que ocurren en las neuronas y que se traducen en la mantención de la sensación dolorosa en el tiempo (Pasile y Bilbery, 2005). Por lo tanto, los fármacos capaces de inhibir la activación de la glia son de suma importancia para el tratamiento
15 del dolor crónico y estudiar nuevas formas farmacéuticas que permitan una liberación continua en el tiempo, se hace crucial para mejorar la efectividad de este tipo fármacos. Una forma de lograr esto es cargar fármacos que bloqueen la actividad glial en nanopartículas que se desintegren lentamente y permitan que el fármaco sea liberado por un periodo de tiempo prolongado.

20 **Nanopartículas poliméricas como sistema de liberación de fármacos**

En años recientes el crecimiento y aplicaciones en el área de nanociencia y nanotecnología no han tenido precedentes. Este incremento se ha observado en muchos niveles pero en particular en el área de medicina, brindando significativos avances en la diagnosis y tratamiento de enfermedades. Como también se han
25 observado nuevos desarrollos en fármacos, nutraceuticos y mejoramiento de la producción de materiales biocompatibles. (Duncan y col, 2003, DeJong y col, 2005; European science foundation (ESF) 2005; European Thecnology Plataform on

Nanomedicine (ESP), 2005; Ferrari, 2005)

La razón de porqué las nanopartículas son atractivas para su utilización es la característica que tiene la relación con su superficie versus su masa, que es mucho mayor en comparación con otras moléculas y su habilidad para adsorber y transportar otras moléculas.

La liberación de fármacos a partir de moléculas de liberación prolongada como las nanopartículas (NPs), formuladas a partir de polímeros biodegradables y biocompatibles está generando un fuerte impacto en el desarrollo preclínico de nuevas formas farmacéuticas (Born y Muller-Schulte, 2006). Este tipo de moléculas ofrecen una amplia plataforma terapéutica que permite reducir el número de dosis, reducir la toxicidad sin alterar sus efectos terapéuticos, proteger al fármaco de la inactivación (debido a la unión a proteínas o a metabolización del fármaco), proveer una liberación prolongada y estable durante largos periodos de tiempo y poseer mayor especificidad frente a tejidos blanco (dado por la funcionalización de la molécula).

Entre los sistemas de liberación prolongada de fármacos se destaca el uso de NPs poliméricas, las cuales al ser dispuestas en un tejido blanco se mantienen en el sitio de inyección liberando el fármaco contenido en su interior, por largos periodos de tiempo; y siendo la mayor ventaja su biodegradabilidad y biocompatibilidad, propiedad que es otorgada principalmente por la característica del polímero empleado en su formulación. Diferentes familias de polímeros biodegradables se han descrito en la formulación de NPs tales como fosfolípidos, lípidos, ácido láctico, dextrano, quitosina, entre otros (Cascone y col, 2002; Baran y col, 2002; Duncan y col, 2003; Kipp y col, 2004).

Las NPs de quitosina presentan una buena biocompatibilidad, sin embargo, su amplia utilización es limitada debido a su potencial antigénico y pobre control en la liberación del agente terapéutico, debido a que su degradación es dependiente de la actividad enzimática (Duncan, 2003). Los poliésteres (lípidos y fosfolípidos) son los polímeros

ampliamente utilizados en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos, debido a que experimentan un perfil de liberación adecuado, alta biocompatibilidad y sus productos de degradación son bio-absorbibles. Sin embargo, su utilización ha sido desarrollada principalmente hacia el área de la cosmética (ESP, 2005). Los polímeros ácido láctico (poli (láctico) (PLA) y ácido poli (láctico - glicólico) (PLGA)) y sus copolímeros han sido los biomateriales de excelencia para el encapsulamiento de fármacos en NPs poliméricas (Waeckerle-Men y col, 2005; Cho H y col, 2004; Kumar y col, 2001; Illum y col, 1987; Berchane y col 2007).

La administración de alimentos y drogas (FDA) aprobó al polímero de PLGA como un polímero biodegradable y biocompatible. Estos polímeros se han utilizado durante décadas en la práctica para aplicaciones en el área clínica (Putney y col 1998), incluidos los dispositivos protésicos, implantes y microesferas cargadas con fármacos para liberación prolongada.

En presencia de agua, PLGA es degradado a ácido láctico y glicólico, moléculas que son subproductos naturales de diversos procesos metabólicos en el cuerpo. La biocompatibilidad de PLGA lo convierte en un excelente candidato para el uso seguro y no irritante para cargar en su interior fármacos. Por otra parte, PLGA tiene pendientes de liberación controlada características, dadas por la razón de su composición entre ácido láctico-ácido glicólico.

Las metodologías descritas en la literatura para el desarrollo de sistemas de NPs de polímeros biodegradables y biocompatibles son múltiples, entre los cuales se destacan: (i) Fase de separación del polímero (Rosca y col 2004); (ii) Secado por atomización (Husmann y col 2002); (iii) Simple o doble emulsión - evaporación (Li X y col, 2009).

Por otro lado, la liberación de un fármaco encapsulado puede producirse en tres fenómenos: (i) difusión del fármaco, (ii) degradación (iii) y erosión de la matriz polimérica (Gospirich A y col 1996).

- La difusión del fármaco cargado dentro de las NPs de PLGA ocurre en la medida que se va generando la ruptura de los enlaces ésteres al azar. Este fenómeno sumado a la solubilización del fármaco dispuesto en la superficie de la NP o en sus porosidades podría generar un estallido inicial de liberación (burst de liberación). Una vez que comienza a disminuir la masa de la partícula, comienza la fase de liberación sostenida en la cual se producirá la degradación y erosión de la matriz polimérica. Los sistemas de liberación prolongada de fármacos basados en NPs poseen propiedades únicas en función de las condiciones de preparación y las propiedades de los polímeros y fármacos (Ito F y col, 2007; Freiberg y col, 2004; Li M y col, 2008; Ruan y col 2002).
- 5
- 10 La presente invención consiste en el desarrollo y caracterización de nanopartículas del polímero biodegradable y biocompatible ácido poli (láctico - glicólico) y la droga pentoxifilina para generar una nueva forma farmacéutica (nanopartícula-fármaco) que permite la reducción a una sola dosis para obtener un tratamiento efectivo del dolor crónico y una prevención de la aparición del mismo.
- 15 **Estado del arte**
- El documento WO9702022 describe nanopartículas biocompatibles y biodegradables para la absorción y administración de medicamentos proteínicos. La invención se refiere tanto al método para producir dichas nanopartículas como para su utilización. Reivindica las nanopartículas para medicamentos proteínicos o péptidos con un
- 20 tamaño de partícula entre 0,02 y 1 μm que contienen un polímero biocompatible, seleccionado dentro del grupo compuesto por polietileno, prolectona, poliláctico, poliglicólico, o un copolímero del mismo. Preferiblemente son utilizados poli(D,L) láctico, poli(D,L)láctico co-glicólico en particular en una relación molar 50:50 (%). En este documento no se describe el uso particular de PLGA con pentoxifilina.
- 25 El documento WO2008054042 describe el uso de nanopartículas biodegradables de PLGA para encapsular ciprofloxacina, que tiene una propiedad de liberación prolongada, además del método de fabricación del compuesto PLGA+ciprofloxacina.

Las nanopartículas biodegradables de PLGA encapsulantes de ciprofloxacina, tienen un tamaño de partícula de 100-500 nm. Reivindica nanopartículas biodegradables porosas de poli (DL-láctico-co-glicólico) que encapsula ciprofloxacina, y que tiene una propiedad de liberación prolongada, y un tamaño de partícula de 100-500 nm. Además
5 reivindica el proceso de manufactura de la nanopartícula y solo el uso de ciprofloxacina junto a las nanopartículas. En este documento no se describe el uso particular de PLGA con pentoxifilina.

El documento WO2007127363 describe un método para depositar un revestimiento que comprende un polímero y al menos dos agentes farmacéuticos en un sustrato.

10 Reivindica que el polímero a utilizar se puede seleccionar entre los siguientes: PLA, PLGA, PGA y Poli(dioxanona). Las drogas que reivindica son macrólidos inmunosupresores como rapamicina y derivados. En ningún caso se describe el polímero con pentoxifilina como agente farmacéutico.

El documento WO2008147372 describe una composición no soluble en agua para la
15 administración de fármacos que comprende un conjugado y un polímero de matriz.

Donde la exposición de la composición a la radiación electromagnética a una longitud de onda e intensidad predeterminada, inducen la liberación del ingrediente activo desde la composición. El conjugado se une a la matriz de polímero a través de interacciones no covalentes. Reivindica la composición no soluble en agua en la forma
20 de un comprimido, cápsula, suspensión, crema, pomada, loción, polvo, gel, solución, pasta, spray, espuma, aceite, enema, supositorio, matriz de liberación controlada o lenta o depósito. Los polímeros que componen dicha composición pueden ser seleccionados de: poli(etileno), poli(propileno), polivinil cloruro, polivinil pirrolidona, poli(2-hidroxietil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido metacrílico), poli(ácido acrílico),
25 poli(dietilaminoetilmetacrilato), poli(dietilaminoetilmetacrilato), silicona, estireno- isopren/butadien-estireno, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico -co- ácido glicólico), poli(caprolactona), poli(ortoesteres) y polifosfazina. Los

medicamentos que pueden ser utilizados en la composición son antibióticos, analgésicos, vitaminas, anti-histamínicos, anti-inflamatorios. En este documento no se describe el uso particular de pentoxifilina como principio activo de la composición.

El documento WO2010009335 describe un dispositivo médico implantable, que comprende: un sustrato, y un recubrimiento para éste, el recubrimiento comprende al menos un polímero y al menos un agente farmacéutico como sustrato, en una morfología terapéuticamente deseable. Reivindica el dispositivo médico que comprende el sustrato y el recubrimiento de polímeros. Además menciona todas las herramientas que se pueden utilizar para insertar este dispositivo médico. Reivindica diferentes medicamentos incluyendo pentoxifilina. El dispositivo comprende al menos uno de los siguientes polímeros, mezclas o derivados de ellos, polilácticos (PLA); PLGA (poli(láctico-co-glicólico); polianhidridos; poliolefinas; poli(N-(2-hidroxi)propil) metacrilamida); DLPLA - poli(D,L- láctico); LPLA - poli(L-láctico); PGA - poliglicólico; PDO - poli(dioxanona); PGA-TMC - poli(glicólico-co-trimetileno carbonato); PGA-LPLA - poli(L-láctico-co-glicólico); PGA-DLPLA - poli(D,L-láctico-co-glicólico); LPLA-DLPLA - poli(láctico-co-D,L-láctico); y PDO-PGA-TMC - poli(glicólico-co-trimetileno carbonato-co-dioxanona). En este documento no se describe el uso particular de pentoxifilina como sustrato o agente farmacéutico.

El documento WO2008128123 incluye composiciones y métodos de fabricación de una nanopartícula polimérica para la entrega de fármacos. En las reivindicaciones se menciona que el polímero puede ser poli-ácido láctico, poli ácido glicólico, ácido poli-láctico-co-glicólico, y combinaciones de los mismos. Se mencionan también los medicamentos que se pueden utilizar en la invención, los cuales se refieren a medicamentos contra el cáncer, antibióticos, antivirales, antifúngicos, antihelmínticos, nutrientes, siRNA, antioxidantes y anticuerpos. Sin embargo, en las reivindicaciones no se mencionan medicamentos o principios activos particulares.

El documento WO2010111238 describe una composición que comprende un poli (ácido alfa-hidroxicarboxílico) sustancialmente libre de impurezas ácidas, en el que el poli (ácido alfa-hidroxicarboxílico) se selecciona desde poli (D, L-láctico-co-glicólico), poli (ácido L-láctico), poli (ácido D-láctico) y poli (D, L-ácido láctico). En el documento se mencionan el grado de impurezas que puede tener la composición, así como las distintas proporciones entre los distintos grupos descritos anteriormente. Se reivindica el uso de esta composición como un dispositivo médico, como stents (por ejemplo, stents vasculares), electrodos, catéteres, cables, marcapasos implantables, carcasas o desfibriladores cardioversor, tornillos, varillas, implantes oftálmicos, pasadores femorales, placas óseas, injertos, dispositivos anastomóticos, envolturas perivasculares, suturas, grapas, derivaciones para la hidrocefalia, injertos de diálisis, dispositivos de colostomía, tubos de fijación de bolsa de drenaje del oído, conductor para marcapasos y cardioversores implantables y desfibriladores, discos vertebrales, clavos óseos, anclas de sutura, barreras hemostáticas, abrazaderas, tornillos, placas, clips, implantes vasculares, adhesivos y selladores de tejidos, andamios de tejidos, varios tipos de apósitos (por ejemplo, apósitos para heridas), sustitutos óseos, dispositivos intraluminales, y apoyos vasculares. Se reivindican gran variedad de medicamentos destacando pentifilina y pentoxifilina, pero con fines diferentes a la presente invención. Este documento presenta el uso de PLGA con pentoxifilina, pero en ningún caso se presenta una nanopartícula-fármaco como formulación para el tratamiento del dolor crónico. Considerando además que este documento soluciona un problema técnico diferente al propuesto, éste documento no afecta la novedad ni el nivel inventivo de la presente innovación.

El documento WO2005084710 describe nanoceldas que permiten la entrega secuencial de dos agentes terapéuticos diferentes. La nanocelda se pueda formular en una composición farmacéutica para la entrega a los pacientes que sufren de enfermedades tales como el cáncer, enfermedades inflamatorias tales como asma.

enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide, enfermedades infecciosas, y enfermedades neurológicas tales como la epilepsia. Se reivindica el uso de un polímero para las nanoceldas como el PLGA. Se menciona que la nanocelda puede ser administrada por vía oral, parenteral, intravenosa, inhalación, intramuscular, subcutánea, rectal, intratecal, nasal, vaginal, intradérmica, mucosal o transdérmica. En este documento no se hace referencia particular a pantoxifilina.

El documento "The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems-a review" (Frødenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. *Int J Pharm*. 2011 Aug 30;415(1-2):34-52. Epub 2011 May 27), es una revisión sobre el uso del polímero poli (D, L-láctico-co-glicólico) (PLGA), utilizado frecuentemente como compuesto biodegradable en la liberación controlada de fármacos encapsulados. Se describen el mecanismo de liberación y las diversas técnicas de encapsulamiento. También se describen los procesos físico-químicos que influyen en la velocidad de liberación del fármaco. Se da una mirada a la investigación básica, la aplicación general y mecanicista en el desarrollo de productos farmacéuticos de liberación controlada.

El documento "Functionalized poly (lactic-co-glycolic acid) enhances drug delivery and provides chemical moieties for surface engineering while preserving biocompatibility" (Bertrem JP, Jay SM, Hynes SR, Robinson R, Criscione JM, Lavik EB. *Acta Biomater*. 2009 Oct;5(8):2860-71. Epub 2009 May 4), describe el uso de PLGA y modificaciones al mismo, para mejorar la liberación de distintos tipos de drogas *in vivo*.

El documento "Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens" (Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC, Schwendeman SP. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005 Jan 10;57(3):391-410), describe el uso de PLGA como partículas poliméricas biodegradables inyectables, para controlar la liberación de antígenos desde una vacuna, con el fin de reducir el número de dosis en el programa de inmunización y optimizar la respuesta inmunitaria deseada. Menciona que

micropartículas de PLGA mostraron flexibilidad y seguridad sin precedentes, para llevar a cabo la liberación de uno o múltiples antígenos de diferentes características físico-químicas y requisitos inmunológicos.

El documento "PLGA/PEG-derivative polymeric matrix for drug delivery system applications: Characterization and cell viability studies" (Fernández-Carballido A, Pastoriza P, García E, Montejo C, Negro S. Int J Pharm. 2008 Mar 20;352(1-2):50-7. Epub 2007 Oct 16), estudia el efecto de la inclusión de un aditivo (PEG-derivado) en las características finales de la matriz polimérica de PLGAs. Además realizaron estudios de citotoxicidad en distintos cultivos celulares.

10 El documento "PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications" (Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. J Control Release. 2012 Jul 20; 161(2):505-22. Epub 2012 Feb 4), presenta los avances desarrollados en los sistemas de suministros de distintos fármacos a base de las nanopartículas PLGA, para el tratamiento de diferentes patologías. Se centran en nanopartículas que son
15 más adecuados para uso parenteral en comparación con micropartículas que son generalmente utilizados como implante. Se describe e ilustran los recientes avances en la industria biomédica utilizando nanopartículas.

El PLGA ha sido ampliamente utilizado para el encapsulamiento de fármacos, sin embargo, no se conocen divulgaciones de una formulación para el tratamiento o
20 prevención del dolor crónico que corresponda a una nanopartícula de PLGA que contenga pentoxifilina.

Breve descripción de la invención

La presente invención divulga una nueva formulación farmacéutica que comprende nanopartículas poliméricas del polímero biodegradable y biocompatible ácido poli
25 (láctico – glicólico) (PLGA) cargadas con la droga pentoxifilina y el uso de esta nueva forma farmacéutica para el tratamiento efectivo del alivio del dolor crónico y para la prevención del dolor crónico mediante la administración de una dosis única.

En una realización preferida, las nanopartículas son sintetizadas mediante el método de doble emulsión y evaporación modificado que comprende las etapas de:

- a) disolución del polímero de PLGA en un solvente;
- b) disolución de pentoxifilina en agua purificada;
- 5 c) adición de la pentoxifilina disuelta en la etapa b) al polímero de PLGA disuelto en la etapa a) previamente enfriado;
- d) emulsión de la mezcla de la etapa c);
- e) adición de una solución de un agente emulsificante en agua purificada;
- f) homogenización de la mezcla de la etapa e);
- 10 g) dilución de la homogenización de la etapa f) en agua purificada;
- h) evaporación del solvente donde se disolvió el polímero de PLGA en la etapa a);
- i) lavado de las nanopartículas con agua purificada;
- j) colección de las nanopartículas en solución.

Las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina de la presente invención son
15 útiles para aliviar y prevenir el dolor crónico mediante la administración intratecal de una dosis única.

La formulación farmacéutica de liberación lenta, controlada y sostenida de las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina de la presente invención comprende la solución de nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina obtenida
20 del método antes descrito y cualquier aditivo, agente o coadyuvante farmacéuticamente adecuado.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: (A) Tamaño de las n-PLGA y n-PLGA PTX determinado mediante dispersión de luz dinámica. (B) Frecuencia de distribución de las n-PLGA PTX. (C) Análisis
25 morfológico mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las n-PLGA PTX (n=6).

Figura 2: Efecto preventivo del dolor crónico en ratas neuropáticas tratadas con n-

PLGA PTX tres días previos a la generación de la lesión sural. En la figura el número 1 corresponde al día de administración de las n-PLGA PTX, y el número 2 al momento en que se realizó el corte del nervio sural en los grupos Neuropatía y Neuropatía + n-PLGA PTX. Control (n=9), Neuropatía (n=9) y Neuropatía + n-PLGA PTX (n=5).

- 5 Figura 3: Efecto preventivo del dolor crónico en ratas sometidas a estimulación eléctrica subcutánea de alta frecuencia (SHFS) y tratadas con n-PLGA PTX. En la figura el número 1 corresponde al día de administración de las n-PLGA PTX, y el número 2 al momento en que se realizó la HFS en los grupos SHFS y SHFS + n-PLGA PTX. Control (n=9), SHFS (n=12) y SHFS + n-PLGA PTX (n=5).
- 10 Figura 4: Efecto revertivo del tratamiento con n-PLGA PTX en ratas neuropáticas. En la figura el número 1 corresponde al día en que se realizó el corte del nervio sural en los grupos Neuropatía y Neuropatía + n-PLGA PTX; y el número 2 corresponde al día de administración de las n-PLGA PTX. Control (n=9), Neuropatía (n=9) y Neuropatía + n-PLGA PTX (n=5).
- 15 Figura 5: Efecto revertivo del tratamiento con n-PLGA PTX en ratas sometidas a HFS. En la figura el número 1 corresponde al día en que se realizó la HFS en los grupos LTP sensibilización y LTP + n-PLGA PTX; y el número 2 corresponde al día de administración de las n-PLGA PTX. Control (n=9), LTP sensibilización (n=12) y LTP + n-PLGA PTX (n=3).
- 20 Figura 6: Efecto revertivo del tratamiento con n-PLGA PTX en ratas con monoartritis. En la figura el número 1 corresponde al día en que se administraron las n-PLGA PTX al grupo (Monoartritis+ n-PLGA PTX). Monoartritis o Control (n=3), Monoartritis + PTX (n=3) y Monoartritis + n-PLGA PTX (n=3).

Descripción detallada de la invención

- 25 La presente invención divulga una nueva formulación farmacéutica que comprende nanopartículas poliméricas del polímero biodegradable y biocompatible ácido poli (láctico – glicólico) (PLGA) cargadas con la droga pentoxifilina y el uso de esta nueva

forma farmacéutica para el alivio efectivo del dolor crónico y para la prevención del dolor crónico mediante la administración de una dosis única.

Las nanopartículas de polímeros poliésteres como PLGA son adecuadas como sistemas de liberación controlada y sostenida de fármacos, debido a su perfil de liberación, su alta biocompatibilidad y a que sus productos de degradación son bioabsorbibles.

La presente invención utiliza la encapsulación de pentoxifilina, un analgésico que inhibe la activación de las glías del dolor, microglías y astrocitos, inhibiendo la liberación de citoquinas en general e interleuquinas en particular. Los fármacos que inhiben la activación de la glía, como el caso de la pentoxifilina, han mostrado ser efectivos en el tratamiento de dolores crónicos, sin embargo, este efecto analgésico es dependiente de su administración en forma repetida o crónica.

La utilización de nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina resuelve este problema ya que permite la liberación lenta, controlada y sostenida de la droga a medida que las nanopartículas se degradan en el tejido blanco, por lo que la administración de una dosis única tiene efecto aliviando o previniendo el dolor crónico durante varios días.

Las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina de la presente invención son sintetizadas por cualquier método conocido en el arte, por ejemplo, pero no limitado a: método de fase de separación del polímero, método de secado por atomización, método de autoensamblaje (Chan, J. M. et al. 2009), o método de simple o doble emulsión y evaporación, tradicional o modificado. En una realización preferida, las nanopartículas son sintetizadas mediante el método de doble emulsión y evaporación modificado que comprende las etapas de:

- a) disolución del polímero de PLGA en un solvente;
- b) disolución de pentoxifilina en agua purificada;
- c) adición de la pentoxifilina disuelta en la etapa b) al polímero de PLGA disuelto en la

etapa a) previamente enfriado;

d) emulsión de la mezcla de la etapa c);

e) adición de una solución de un agente emulsificante en agua purificada;

f) homogenización de la mezcla de la etapa e);

5 g) dilución de la homogenización de la etapa f) en agua purificada;

h) evaporación del solvente donde se disolvió el polímero de PLGA en la etapa a);

i) lavado de las nanopartículas con agua purificada;

j) colección de las nanopartículas en solución.

10 El polímero de PLGA utilizado en la etapa a) y por lo tanto, las nanopartículas de PLGA de la presente invención, tienen un rango de proporción de ácido poliláctico a ácido poliglicólico desde 10% de ácido poliláctico con 90% de ácido poliglicólico, hasta 90% de ácido poliláctico con 10% de ácido poliglicólico, pudiendo ser cualquier combinación que se encuentre dentro de esos rangos. En una realización preferida, la proporción es de 50% de ácido poliláctico y 50% de ácido poliglicólico.

15 El solvente utilizado en la etapa a) es cualquiera que permita disolver el polímero, por ejemplo, pero no limitado a diclorometano o cloroformo.

La proporción de polímero de PLGA a pentoxifilina utilizada en el método de síntesis de la presente invención va desde 0,01% PLGA y 0,0003% pentoxifilina, hasta 5% PLGA y 0,3% pentoxifilina, pudiendo ser cualquier combinación que se encuentre
20 alrededor de este rango. En una realización preferida, la proporción de polímero de PLGA a pentoxifilina utilizada en el método de síntesis de la presente invención es 0,3% de PLGA y 0,01% de pentoxifilina.

La etapa d) de emulsión de la mezcla de la etapa c) se realiza con cualquier método conocido en la técnica. (por ejemplo: Cheng, L. *et al.* 2011) En una realización
25 particular la etapa d) de emulsión de la mezcla de la etapa c) se realiza utilizando un sonicador. En una realización preferida, la emulsión en el sonicador se realiza con una frecuencia de 10 a 30 KHz, a una potencia de 90 a 170 watts, durante 40 a 80

segundos. En otra realización aún más preferida, la emulsión en el sonicador se realiza con una frecuencia de 20 KHz, a una potencia de 130 watts, durante 50 segundos.

5 El agente emulsificante utilizado en la solución de la etapa e) puede ser cualquiera que permita emulsificar la emulsión de la etapa d), por ejemplo, pero no limitado a: polivinil alcohol (PVA), polietilenglicol o sus derivados, o emulsificantes catiónicos y aniónicos de uso farmacéutico, o cualquier combinación de ellos.

10 En una realización particular, cuando se utiliza PVA en la etapa e), éste está hidrolizado en 80 a 95%. En una realización preferida, cuando se utiliza PVA en la etapa e), éste está hidrolizado en 87-89%.

En otra realización preferida, cuando se utiliza PVA en la etapa e), la solución de PVA en agua purificada comprende 0,1 a 5% p/v de PVA. En una realización aún más preferida, la solución de PVA en agua purificada de la etapa e) comprende 0,5% p/v de PVA.

15 La homogenización de la etapa f) se realiza mediante cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo: Ribeiro-Costa, R. M. *et al.*, 2004), por ejemplo, pero no limitado a: homogenización mediante un sonicador, mediante un vórtex, mediante un ultraturrax, mediante homogenizadores alta presión o mediante homogenizadores de cualquier tipo o cualquier combinación de ellos. En una realización particular, la

20 homogenización de la etapa f) se realiza utilizando un sonicador. En una realización preferida, la homogenización en el sonicador se realiza con una frecuencia de 10 a 30 KHz, a una potencia de 90 a 170 watts, durante 5 a 70 segundos. En otra realización aún más preferida, la homogenización en el sonicador se realiza con una frecuencia de 20 KHz, a una potencia de 130 watts, durante 15 segundos y se repite luego

25 durante 40 segundos.

La evaporación del solvente en la etapa h) se realiza por cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo: Chen, J. & Davis, S. S. 2002), por ejemplo pero no limitado

a: agitación de la solución, corrientes de gases como nitrógeno u oxígeno, calor, liofilización o cualquier combinación de ellas. En una realización particular, la evaporación del solvente en la etapa h) se realiza por agitación orbital moderada (70 a 170 rpm) a temperatura ambiente durante 5 a 20 horas.

- 5 La colección de las nanopartículas en solución de la etapa j) se realiza por cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo: Shi, J., et al. 2011), por ejemplo pero no limitado a: filtración, filtración y centrifugación, centrifugación diferencial, centrifugación en gradiente o cualquier combinación de ellas. En una realización particular las nanopartículas se colectan por filtración y centrifugación. En una realización preferida,
- 10 la filtración para la colección de las nanopartículas se realiza mediante un filtro con corte 80 a 120 kDa y centrifugando a 3500 a 5500G durante el tiempo necesario para obtener una solución con nanopartículas. En una realización aún más preferida, la filtración para la colección de las nanopartículas se realiza mediante un filtro con corte 100 kDa y centrifugando a 4500G durante el tiempo necesario para obtener una
- 15 solución con nanopartículas.

Las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina de la presente invención tienen un tamaño homogéneo entre 150 a 410 nm. En una realización preferida, las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina de la presente invención tienen un tamaño homogéneo de 250 nm.

- 20 Las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina de la presente invención son esféricas, con una superficie lisa e hidrofílica, un cascarón polimérico y una cavidad central donde se encuentra la pentoxifilina encapsulada.

- Las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina de la presente invención poseen una carga superficial negativa con un valor entre -24 y -13 mV. En una
- 25 realización preferida, las nanopartículas de PLGA cargadas con PTX de la presente invención poseen una carga superficial negativa con un valor de -18,5 mV.

El método de síntesis de nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina de la

presente invención permite una eficacia de encapsulamiento entre 40 y 60% del fármaco agregado. En una realización preferida, la eficiencia de encapsulamiento es de 50% del fármaco agregado.

La proporción de pentoxifilina encapsulada en las nanopartículas de PLGA de la presente invención es entre 1µg de pentoxifilina en 10µL de solución de nanopartículas, hasta 3µg de pentoxifilina en 10µL de solución de nanopartículas o cualquier proporción que se encuentre dentro de estos rangos. En una realización preferida la proporción de pentoxifilina encapsulada en las nanopartículas de PLGA de la presente invención es 2µg de pentoxifilina en 10µL de solución de nanopartículas.

Las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina de la presente invención son estables ya que no presentan cambios significativos en el tamaño cuando son expuestas a baja temperatura o a liofilización.

Las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina de la presente invención son útiles para tratar y prevenir el dolor crónico mediante la administración de una dosis única.

Las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina de la presente invención se administran en una dosis única. La dosis única de las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina de la presente invención se administra por ejemplo, pero no limitado a: vía intratecal, vía intravenosa, o vía intramuscular. En una realización preferida, la dosis única de las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina de la presente invención se administra vía intratecal.

La formulación farmacéutica de liberación lenta, controlada y sostenida de las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina de la presente invención comprende la solución de nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina obtenida del método antes descrito y cualquier aditivo, agente o coadyuvante farmacéuticamente adecuado.

La dosis única de formulación farmacéutica de liberación lenta, controlada y sostenida de las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina con efecto farmacológico de la presente invención está en el rango de 0,001 a 0,1 mg de pentoxifilina encapsulada/kilo de peso corporal del sujeto que sufre o se sabe que sufrirá dolor crónico. En una realización preferida, la dosis única de formulación farmacéutica de liberación lenta, controlada y sostenida de las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina con efecto farmacológico de la presente invención es de 0,01 mg de pentoxifilina encapsulada /kilo de peso corporal del sujeto que sufre o se sabe que sufrirá dolor crónico.

10 Ventajas de la presente invención

La presente invención permite resolver el problema de la necesidad de una administración permanente de medicamentos para tratar el dolor crónico. La presente invención utiliza una dosis única de una formulación farmacéutica que comprende al menos una solución de nanopartículas poliméricas biodegradables y biocompatibles de PLGA cargadas con pentoxifilina para prevenir y tratar el dolor crónico y puede comprender adicionalmente cualquier aditivo, agente o coadyuvante farmacéuticamente adecuado.

Aplicación industrial

La presente invención se aplica a la industria de la medicina para cubrir todas aquellas enfermedades que como consecuencia de la patología de fondo generen dolores crónicos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis y caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas con pentoxifilina (nPLGA-PTX).

Las nanopartículas (NPs) de PLGA cargadas con pentoxifilina (nPLGA-PTX) fueron sintetizadas por una modificación del método de doble emulsión (agua / aceite / fase acuosa) descrito por el grupo de Li (Li y col., 2001). El tipo de PLGA (Sigma) utilizado

está compuesto por proporciones de 50% de ácido poliláctico y de 50% ácido poliglicólico. El copolímero de PLGA (3 mg/mL) se disolvió en diclorometano (Sigma), y el fármaco (PTX, Sigma) se disolvió en agua milliQ. El fármaco disuelto (0,5 mL) fue añadido a la solución de PLGA (3 mg/mL) enfriada previamente con hielo. Luego, esta
5 mezcla fue emulsionada con un sonicador (VCX 130, Sonic Vibracell, USA) a 100% de la amplitud (frecuencia 20 KHz, potencia 130 watts) por 60 segundos. A esta emulsión se le añadió una solución de 0,5% p/v de polivinil alcohol (PVA, 87-89% hidrolizado, Sigma) disuelta en agua milliQ y fue homogenizado dos veces a 100% de amplitud (20 KHz, 130 watts) 15 segundos y 40 segundos cada vez. Esta emulsión doble se agregó
10 a un vaso de precipitado con agua milliQ (25 mL) y el diclorometano presente en la muestra fue eliminado por evaporación en un sistema de agitación moderada (120 rpm en agitador orbital) durante la noche, a temperatura ambiente. Las nanopartículas libres de diclorometano, se lavaron en agua milliQ y se colectaron por filtración mediante un filtro de celulosa con corte a 100 KDa (Amicon, Millipore) centrifugando a
15 4500G, hasta obtener una solución con nanopartículas. Finalmente el pellet obtenido se almacenó a -20° C. Para controlar el procedimiento de preparación y los efectos de la nanopartícula, se prepararon nanopartículas vacías, empleando los mismos métodos anteriormente descritos.

El tamaño y potencial zeta de las nanopartículas se midió por (dispersión de luz
20 dinámica) DLS (zetaziser nano S90, Malvern, Reino Unido) y su morfología por microscopía de transmisión electrónica (TEM) (EVO MA10, Zeiss, Alemania). Para ello, se tomó una alícuota de 50 μ L de una preparación de nanopartículas y se llevó a un volumen de 1 mL con agua milliQ para su análisis mediante DLS.

Las n-PLGA PTX mostraron un tamaño aproximado de $258,6 \pm 79,5$ nm ($n= 6$,
25 muestras o preparaciones independientes), el cual fue medido mediante dispersión de luz dinámica y no mostró diferencias significativas respecto de las nanopartículas vacías (n-PLGA), como se observa en la Figura 1A. La Figura 1B muestra la

frecuencia de distribución de las n-PLGA PTX. La forma de las n-PLGA PTX fue evaluada mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) utilizando como medio de contraste acetato de uranilo, el cual permitió resaltar las zonas hidrofílicas de la preparación. Las imágenes obtenidas mostraron partículas esféricas con una superficie hidrofílica, un cascarón polimérico y una cavidad central donde se encuentra el fármaco encapsulado de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas y la literatura, como se observa en la Figura 1C. El análisis de la carga superficial o potencial zeta de las n-PLGA PTX mediante dispersión de luz dinámica mostró que las partículas poseen una carga negativa con un valor de $-18,66 \pm 4,91$ mV (n=5, preparaciones independientes).

Ejemplo 2: Eficiencia de encapsulamiento y cinética de liberación in vitro

La eficiencia de encapsulamiento (EE%) de PTX se determinó a través de la comparación cuantitativa de la cantidad de fármaco entre la carga inicial y el resto del fármaco que queda en la solución después de la centrifugación de las nPLGA-PTX, durante el periodo de la preparación de las nanopartículas. La cantidad de fármaco fue determinada mediante espectrofotometría UV-visible (Agilent 8453, Agilent technologies, Alemania) a una longitud de onda de 273 nm en cubeta de cuarzo semimicro o UPLC (Acquity system, Waters, Milford, MA, USA).

La separación cromatográfica de la PTX se realizó en una columna C18 de dimensiones 50×2,1mm, 1,7µm; la fase móvil tenía una relación 89:1:10 (v/v) de agua, metanol y acetonitrilo a una tasa de flujo de 0,6 mL/min. La detección fue obtenida a una longitud de onda de 273 nm, con un volumen de inyección de 5 µL. La EE% se determinó a partir de las siguientes relaciones:

Capacidad de carga teórica = fármaco total/ (fármaco total + polímero)

(i)

Capacidad de carga real = fármaco encapsulado/ (fármaco total + polímero)

(ii)

$EE\% = (\text{Capacidad de carga real} / \text{Capacidad de carga teórica}) \times 100\%$
(iii)

La eficacia de encapsulamiento obtenida mostró que un 50% del fármaco agregado en el proceso de formulación fue encapsulado. A partir de estos resultados, se determinó la carga real o efectiva (del inglés loading) y se calcularon las dosis a utilizar en los experimentos in vivo, siendo establecido que 10 μL de nanopartículas contenían un monto de 2 μg de pentoxifilina (n=8 preparaciones independientes).

Ejemplo 3: Determinación de las propiedades analgésicas y comparación in vivo de las nanopartículas.

10 Animales

Se utilizó un total de 89 ratas machos Sprague-Dawley de peso entre 200-250 gramos. Todas las ratas fueron obtenidas del bioterio de la Universidad de Chile, Facultad de Medicina.

Las ratas fueron mantenidas en condiciones controladas de luz oscuridad (12:12, luz: oscuridad), temperatura ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) y flujo de aire. Los animales contaron con agua y comida ad libitum. Diariamente las jaulas fueron aseadas y los animales fueron evaluados en su condición general (aspecto general, peso y tamaño). Todos los protocolos experimentales fueron realizados conforme a la "guía de cuidado de animales de laboratorio" publicada por National Institutes of Health (NIH), por la "guía para el uso ético de animales en investigación de dolor" (Jayo Cisneros, 1996) publicada por International Association for Study of Pain (IASP) y el Comité de Ética de la Universidad de Santiago de Chile.

Modelos de dolor Crónico

Mononeuropatía

25 Los animales de experimentación fueron anestesiados con isoflurano y mediante una pequeña incisión en la piel, de aproximadamente 1 cm de largo, en el muslo se expuso el nervio ciático. Se desbridó el tejido subcutáneo y el músculo hasta encontrar el

nervio ciático. Posteriormente se siguió el recorrido hasta la división del nervio en tres ramas: el sural, el perineal común y el tibial. Luego se separaron las ramas y el nervio sural fue ligado y seccionado a dos milímetros de su nacimiento. Finalmente se realizó una sutura por planos. Una vez terminada la intervención se administraron 5mg/kg de ketoprofeno i.p. como analgésico, y 7,5 mg/kg, de enrofloxacinó i.p. como antimicrobiano (Rívera y Cabrero, 2008), una vez al día, durante tres días. Esta lesión nerviosa genera una hiperalgesia o dolor crónico que puede ser comparado con el dolor que se produce en personas que padecen de lumbago y que se mantiene en los animales por más de un mes. Los animales fueron utilizados a los 14 días post cirugía.

- 5
- 10 **Estimulación eléctrica subcutánea de alta frecuencia (SHFS, por sus siglas en inglés, Subcutaneous High Frequency Stimulation)**

El modelo de estimulación eléctrica subcutánea de alta frecuencia, SHFS, consiste en la estimulación eléctrica subcutánea de alta frecuencia (HFS), lo cual genera un dolor sin lesión periférica, que representa un modelo ideal para estudiar por ejemplo los dolores asociados a la neuralgia del trigémino. Para ello, las ratas fueron anestesiadas 1,5- 2,0% con isoflurano, y fueron insertados electrodos de aguja en el segundo y tercer orjejo de la pata derecha trasera. La estimulación eléctrica se realizó en dos períodos de 3 minutos separados por un intervalo de 10 minutos sin estímulo. En cada período, la rata se estimuló con trenes de 1segundo de estimulación por 9 segundos de reposo. La estimulación consistió en pulsos eléctricos a una frecuencia de 100Hz, intensidad de 7mA y 120 volts.

- 15
- 20

Las ratas finalmente fueron evaluadas mediante el test conductual de Randall-Selitto durante 0, 1, 3, 7, 10, 14 y 21 días.

Monoartritis

- 25 Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de un peso aproximado de 100 g. Este modelo fue descrito por Butler (Butler y col, 1992). Se inoculó en la pata derecha (cuarto tibi-tarsiano) de las ratas con 50 μ L de adyuvante completo de Freund, que contiene 300

5 μg de *Mycobacterium butiricum*. Esta inyección produce un síndrome de artritis localizada, resultando ser estable entre cuatro y seis semanas post-inoculación. Durante este período hay un establecimiento de dolor neurogénico e hiperalgesia, y este dolor es mantenido por un período superior a dos meses. Para el control de las ratas se inyectó sólo con el vehículo del *Mycobacterium butiricum*.

Inyección intratecal

10 Todas las dosis de las nanopartículas o los fármacos libres fueron administradas por vía intratecal (i.t.) en un volumen máximo de 10 μL , disueltas en líquido cefalorraquídeo artificial (LCA: CaCl_2 1,3mM, KCl 2,6mM, MgCl_2 0,9mM, NaHCO_3 20mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,5mM, NaCl 125mM). La inyección i.t. consiste en la administración del fármaco al interior del espacio subaracnoideo, entre las vértebras lumbares L5 y L6 (Mestre y col, 1994) usando una jeringa Hamilton con una aguja de 25Gx1/2". La entrada al espacio subaracnoideo se evidencia mediante un leve movimiento en la cola de la rata, producto de la estimulación mecánica de la aguja al

15 penetrar las meninges de la médula espinal.

Para proceder a realizar esta inyección i.t. las ratas fueron anestesiadas brevemente con isoflurano (5%, en oxígeno gaseoso) durante 2 minutos. Para los controles, se realizó una inyección de 10 μL de LCA.

Algesimetría

20 La evaluación del efecto analgésico de las nanopartículas cargadas con PTX o del fármaco libre se realizó con el test de presión de la pata en ratas, usando un equipo llamado algesímetro o Randall-Selitto (1957); (Ugo Basile, Italia). Este test consiste en la compresión gradual y creciente de la pata utilizando una punta roma. La respuesta nociceptiva se evidencia por el reflejo de retirada de la pata o la vocalización de la

25 rata.

Este test permite determinar el umbral nociceptivo (en gramos) en respuesta a una estimulación mecánica. Los estudios se realizaron antes (preventiva) y/o después

(curativa) de la inducción a un modelo determinado de dolor crónico (mononeuropatía, monoartritis, SHFS).

Efecto preventivo de las n-PLGA PTX en modelos *in vivo* de dolor crónico.

Se evaluó el efecto preventivo de las n-PLGA PTX en la instauración del dolor crónico en el modelo de neuropatía y en el modelo de estimulación eléctrica subcutánea de alta frecuencia (SHFS).

En ambos modelos, el diseño experimental fue similar y consistió en la administración de las n-PLGA PTX tres días antes (Figuras 2 y 3, marcado con número 1, en tiempo -3 días) de la generación del modelo de dolor (Figuras 2 y 3, marcado con número 2, en tiempo 0 días). La evaluación de los animales se realizó con el test de Randall-Sellito. En los 2 modelos de dolor crónico los animales fueron separados en 3 grupos experimentales: El grupo control (o sham) que corresponde a los animales que fueron sometidos al mismo procedimiento quirúrgico que los otros grupos experimentales pero sin realizar la inducción del cuadro doloroso. El grupo control positivo, el cual corresponde a los animales a los que se indujo el cuadro doloroso; es decir en el caso de la neuropatía se corta el nervio sural, mientras que en el caso de SHFS se estimula eléctricamente la pata. El tercer grupo corresponde al grupo experimental en el cual se administra las n-PLGA PTX y luego se genera el modelo de dolor crónico. En todos los casos los animales son evaluados hasta el día 14 post inducción del cuadro de dolor.

Los resultados obtenidos en ambos modelos experimentales mostraron que el grupo control (n=9) no manifestó cambios en su umbral del dolor como era esperado. Por otra parte, las ratas sometida al modelos de neuropatía (n=9) o SHFS (n=12) mostraron una disminución significativa de su umbral. Interesantemente, aquellos grupos que recibieron tratamiento previo con n-PLGA PTX y posteriormente recibieron un corte del nervio sural (n=5) o la generación de SHFS (n=5) mostraron un aumento en su umbral del dolor que se mantiene hasta el día 14 del estudio, tal como se muestra en las Figuras 2 y 3. Los resultados obtenidos en ambos modelos de

experimentación sustentan que el tratamiento con n-PLGA PTX previene el dolor crónico inducido por neuropatía o SHFS.

Efecto terapéutico (revertivo) de las n-PLGA PTX en modelos *in vivo*.

Utilizando los mismos modelos de dolor crónico antes descritos se desarrolló un

5 diseño experimental para probar el efecto terapéutico de las n-PLGA PTX. Para ello, se administraron las n-PLGA PTX 3 días después (Figuras 4 y 5, marcado con número 2, en tiempo 3 días) de realizar un corte en el nervio sural o estimulación SHFS (Figuras 4 y 5, marcado con número 1, en tiempo 0 días). Los resultados obtenidos mostraron que, en ambos casos, el grupo control no mostró variaciones en su umbral

10 del dolor. Respecto al modelo neuropático, las ratas que recibieron un corte en el nervio sural (grupo neuropatía, n=9) a partir del segundo día mostraron una disminución significativa de su umbral del dolor. Por otra parte, las ratas del grupo que recibió tratamiento con n-PLGA PTX (n=5) a los 3 días de recibir el corte del nervio sural mostraron un cambio significativo de su umbral de dolor, revirtiendo

15 completamente la neuropatía 2 días después de la administración de las nanopartículas y lo que se mantiene hasta el final del experimento, día 14. Los resultados obtenidos demostraron que la terapia con n-PLGA PTX tiene un efecto revertivo de la mononeuropatía generada experimentalmente en las ratas tal como se presenta en la Figura 4.

20 Los resultados antes mencionados fueron corroborados con el modelo de estimulación de alta frecuencia. En la Figura 5, se muestran los resultados obtenidos, donde se observa claramente que la administración de las n-PLGA PTX revirtió la disminución del umbral del dolor mostrado en las ratas sometidas a SHFS.

El efecto terapéutico de las n-PLGA PTX, también fue demostrado en un tercer modelo

25 de dolor crónico de monoartritis obtenido como se indicó anteriormente. La inyección con *Mycobacterium butyricum* produce un síndrome de artritis localizada, resultando ser estable entre cuatro y seis semanas luego de la inoculación, y se establece un

dolor persistente hiperalgésico y neurogénico, este cuadro puede ser mantenido por un periodo mayor de dos meses. El dolor es muy estable y adecuado para estudiar los efectos de fármacos con características antinociceptivas.

5 En el diseño experimental, se indujo a los tres grupos experimentales a la generación de monoartritis. De los grupos de animales, un grupo recibió una dosis única de pentoxifilina (Monoartritis+PTX), otro fue el control de monoartritis y el tercero (Monoartritis+ n-PLGA PTX) recibió tratamiento con nanopartículas a día 0 (Figura 6, marcado con número 1, en tiempo 0 días).

10 Los resultados obtenidos (Figura 6), muestran un claro aumento del umbral nociceptivo de los animales que recibieron tratamiento con nanopartículas, lo cual confirma los resultados obtenidos con los otros 2 modelos de estudio.

Ejemplo 4: Ensayos toxicológicos.

15 Para estudiar los posibles efectos tóxicos de las nanopartículas se realizó la evaluación de parámetros sanguíneos bioquímicos y hematológicos. Se obtuvieron muestras de sangre de ratas tratadas con nPLGA-PTX y sus respectivos controles. En el perfil bioquímico se analizaron los parámetros correspondientes al metabolismo renal y hepático junto con una evaluación de los parámetros hematológicos.

20 En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos, donde se observa que no hubo diferencias significativas en los parámetros analizados a los 3, 7 y 10 días después de la administración de las n-PLGA PTX. De igual manera los parámetros hematológicos medidos no presentaron alteraciones significativas, tal como muestra la Tabla 2.

Tabla 1. Análisis toxicológico de parámetros sanguíneos bioquímicos determinados a los 3, 7 y 10 días después de la administración de las n-PLGA PTX.

| Parámetro | Control (n=12) | n-PLGA PTX | | |
|----------------------------------|-------------------|----------------|----------------|-----------------|
| | | día 3 (n=3) | día 7 (n=3) | día 10 (n=3) |
| Proteína Total (gr/dL) | 5,8 ± 2,2 | 5,5 ± 0,9 | 6,2 ± 0,4 | 6,2 ± 0,1 |
| Albumina (gr/dL) | 3,3 ± 0,1 | 3,8 ± 0,4 | 3,5 ± 0,1 | 3,6 ± 0,1 |
| Globulinas (gr/dL) | 3,4 ± 0,4 | 2,1 ± 0,7 | 2,7 ± 0,5 | 2,6 ± 0,1 |
| Fosforo (mg/dL) | 8,7 ± 0,3 | 8,3 ± 0,4 | 7,9 ± 0,1 | 7,8 ± 0,0 |
| Calcio (mg/dL) | 9,9 ± 0,5 | 9,9 ± 0,2 | 10,2 ± 0,1 | 10,3 ± 0,1 |
| Bilirubina (mg/dL) | 0,06 ± 0,03 | 0,06 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,06 ± 0,01 |
| Fosfatasa Alcalina (U/L) | 288 ± 32 | 178 ± 1 | 184 ± 71 | 151 ± 32 |
| Lactato Deshidrogenasa LDH (U/L) | 421 ± 61 | 494 ± 244 | 579 ± 59 | 392 ± 7 |
| GTT (U/L) | 3,4 ± 1,5 | 5,0 ± 2,8 | 4,6 ± 0,7 | 5,0 ± 0,0 |
| ALT/GTP (U/L) | 62,6 ± 4,5 | 73,0 ± 1,4 | 75,6 ± 2,7 | 72,6 ± 2,9 |
| AST/GOT (U/L) | 110 ± 4 | 113,5 ± 18,5 | 130,5 ± 18,8 | 103,4 ± 5,1 |
| Nitrógeno Ureico (mg/mL) | 15,5 ± 2,5 | 12,3 ± 1,3 | 12,5 ± 0,0 | 12,6 ± 0,8 |
| Creatinina (mg/mL) | 0,6 ± 0,006 | 0,30 ± 0,01 | 0,30 ± 0,00 | 0,35 ± 0,07 |

Tabla 2. Análisis toxicológico de parámetros sanguíneos hematológicos determinados a los 3, 7 y 10 días después de la administración de las n-PLGA PTX.

| Parámetro | Control (n=12) | n-PLGA PTX | | |
|-------------------------------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|
| | | día 3 (n=3) | día 7 (n=3) | día 10 (n=3) |
| Leucocitos totales (miles/ μ L) | 5,4 \pm 1,8 | 5,7 \pm 0,9 | 5,9 \pm 0,9 | 5,7 \pm 0,8 |
| Segmentados (miles/ μ L) | 2,1 \pm 0,8 | 1,4 \pm 0,4 | 0,9 \pm 0,2 | 1,3 \pm 0,1 |
| Linfocitos (miles/ μ L) | 4,7 \pm 1,5 | 4,2 \pm 0,5 | 4,9 \pm 0,7 | 4,1 \pm 0,7 |
| Eritrocitos (miles/ μ L) | 5,9 \pm 1,0 | 7,1 \pm 0,8 | 7,0 \pm 0,1 | 7,2 \pm 0,1 |
| Hematocrito (%) | 30,5 \pm 7,5 | 40,8 \pm 4,4 | 39,9 \pm 1,2 | 40,8 \pm 0,8 |
| Hemoglobina (gr/dL) | 12,4 \pm 1,8 | 13,9 \pm 1,3 | 13,5 \pm 0,3 | 13,8 \pm 0,2 |
| VCM (fL) | 58,9 \pm 3,5 | 57,8 \pm 1,2 | 57,1 \pm 1,5 | 58,9 \pm 0,5 |
| CHCM (gr/dL) | 27 \pm 3,5 | 34,3 \pm 0,4 | 33,8 \pm 0,3 | 33,8 \pm 0,1 |

5 Referencias

- * Amin A, Aitun M, Thakker G, Patel P, Vyas P, Patel R, Patel J, Abramson S. A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. Proc Natl Acad Sci USA. (1996), 93: 14014-14019.
- * Andine P, Rudolph KA, Fredholm BB, Hagberg H. Effect of propentofylline (HWA 285) on extracellular purines and excitatory amino acids in CA1 of rat hippocampus during transient ischaemia. Br J Pharmacol (1990), 100: 814-818.
- * Baran ET, Ozer N, Hasirci V. In vitro half-life of nanoencapsulated L-

- asparaginase. *J Mat in Med* (2002), 13: 1113-1121.
- * Berchane NS, Carson KH, Rice-Ficht AC, Andrews MJ. Effect of mean diameter and polydispersity of PLG microspheres and drug release: experiment and theory. *Int J Pharm* (2007).
 - 5* Bertram JP, Jay SM, Hynes SR, Robinson R, Criscione JM, Lavik EB. Functionalized poly (lactic-co-glycolic acid) enhances drug delivery and provides chemical moieties for surface engineering while preserving biocompatibility. *Acta Biomater*. 2009 Oct;5(8):2660-71. Epub 2009 May 4.
 - * Born PJ, Muller-Schulte D. Nanoparticle in drug delivery and environmental
10 exposure: same size, same risk?. *Nanomedicine* (2006), 1:235-249.
 - * Butler S.H., Godefroy F., Besson J.-M, Weil-Fugazza J. A limited arthritic model studies in a model of monoarthritis in the rat. *Pain* (1992), 48: 73-81.
 - * Carmignoto G. Astrocyte neurone crossstalk variants of the same language?. *Trend Pharmacol Sci* (2000), 10: 373-375.
 - 15* Carmignoto G. Reciprocal communication system between astrocytes and neurones. *Prog Neurobiol* (2000), 8:561-581.
 - * Cascone MG, Lazzeri L, Carmignani C. Galafin nanoparticles produced by a simple W/O emulsion as delivery system for methotrexate. *J Mat Sci: Mat in Med* (2002), 13523-13526.
 - 20* Chan, J. M. et al. PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials* 30, 1627–1634 (2009)
 - * Chauhan NB, Siegel GJ, Feinstein DL. Propentofylline attenuates tau hyperphosphorylation in Alzheimer's Swedish mutant model Tg 2576. *Neuropharmacol* (2005), 48(1): 93-104.
 - 25* Chen, J. & Davis, S. S. The release of diazepam from poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres. *Journal of Microencapsulation* 19, 191–201 (2002).
 - * Cheng, L., Jin, C., Lv, W., Ding, Q. & Han, X. Developing a Highly Stable

PLGA-mPEG Nanoparticle Loaded with Cisplatin for Chemotherapy of Ovarian Cancer. PLoS ONE 6, e25433 (2011).

- Chizh BA. Novel approaches to targeting glutamate receptors for the treatment of the chronic pain. *Aminoacid* (2002), 23: 169-176.
- 5• Cho H, Chung D, Jeongho A. Poly(D-Lactide-ran-epsilon caprolactone)-poly(ethyleneglycol)-poly(D-L lactide-ran-epsilon caprolactone) as parental drug-delivery system. *Biomaterials* (2004), 25(17): 3733-3742.
- Chou R, Huffman LH; American Pain Society; American College of Physicians. Medications for acute and chronic low back pain: a review of the evidence for an
10 American Pain Society/American College of Physicians clinical practice guideline. *Ann Intern Med.* (2007), 147(7):505-14.
- Codere T, Katz J, Vaccarino A, Melzack R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* (1993), 52: 258-285.
- 15• Constandil L, Pelissier T, Soto-Moyano R, Mondaca M, Sáez H, Laurido C, Muñoz C, López Nandy, and Hernández A. Interleukin-1 β increases spinal cord wind-up activity in normal but not in monoarthritic rats. *Neuroscience Letters* (2003), 342: 139-142.
- Coutaux A, Adam F, Willer J-C, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* (2005), 72: 359-371.
- 20 • Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release.* 2012 Jul 20; 161(2):505-22. Epub 2012 Feb 4.
- DeJong WH, Geertsma RE, Roszek B. Nanotechnology in medical applications possible risk for human health. Report 265001 002/2005 National institute for public
25 health and environment (RIVM). Bilthoven, The Netherlands.
- DeLeo J, Toth L, Schubert P, Rudolphi K, Kreutzberg. GW. Ischemia-induced

neuronal cell death, calcium accumulation, and glial response in the hippocampus of the Mongolian gerbil and protection by propentofylline (HWA 285). *J Cereb Blood Flow Metab* (1987), 7: 745-751.

- 5 * DeLeo JA, Colburn RW. Proinflammatory cytokines in glial cells: Their role in neuropathic pain. In: *Cytoquines and Pain (Progress in inflammation Research)*. Birkhauser Basel Switzerland (1999): 159-182.
- 10 * Detloff MR, Fisher LC, McGaughy V, Longbrake E, Popovich PG, Basso DM. Remote activation of microglia and pro-inflammatory cytokines predict the onset and severity of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* (2008), 212: 337-347.
- * Doubell TP, Mannion RJ, Woolf CJ. The dorsal Horn: state-dependent sensory processing, plasticity and the generation of pain. En: Wall P, Melzack R, editores. *Textbook of Pain*. 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone (2003): 165-182.
- 15 * Duncan R. The Dawning era of polymer therapeutics. *Nat Rev Drug Disc* (2003), 2:347-360.
- * ESF. European Science Foundation (2005) Policy briefing (ESF). ESF scientific forward look on nanomedicine (IREG). Strasbourg, France (ISBN 2-912049-520).
- * ESP. European Technology Platform on Nanomedicine (2005). Vision paper and basis for a strategic research agenda for nanomedicine. European commission
20 Luxemburg office for official publications of the European commission (ISBN 92-894-9599-5).
- * Fernández-Carballido A, Pastoriza P, Barcia E, Montejo C, Negro S. PLGA/PEG-derivative polymeric matrix for drug delivery system applications: Characterization and cell viability studies. *Int J Pharm*. 2008 Mar 20;352(1-2):50-7.
25 Epub 2007 Oct 18.
- * Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* (2005), 5: 161-171.

- Fonnum F, Johnsen A, Hassel B. Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. *Glia* (1997), 21: 106-113.
- Frampton JE, Brogden RN. Pentoxifylline (oxpentifylline). A review of its therapeutic efficacy in the management of peripheral vascular and cerebrovascular disorders. *Drugs Aging*. 1995 Dec;7(6):480-503.
- 5 • Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm.* (2004), 282(1-2):1-18.
- Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—a review. *Int J Pharm.* 2011 Aug 30;415(1-2):34-52. Epub 2011 May 27.
- 10 • Fu KY, Light AR, Matsushima GK, Maixner W. Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hind paw. *Brain Res.* 1999 Apr 17;825(1-2):59-67.
- Garrison C, Dougherty P, Kajander K, Carlton S. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Research* (1991) 565:1-7.
- Goepferich A. Mechanism of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* (1996), 17 (2): 103-114.
- Goicoechea C, Martin M. Mecanismos periféricos y centrales del dolor. *Reumatol Clin* (2006), 2 supl1: S5-S9.
- 20 • Hains BC, Waxman SG. Activated microglia contributes to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci* (2006), 26, 4308–4317.
- Hassel B, Paulsen R, Johnsen A, Fonnum F. Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain res.* (1992), 576: 120-124.
- 25 • Haydon PG. Glia: listening and talking to the synapse. *Nature Reviews Neuroscience* (2001), 2: 185- 193.

- * Husmann M, Schenderlein S, Luck M, Lindner H, Kleinebudde P. Polymer erosion in PLGA microparticles produced by phase separation method. *Int J Pharm* (2002), 242(1-2):277-280.
- * Illum L, Davis SS, Muller RH, Mak E, West P. The organ distribution and
5 circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a block copolymer-proloxamine 908. *Life Sci* (1987), 40(4): 367-374.
- * Inoue A, Ikoma K, Morioka N, Kumagai K, Hashimoto T, Hide I, Nakata Y. Interleukin-1 β induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system. *J Neurochem* (1999), 73: 2206-2213.
- 10* Ito F, Fujimori H, Makino K. Incorporation of water-soluble drugs in PLGA microspheres. *Colloids Surf B Biointerfaces* (2007), 54(2):173-178.
- * Jayo M, Cisneros J. "Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio" Institute of Laboratory Animal Resources, commission on Life Sciences National Research Council Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional De
15 Medicina. 1999. Copyright National Academy Press, Washington, DC (1998).
- * Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC, Schwendeman SP. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005 Jan 10;57(3):391-410.
- * Kipp JE. The role of solid nanoparticle technology in the parental delivery of
20 poorly water-soluble drugs. *Int J Pharmacol* (2004), 284:109-122.
- * Kreuzberg GW. Microglia a sensor for pathological event in the CNS. *Trends Neurosci* (1996), 19 (8): 312-318.
- * Kumar N, Ravikumar MN, Domb AJ. Biodegradable block copolymers. *Adv Drug Deliv Rev* (2001), 53(1): 23-44.
- 25* Ledebøer A, Liu T, Shumilla J, Mahoney J, Vijay S, Gross M, Vargas J, Sultzbaugh L, Claypool MD, Sanftner LM, Watkins LR, Johnson KW. The glial modulatory drug AV411 attenuates mechanical allodynia in rats models of neuropathic

- pain. *Neuron Glia Biol.* (2007), 2: 279-291.
- Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm.* (2008), 363(1-2):26-39.
 - Li X, Xu Y, Chen G, Wei P, Ping Q: PLGA nanoparticles for the oral delivery of 5-Fluorouracil using high pressure homogenization/emulsification as the preparation method and in vitro/in vivo studies. *Drug Dev Ind Pharm* 2008, 34:107-115.
 - Lipton SA, Singel DJ, Staimier JS. Nitric oxide in the central nervous system. *Prog Brain res* (1994), 103: 359- 354.
 - Liu J, Feng X, Yu M, Xie W, Zhao X, Li W, Guan R, Xu J. Pentoxifylline attenuates development of hyperalgesia in rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* (2007), 412: 268-272.
 - Livingston A. Pain and analgesia in non-mammalian species. Thalhammer JG, Short CE. Edición. *Proceedings of do Animal Have Pain?, an official satellite symposium of the 9 World Congress on Pain.* Vienna, IASP Press 16, (1999).
 - 15• Mantyh PW, Clohisey DR, Koltzenburg M, Hunt SP. Molecular mechanisms of cancer pain. *Nat Rev Cancer* (2002), 2(3):201-9.
 - Meller ST, Dykstra C, Grzybycki D, Murphy S, Gebhart GF. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology.* 1994 Nov;33(11):1471-8.
 - 20• Mestre C, Pélissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschaller A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* (1994), 32(4): 197-200.
 - Mika J, Osikowicz M, Makuch W, Przewocka B. Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and 25 mouse models of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* (2007), 560: 142-149.
 - Mika J. Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness. *Pharmacol Reports* (2006), 60: 297-307.

- * Miller RF. D-serines a glial modulator of nerve cells. *Glia* (2004), 47(3): 275-283.
- * Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nature Neuroscience* (2009), 10: 23- 36.
- 5* Nogushi K, R. Dubner, M. A. Ruda. Proenkephalin mRNA in spinal dorsal horn neurons is induced by peripheral inflammation and is co-localized with Fos and Fos-related proteins. *Neuroscience* (1992), 48: 561 -570.
- * Paeile J, Bilbery N. El Dolor, de lo molecular a lo clínico, Eds. 3^o, Editorial Mediterráneo, Santiago - Buenos Aires. (2005): 23-41.
- 10* Parkinson FE, Paterson ARP, Young JD, Cass CE .Inhibitory effects of propentofylline on [3H] adenosine influx. *Biochem Pharmacol* (1993), 46: 891–896.
- * Parkinson FE, Fredholm BB. Effects of propentofylline on adenosine A1 and A2 receptors and nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporters: quantitative autoradiographic analysis. *Eur J Pharmacol* (1991) 202, 361–366.
- 15* Platzter C, Fritsch E, Eisner T, Lehmann MH, Volk HD, Prosch S: Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur J Immunol* (1998), 29: 3098–3104.
- * Porter JM, Cutler BS, Lee BY, Reich T, Reichle FA, Scogin JT, Strandness
20 DE. Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent claudication: multicenter controlled double-blind trial with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients. *Am Heart J*. 1982 Jul;104(1):66-72.
- * Putney SD, Burke PA. Improving protein therapeutics with sustained-release formulations. *Nat Biotechnol* (1998), 16 (2): 153-157.
- 25* Ribeiro-Costa, R. M. et al. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *Journal of Microencapsulation* 21, 371–384

- (2004).
- * Richardson JD, Vasko MR. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. JPET (2002), 302: 839-845.
 - * Rivera A, Cabrero M. Manejo y tratamiento de los animals exóticos. Ediciones Mayo S A, Barcelona, España, (2006): 100.
 - * Rosca JD, Watari F, Uo M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. J Control Release. 2004 Sep 30;99(2):271-80.
 - * Rother, M., Kittner, B., Rudolphi, K, Robner M, Labs KH. HWA 285 (propentophylline) a new compound for the treatment of both vascular dementia and dementia of the Alzheimer's type. Ann NY Acad Sci (1998), 47: 705-711.
 - * Ruan G, Feng S S, Li Q T. Effects of materials hydrophobicity on physical properties of polymeric microspheres formed by double emulsion process. J Control Release (2002), 84 (3): 151-160.
 - 15* Scholz J, Woolf C. Can we conquer pain? Nature Neuroscience (2002), 5: 1062-1067.
 - * Schubert P, Rudolphi K. Interfering with the pathologic activation of microglial cells and astrocytes in dementia. Alzheimer Disease and Associates Disorders (1998), 12: S21-8.
 - 20* Schubert P, Ogata T, Miyazaki H, Marchini C, Ferroni S, Rudolphi K. Pathological immuno-reactions of glial cells in Alzheimer's disease and possible sites of interference. J Neural Transm Suppl. (1998); 54: 167-74.
 - * Schubert P, Morino T, Miyazaki H, Ogata T, Nakamura Y, Marchini C, Ferroni S. Cascading glia reactions: a common pathomechanism and its differentiated control by cyclic nucleotide signaling. Ann N Y Acad Sci. (2000), 903: 24-33.
 - 25 * Shen M R, Chiang P H, Yang R C, Hong C Y, and Chen S S. Pentoxifylline

- stimulates human sperm motility both in vitro and after oral therapy. *Br J Clin Pharmacol.* 1991 June; 31(6): 711–714.
- Shi, J., Xiao, Z., Votruba, A. R., Vilos, C. & Farokhzad, O. C. Differentially Charged Hollow Core/Shell Lipid-Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticles for Small Interfering RNA Delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 7027–7031 (2011).
 - Shinoda I, Furukawa Y, Furukawa S. Stimulation of nerve growth factor synthesis/secretion by propentofylline in cultured mouse astroglial cells. *Biochem Pharmacol* (1990), 39: 1813–1816.
 - Si Q, Nakamura Y, Ogata T, Kataoka K, Schubert P. Differential regulation of microglial activation by propentofylline via cAMP signaling. *Brain Res* (1998), 23: 97-104.
 - Solicitud de patente WO9702022, Biocompatible and biodegradable nanoparticles designed for proteinaceous drugs absorption and delivery; Univ liege; Grandfils Christian; Jerome Robert. Fecha de publicación 02-07-1996.
 - 15• Solicitud de patente WO2008054042, Bio-degradable nanoparticles of poly(DL-lactide-co-glycolide) encapsulating ciprofloxacin HCl having an extended-release property, and manufacturing method thereof; Nah Jas Woon; Jung Teok Rae; Jeong Young. Fecha de publicación 05-01-2007.
 - Solicitud de patente WO2007127363, Coatings containing multiple drugs; Micell Technologies Inc; Deyoung James; Taylor Doug; McClain Jim; Smoke Clint. Fecha de publicación 26-04-2007.
 - Solicitud de patente WO2009147372, Drug delivery composition; Univ Belfast; Mccoy Colin Peter; Gorman Sean Patrick; Jones David Simon. Fecha de publicación 28-05-2009.
 - 25• Solicitud de patente WO2010009335, Drug delivery medical device; Micell Technologies Inc; McClain James B; Taylor Douglas; Neet John. Fecha de publicación

- 16-07-2009.
- WORLD PATENT OFFICE
- 5
- * Solicitud de patente WO2008128123, Formulation of active agent loaded activated piga nanoparticles for targeted cancer nano-therapeutics; Univ North Texas; Braden Arthur R C; Vishwanatha Jamboor K; Kafka Erica; Fecha de publicación 11-04-2008.
 - * Solicitud de patente WO2010111238, Improved biodegradable polymers; Micell Technologies Inc; Taylor Douglas; McClain James B; Schmitt Edward. Fecha de publicación 23-03-2010.
 - * Solicitud de patente WO2005084710, Nanocell drug delivery system; 10 Massachusetts Inst Technology; Sengupta Shiladitya; Zhao Ganlin; Capila Ishan; Eavarone David. Fecha de publicación 02-03-2005.
 - * Sweitzer SM, Colburn R, Rutkowski M., DeLeo J. Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1 β expression that correlates with pain behavior in the rat. *Brain Res* (1999), 829:208-221.
 - 15* Sweitzer SM, Schubert P, DeLeo J.A., Propentofylline, a glial modulating agent, exhibits antialodynic properties in a rat model of neuropathic pain, *J Pharmacol Exp Ther* 297 (2001), 1210-1217.
 - * Sweitzer SM, DeLeo J. Propentofylline: glial modulation, neuroprotection and alleviation of chronic pain. *Handb Exp Pharmacol* (2011), 200: 235 -250.
 - 20* Tawfik VL, Regan MR, Haenggeli C, LaCroix-Fralish ML, Nuttle- McManemy N, Perez N, Rothstein JD, DeLeo JA. Propentofylline induced astrocyte modulation leads to alterations in glial glutamate promoter activation following spinal nerve transection. *Neuroscience* (2008), 152: 1086 -1092.
 - * Temjan G, Bonica J. Spinal mechanisms and their modulation. En: Loesser J, 25 Butler S, Chapman CR, Turk DC, editores. *Bonica's Management of Pain*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; (2001), 73-152.

- * Tikka T, Fiebich B, Goldsvein G, Keinänen R, Kaistínaaho J. Minocycline, a tetracycline derivate, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibition activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* (2001), 21: 2580-2588.
- * Turk DC, Okifuji A. Pain terms and taxonomies of pain. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC, editors. *Cole: Pain Management: pp. 23-30* *Eonics's management of pain*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:17-25
- * Waeckerle-Men Y, Groettrup M. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* (2005), 57(3): 475-482.
- 10* Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain. *TINS*. (2001), 24: 450-455.
- * Watkins LR, Maier SF. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contributes to pathological pain states. *Physiol Rev* (2002), 82 (4): 981-1011.
- * Woolf C, Salter M. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 15 (2000), 288: 1765-1768.

Reivindicaciones

1. Método de síntesis de nanopartículas de ácido poli (láctico-glicólico) (PLGA) con pentoxifilina encapsulada, que comprende las etapas de a) disolución del polímero de PLGA en un solvente; b) disolución de pentoxifilina en agua purificada; c) adición de la pentoxifilina disuelta en la etapa b) al polímero de PLGA disuelto en la etapa a) previamente enfriado; d) emulsión de la mezcla de la etapa c); e) adición de una solución de un agente emulsificante en agua purificada; f) homogenización de la mezcla de la etapa e); g) dilución de la homogenización de la etapa f) en agua purificada; h) evaporación del solvente donde se disolvió el polímero de PGLA en la etapa a); i) lavado de las nanopartículas con agua purificada; j) colección de las nanopartículas en solución.
2. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el polímero de PLGA utilizado en la etapa a) tiene un rango de proporción de ácido poliláctico a ácido poliglicólico que va desde 10% de ácido poliláctico con 90% de ácido poliglicólico, hasta 90% de ácido poliláctico con 10% de ácido poliglicólico o cualquier combinación que se encuentre dentro de esos rangos.
3. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el polímero de PLGA utilizado en la etapa a) tiene una proporción de 50% de ácido poliláctico y 50% de ácido poliglicólico.
4. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el solvente utilizado en la etapa a) es diclorometano o cloroformo.
5. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la proporción de polímero de PLGA a pentoxifilina utilizada va desde 0,01% PLGA y 0,0003% pentoxifilina, hasta 9% PLGA y 0,3% pentoxifilina o cualquier combinación que se encuentre dentro de esos rangos.
6. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la proporción de polímero de PLGA a pentoxifilina utilizada es 0,3% de PLGA y 0,01% de pentoxifilina.
7. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 1, en que la etapa d) de emulsión de la mezcla de la etapa c) se realiza utilizando un sonicador.
8. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 7, en que la emulsión en el sonicador se realiza con una frecuencia de 10 a 30 KHz, a una potencia de 80 a 170 watts, durante 40 a 80 segundos.

9. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 7, en que la emulsión en el sonicador se realiza con una frecuencia de 20 KHz, a una potencia de 130 watts, durante 60 segundos.
10. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el agente emulsificante utilizado en la solución de la etapa e) es polivinil alcohol (PVA), polietilenglicol o sus derivados, o emulsificantes catiónicos y aniónicos de uso farmacéutico o cualquier combinación de ellos.
11. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 10, cuando se utiliza PVA en la etapa e), éste está hidrolizado en 80 a 95%.
12. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 10, cuando se utiliza PVA en la etapa e), éste está hidrolizado en 87-89%.
13. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 10, cuando se utiliza PVA en la etapa e), la solución de PVA en agua purificada comprende 0,1 a 5% p/v de PVA.
14. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 10, cuando se utiliza PVA en la etapa e), la solución de PVA en agua purificada comprende 0,5% p/v de PVA.
15. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 1, en que la homogenización de la etapa f) se realiza mediante un sonicador, mediante un vórtex, mediante un ultra-turrax, mediante homogenizadores alta presión o mediante homogenizadores de cualquier tipo o cualquier combinación de ellos.
16. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 15, en que la homogenización de la etapa f) se realiza utilizando un sonicador con una frecuencia de 10 a 30 KHz, a una potencia de 90 a 170 watts, durante 5 a 70 segundos.
17. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 15, en que la homogenización en el sonicador se realiza con una frecuencia de 20 KHz, a una potencia de 130 watts, durante 15 segundos y se repite luego durante 40 segundos.
18. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 1, en que la evaporación del solvente en la etapa h) se realiza mediante agitación de la solución, corrientes de gases como nitrógeno u oxígeno, calor, liofilización o cualquier combinación de ellas.
19. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 18, en que la evaporación del solvente en la etapa h) se realiza por agitación orbital moderada (70 a 170 rpm) a temperatura ambiente

- durante 5 a 20 horas.
20. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 1, en que la colección de las nanopartículas en solución de la etapa j) se realiza por filtración, filtración y centrifugación, centrifugación diferencial, centrifugación en gradiente o cualquier combinación de ellas.
 21. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 20, en que las nanopartículas se coleccionan por filtración y centrifugación mediante un filtro con corte 80 a 120 KDa y centrifugando a 3500 a 5500G durante el tiempo necesario para obtener una solución con nanopartículas.
 22. Método de síntesis de acuerdo a la reivindicación 21, en que la filtración para la colección de las nanopartículas se realiza mediante un filtro con corte 100 KDa y centrifugando a 4500G durante el tiempo necesario para obtener una solución con nanopartículas.
 23. Una formulación farmacéutica para aliviar y prevenir el dolor crónico, que comprende nanopartículas de ácido poli (láctico-glicólico) (PLGA) con pentoxifilina encapsulada, en una forma que permite la administración de una dosis única.
 24. Formulación farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 23, en donde las nanopartículas de ácido poli (láctico-glicólico) (PLGA) tienen un rango de proporción de ácido poliláctico a ácido poliglicólico que va desde 10% de ácido poliláctico con 90% de ácido poliglicólico, hasta 90% de ácido poliláctico con 10% de ácido poliglicólico o cualquier combinación que se encuentre dentro de esos rangos.
 25. Formulación farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 23, en donde las nanopartículas de ácido poli (láctico-glicólico) (PLGA) tienen una proporción de 50% de ácido poliláctico y 50% de ácido poliglicólico.
 26. Formulación farmacéutica de acuerdo a las reivindicaciones 23 a 25, en donde las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina tienen un tamaño homogéneo entre 150 a 410 nm.
 27. Formulación farmacéutica de acuerdo a las reivindicaciones 23 a 25, en donde las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina tienen un tamaño homogéneo de 250 nm.
 28. Formulación farmacéutica de acuerdo a las reivindicaciones 23 a 27, en donde las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina son esféricas, con una superficie lisa e

- hidrofílica, un cascarón polimérico y una cavidad central donde se encuentra la pentoxifilina encapsulada.
29. Formulación farmacéutica de acuerdo a las reivindicaciones 23 a 28, en donde las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina poseen una carga superficial negativa con un valor entre -24 y -13 mV.
 30. Formulación farmacéutica de acuerdo a las reivindicaciones 23 a 28, en donde las nanopartículas de PLGA cargadas con PTX poseen una carga superficial negativa con un valor de -18,5 mV.
 31. Formulación farmacéutica de acuerdo a las reivindicaciones 23 a 30, en donde la proporción de pentoxifilina encapsulada en las nanopartículas de PLGA es entre 1µg de pentoxifilina en 10µL de solución de nanopartículas, hasta 3µg de pentoxifilina en 10µL de solución de nanopartículas o cualquier proporción que se encuentre dentro de estos rangos.
 32. Formulación farmacéutica de acuerdo a las reivindicaciones 23 a 30, en donde la proporción de pentoxifilina encapsulada en las nanopartículas de PLGA es 2µg de pentoxifilina en 10µL de solución de nanopartículas.
 33. Formulación farmacéutica de acuerdo a las reivindicaciones 23 a 32, en donde las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina son estables y no presentan cambios significativos en el tamaño cuando son expuestas a baja temperatura o a liofilización.
 34. Formulación farmacéutica de acuerdo a las reivindicaciones 23a 33, que además comprende cualquier aditivo, agente o coadyuvante farmacéuticamente adecuado.
 35. Formulación farmacéutica de acuerdo a las reivindicaciones 23 a 34, en donde la administración de la dosis única es vía intratecal, vía intravenosa, o vía intramuscular.
 36. Formulación farmacéutica de acuerdo a las reivindicaciones 23 a 35, en donde la dosis única de formulación farmacéutica de liberación lenta, controlada y sostenida de las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina con efecto farmacológico de la presente invención está en el rango de 0,001 a 0,1 mg de pentoxifilina encapsulada/kilo de peso corporal del sujeto que sufre o se sabe que sufrirá dolor crónico.
 37. Formulación farmacéutica de acuerdo a las reivindicaciones 23 a 35, en donde la dosis única de formulación farmacéutica de liberación lenta, controlada y sostenida de las

- nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina con efecto farmacológico de la presente invención es de 0,01 mg de pentoxifilina encapsulada /kilo de peso corporal del sujeto que sufre o se sabe que sufrirá dolor crónico.
38. Uso de nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina, que sirve para la fabricación de una formulación farmacéutica útil en el tratamiento del alivio y prevención del dolor crónico mediante la administración de una dosis única.
 39. Uso de acuerdo a la reivindicación 38, en donde las nanopartículas de ácido poli (láctico-glicólico) (PLGA) tienen un rango de proporción de ácido poliláctico a ácido poliglicólico que va desde 10% de ácido poliláctico con 90% de ácido poliglicólico, hasta 90% de ácido poliláctico con 10% de ácido poliglicólico o cualquier combinación que se encuentre dentro de esos rangos.
 40. Uso de acuerdo a la reivindicación 38, en donde las nanopartículas de ácido poli (láctico-glicólico) (PLGA) tienen una proporción de 50% de ácido poliláctico y 50% de ácido poliglicólico.
 41. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 40, en donde las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina tienen un tamaño homogéneo entre 150 a 410 nm.
 42. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 40, en donde las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina tienen un tamaño homogéneo de 250 nm.
 43. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 42, en donde las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina son esféricas, con una superficie lisa e hidrofílica, un cascarón polimérico y una cavidad central donde se encuentra la pentoxifilina encapsulada.
 44. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 43, en donde las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina poseen una carga superficial negativa con un valor entre -24 y -13 mV.
 45. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 43, en donde las nanopartículas de PLGA cargadas con PTX poseen una carga superficial negativa con un valor de -18,5 mV.
 46. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 45, en donde la proporción de pentoxifilina encapsulada en las nanopartículas de PLGA es entre 1µg de pentoxifilina en 10µL de solución de nanopartículas, hasta 3µg de pentoxifilina en 10µL de solución de

- nanopartículas o cualquier proporción que se encuentre dentro de estos rangos.
47. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 45, en donde la proporción de pentoxifilina encapsulada en las nanopartículas de PLGA es 2µg de pentoxifilina en 10µL de solución de nanopartículas.
 48. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 47, donde las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina son estables y no presentan cambios significativos en el tamaño cuando son expuestas a baja temperatura o a liofilización.
 49. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 48, en donde la formulación farmacéutica además comprende cualquier aditivo, agente o coadyuvante farmacéuticamente adecuado.
 50. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 49, donde la administración de la dosis única es vía intratecal, vía intravenosa, o vía intramuscular.
 51. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 50, en donde la dosis única de formulación farmacéutica de liberación lenta, controlada y sostenida de las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina con efecto farmacológico de la presente invención está en el rango de 0,001 a 0,1 mg de pentoxifilina encapsulada/kilo de peso corporal del sujeto que sufre o se sabe que sufrirá dolor crónico.
 52. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 38 a 50, en donde la dosis única de formulación farmacéutica de liberación lenta, controlada y sostenida de las nanopartículas de PLGA cargadas con pentoxifilina con efecto farmacológico de la presente invención es de 0,01 mg de pentoxifilina encapsulada /kilo de peso corporal del sujeto que sufre o se sabe que sufrirá dolor crónico.

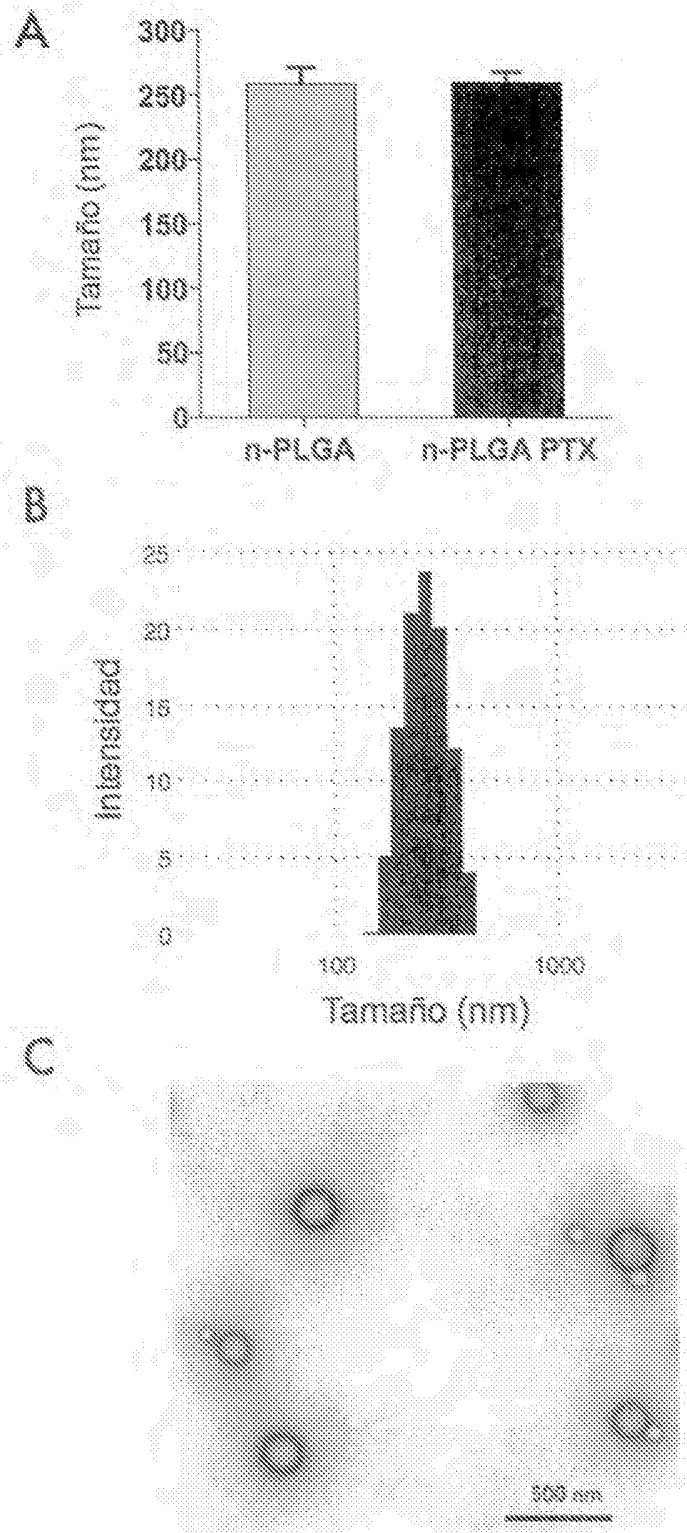


Figura 1

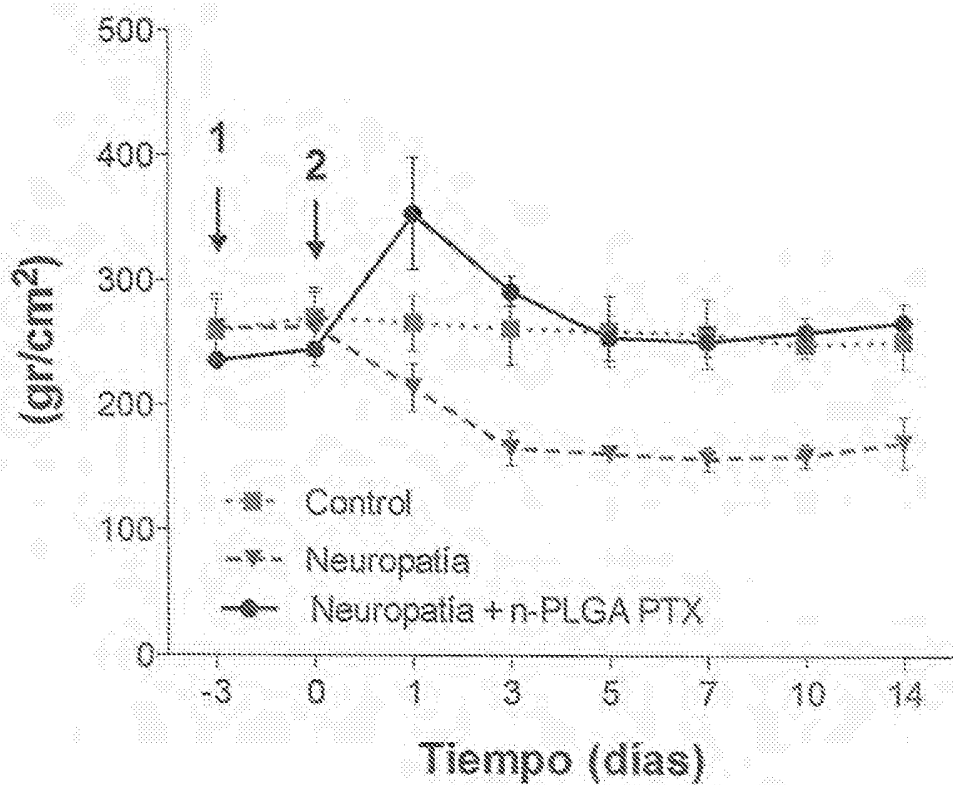


Figura 2

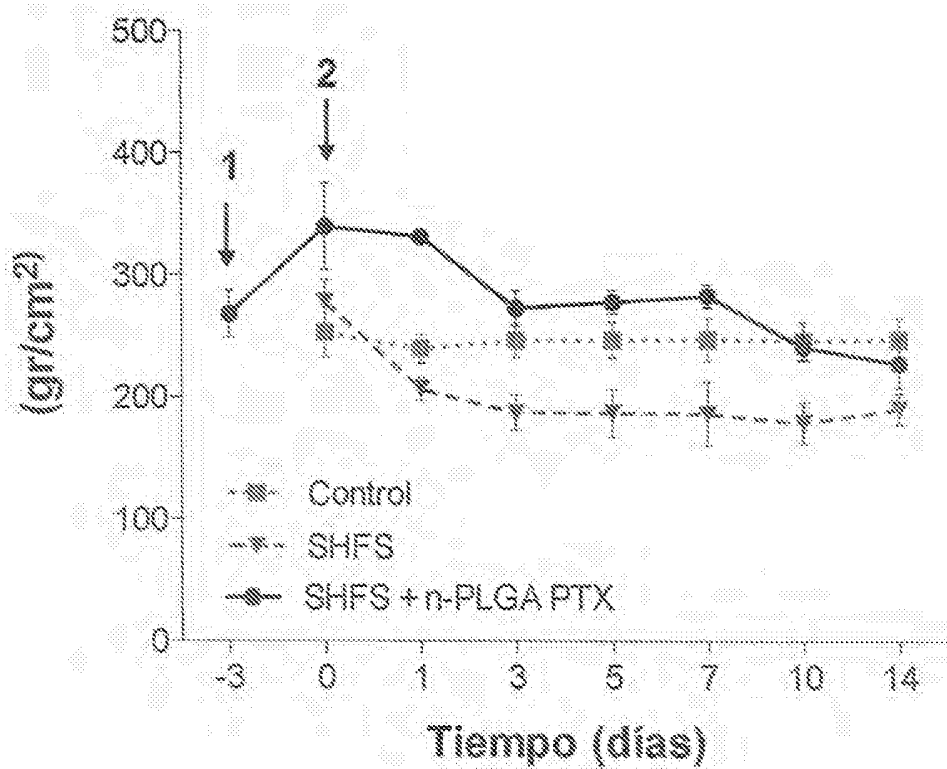


Figura.3

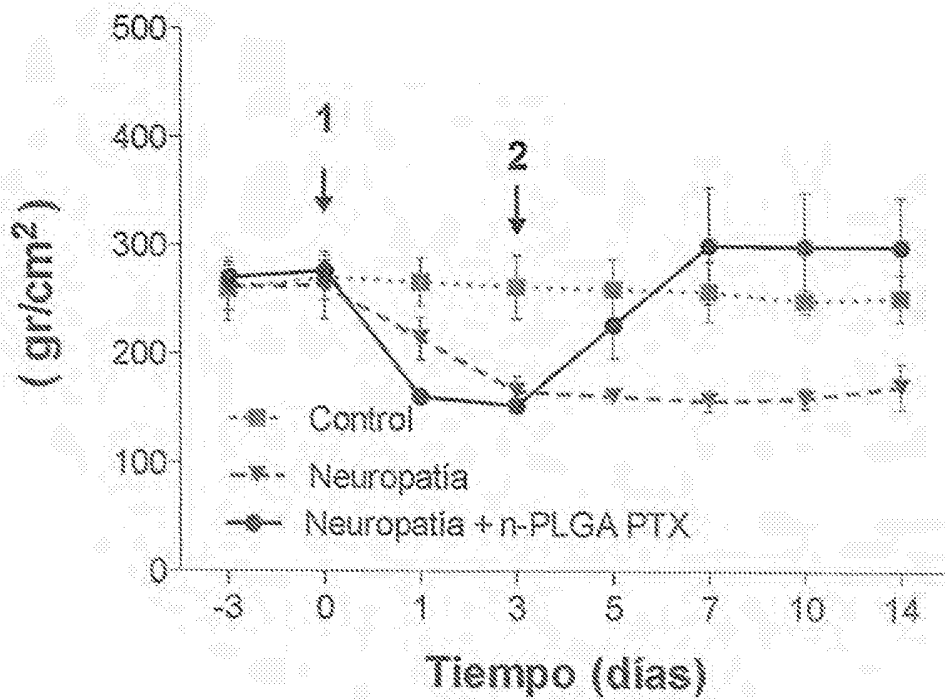


Figura 4

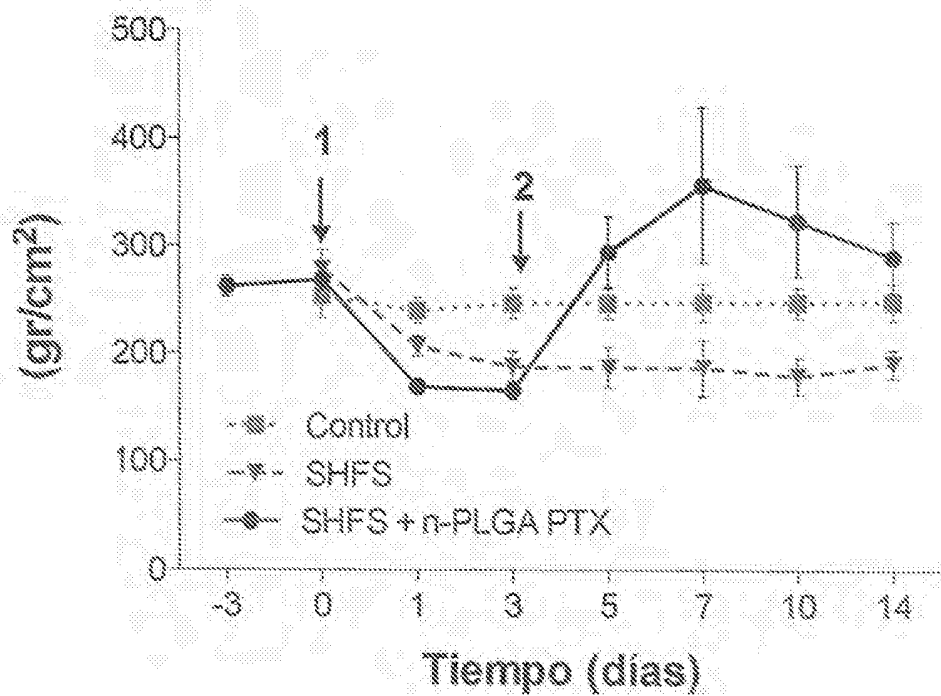


Figura 5

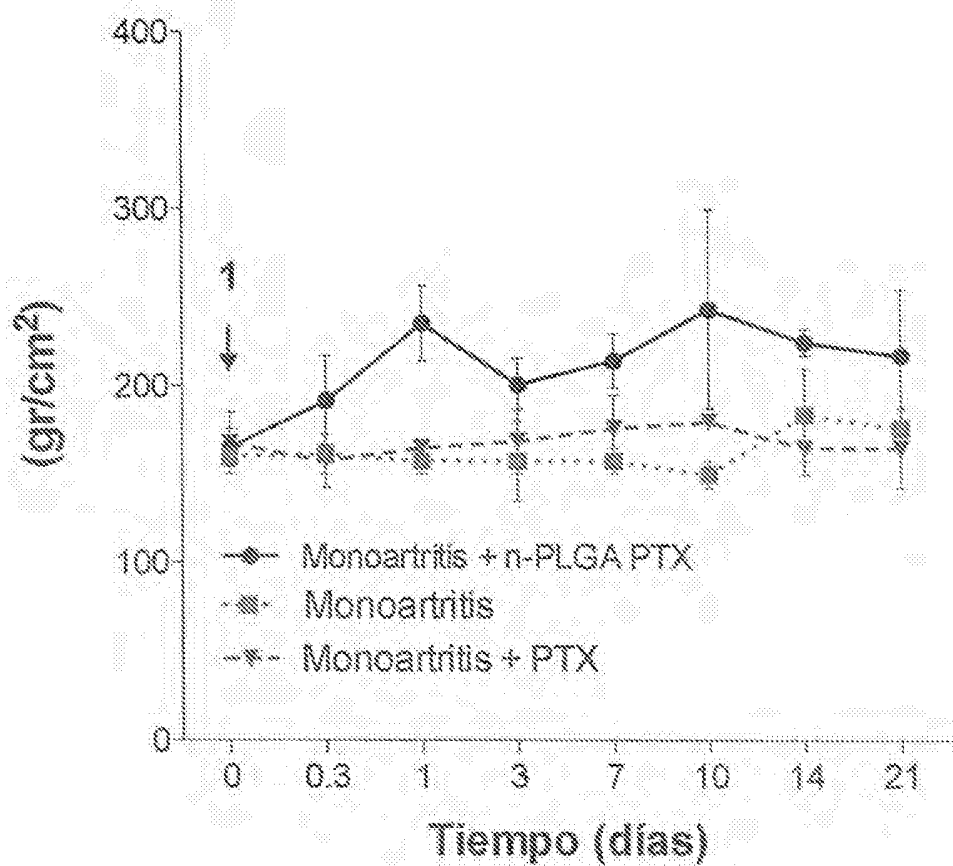


Figura 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CL2013/000084

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

B82Y, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, REGISTRY, CAS, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | VARSHOSAZ JALEH et al. Enhancement of oral bioavailability of pentoxifylline by solid lipid nanoparticles. Journal of Liposome Research JUN 2010 00/06/2010 VOL: 20 No: 2 Pags: 115-123 ISSN 0898-2104 Doi: doi:10.3109/08982100903161456 | 1-52 |
| A | US 2009263491 A1 (KREUTER JORG et al.) 22/10/2009, paragraphs [0003], [0019], [0034], [0035], [0042], [0043], [0090], [0095]; examples 2, 3, 5, 6, 7. | 1-52 |
| A | WO 2008054042 A1 (NAH JAE WOON et al.) 08/05/2008, paragraph [0007]; examples 1, 2. | 1-52 |
| A | WO 9519174 A1 (ALZA CORP) 20/07/1995, page 1, line 3 – page 4, line 25; figures; examples. | 1-52 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

| | |
|--|--|
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> | <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> |
|--|--|

Date of the actual completion of the international search
21/02/2014

Date of mailing of the international search report
(24/02/2014)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
N. Vera Gutierrez

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495544

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2013/000084

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/522 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

A61K47/34 (2006.01)

A61P25/04 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/CL2013/000084

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

B82Y, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, REGISTRY, CAS, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones nº |
|------------|--|--|
| A | VARSHOSAZ JALEH et al. Enhancement of oral bioavailability of pentoxifylline by solid lipid nanoparticles. Journal of Liposome Research JUN 2010 00/06/2010 VOL: 20 No: 2 Pags: 115-123 ISSN 0898-2104 Doi: doi:10.3109/08982100903161456 | 1-52 |
| A | US 2009263491 A1 (KREUTER JORG et al.) 22/10/2009, párrafos [0003], [0019], [0034], [0035], [0042], [0043], [0090], [0095]; ejemplos 2, 3, 5, 6, 7. | 1-52 |
| A | WO 2008054042 A1 (NAH JAE WOON et al.) 08/05/2008, párrafo [0007]; ejemplos 1, 2. | 1-52 |
| A | WO 9519174 A1 (ALZA CORP) 20/07/1995, página 1, línea 3 – página 4, línea 25; figuras; ejemplos. | 1-52 |

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

| | |
|--|--|
| <p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p> | <p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p> |
|--|--|

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
21/02/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
24 de febrero de 2014 (24/02/2014)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
N. Vera Gutierrez
Nº de teléfono 91 3495544

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/CL2013/000084

| Documento de patente citado en el informe de búsqueda | Fecha de Publicación | Miembro(s) de la familia de patentes | Fecha de Publicación |
|---|----------------------|--------------------------------------|----------------------|
| US2009263491 A1 | 22.10.2009 | US2011293730 A1 | 01.12.2011 |
| | | KR20080111079 A | 22.12.2008 |
| | | MX2008011892 A | 14.11.2008 |
| | | US8003128 B2 | 23.08.2011 |
| | | RU2008140367 A | 20.04.2010 |
| | | RU2423104 C2 | 10.07.2011 |
| | | NZ571354 A | 25.02.2011 |
| | | JP2009530325 A | 27.08.2009 |
| | | WO2007110152 A2 | 04.10.2007 |
| | | WO2007110152 A3 | 21.02.2008 |
| | | EP1998752 A2 | 10.12.2008 |
| | | CN101410099 A | 15.04.2009 |
| | | CA2644411 A1 | 04.10.2007 |
| | | BRPI0709352 A2 | 12.07.2011 |
| | | AU2007229738 A1 | 04.10.2007 |
| | | DE102006013531 A1 | 27.09.2007 |
| | | ----- | ----- |
| WO2008054042 A1 | 08.05.2008 | ----- | 07.05.2008 |
| ----- | ----- | KR20080039645 A | 20.08.2008 |
| ----- | ----- | KR100853309B B1 | ----- |
| WO9519174 A1 | 20.07.1995 | ----- | 18.02.1997 |
| ----- | ----- | US5603954 A | 06.09.1995 |
| ----- | ----- | ZA9500033 A | 01.08.1995 |
| ----- | ----- | AU1599295 A | 02.07.1996 |
| ----- | ----- | US5532003 A | ----- |
| ----- | ----- | ----- | ----- |

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K31/522 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

A61K47/34 (2006.01)

A61P25/04 (2006.01)