



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 358 493**

⑫ Número de solicitud: 200800958

⑤ Int. Cl.:
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **05.04.2008**

⑫ Fecha de publicación de la solicitud: **11.05.2011**

⑫ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
11.05.2011

⑦ Solicitante/s: **INSTITUTO CIENTÍFICO Y
TECNOLÓGICO DE NAVARRA, S.A.**
Avda. Pío XII, 53
31008 Pamplona, Navarra, ES

⑦ Inventor/es: **Irache Garreta, Juan Manuel y
Zabaleta Sanz de Acedo, Virginia**

⑦ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤ Título: **Nanopartículas pegiladas que comprenden una molécula biológicamente activa y sus aplicaciones.**

⑤ Resumen:

Nanopartículas pegiladas que comprenden una molécula biológicamente activa y sus aplicaciones.

Se describen unas nanopartículas pegiladas, a base de un polímero biocompatible y un polietilenglicol, que contienen una molécula biológicamente activa, e.g., paclitaxel, útiles como sistemas para la administración oral de dicha molécula biológicamente activa.

ES 2 358 493 A1

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas pegiladas que comprenden una molécula biológicamente activa y sus aplicaciones.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con unas nanopartículas pegiladas, a base de un polímero biocompatible y un polietilenglicol, que contienen una molécula biológicamente activa, útiles como sistemas para la administración oral de dicha moléculas biológicamente activa. La invención también se relaciona con un procedimiento para su producción, con composiciones que contienen dichas nanopartículas pegiladas y con sus aplicaciones.

Antecedentes de la invención

En los últimos años, se ha producido un interés creciente en el desarrollo de sistemas particulares que mejoren las propiedades biofarmacéuticas de los fármacos cuando se administren por vía oral. Con este objetivo se ha propuesto el uso de transportadores poliméricos (nanopartículas). De hecho, las nanopartículas se definen como sistemas coloidales de partículas poliméricas sólidas de tamaño inferior al micrómetro (típicamente entre 10-1000 nm), constituidas por polímeros naturales o sintéticos. Dependiendo del método de preparación, se subdividen en nanoesferas matriciales y nanocápsulas vesiculares (Marchais *et al.*, Journal Drug Dev Ind Pharm 24 (1998) 883-888). Las nanoesferas son formas matriciales formadas por una red tridimensional polimérica en la que el fármaco está física y uniformemente disperso, mientras que las nanocápsulas son sistemas vesiculares formados por una cavidad interna que contiene el fármaco y que está rodeada por una membrana o pared polimérica. En ambos casos, debido a la elevada superficie específica de estos sistemas, las moléculas de la sustancia biológicamente activa pueden estar atrapadas o quedar adsorbidas en la superficie de las nanopartículas. Una de las características más importantes que ofrecen las nanopartículas radica en su capacidad para la liberación controlada del fármaco incorporado, que, unido a su pequeño tamaño, permiten el diseño de sistemas transportadores adecuados para ser administrados por distintas vías (oral, parenteral, ocular) y cuyas aplicaciones terapéuticas son consecuencia de su distribución en el organismo.

La vía oral es la vía más popular y atractiva para la administración de fármacos. El uso de esta vía se asocia con un aumento significativo de la aceptación de la medicación por parte del paciente y con menores costes sanitarios. Sin embargo, un importante número de fármacos presenta una eficacia muy baja cuando se administran mediante esta vía. Este fenómeno puede ser debido a uno o varios de los siguientes factores que condicionan la biodisponibilidad oral de un fármaco: (i) baja permeabilidad de la molécula activa para atravesar la mucosa (asociado generalmente a fármacos de naturaleza hidrófila), (ii) liberación incompleta del fármaco desde la forma de dosificación, (iii) metabolismo presistémico, (iv) baja solubilidad del principio activo en el ambiente gastrointestinal (asociado a fármacos de naturaleza hidrófoba), y (v) baja estabilidad en el ambiente gastrointestinal (presencia de valores de pH extremos, enzimas, etc.).

Los sistemas coloidales, tales como las nanopartículas, han sido propuestos para superar algunos de estos obstáculos, tratando de esconder el fármaco del ataque enzimático y aumentando así su biodisponibilidad oral. En principio, estos transportadores poseen una gran superficie específica lo que facilita su interacción con el soporte biológico (mucosa gastrointestinal) y permite incrementar la difusión de algunos fármacos a través de ella. Igualmente, el control de la liberación del fármaco permite prolongar en el tiempo el efecto de moléculas con semi-vidas biológicas bajas y, además, son capaces de proteger los fármacos frente a su eventual degradación. Por ello, la asociación de determinados fármacos a las nanopartículas ha permitido, en ocasiones, aumentar de forma significativa la biodisponibilidad oral de la molécula activa. Ejemplos ilustrativos de fármacos cuya biodisponibilidad oral aumenta mediante su encapsulación o asociación a nanopartículas incluyen calcitonina de salmón, furosemida, estradiol, avarol, dicumarol, nifedipina y fluoropirimidinas.

Dentro de la familia de los vinil éteres, los polímeros con mayor aplicación farmacéutica son los derivados del metil vinil éter (Kirk-Othmer Journal/Encyclopedia of Chemical Technology (1981) 1053-1069). El principal copolímero de metil vinil éter se obtiene tras la polimerización con anhídrido maleico a partir de acetileno, obteniéndose el poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA), comercializado por ISPTM bajo la marca comercial Gantrez[®] AN. El copolímero PVM/MA está compuesto estructuralmente por dos grupos funcionales diferenciados que tienen características de solubilidad diferentes: un grupo éster hidrófobo y un grupo anhídrido. El grupo carboxílico es un solubilizante, ya que tiende a disolver el polímero cuando se ioniza, y el grupo éster es hidrofóbico, ya que retrasa la penetración del agua en el polímero. Los copolímeros sintéticos PVM/MA tienen aplicaciones muy diversas. El Gantrez[®] AN se utiliza ampliamente como espesante y floculante, adhesivo dental, excipiente en comprimidos bucales, excipiente en parches transdérmicos, etc. Por otra parte se ha descrito el uso de estos copolímeros para la liberación controlada de fármacos (Heller, J Appl Polym Sci 22 (1978) 1991-2009), y, en formas matriciales, para la liberación tópica de fármacos en el ojo (Finne *et al.*, J Pharm Sci 80 (1991) 670-673; Finne *et al.*, Int J Pharm 65 (1990) 19-27).

En los últimos años, el grupo de investigación al que pertenecen los inventores ha desarrollado y presentado una serie de patentes relacionadas con nanopartículas a base de estos copolímeros (ES 200601399; Arbos *et al.*, J Control Release 96 (2004) 55-65; ES 2178961 (2001)). Estas nanopartículas han demostrado una gran versatilidad para poder encapsular proteínas y fármacos de síntesis química. Por otra parte, presentan propiedades bioadhesivas que las hacen atractivas para su utilización en la administración oral de fármacos. Por último, presentan la ventaja de poder modificar su superficie de forma fácil, homogénea y repetitiva lo que les hace ideales para poder modular su distribución en el

organismo. En este contexto, la asociación de las nanopartículas con polímeros convenientes puede modificar sus características físico-químicas e, indirectamente, su distribución e interacción con el medio biológico. Una posible estrategia es la unión de una o más cadenas de polietilenglicol (PEG) a las nanopartículas, proceso conocido como pegilación u obtención de nanopartículas furtivas.

Los polietilenglicoles (PEG) o también llamados “macrogoles”, son un grupo de polímeros formados por polimerización del óxido de etileno (EO) con agua bajo catálisis alcalina que después será neutralizada. Están compuestos por dos grupos hidroxilo primarios terminales y una cadena central carbonada, responsable de la variación de peso molecular entre un polietilenglicol y otro, y que condiciona además su consistencia líquida o sólida. Los PEG presentan una elevada solubilidad acuosa y una baja toxicidad. Entre sus derivados destacan los mono-, di- y poliésteres, pero también pueden reaccionar con otros productos para dar lugar a éteres, aminas y acetales, entre otros. Se trata de uno de los polímeros más populares para la modificación de la superficie de transportadores de moléculas activas. De hecho, se ha comprobado que los PEG reducen las interacciones de las nanopartículas con las células del sistema fagocítico macrófago (MPS), prolongando así la circulación de las nanopartículas en el torrente sanguíneo tras la administración parenteral de las mismas. Con respecto a su uso por vía oral, la asociación de polietilenglicoles a las nanopartículas convencionales permite protegerlas contra el ataque enzimático en los líquidos digestivos. Esto es debido a su potencial para rechazar las proteínas, minimizando así su interacción con la mucina y otras proteínas presentes en el lumen, lo que puede llevar a incrementos de la biodisponibilidad de ese fármaco y/o reducción de efectos adversos. Además, se ha demostrado que los polietilenglicoles son capaces de reducir la actividad de la glicoproteína-P y de complejos enzimáticos asociados al citocromo P450, interfiriendo en la estructura de la membrana apical y, como consecuencia, directa o indirectamente, afectando a la función de dichos transportadores. Para ello, se ha estudiado la permeabilidad intestinal, *in vitro*, requisito indispensable para la biodisponibilidad oral (Johnson *et al*, AAPS PharmSci 4 (2002) E40) (Collnot *et al.*, Mol Pharm 4 (2007) 465-474).

Numerosos fármacos, entre los que se incluyen diversos agentes antitumorales, se administran por vía parenteral, lo que plantea diversos problemas. Entre las principales ventajas que supondría la administración de agentes antitumorales por vía oral, merece la pena destacar el aumento de la calidad de vida de los pacientes así como la reducción de los costes sanitarios. Esta vía de administración permitiría una exposición continua de las células cancerosas al fármaco antitumoral a un nivel de concentración apropiado y sostenido lo que puede mejorar el índice terapéutico y reducir los efectos secundarios. Sin embargo, la gran mayoría de estos fármacos (e.g., paclitaxel) presentan una baja biodisponibilidad al ser administrados por vía oral.

El paclitaxel (Taxol[®], Bristol Myers Squibb Company), un producto extraído del árbol *Taxus brevifolia*, fue descrito por primera vez en 1.971 y desde 1.993 es el agente quimioterápico contra el cáncer más empleado en todo el mundo. El paclitaxel actúa a nivel celular promoviendo la polimerización de la tubulina. De este modo, los microtúbulos formados en presencia de paclitaxel son extraordinariamente estables y no funcionales, causando así la muerte celular por la incapacidad dinámica y funcional de los microtúbulos para la división celular. En Europa, este fármaco está indicado tanto como agente individual como en combinación con otros tratamientos oncológicos para el tratamiento de cáncer de ovario, de mama y de células pulmonares no pequeñas, tanto avanzado como metastático.

El principal inconveniente de este fármaco radica en su escasa biodisponibilidad oral debido a su baja solubilidad acuosa y al efecto de metabolismo de primer paso principalmente. Tras la administración oral, el paclitaxel es sustrato de la glicoproteína-P, así como de otros miembros de la superfamilia ABC (ATP-binding cassette), tales como BCRP y MRP2. La superfamilia ABC transportadora de proteínas juega un papel central en la defensa del organismo frente a compuestos tóxicos y frente a algunos agentes anticancerosos. Dichas proteínas (glicoproteína-P, MRP2 y BCRP) están localizadas en la zona apical de las membranas intestinal, hepática y renal, mediando el bombeo de xenobióticos y toxinas a la luz intestinal, biliar y orina. Además, tanto la glicoproteína-P como MRP2 se localizan conjuntamente junto con CYP3A4, glutatión-S-transferasas y UDP-glucuronosiltransferasas lo que supone una actuación sinérgica en la regulación de la biodisponibilidad oral de los fármacos administrados.

Por todo ello, actualmente, el paclitaxel está formulado para su uso en clínica y por vía intravenosa en un vehículo compuesto por Cremophor EL:etanol (1:1). Con el fin de prevenir y minimizar los efectos tóxicos del Cremophor EL por vía intravenosa y mejorar el índice terapéutico del fármaco, recientemente, se ha comercializado una nueva formulación basada en la encapsulación del fármaco en nanopartículas de albúmina denominada Abraxane[®] (Green *et al.* Annals of Oncology 17: 1263-1268, 2006).

Adicionalmente, se están empleando diversas estrategias para desarrollar formulaciones de paclitaxel, principalmente para su administración por vía oral, la más aceptada por los pacientes y con menores costes y mayores beneficios. Estas estrategias incluyen el uso de profármacos (Hennenfent *et al.*, Journal/Ann Oncol 17 (2006) 735-749) (Sabbatini *et al.*, Journal/J Clin Oncol 22 (2004) 4523-4531), análogos (Cassinelli *et al.*, Journal/Clin Cancer Res 8 (2002) 2647-2654) (Broker *et al.*, Journal/Clin Cancer Res 13 (2007) 3906-3912), emulsiones y liposomas (Hennenfent *et al.*, Journal/Ann Oncol 17 (2006) 735-749), para evitar los efectos adversos derivados de su vehiculización así como para solventar su resistencia atribuida a la glicoproteína-P y otros transportadores, mejorando así su biodisponibilidad oral. Además, la administración simultánea de inhibidores de la glicoproteína-P, tales como verapamilo o ciclosporina A, mejora la biodisponibilidad del fármaco, aumentando su absorción oral y disminuyendo su eliminación (van Asperen *et al.*, Journal/Clin Cancer Res 4 (1998) 2293-2297).

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar sistemas de administración de fármacos capaces de aumentar la bio-disponibilidad de numerosos principios activos (fármacos) cuando se administran por vía oral, por ejemplo, fármacos de naturaleza lipófila o que sean sustrato de la glicoproteína-P (e.g., paclitaxel). Ventajosamente, dichos sistemas de administración deberían tener la capacidad de incorporar cantidades variables de fármacos lipófilos, e, idealmente, deberían ser capaces de evitar el efecto de la glicoproteína-P sobre el fármaco transportado. Estos objetivos pueden ser conseguidos mediante las nanopartículas proporcionadas por la presente invención.

Compendio de la invención

Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que la modificación y recubrimiento de las nanopartículas de un polímero biocompatible, tal como el copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA), con un polietilenglicol permite obtener nanopartículas pegiladas capaces de encapsular cantidades importantes de moléculas biológicamente activas (e.g., paclitaxel). Dichas nanopartículas pegiladas cargadas con una molécula biológicamente activa (e.g., fármaco o principio activo) proporcionadas por esta invención permiten la absorción de dicha molécula biológicamente activa (e.g., paclitaxel) a través de la mucosa oral y la obtención de niveles plasmáticos importantes y sostenidos de dicha molécula biológicamente activa durante, al menos, 48 horas. Por otra parte, dichas nanopartículas pegiladas pueden ser aplicadas para la administración oral (o a través de otras mucosas) de numerosos fármacos incluyendo aquellos que sean sustratos de la glicoproteína-P y/o de los complejos enzimáticos asociados al citocromo P-450 (e.g., paclitaxel), así como para la administración de fármacos con elevada toxicidad (e.g., citostáticos) al ofrecer niveles plasmáticos sostenidos y constantes de la molécula biológicamente activa durante periodos de tiempo muy elevado (e.g., al menos, 48 horas, en el caso del paclitaxel), lo que posibilita tratamientos alternativos a la perfusión hospitalaria, permitiendo un abaratamiento del coste sanitario de los tratamientos con este tipo de fármacos y una mejora en la calidad de vida del paciente.

Por tanto, la invención proporciona unas nanopartículas que solucionan los problemas mencionados anteriormente, es decir, unas nanopartículas con capacidad para asociar elevadas cantidades de moléculas biológicamente activas (e.g., paclitaxel) para su administración efectiva a través de la vía oral. Por ello, estas nanopartículas poseen unas características bioadhesivas adecuadas que favorecen la interacción de la forma farmacéutica que contiene el fármaco o molécula biológicamente activa con la superficie de la mucosa. Además, dichas nanopartículas permiten liberar el fármaco proporcionando niveles plasmáticos sostenidos y constantes del mismo cuando son administradas por vía oral o a través de cualquier otra mucosa del organismo. Asimismo, dichas nanopartículas minimizan el efecto de la glicoproteína-P y/o del complejo enzimático asociado al citocromo P450, en el caso de que el fármaco sea sustrato de dicha glicoproteína-P y/o del complejo enzimático asociado al citocromo P450.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con nanopartículas pegiladas que comprenden un polímero biocompatible, un polietilenglicol o un derivado del mismo, y una molécula biológicamente activa seleccionada del grupo formado por actinomicina D, albendazol, aldosterona, alprazolam, amiodarona, amitriptilina, amprenavir, asimadolina, atorvastatina, bunitrolol, buspirona, camptotecina, carbamazepina, carvedilol, celiprolol, ciclosporina A, cimetidina, clotrimazol, colchicina, cortisona, daunorubicina, debrisoquina, dexametasona, diazepam, digitoxina, digoxina, diltiazem, docetaxel, domperidona, doxorubicina, efavirenz, epirubicina, eritromicina, ergotamina, estradiol, estradiol glucurónico, erlotinib, etopósido, fenitoína, fentanilo, felodipina, fenotiacinas, fexofenadina, fluoroquinolonas, fluorouracilo, FK-506, gentamicina, griseofulvina, hidro cortisona, imatinib, indinavir, itraconazol, ivermectina, ketoconazol, kaemferol, levofloxacina, lidocaína, loperamida, losarían, lovastatina, mebendazol, metilprednisolona, metotrexato, mibefradil, midazolam, misoldipina, morfina, nelfinavir, nicardina, nitrendipina, nifedipina, ondansetron, paclitaxel, pentazocina, praziquantel, prednisolona, prednisona, quercetina, quinidina, ranitidina, rapamicina, rifabutin, rifampicina, ritonavir, saquinavir, sirolimus, sulfametiazol, tacrolimus, tamoxifen, talinolol, tenipósido, terfenadina, tetraciclina, topotecan, triamcinolona, valsopodar, verapamil, vinblastina, vincristina, vindesina, zopliclona, sus derivados, y sus mezclas.

En una realización particular, el polímero biocompatible es un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA). En otra realización particular, el polietilenglicol (PEG) es PEG 2000, PEG 6000 o PEG 10000. En otra realización particular, la molécula biológicamente activa es paclitaxel. En este caso, la administración por vía oral de las nanopartículas pegiladas conteniendo paclitaxel permite obtener un aumento espectacular de la biodisponibilidad oral del paclitaxel, cuya absorción oral es prácticamente nula debido a sus características físico-químicas (elevada lipofilia) y al hecho de ser sustrato de la glicoproteína-P localizada en el tracto gastrointestinal.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende dichas nanopartículas pegiladas que contienen una molécula biológicamente activa.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de dichas nanopartículas pegiladas que contienen una molécula biológicamente activa.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una gráfica que muestra la variación de la cantidad de paclitaxel (PTX) encapsulado en las diferentes formulaciones en función del tipo de polietilenglicol utilizado y de la cantidad de fármaco añadido inicialmente. Los resultados muestran los valores de la media $\pm$ desviación típica ($n = 6$). PTX-NP: nanopartículas de PVM/MA con paclitaxel; PTX-NP-gli: nanopartículas de PVM/MA y glicina con paclitaxel; PTX-NP2: nanopartículas de PVM/MA

y PEG 2000 con paclitaxel; PTX-NP6: nanopartículas de PVM/MA y PEG 6000 con paclitaxel; PTX-NP10: nanopartículas de PVM/MA y PEG 10000 con paclitaxel.

La Figura 2 muestra las concentraciones plasmáticas de paclitaxel (PTX) en función del tiempo tras la administración en animales de laboratorio de las distintas formulaciones de PTX. Los resultados muestran los valores de la media $\pm$ desviación típica. En la Figura 2A se muestra la concentración plasmática de PTX en función del tiempo tras la administración por vía intravenosa (i.v.), de una dosis de 10 mg/kg de Taxol® (formulación comercial de paclitaxel). En la Figura 2B se muestra la concentración plasmática de PTX en función del tiempo tras la administración por vía oral, de una dosis de 10 mg/kg de Taxol® (formulación comercial de paclitaxel). En la Figura 2C se muestra la concentración plasmática de PTX en función del tiempo tras la administración por vía oral, de una dosis de 10 mg/kg de las siguientes formulaciones:

PTX-NP-gli: nanopartículas control de PVM/MA con glicina y paclitaxel;

PTX-NP2: nanopartículas de PVM/MA y PEG 2000 con paclitaxel;

PTX-NP6: nanopartículas de PVM/MA y PEG 6000 con paclitaxel; y

PTX-NP 10: nanopartículas de PVM/MA y PEG 10000 con paclitaxel.

Descripción detallada de la invención

Nanopartículas

En un aspecto, la invención se relaciona con unas nanopartículas pegiladas, en adelante nanopartículas de la invención, que comprenden un polímero biocompatible, un polietilenglicol o un derivado del mismo, y una molécula biológicamente activa seleccionada del grupo formado por actinomicina D, albendazol, aldosterona, alprazolam, amiodarona, amitriptilina, amprenavir, asimadolina, atorvastatina, bunitrolol, buspirona, camptotecina, carbamazepina, carvedilol, celiprolol, ciclosporina A, cimetidina, clotrimazol, colchicina, cortisona, daunorubicina, debrisoquina, dexametasona, diazepam, digitoxina, digoxina, diltiazem, docetaxel, domperidona, doxorubicina, efavirenz, epirubicina, eritromicina, ergotamina, estradiol, estradiol glucurónico, erlotinib, etopósido, fenitoína, fentanilo, felodipina, fenotiacinas, fexofenadina, fluoroquinolonas, fluorouracilo, FK-506, gentamicina, griseofulvina, hidrocortisona, imatinib, indinavir, itraconazol, ivermectina, ketoconazol, kaemferol, levofloxacina, lidocaína, loperamida, losartan, lovastatina, mebendazol, metilprednisolona, metotrexato, mibefradil, midazolam, misoldipina, morfina, nelfinavir, nicardina, nitrendipina, nifedipina, ondansetron, paclitaxel, pentazocina, praziquantel, prednisolona, prednisona, quercetina, quinidina, ranitidina, rapamicina, rifabutin, rifampicina, ritonavir, saquinavir, sirolimus, sulfametiazol, tacrolimus, tamoxifen, talinolol, tenipósido, terfenadina, tetraciclina, topotecan, triamcinolona, valsopodar, verapamil, vinblastina, vincristina, vindesina, zopliclona, sus derivados, y sus mezclas.

Las nanopartículas de la invención poseen unas características físico-químicas adecuadas, de especificidad y de bioadhesión a la mucosa gastrointestinal, lo que las convierte en sistemas potencialmente útiles para el transporte de moléculas biológicamente activas, incluyendo en particular, moléculas biológicamente activas de naturaleza lipófila, moléculas biológicamente activas que sean sustrato de la glicoproteína-P o del complejo enzimático asociado al citocromo P450. Las nanopartículas de la invención mejoran la biodisponibilidad oral de dichas moléculas biológicamente activas, en general, y, en particular, de moléculas biológicamente activas de naturaleza lipófila y/o de moléculas biológicamente activas que puedan ser sustrato de la glicoproteína-P. De hecho, las nanopartículas de la invención pueden prolongar el tiempo de residencia de la moléculas biológicamente activa en la mucosa tras su administración por vía oral. Asimismo, las nanopartículas de la invención pueden ser utilizadas como sistema de transporte de moléculas biológicamente activas con elevada toxicidad, por ejemplo, citostáticos, debido a que ofrecen niveles plasmáticos sostenidos y constantes de tales fármacos durante periodos de tiempo elevados, lo que permite el diseño de tratamientos alternativos a la perfusión hospitalaria, redundando en un abaratamiento del coste sanitario de los tratamientos con este tipo de fármacos.

El término “nanopartícula”, tal como aquí se utiliza, se refiere a esferas o formas similares con un tamaño medio inferior a 1,0 micrómetro (μm). En general, las nanopartículas de la invención presentan un tamaño medio de partícula comprendido entre 1 y 999 nanómetros (nm), preferentemente entre 10 y 900 nm. En una realización particular, las nanopartículas de la invención presentan un tamaño medio de partícula comprendido entre 100 y 400 nm.

Por “tamaño medio” se entiende el diámetro promedio de la población de nanopartículas que se mueve conjuntamente en un medio acuoso. El tamaño medio de estos sistemas se puede medir por procedimientos estándar conocidos por los expertos en la materia y que se describen, a modo ilustrativo, en la parte experimental que acompaña a los ejemplos descritos más adelante. El tamaño medio de las partículas puede verse influenciado principalmente por la cantidad y peso molecular del polímero biocompatible, por la naturaleza y cantidad del PEG, o derivado del mismo, y por la naturaleza y cantidad de la molécula biológicamente activa, presentes en las nanopartículas de la invención (en general, a mayor cantidad o peso molecular de dichos componentes, el tamaño medio de la nanopartícula se incrementará), y por algunos parámetros del procedimiento de producción de dichas nanopartículas, tales como la velocidad de agitación, etc.

Polímero biocompatible

Las nanopartículas de la invención comprenden un polímero biocompatible. Prácticamente cualquier polímero biocompatible conocido en el estado de la técnica que permita obtener nanopartículas puede ser utilizado para la puesta en práctica de la presente invención. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos polímeros biocompatibles incluyen polihidroxiácidos, tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc., y copolímeros de éstos, e.g., poli(ácido láctico-co-glicólico) [PLGA], etc.; polianhídridos; poliésteres; polisacáridos, e.g., quitosano, etc. El peso molecular de dicho polímero biocompatible puede variar dentro de un amplio intervalo siempre y cuando satisfaga las condiciones establecidas de formar nanopartículas y ser biocompatible.

En una realización particular, el polímero biocompatible utilizado es el copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico en forma anhídrido (PVM/MA). En una realización concreta puede utilizarse, por ejemplo, el copolímero PVM/MA comercializado con la denominación comercial Gantrez® AN. En una realización particular, dicho copolímero PVM/MA tiene un peso molecular comprendido entre 100 y 2.400 kDa, preferentemente entre 200 y 2.000 kDa, más preferentemente entre 180 y 250 kDa. Este polímero biocompatible (PVM/MA) resulta particularmente ventajoso ya que se utiliza ampliamente en tecnología farmacéutica debido a su baja toxicidad ($DL_{50} = 8-9$ g/kg por vía oral) y excelente biocompatibilidad. Además, es fácil de obtener, tanto por la cantidad como por su precio. Este polímero biodegradable (PVM/MA) puede reaccionar con distintas sustancias hidrófilas, debido a la presencia de sus grupos anhídridos, sin tener que recurrir a los reactivos orgánicos usuales (glutaraldehído, derivados de carbodiimida, etc.) que poseen una toxicidad importante. En un medio acuoso, el copolímero PVM/MA es insoluble, pero sus grupos anhídrido se hidrolizan dando lugar a unos grupos carboxílicos. La disolución es lenta y depende de las condiciones en las que se produce. Debido a la disponibilidad de grupos funcionales en PVM/MA, la unión covalente de moléculas con grupos nucleofílicos, tales como hidróxido o amino, tiene lugar por simple incubación en un medio acuoso.

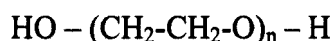
La solicitud de patente internacional WO 02/069938, cuyo contenido se incorpora en esta descripción por referencia, describe nanopartículas (no pegiladas) de copolímero PVM/MA, mientras que la solicitud de patente internacional WO05/104648 describe el desarrollo y aplicación de nanopartículas pegiladas.

Polietilenglicol y sus derivados

Las nanopartículas de la invención comprenden, además del polímero biocompatible, un polietilenglicol o un derivado del mismo.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “polietilenglicol” incluye cualquier polímero hidrofílico soluble en agua que contiene grupos éter unidos por grupos alquilénico de 2 ó 3 carbonos, opcionalmente ramificados. Así esta definición incluye polietilenglicoles, polipropilenglicoles, ramificados o no, y también copolímeros (e.g., bloque o al azar) que incluyen los dos tipos de unidades. El término también incluye derivados sobre los grupos hidroxilo terminales, que pueden estar modificados (uno o los dos de los extremos) para introducir grupos alcoxi, acrilato, metacrilato, alquilo, amino, fosfato, isotiocianato, sulfhidrido, mercapto, sulfato, etc. El polietilenglicol (incluyendo el polipropilenglicol) puede presentar sustituyentes sobre los grupos alquilenos. De forma preferente estos sustituyentes, si están presentes, son grupos alquilo.

Los polietilenglicoles son polímeros solubles en agua que han sido aprobados para la administración de fármacos por vía oral, parenteral y tópica (FDA). Los polietilenglicoles se fabrican por polimerización del óxido de etileno (EO) o de propileno (OP) en presencia de agua, monoetilenglicol o dietilenglicol como iniciadores de la reacción, en medio alcalino (1,2-Epoxide Polymers: Ethylene Oxide Polymers and Copolymers in Encyclopedia of Polymer Science and Engineering; Mark, H.F. (Ed.), John Wiley and Sons Inc., 1986, pp. 225-273). Cuando se alcanza el peso molecular deseado (controlado generalmente mediante medidas en proceso de la viscosidad) la reacción de polimerización se termina por neutralización del catalizador con un ácido (ácido láctico, ácido acético u otros). El resultado es un polímero lineal de estructura muy simple:



donde (n) es el número de unidades o monómeros de EO; alternativamente las unidades contienen grupos propileno.

Aunque técnicamente todos estos productos deberían llamarse poli(oxialquilenos), los productos con pesos moleculares (o masa molecular) medios entre 200 y 35.000 son conocidos como polietilenglicoles (PEGs). Este término de polietilenglicol es normalmente usado para indicar la influencia significativa de los grupos terminales hidroxilos en las propiedades físico-químicas de estas moléculas. El término PEG suele ser utilizado en combinación con un valor numérico. Dentro de la industria farmacéutica, el número indica el peso molecular medio, mientras que en la industria cosmética el número que acompaña a las letras PEG se refiere a las unidades de EO polimerizadas y que forman la molécula (Handbook of Pharmaceutical Excipients, Rowe R.C., Sheskey P. J., Weller P.J. (Eds.), 4th Edition, Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association, London, UK, 2003). Los PEGs están recogidos en

las distintas farmacopeas, aunque la nomenclatura difiere (International Harmonisation: Polyethylene glycol (PEG): Pharmeuropa 1999, 11, 612-614). Según el Handbook of Pharmaceutical Excipients (Fourth Edition), 2003 Edited by R.C. Rowe, P.J. Sheskey and P.J. Weller Published by the Pharmaceutical Press (London, UK) and the American Pharmaceutical Association (Washington, USA). Los polioxietilen-glicoles también se denominan polietilenglicoles, macrogols, macrogola o PEG. La Farmacopea Británica (British Pharmacopeia) usa el término “polietilenglicoles” y “macrogols”; la Farmacopea Europea (Ph Eur) usa “polietilenglicoles” y “Macrogola”, mientras que la Farmacopea Norteamericana (USP) usa “polyethylene glycol(s)”.

Los PEGs con peso molecular inferior a 400 son líquidos no volátiles a temperatura ambiente. PEG 600 muestra un punto de fusión comprendido entre 17 y 22°C, mientras que los PEGs con pesos moleculares medios comprendidos entre 800 y 2000 son materiales pastosos con bajos puntos de fusión. Por encima de un peso molecular superior a 3000, los PEGs son sólidos y, comercialmente, se puede encontrar hasta PEG 35000. Por otra parte, aunque el punto de fusión de los PEGs aumenta al aumentar el peso molecular, el punto de ebullición aumenta hasta un valor máximo de 60°C. Igualmente, al aumentar el peso molecular, disminuye su solubilidad acuosa. De todas formas, para PEG 35000, se puede disolver en agua una cantidad cercana al 50% m/m.

Desde un punto de vista toxicológico, los PEGs son considerados como poco tóxicos y poco inmunógenos (Hermansky S.J *et al.*, Food Chem. Toxic., 1995, 33, 139-140; Final Report on the Safety Assessment of PEGs: J.A. C. T., 1993, 12, 429-457; Polyethylene glycol, 21 CFR 172.820, FDA). La ingesta diaria admisible, definida por la WHO, es de 10 mg/kg peso (Polyethylene glycols; Twenty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; World Health Organisation, Geneva; Technical Report Series 1980, 648, 17-18).

Los derivados de PEG presentan ventajas similares a los PEGs tradicionales, por ejemplo, su solubilidad acuosa, inactividad fisiológica, baja toxicidad y estabilidad bajo condiciones muy diversas. Estos derivados incluyen productos muy variados y se caracterizan por el grupo funcional que sustituye al hidroxilo, e.g., grupos amino opcionalmente sustituidos, fenoles, aldehídos, isotiocianatos, mercapto, etc. Entre los derivados de polietilenglicol que se pueden utilizar en la invención cabe destacar:

- polioxietilen ésteres, tales como PEG monometiléter monosuccinimidil succinato éster; PEG monometiléter monocarboximetil éster; PEG adipato; PEG diestearato; PEG monoestearato; PEG hidroxiestearato; PEG dilaurato; PEG dioleato, PEG monooleato, PEG monoricinooleato; PEG de ésteres de aceite de coco; etc.;
- polioxietilén alquil éteres, tales como PEG monometil éter o metoxi PEG (mPEG); PEG dimetiléter; etc.;
- otros, tales como poli(etilenglicol tereftalato); derivados de polioxietilén y ésteres de sorbitano y ácidos grasos; copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno; copolímeros de óxido de etileno con acrilamida; etc.; y
- derivados de PEG tales como O,O'-bis-(2-aminoetil)polietilenglicol (DAE-PEG 2000); O,O'-bis-(2-aminopropil)polipropilenglicol-polietilenglicol-polipropilenglicol; etc.

En una realización particular, el PEG no está ramificado y los grupos hidroxilo no están sustituidos. En esta realización particular, el PEG a utilizar tiene, preferentemente, un peso molecular comprendido entre 400 y 35.000 Da. Ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que, cuando se utiliza PEG con un peso molecular de 2.000 Da aproximadamente, se producen las nanopartículas pegiladas con mayor capacidad para favorecer la absorción de la molécula biológicamente activa (e.g., paclitaxel). Por tanto, en una realización particular preferida de la invención, el PEG utilizado en la fabricación de las nanopartículas de la invención tiene un peso molecular igual o superior a 400, preferentemente igual o superior a 1.000 (PEG 1000), más preferentemente comprendido entre 1.500 y 10.000 Da, aún más preferentemente, igual o superior a 2.000 Da (PEG 2000), siendo especialmente preferido el PEG con un peso molecular comprendido entre 2.000 Da (PEG 2000) y 6.000 Da (PEG 6000) puesto que proporcionan buenos resultados.

La relación en peso PEG (o derivado del mismo): polímero biocompatible puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la relación en peso PEG:polímero biocompatible es de 1:2-20, preferentemente de 1:2-10, más preferentemente alrededor de 1:8. Así, en una realización concreta de la invención se utiliza PEG 2000, PEG 6000 o PEG 10000, en una relación en peso respecto al polímero (PVM/MA) de 1:8.

En otra realización particular, el PEG utilizado en la producción de las nanopartículas de la invención presenta un grupo hidroxilo terminal bloqueado, por ejemplo, mediante un derivado de éter metílico, lo que reduce su hidrofilia e incluso puede cambiar la estructura de la nanopartícula. En este caso, un porcentaje mayor de las cadenas de PEG estaría incluido en el interior y solamente una pequeña parte de las mismas se localizaría en la superficie de las nanopartículas. Esta particularidad permite modular las características de las nanopartículas mediante el bloqueo de los grupos hidroxilo o bien la introducción de otros grupos funcionales. En este sentido, el mPEG contribuiría a modificar la liberación del fármaco modificando la porosidad de la matriz polimérica.

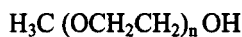
ES 2 358 493 A1

En otra realización particular, el PEG presenta grupos funcionales terminales diferentes al hidroxilo, tales como grupos amino. Estos grupos amino a su vez pueden estar sustituidos y presentar grupos funcionales. En una realización preferida, los grupos amino son $-NH_2$. La administración oral de nanopartículas pegiladas con un PEG que contiene dichos grupos amino hace que se acumulen sobre ciertos segmentos del tracto intestinal, lo que permite una administración específica.

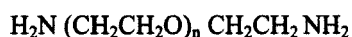
A continuación, se indican, de forma ilustrativa no limitativa, las estructuras químicas de algunos polialquilenglicoles correspondientes a los grupos anteriormente mencionados con distintos tipos de grupos funcionales:



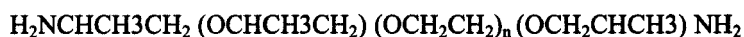
a)



b)



c)



d)

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de PEG que pueden ser utilizados en la presente invención incluyen concretos incluyen el polietilenglicol 2000, 6000 ó 10000 (PEG 2000, PEG 6000 o PEG 10000); el éter metílico de polietilenglicol 2000 (mPEG 2000); O,O'-bis-(2-aminoetil) polietilenglicol 2000 (DAE-PEG 2000); y O,O'-bis-(2-aminopropil) polipropilenglicol-polietilenglicol-polipropilenglicol (DAP-PEG 2000).

La selección del PEG permite modular a voluntad las características del sistema que se genera. El uso de mezclas de polietilenglicoles de diferentes tipos añade un factor más de variabilidad. Desde el punto de vista práctico esto es importante para adaptar y seleccionar el sistema más adecuado para cada molécula activa y para cada modo de administración.

Molécula biológicamente activa

La nanopartícula de la invención comprenden, además del polímero biocompatible y de un polietilenglicol o derivado del mismo, una molécula biológicamente activa seleccionada del grupo formado por actinomicina D, albendazol, aldosterona, alprazolam, amiodarona, amitriptilina, amprenavir, asimadolina, atorvastatina, bunitrolol, buspirona, camptotecina, carbamazepina, carvedilol, celiprolol, ciclosporina A, cimetidina, clotrimazol, colchicina, cortisona, daunorubicina, debrisoquina, dexametasona, diazepam, digitoxina, digoxina, diltiazem, docetaxel, domperidona, doxorubicina, efavirenz, epirubicina, eritromicina, ergotamina, estradiol, estradiol glucurónico, erlotinib, etopósido, fenitoína, fentanilo, felodipina, fenotiacinas, fexofenadina, fluoroquinolonas, fluorouracilo, FK-506, gentamicina, griseofulvina, hidrocortisona, imatinib, indinavir, itraconazol, ivermectina, ketoconazol, kaemferol, levofloxacina, lidocaína, loperamida, losartan, lovastatina, mebendazol, metilprednisolona, metotrexato, mibeiradil, midazolam, misoldipina, morfina, nelfinavir, nicardina, nitrendipina, nifedipina, ondansetron, paclitaxel, pentazocina, praziquantel, prednisolona, prednisona, quercetina, quinidina, ranitidina, rapamicina, rifabutin, rifampicina, ritonavir, saquinavir, sirolimus, sulfametiazol, tacrolimus, tamoxifen, talinolol, tenipósido, terfenadina, tetraciclina, topotecan, triamcinolona, valsopodar, verapamil, vinblastina, vincristina, vindesina, zopiclona, sus derivados, y sus mezclas.

El término “molécula biológicamente activa”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier sustancia (e.g., un fármaco o principio activo de un medicamento) que se administra a un sujeto, preferentemente un ser humano, con fines profilácticos o terapéuticos; es decir, cualquier sustancia que puede ser utilizada en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad o para mejorar el bienestar físico y mental de humanos y animales.

El término “derivado”, aplicado a una molécula biológicamente activa, tal como aquí se utiliza, incluye profármacos y análogos de dicha molécula biológicamente activa.

Las nanopartículas de la invención pueden incorporar una o más de dichas moléculas biológicamente activas independientemente de las características de solubilidad de las mismas, aunque, dichas nanopartículas pueden ser particularmente útiles para la administración por vía oral de moléculas biológicamente activas de naturaleza hidrófoba o de compuestos que sean sustrato de la glicoproteína-P o del complejo enzimático asociado al citocromo P450.

En una realización particular, la molécula biológicamente activa presente en las nanopartículas de la invención es paclitaxel.

Las nanopartículas de la invención permiten modificar la distribución de la molécula biológicamente activa que contienen al ser administradas por una vía que dé acceso a alguna mucosa del organismo (e.g., oral, etc.).

La relación en peso (molécula biológicamente activa)/(polímero biocompatible) en las nanopartículas de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, dicha relación en peso (molécula biológicamente activa)/(polímero biocompatible) está comprendida entre 1/1 y 1/20 p/p (peso/peso).

Procedimiento de obtención de las nanopartículas de la invención

La incorporación de la molécula biológicamente activa a las nanopartículas pegiladas puede llevarse a cabo mediante un procedimiento como el descrito en ES 2246694, que comprende la incorporación de la molécula biológicamente activa a una solución que comprende el polímero biocompatible y el polietilenglicol, en un disolvente apropiado (e.g., acetona), antes de la formación de las nanopartículas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de las nanopartículas de la invención, en adelante procedimiento de la invención, que comprende incubar simultáneamente un polímero biocompatible, un polietilenglicol o un derivado del mismo, y una molécula biológicamente activa seleccionada del grupo formado por actinomicina D, albendazol, aldosterona, alprazolam, amiodarona, amitriptilina, amprenavir, asimadolina, atorvastatina, bunitrolol, buspirona, camptotecina, carbamazepina, carvedilol, celiprolol, ciclosporina A, cimetidina, clotrimazol, colchicina, cortisona, daunorubicina, debrisoquina, dexametasona, diazepam, digitoxina, digoxina, diltiazem, docetaxel, domperidona, doxorubicina, efavirenz, epirubicina, eritromicina, ergotamina, estradiol, estradiol glucurónico, erlotinib, etopósido, fenitoína, fentanilo, felodipina, fenotiacinas, fexofenadina, fluoroquinolonas, fluorouracilo, FK-506, gentamicina, griseofulvina, hidroclotisona, imatinib, indinavir, itraconazol, ivermectina, ketoconazol, kaemferol, levofloxacina, lidocaína, loperamida, losartan, lovastatina, mebendazol, metilprednisolona, metotrexato, mibefradil, midazolam, misoldipina, morfina, nelfinavir, nocardina, nitrendipina, nifedipina, ondansetron, paclitaxel, pentazocina, praziquantel, prednisolona, prednisona, quercetina, quinidina, ranitidina, rapamicina, rifabutin, rifampicina, ritonavir, saquinavir, sirolimus, sulfametiazol, tacrolimus, tamoxifen, talinolol, tenipósido, terfenadina, tetraciclina, topotecan, triamcinolona, valsopodar, verapamil, vinblastina, vincristina, vindesina, zopliclona, sus derivados, y sus mezclas.

En una realización particular, el procedimiento de la invención para producir nanopartículas pegiladas que contienen una molécula biológicamente activa consiste en una modificación de un procedimiento general descrito anteriormente y basado en la desolvatación controlada del polímero tras la incubación conjunta del copolímero y el polietilenglicol [Arbos *et al*, J Control Release 83 (2002) 321-330; ES 2246694; WO05/104648] que incluye, como diferencia fundamental con los procedimientos desarrollados anteriormente, la adición de un compuesto que posibilite la solubilización de la molécula biológicamente activa (en caso necesario).

En una realización particular, las nanopartículas de la invención pueden obtenerse mediante un procedimiento que comprende la incorporación de una solución de la molécula biológicamente activa en un disolvente adecuado (e.g., acetona), a una solución que comprende el polímero biocompatible y el PEG en un disolvente adecuado (generalmente, el mismo que el de la solución de la molécula biológicamente activa) antes de la formación de las nanopartículas. Tras incubar durante un periodo de tiempo apropiado bajo agitación se añade un disolvente (e.g., etanol) para obtener una suspensión de nanopartículas pegiladas que contenían la molécula biológicamente activa. Seguidamente, se adiciona, en su caso, una solución (normalmente acuosa) de un compuesto que posibilita la solubilización de la molécula biológicamente activa a dicha suspensión de nanopartículas pegiladas que contienen la molécula biológicamente activa y se deja homogeneizar. En una realización particular, la molécula biológicamente activa es paclitaxel y el compuesto que permite la solubilización de dicho fármaco es la glicina, que se añade en una solución acuosa de glicina y edetato sódico y glicina. En este caso, la relación fase orgánica/solución hidroalcohólica puede variar en un amplio intervalo, típicamente, dicha relación está comprendida entre 1/1 y 1/10 v/v (volumen/volumen).

A continuación, si se desea, se eliminan los disolventes orgánicos por métodos convencionales. La suspensión resultante, si se desea, se somete a purificación por métodos convencionales (e.g., mediante ultracentrifugación, etc.). Los sobrenadantes se eliminaron y el residuo, si se desea, se resuspende o se congela a -80°C para su posterior liofilización y conservación a largo plazo por métodos convencionales.

La concentración del polímero biocompatible, así como la del PEG o derivado del mismo y de la molécula biológicamente activa puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la concentración del polímero biocompatible está comprendida entre 0,001 y 10% p/v, la concentración del polietilenglicol o derivado del mismo entre 0,001 y 5% p/v, y la concentración de dicha molécula biológicamente activa entre 0,001 y 5% p/v.

En una realización particular, dicho polímero biocompatible es PVM/MA; el PEG es un PEG seleccionado entre PEG 2000, PEG 6000 y PEG 10000; la molécula biológicamente activa es paclitaxel; y la acetona es el disolvente de la solución que comprende el polímero biocompatible y el PEG así como el disolvente de la solución de dicha molécula biológicamente activa (paclitaxel).

En otra realización particular, el procedimiento de la invención comprende, además, la eliminación de los disolventes orgánicos y/o la purificación de las nanopartículas pegiladas.

En una realización concreta, la invención proporciona nanopartículas pegiladas que contienen paclitaxel. Dichas nanopartículas pueden obtenerse mediante un procedimiento que comprende:

- a) suspender, por una parte, el polietilenglicol y el polímero biocompatible (e.g., PVM/MA) en acetona y mantener la mezcla resultante en agitación;

- b) añadir una solución acetónica de paclitaxel a dicha suspensión que contiene el polímero (e.g., PVM/MA) y el polietilenglicol, e incubar la mezcla resultante bajo agitación;
- c) desolvatar el polímero mediante adición de etanol y agua incorporando, además, una solución acuosa de glicina y edetato disódico y dejar homogeneizar durante un periodo de tiempo apropiado (e.g., 10 minutos); y
- d) evaporar los disolventes orgánicos (e.g., bajo presión reducida) y ajustar el volumen final con una solución de glicina; y
- e) si se desea, purificar la suspensión resultante por un método convencional apropiado y el residuo, si se desea, se resuspende en una solución acuosa de un crioprotector (e.g., sacarosa, lactosa, manitol, etc.) y se liofiliza.

La concentración del polímero biocompatible, así como la del PEG o derivado del mismo y del paclitaxel puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la concentración del polímero biocompatible está comprendida entre 0,001 y 10% p/v, la concentración del polietilenglicol o derivado del mismo entre 0,001 y 5% p/v, y la concentración de paclitaxel entre 0,001 y 5% p/v.

En una realización particular, dicho polímero biocompatible es PVM/MA; y el PEG es un PEG seleccionado entre PEG 2000, PEG 6000 y PEG 10000, preferentemente, PEG 2000.

En otra realización particular, la relación en peso paclitaxel :polímero biocompatible es de 1:2-20, aunque relaciones cercanas a una relación en peso de 1:10 dan buenos resultados. A modo ilustrativo, 10 mg de paclitaxel añadidos a una dispersión de acetona conteniendo 100 mg de polímero y 12,5 mg de PEG 2000 da una asociación eficiente. En este caso la cantidad de fármaco asociada a las nanopartículas es de aproximadamente 150 microgramos de paclitaxel por mg nanopartícula. Estas nanopartículas se caracterizan por tener un tamaño cercano a los 180 nm.

En una realización particular, la administración por vía oral una dosis de 10 mg/kg de paclitaxel formulado en nanopartículas pegiladas con PEG 2000, permitió obtener niveles plasmáticos constantes y sostenidos durante al menos 48 horas, tras alcanzar la concentración plasmática máxima (C_{max}) en un tiempo de aproximadamente 6 horas. El área bajo la curva plasmática (AUC) de paclitaxel obtenida por esta formulación es de, aproximadamente, 0,7 veces a la obtenida por administración intravenosa del medicamento comercial administrado a la misma dosis. Esta formulación se caracteriza por ofrecer un tiempo medio de residencia del fármaco en el organismo (MRT) de aproximadamente 15 veces superior al que se obtiene tras la administración de la formulación comercial por vía intravenosa.

En otra realización particular, la administración por vía oral una dosis de 10 mg/kg de paclitaxel formulado en nanopartículas pegiladas con PEG 6000, permitió obtener niveles plasmáticos constantes y sostenidos durante al menos 48 horas, tras alcanzar la concentración plasmática máxima (C_{max}) en un tiempo de aproximadamente 3 horas. El área bajo la curva plasmática (AUC) de paclitaxel obtenida por esta formulación es de, aproximadamente, 0,4 veces superior a la obtenida por administración intravenosa del medicamento comercial administrado a la misma dosis. Esta formulación se caracteriza por ofrecer un tiempo medio de residencia del fármaco en el organismo (MRT) de aproximadamente 15 veces superior al que se obtiene tras la administración de la formulación comercial por vía intravenosa.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende, al menos, una nanopartícula de la invención, y un excipiente, vehículo o adyuvante, farmacéuticamente aceptable.

En general, la molécula biológicamente activa presente en la nanopartícula de la invención estará en el interior de la nanopartícula de la invención; no obstante, podría suceder que parte de dicha molécula biológicamente activa estuviera también unida a la superficie de la nanopartícula si bien la mayor parte del mismo estará en el interior (e.g., encapsuladas) de las nanopartículas de la invención.

Las nanopartículas de la invención pueden utilizarse para modificar la distribución de la molécula biológicamente activa asociada al ser administradas por una vía que dé acceso a alguna mucosa del organismo, preferentemente, por vía oral.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición líquida (suspensión o dispersión de las nanopartículas) para administración oral, bucal, sublingual, etc.; o cualquier composición sólida (e.g., cápsulas, etc.) para su administración oral. Por tanto, en una realización particular, la composición farmacéutica proporcionada por esta invención se administra por vía oral.

Las composiciones farmacéuticas descritas comprenderán los excipientes adecuados para cada formulación. Las formulaciones sólidas orales se preparan de forma convencional por métodos conocidos por los técnicos en la materia.

Los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

5 La proporción de la molécula biológicamente activa incorporada en la nanopartícula de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, puede ser de hasta un 25% en peso respecto al peso total de las nanopartículas. No obstante, la proporción adecuada dependerá en cada caso de la moléculas biológicamente activa incorporada.

10 La dosis a administrar de nanopartículas de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal, preferentemente, entre 0,1 y 2 mg por kg de peso corporal.

15 En una realización particular, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende nanopartículas pegiladas de la invención que comprenden un polímero biocompatible, un polietilenglicol o un derivado del mismo, y paclitaxel o un derivado del mismo, y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización concreta, dicho polímero biocompatible es un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA). En otra realización concreta, dicha composición farmacéutica se formula en forma de una forma farmacéutica de administración adecuada para su administración por vía oral o por una vía de acceso a mucosas, preferentemente, para su administración por vía oral. En otra realización concreta, dicha composición farmacéutica se encuentra en forma liofilizada junto con un agente crioprotector.

En una realización concreta, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende:

<u>Componente</u>	<u>% en peso respecto total</u>
Copolímero de metil vinil eter y anhídrido maleico (PVN/MA)	75,00 - 95,00
Polietilenglicol 2000	5,00 - 24,99
Paclitaxel	0,01 – 15,00

35 En otra realización concreta, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende:

<u>Componente</u>	<u>% en peso respecto total</u>
Copolímero de metil vinil eter y anhídrido maleico (PVN/MA)	70,00 - 95,00
Polietilenglicol 6000	5,00 - 24,99
Paclitaxel	0,01 - 20,00

50 La invención se describe a continuación mediante unos ejemplos que no son limitativos de la invención, sino ilustrativos.

Ejemplos

55 Los siguientes ejemplos describen la producción y caracterización de nanopartículas a base de un polímero biodegradable (PVM/MA) que incorporan distintos tipos de polietilenglicoles y una molécula biológicamente activa (paclitaxel). Dichos ejemplos ponen de manifiesto la capacidad de dichas nanopartículas paginadas de promover la absorción oral de dicha molécula biológicamente activa (paclitaxel). Como puede apreciarse en dichos ejemplos, cuando se utiliza paclitaxel como molécula biológicamente activa, su incorporación en dichas nanopartículas pegiladas permite mantener niveles plasmáticos constantes y sostenidos de dicho fármaco durante, al menos, 48 horas.

60 A continuación, se describen los materiales y métodos generales utilizados para la producción y caracterización de dichas nanopartículas, así como para el estudio farmacocinética de las mismas.

65

I. Materiales y Métodos

A. Materiales

El poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) [PVM/MA], conocido como Gantrez[®] AN 119 (PM 200.000), fue donado por ISP[™] (Barcelona, España). Los polietilenglicoles (PEGs) 2000, 6000 y 10000 (PEG 2000, PEG 6000 y PEG 10000) así como el edetato disódico se obtuvieron de Fluka (Suiza). El paclitaxel (USP 26 grado >99,5%) fue suministrado por 21CEC (Reino Unido) y el docetaxel (Taxotere[®]) por Aventis-Pharma (Francia). La glicina y los disolventes orgánicos acetona y etanol fueron suministrados por VWR Prolabo (Francia). El resto de materiales utilizados fueron de grado HPLC, suministrados por Merck (Alemania), y el agua desionizada empleada también en el análisis fue preparada por un sistema de purificación de agua (Wasserlab, Pamplona, España).

B. Procedimiento general de producción de nanopartículas pegiladas que contienen una molécula biológicamente activa (paclitaxel)

El procedimiento seguido para la producción de las nanopartículas pegiladas a base de PVM/MA y PEG que contienen una molécula biológicamente activa es una modificación de un procedimiento general descrito anteriormente y basado en la desolvatación controlada del polímero tras la incubación conjunta del copolímero (PVM/MA) y el polietilenglicol (PEG) [Arbos *et al.*, J Control Release 83 (2002) 321-330; ES 2246694; WO05/104648] que incluye, como diferencia fundamental con los procedimientos desarrollados anteriormente, la adición de glicina para permitir la solubilización de paclitaxel.

Las nanopartículas pegiladas que contenían una molécula biológicamente activa (paclitaxel) se obtuvieron mediante la incorporación de una solución acetónica de paclitaxel a la solución de PVM/MA y PEG en acetona antes de la formación de las nanopartículas. Brevemente, se dispersaron, por un lado, 12,5 mg de PEG (2000, 6000 ó 10000) en 3 ml de acetona mediante ultrasonificación (aproximadamente 20 minutos) y por otro, 100 mg del copolímero PVM/MA también en 2 ml de acetona. A continuación, se incorporó una de dichas suspensiones sobre la otra y la mezcla resultante se mantuvo en agitación. Posteriormente, se adicionó una solución acetónica de paclitaxel (5, 7,5 ó 10 mg de paclitaxel en 0,5 ml de acetona) en la fase orgánica (acetona) que contenía el polímero (PVM/MA) y el PEG y se incubaron conjuntamente durante un periodo de tiempo aproximado de 1 hora bajo agitación (agitador mecánico o magnético), y, posteriormente, se adicionaron 10 ml de etanol, obteniéndose una suspensión de nanopartículas pegiladas que contenían paclitaxel. A continuación, se adicionaron 10 ml de una solución acuosa de glicina (50 mg) y edetato disódico (20 mg) a dicha suspensión de nanopartículas pegiladas que contenían paclitaxel y se dejó homogeneizar durante 10 minutos. Finalmente, se evaporaron los disolventes orgánicos bajo presión reducida y el volumen final se ajustó con solución de glicina a 10 ml. La suspensión se sometió a purificación por ultracentrifugación en tubos Vivaspin (20 minutos a 3.000 x g). Los sobrenadantes se eliminaron y el residuo se resuspendió en solución de glicina o en una solución de glicina y sacarosa al 5%. Eventualmente pueden congelarse a -80°C para su posterior liofilización y conservación a largo plazo (Virtis Genesis, Nueva York, EEUU).

C. Caracterización físico-química de las nanopartículas

La caracterización de las nanopartículas ha conllevado diversos estudios, que se describen a continuación. Dentro de los estudios físico-químicos se determinó el tamaño de partícula y la carga superficial de las nanopartículas, ésta última mediante la medida del potencial zeta. Ambos parámetros fueron obtenidos por espectroscopia de correlación fotónica (PCS) utilizando un Zetasizer nano Z-S (Malvern Instruments/Optilas, España).

El rendimiento del proceso se calculó gravimétricamente, utilizando el peso de las muestras liofilizadas sin agente crioprotector (Arbos *et al.*, Int J Pharm 242 (2002) 129-136). Dicho valor se corroboró mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección mediante detector evaporativo de luz dispersa (ELSD) [Zabaleta *et al.*, J Pharm Biomed Anal 44 (2007) 1072-1078] siguiendo el método descrito abajo y que permite la cuantificación de los PEGs y del PVM/MA.

La cuantificación de los PEGs se realizó mediante HPLC acoplado a un detector tipo ELSD 2000 Alltech (Estados Unidos). El cromatógrafo utilizado para el análisis fue el modelo 1100 series LC (Agilent, Alemania), como fuente de gas nitrógeno para el ELSD se empleó un generador de nitrógeno Alltech (Ingeniería Analítica, Barcelona, España) y los datos se analizaron en un ordenador Hewlett-Packard mediante el programa Chem-Station G2171 [Zabaleta *et al.*, J Pharm Biomed Anal 44 (2007) 1072-1078]. La separación cromatográfica se llevó a cabo a 40°C utilizando una columna PL Aquagel-OH 30 (Agilent 300 mm x 7,5 mm; 8 µm) y la composición de la fase móvil fue una mezcla de metanol/agua en gradiente (Tabla 1) a flujo 1 ml/min.

TABLA 1

Condiciones de fase móvil en gradiente (A: metanol, C: agua)

Tiempo (min)	A (%)	C (%)
0	50	50
6	50	50
8	40	60
10	25	75
12	10	90
14	50	50

Las condiciones del detector (ELSD) se optimizaron hasta conseguir la máxima sensibilidad de acuerdo con el gradiente utilizado en la fase móvil (temperatura de nebulizador: 110°C; flujo de nitrógeno: 3 l/min). Para el análisis de las muestras, los sobrenadantes obtenidos tras el proceso de purificación de las nanopartículas, se diluyeron hasta 10 ml con agua purificada. Como muestra para su posterior análisis se tomaron alícuotas de 1 ml de sobrenadante y 20 µl de éste se inyectaron en la columna. La separación cromatográfica de los diferentes polietilenglicoles (PEGs) y del PVM/MA se completó en menos de 14 minutos. El tiempo de retención fue de $4,48 \pm 0,06$ minutos para el PVM/MA, $7,71 \pm 0,01$ minutos para el PEG 2000, $6,92 \pm 0,02$ para el PEG 6000 y $6,55 \pm 0,01$ minutos para el PEG 10000. El límite de cuantificación fue de 0,075 mg/ml para los PEGs y 0,25 mg/ml para el PVM/MA. La precisión no superó el límite del 8%.

D. Cuantificación del paclitaxel

La cantidad del paclitaxel encapsulado en las nanopartículas pegiladas se determinó por HPLC. El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo modelo 1100 series LC (Agilent, Alemania) acoplado a un sistema de detección ultravioleta (UV) de diodo-array. Los datos se analizaron en un ordenador Hewlett-Packard mediante el programa Chem-Station G2171. Para la separación del paclitaxel se utilizó una columna de fase reversa Phenomenex Gemini C18 (150 mm x 3 mm; 5 µm) calentada a 30°C. La fase móvil estaba compuesta por una mezcla de solución reguladora de fosfatos (pH= 2; 0,01 M) y acetonitrilo (en proporción 50/50 en volumen), y fue bombeada a un flujo de 0,5 ml/min. La detección se realizó a 228 nm.

Para el análisis de las muestras en fresco, se tomaron 200 µl de suspensión acuosa de nanopartículas, rompiéndose las mismas con 1 ml de dimetilsulfóxido. Se inyectaron alícuotas de 10 µl en la columna HPLC para su análisis.

E. Estudios farmacocinéticos

Los estudios farmacocinéticos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas del Comité Ético de la Universidad de Navarra así como de la legislación europea en animales de experimentación (86/609/EU). Para ello, ratas macho Wistar, de peso medio 225 g (Harían, España), se aislaron en jaulas metabólicas 12 horas antes de la administración de las formulaciones, sin acceso a comida, pero permitiéndoles el acceso libre al agua de bebida.

Los animales se dividieron en 6 grupos de tratamiento (6 animales por grupo) y se trataron con dosis únicas de 10 mg/kg (2,25 mg) de paclitaxel incorporado en alguna de las siguientes formulaciones:

- (i) solución intravenosa (i.v.) de Taxol® (Bristol-Myers Squibb, Madrid, España);
- (ii) solución oral de Taxol®;
- (iii) nanopartículas a base de PVM/MA conteniendo paclitaxel [PTX-NP];
- (iv) nanopartículas a base de PVM/MA pegiladas con PEG2000 conteniendo paclitaxel [PTX-NP2];
- (v) nanopartículas a base de PVM/MA pegiladas con PEG6000 conteniendo paclitaxel [PTX-NP6]; y
- (vi) nanopartículas a base de PVM/MA pegiladas con PEG10000 conteniendo paclitaxel [PTX-NP 10].

A los animales se les administró 1 ml de las distintas formulaciones, disueltas o dispersas en agua, excepto en el caso de la solución i.v. (formulación comercial), que se administró mediante bolus i.v. en la vena de la cola (0,3 ml).

Tras la administración se procedió a extraer, a diferentes tiempos, un volumen de sangre de aproximadamente 300 μ l, utilizando ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante y recuperando la volemia del animal (rata) con un volumen equivalente de suero fisiológico vía intraperitoneal (i.p.). La sangre se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante (plasma) se congeló a una temperatura de -80°C. El estudio se realizó de acuerdo con los principios recogidos en las guías internacionales de experimentación animal (WHO Chronicle, 39 (2): 51-56, 1985; A CIOMS Ethical Code for Animal Experimentation) siguiendo un protocolo aprobado por el Comité Ético de experimentación animal de la Universidad de Navarra (Protocolo nº: 076-06).

Pretratamiento de las muestras

La extracción del paclitaxel a partir de plasma se realizó mediante un procedimiento de extracción líquido-líquido, utilizando t-butilmetiléter como disolvente de extracción. Para ello se tomaron alícuotas de plasma (0,1 ml), se ajustaron a un volumen de 1 ml con agua y se les añadió 0,2 μ g de docetaxel como patrón interno. A continuación, se añadieron 4 ml de ter-butilmetiléter y se agitó durante 1 minuto. Después, se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante (fase orgánica) que se evaporó en una centrifuga evaporadora (Savant, Barcelona, España). El extracto así obtenido se reconstituyó en 125 μ l de una mezcla (50/50 v/v) de acetonitrilo y solución reguladora de fosfatos (pH= 2; 0,01 M) mediante agitación con vortex durante 1 minuto. La solución resultante fue transferida a un vial de inyección.

Método analítico: HPLC

La cuantificación del paclitaxel se realizó por cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta-visible. Como patrón interno se utilizó docetaxel. El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo modelo 1100 series LC (Agilent, Alemania). Los datos se analizaron en un ordenador Hewlett-Packard mediante el programa Chem-Station G2171. Para la separación del paclitaxel se utilizó una columna de fase reversa Gemini C18 (Phenomenex) 150 mm x 3 mm; 5 μ m, calentada a 30°C. La fase móvil estaba compuesta por una mezcla de solución reguladora de fosfatos (pH= 2; 0,01 M) y acetonitrilo (en proporción 50/50 en volumen), y fue propulsada a través de la columna a un flujo de 0,5 ml/min. La detección se realizó a 228 nm.

El método analítico utilizado ha sido validado, comprobándose la relación lineal entre la respuesta del detector y las concentraciones de paclitaxel en plasma a lo largo del intervalo de concentraciones comprendido entre 40 y 3.200 ng/ml.

Análisis Farmacocinético

El análisis farmacocinético de los datos de las concentraciones plasmáticas a lo largo del tiempo obtenidos tras la administración de paclitaxel se realizó utilizando el procedimiento de ajuste nocompartimental del programa de ajuste farmacocinético WinNonlin 1.5 (Pharsight Corporation, Mountain View, USA).

Los parámetros farmacocinéticos calculados fueron los siguientes: concentración máxima (C_{max}), tiempo en el cual se alcanza la C_{max} (t_{max}), el área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC_{0-inf}), el tiempo de residencia media (MRT), la semivida biológica en la fase de eliminación terminal ($t_{1/2\alpha}$) y la biodisponibilidad oral (F) del paclitaxel.

El tiempo de residencia media (MRT) se calculó mediante el cociente entre el valor del AUMC (área bajo la curva en el primer momento de la concentración plasmática) y el del AUC. La biodisponibilidad oral (F) se calculó mediante el cociente entre el valor del AUC de cada formulación respecto al AUC de la formulación comercial (Taxol®).

F. Análisis estadístico

Para el estudio farmacocinético, las formulaciones se analizaron utilizando el test no paramétrico "Mann-Whitney". Valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos. Todos los cálculos se hicieron con el programa estadístico de software SPSS® (SPSS® 10, Microsoft, Estados Unidos).

II. Resultados

II.1 Optimización del proceso de encapsulación del paclitaxel en las nanopartículas pegiladas

Las nanopartículas pegiladas conteniendo paclitaxel fueron obtenidas según el procedimiento previamente descrito en el apartado B de los Materiales y Métodos.

Dado que el paclitaxel (PTX) por sí solo no es capaz de incluirse en las nanopartículas de PVM/MA (Gantrez® AN 119) y es eliminado en el proceso de purificación por filtración de las mismas, en forma de cristales sin solubilizar, se hizo necesario adicionar a la formulación un componente (glicina) que, además de aumentar su solubilidad, mejoraba

su encapsulación en las nanopartículas, tal como se muestra en la Tabla 2. Para la preparación de las nanopartículas se utilizaron diferentes polietilenglicoles (PEGs), que variaban en su peso molecular, y se observó la mejora de la eficacia de encapsulación del PTX, destacando las nanopartículas producidas con PEG 2000 y seguido de los otros 2 tipos, las producidas con PEG 6000 y PEG 10000.

Asimismo, se ensayaron también diferentes cantidades de paclitaxel (5, 7,5, 10 mg), empleando siempre la misma cantidad de PEG (12,5 mg) en los diferentes tipos de nanopartículas, observándose que se obtenía mayor cantidad de fármaco encapsulado al aumentar la cantidad añadida, y, por tanto, una mayor eficacia de encapsulación del PTX en las nanopartículas. La Figura 1 muestra la evolución del contenido en PTX en las nanopartículas pegiladas, en función de la cantidad de PTX empleada y del tipo de PEG utilizado.

Tras estos ensayos, se determinó que la cantidad óptima de PTX a incluir inicialmente en las diferentes formulaciones era de 10 mg de PTX (1:10 PTX/PVM/MA), obteniéndose así los mejores rendimientos. La Tabla 2 muestra la cantidad de PTX encapsulado cuando inicialmente se añadieron 10 mg en función de los diferentes PEGs utilizados. Merece la pena destacar que, tal como se ha mencionado antes, la glicina facilita la resuspensión de las nanopartículas liofilizadas.

TABLA 2

Cantidad de PTX asociado a las diferentes formulaciones de nanopartículas pegiladas en función del tipo de PEG utilizado (cantidad inicial de paclitaxel añadida: 10 mg). Los resultados muestran media $\pm$ desviación típica (n = 6)

Formulación	Tamaño (nm)	PTX ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
PTX - NP	170,6 $\pm$ 5	0,31 $\pm$ 1,3
PTX - NP - gli	176,8 $\pm$ 3	78,11 $\pm$ 3,2
PTX - NP2	177,5 $\pm$ 4	150,17 $\pm$ 5,2
PTX - NP6	179,6 $\pm$ 5	144,03 $\pm$ 3,1
PTX - NP10	187,7 $\pm$ 2	144,59 $\pm$ 6,4

Los datos muestran la media $\pm$ la desviación típica (n = 6)

PTX-NP: nanopartículas a base de PVM/MA y paclitaxel

PTX-NP-gli: nanopartículas control a base de PVM/MA y paclitaxel con adición de glicina

II.2 Caracterización de las partículas pegiladas conteniendo paclitaxel

La Tabla 3 resume las características físico-químicas principales de las nanopartículas probadas en el estudio farmacocinético. Las nanopartículas control (PTX-NP-gli) tenían un tamaño cercano a los 180 nm con una carga superficial negativa de -45 mV. Por otra parte, las nanopartículas pegiladas que contienen encapsulado el PTX mostraron tamaños similares entre ellas y respecto a las nanopartículas control y una carga superficial algo menos negativa (alrededor de -40 mV) que las nanopartículas no pegiladas. Se observó también que la adición de glicina a las nanopartículas no pegiladas convencionales (PTX-NP), no modificó el rendimiento de las mismas pero sí aumentó significativamente la cantidad de PTX encapsulado. Por último, es de destacar que la presencia del PEG tampoco ejerció ningún efecto sobre el rendimiento de fabricación de las nanopartículas que variaba entre el 50% y el 60%.

TABLA 3

Características físico-químicas de las diferentes formulaciones con PEGs utilizadas en los estudios farmacocinéticos

Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Rendimiento (%)	PTX ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
PTX - NP	170,6 $\pm$ 5	0,15	-43,57 $\pm$ 3,2	50,45 $\pm$ 0,9	0,31 $\pm$ 1,3
PTX - NP - gli	176,8 $\pm$ 3	0,09	-44,2 $\pm$ 7,1	62,21 $\pm$ 1,1	78,11 $\pm$ 3,2
PTX - NP2	177,5 $\pm$ 4	0,14	-40,3 $\pm$ 1,1	60,17 $\pm$ 1,2	150,17 $\pm$ 5,2
PTX - NP6	179,6 $\pm$ 5	0,14	-39,5 $\pm$ 4,2	63,82 $\pm$ 2,1	144,03 $\pm$ 3,1
PTX - NP10	187,7 $\pm$ 2	0,13	-41,1 $\pm$ 1,3	63,08 $\pm$ 0,8	144,59 $\pm$ 6,4

Los datos muestran la media $\pm$ la desviación estándar (n = 8)

PTX-NP: nanopartículas a base de PVM/MA y paclitaxel

PTX-NP-gli: nanopartículas control a base de PVM/MA y paclitaxel con adición de glicina

II.3 Estudio farmacocinético de las nanopartículas pegiladas conteniendo paclitaxel tras su administración oral en animales de laboratorio

El paclitaxel es un fármaco que se caracteriza por presentar un perfil farmacocinético dosis-dependiente. Por tanto, previamente fue necesario determinar el perfil farmacocinético tras administrar por vía intravenosa (i.v.) u oral la formulación comercial de paclitaxel a la dosis seleccionada para su formulación en nanopartículas (10 mg/kg).

Los estudios farmacocinéticos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas del Comité Ético de la Universidad de Navarra así como de la legislación europea en animales de experimentación (86/609/EU). Para ello, ratas macho Wistar, de peso medio 225 g (Harían, España), se aislaron en jaulas metabólicas 12 horas antes de la administración de las formulaciones, sin acceso a comida, pero permitiéndoles el acceso libre al agua de bebida.

El estudio farmacocinético se dividió en 2 fases. En el primer estudio se administró 10 mg/kg de la formulación comercial de paclitaxel (Taxol®) por vía i.v. y oral a dos grupos de ratas macho Wistar (n= 6). El segundo estudio consistió en administrar, por vía oral, a distintos grupos de animales, las diferentes formulaciones de nanopartículas: PTX-NP, PTX-NP-gli, PTX-NP2, PTX-NP6, y PTX-NP10. La dosis de paclitaxel seleccionada fue de 10 mg/kg.

Tras la administración se procedió a extraer a diferentes tiempos (0, 10, 30, 60, 90, 180, 360, 480 minutos, 24 horas, 32 y 48 horas) un volumen de sangre de aproximadamente 300 µl, utilizando EDTA como anticoagulante y recuperando la volemia del animal (rata) con un volumen equivalente de suero fisiológico vía intraperitoneal (i.p.). El análisis farmacocinético de los datos obtenidos tras la administración de paclitaxel se realizó utilizando el procedimiento de ajuste no compartimental del programa de ajuste farmacocinético WinNonlin 1.5 (Pharsight Corporation, Mountain View, Estados Unidos).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2. Como se puede observar en la Figura 2A, la administración i.v. de la formulación convencional muestra un pico de concentración de fármaco en plasma en la primera toma de muestra, seguido de una disminución bifásica a lo largo del tiempo. Dicho perfil es similar al descrito por otros autores en la bibliografía [Wiernik *et al.*, Journal Cáncer Res 47 (1987) 2486-2493; Yeh *et al.*, Journal Pharm Res 22 (2005) 867-874]. Cuando dicha formulación comercial se administra por vía oral (Figura 2B), los niveles plasmáticos de paclitaxel son nulos. Por el contrario, al administrar por vía oral las formulaciones de paclitaxel en nanopartículas pegiladas (Figura 2C) se pudo comprobar que estas formulaciones daban lugar a niveles plasmáticos sostenidos en el tiempo. Dichos niveles plasmáticos eran más elevados y más prolongados para PTX-NP2 que para PTX-NP6 o para PTX-NP10. En realidad, se pudo constatar cómo la pegilación permitía la absorción de paclitaxel, aunque el aumento del peso molecular del PEG utilizado para pegar las nanopartículas afectaba negativamente a la absorción del fármaco. La Tabla 4 recoge los valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras realizar un análisis no compartimental de los datos experimentales obtenidos tras administrar las distintas formulaciones de paclitaxel en nanopartículas. Para PTX-NP2 y PTX-NP6, los niveles plasmáticos de fármaco se mantenían durante, al menos, 48 horas. Comparando ambas formulaciones se puede observar que tanto la C_{max} como el AUC son significativamente mayores para PTX-NP2 que para PTX-NP6. Igualmente, la F para PTX-NP2 y PTX-NP6 fue de 0,7 y 0,4 respectivamente. Dicho valor, para las nanopartículas no pegiladas (PTX-NP-gli), fue de 0,09 y para la formulación comercial fue de 0.

TABLA 4

Parámetros farmacocinéticos de las diferentes formulaciones ensayadas

Formulación	Vía Admon.	AUC (ng h/ml)	C _{max} (ng)	T _{max} (h)	MRT (h)	T _{1/2z} (h ⁻¹)	F
Taxol®	i.v.	79212	216674	0,01	1,69	2,59	1
Taxol®	Oral	ND	15	ND	ND	ND	0
PTX-NP2	Oral	56093	2115	5,8	26,44	9,33	0,7
PTX-NP6	Oral	32356	1864	3	26,57	6,24	0,4
PTX-NP10	Oral	13110	1377	3,25	17,87	28,86	0,16
PTX-NP-gli	Oral	7398	150	3,8	31,07	27,18	0,09

AUC_{0-inf}: área bajo la curva de niveles plasmáticos; C_{max}: concentración máxima; T_{max}: tiempo en el cual se alcanza la C_{max}; MRT: tiempo de residencia media; T_{1/2z}: semivida biológica en la fase de eliminación terminal. ND: no determinado.

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula pegilada que comprende un polímero biocompatible, un polietilenglicol o un derivado del mismo, y una molécula biológicamente activa seleccionada del grupo formado por actinomicina D, albendazol, aldosterona, alprazolam, amiodarona, amitriptilina, amprenavir, asimadolina, atorvastatina, bunitrolol, buspirona, camptotecina, carbamazepina, carvedilol, celiprolol, ciclosporina A, cimetidina, clotrimazol, colchicina, cortisona, daunorubicina, debrisoquina, dexametasona, diazepam, digitoxina, digoxina, diltiazem, docetaxel, domperidona, doxorubicina, efavirenz, epirubicina, eritromicina, ergotamina, estradiol, estradiol glucurónico, erlotinib, etopósido, fenitoína, fentanilo, felodipina, fenotiacinas, fexofenadina, fluoroquinolonas, fluorouracilo, FK-506, gentamicina, griseofulvina, hidrocortisona, imatinib, indinavir, itraconazol, ivermectina, ketoconazol, kaemferol, levofloxacina, lidocaína, loperamida, losartan, lovastatina, mebendazol, metilprednisolona, metotrexato, mibefradil, midazolam, misoldipina, morfina, nelfinavir, nicardina, nitrendipina, nifedipina, ondansetron, paclitaxel, pentazocina, praziquantel, prednisolona, prednisona, quercetina, quinidina, ranitidina, rapamicina, rifabutin, rifampicina, ritonavir, saquinavir, sirolimus, sulfametiazol, tacrolimus, tamoxifen, talinolol, tenipósido, terfenadina, tetraciclina, topotecan, triamcinolona, valspodar, verapamil, vinblastina, vincristina, vindesina, zopiclona, sus derivados, y sus mezclas.
2. Nanopartícula según la reivindicación 1, en la que dicho polímero biocompatible es un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA).
3. Nanopartícula según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho polímero biocompatible tiene un peso molecular comprendido entre 100 y 2.400 kDa, preferentemente entre 200 y 2.000 kDa, más preferentemente, entre 180 y 250 kDa.
4. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho polietilenglicol o derivado del mismo tiene un peso molecular comprendido entre 400 y 35.000 Da.
5. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho polietilenglicol se selecciona del grupo formado por un polietilenglicol, un polipropilenglicol, un copolímero que comprende un polietilenglicol y un polipropilenglicol, y sus mezclas.
6. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho polietilenglicol presenta, al menos, un grupo hidroxilo terminal modificado, preferentemente con un grupo alcoxi, acrilato, metacrilato, alquilo, amino, fosfato, isotiocianato, sulfhidrilo, mercapto o sulfato.
7. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho polietilenglicol se selecciona del grupo formado por polietilenglicol 2000, polietilenglicol 6000, polietilenglicol 10000 y sus mezclas.
8. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la relación en peso polietilenglicol:polímero biocompatible es de 1:2-20, preferentemente de 1:2-10, más preferentemente alrededor de 1:8.
9. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la relación entre dicha molécula biológicamente activa y el polímero biocompatible está comprendida entre 1/1 y 1/20 p/p (peso/peso).
10. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha molécula biológicamente activa es paclitaxel o un derivado del mismo.
11. Una nanopartícula pegilada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, como medicamento.
12. Una composición farmacéutica que comprende, al menos, una nanopartícula pegilada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, junto con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, en una forma farmacéutica de administración por vía oral.
14. Empleo de una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la elaboración de una composición farmacéutica.
15. Un procedimiento para la producción de nanopartículas pegiladas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende incubar simultáneamente un polímero biocompatible, un polietilenglicol o un derivado del mismo, y una molécula biológicamente activa seleccionada del grupo formado por actinomicina D, albendazol, aldosterona, alprazolam, amiodarona, amitriptilina, amprenavir, asimadolina, atorvastatina, bunitrolol, buspirona, camptotecina, carbamazepina, carvedilol, celiprolol, ciclosporina A, cimetidina, clotrimazol, colchicina, cortisona, daunorubicina, debrisoquina, dexametasona, diazepam, digitoxina, digoxina, diltiazem, docetaxel, domperidona, doxorubicina, efavirenz, epirubicina, eritromicina, ergotamina, estradiol, estradiol glucurónico, erlotinib, etopósido, fenitoína, fentanilo, felodipina, fenotiacinas, fexofenadina, fluoroquinolonas, fluorouracilo, FK-506, gentamicina, griseofulvina, hidrocortisona, imatinib, indinavir, itraconazol, ivermectina, ketoconazol, kaemferol, levofloxacina, lidocaína, loperamida, losartan, lovastatina, mebendazol, metilprednisolona, metotrexato, mibefradil, midazolam, misoldipina, morfina, nelfi-

ES 2 358 493 A1

navir, nicardina, nitrendipina, nifedipina, ondansetron, paclitaxel, pentazocina, praziquantel, prednisolona, prednisona, quercetina, quinidina, ranitidina, rapamicina, rifabutin, rifampicina, ritonavir, saquinavir, sirolimus, sulfametiazol, tacrolium, tamoxifen, talinolol, tenipósido, terfenadina, tetraciclina, topotecan, triamcinolona, valspodar, verapamil, vinblastina, vincristina, vindesina, zopiclona, sus derivados, y sus mezclas.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, que comprende, además, el desecado, opcionalmente en presencia de un agente crioprotector, de las nanopartículas pegiladas que contienen la molécula biológicamente activa.

17. Una composición farmacéutica que comprende nanopartículas pegiladas que comprenden un polímero biocompatible, un polietilenglicol o un derivado del mismo, y paclitaxel o un derivado del mismo, y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

18. Composición farmacéutica según la reivindicación 17, en la que dicho polímero biocompatible es un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA).

19. Composición farmacéutica según la reivindicación 17 ó 18, en forma liofilizada o en una forma farmacéutica de administración adecuada para su administración por vía oral o por una vía de acceso a mucosas.

20. Composición farmacéutica según la reivindicación 19, en forma liofilizada que comprende, además, un diluyente de uso farmacéutico o un agente crioprotector.

21. Composición farmacéutica según la reivindicación 20, que comprende:

<u>Componente</u>	<u>% en peso respecto total</u>
Copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVN/MA)	75,00 - 95,00
Polietilenglicol 2000	5,00 - 24,99
Paclitaxel	0,01 - 15,00

22. Composición farmacéutica según la reivindicación 20, que comprende:

<u>Componente</u>	<u>% en peso respecto total</u>
Copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVN/MA)	70,00 - 95,00
Polietilenglicol 6000	5,00 - 24,99
Paclitaxel	0,01 - 20,00

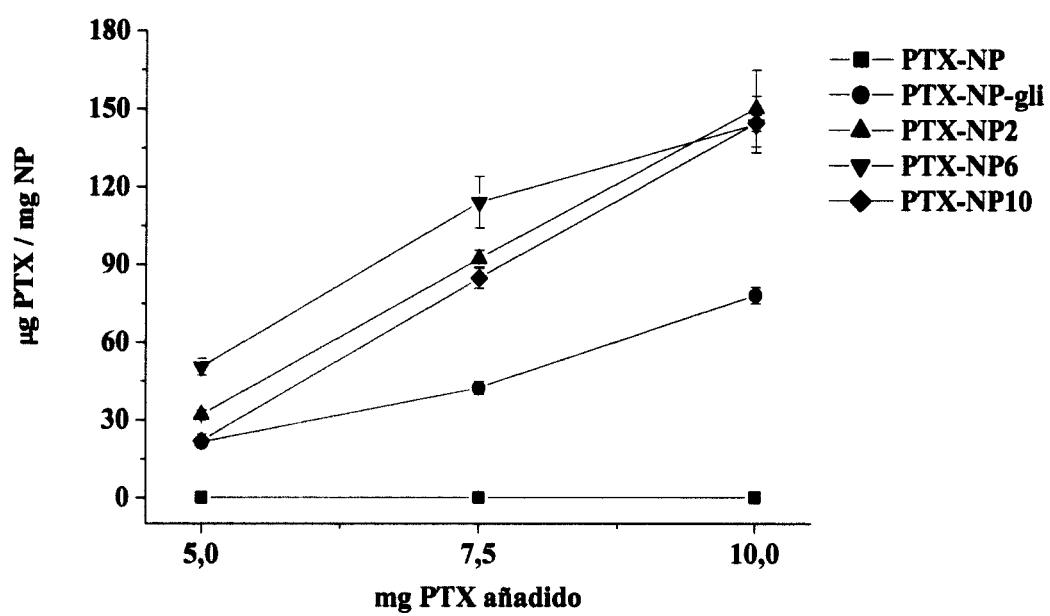


Figura 1

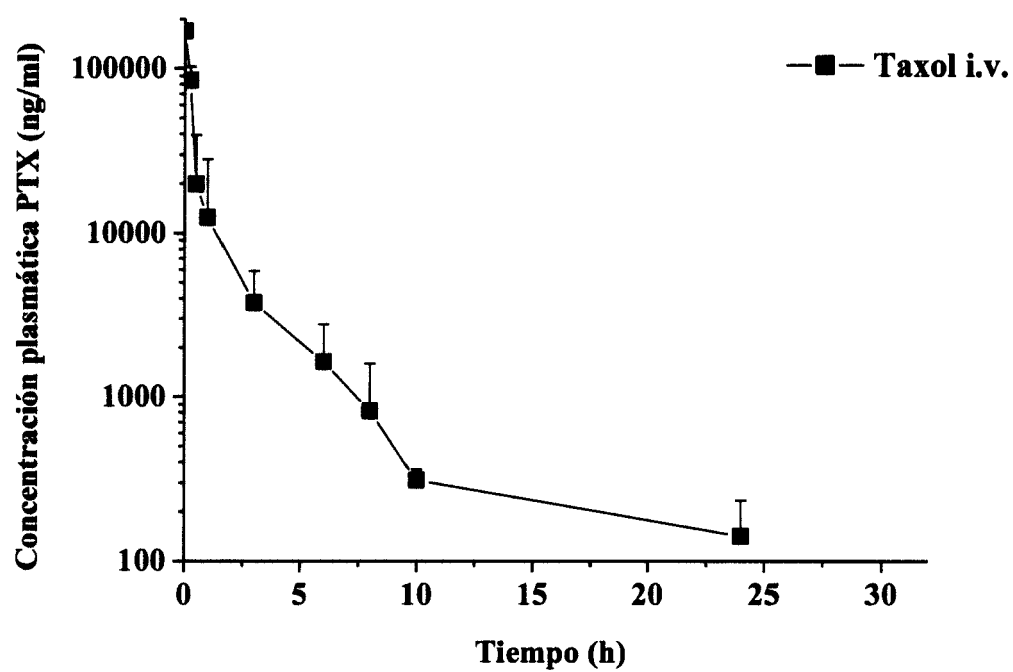


Figura 2A

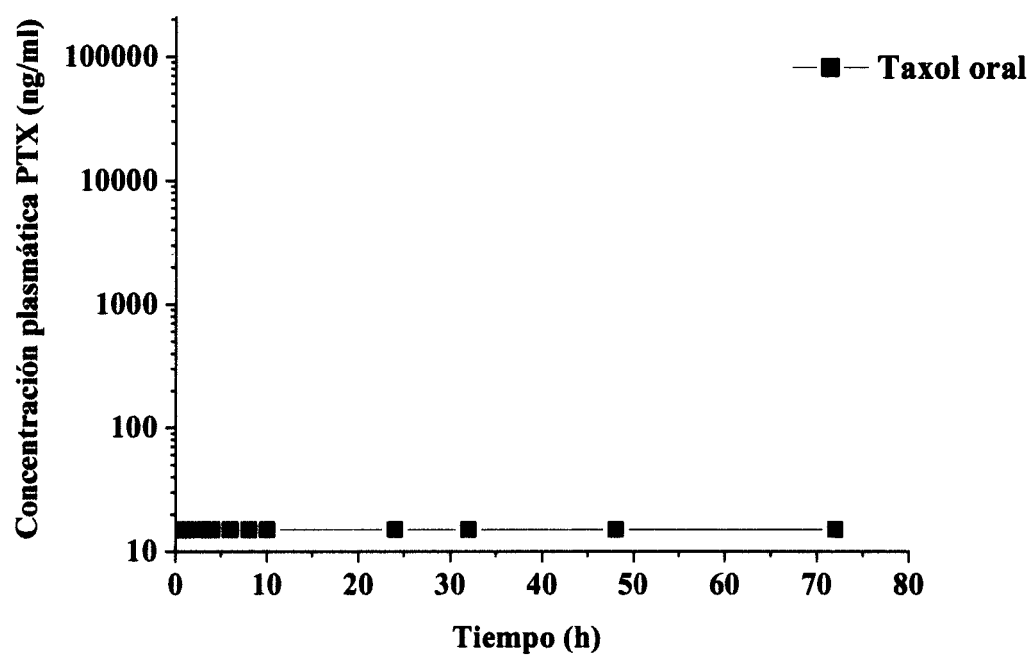


Figura 2B

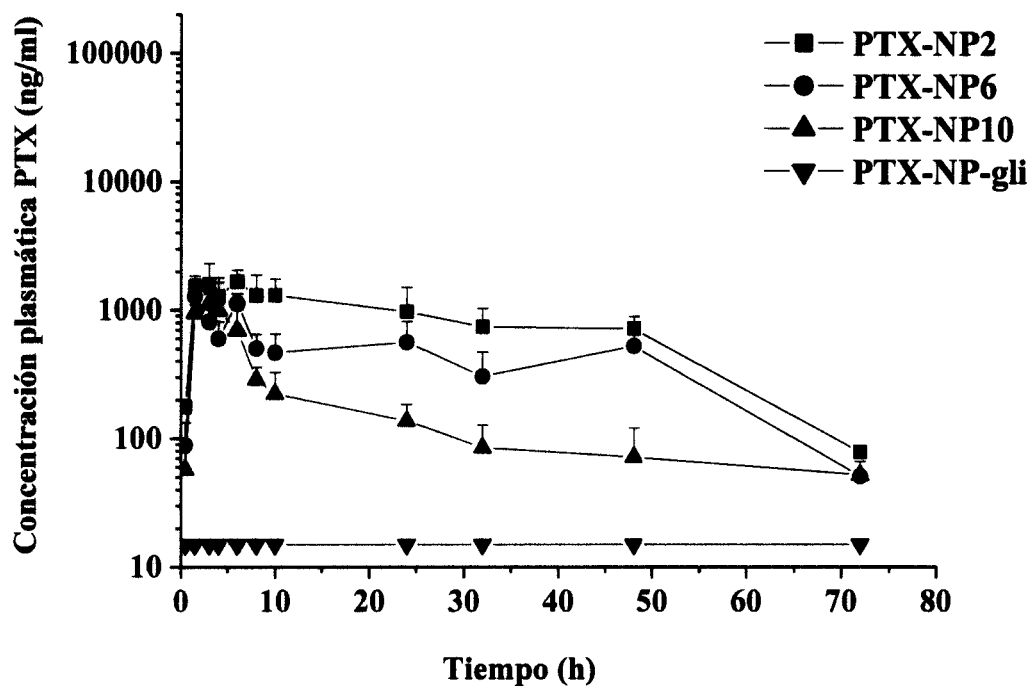


Figura 2C



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200800958

②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.04.2008

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K9/51** (2006.01)
A61K31/337 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2006014626 A2 (CELATOR PHARMACEUTICALS, INC.; THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY) 09.02.2006, párrafos [0002],[0039],[0045]-[0047],[0066],[0071],[0073],[0083]; ejemplos 1-4.	1-22
X	US 6322817 B1 (MAITRA, AMARNATH et al.) 27.11.2001, columna 1, líneas 8-11; columna 2, líneas 24-60; columna 3, líneas 16-43; columna 4, líneas 6-30; ejemplos II,III.	1-22
A	ES 2246694 A1 (INSTITUTO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO DE NAVARRA, S.A.) 16.02.2006, todo el documento.	1-22
A	YONCHEVA, KRASSIMIRA et al.; Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties; European Journal of Pharmaceutical Sciences, volumen 24, número 5, páginas 411-419, 01.04.2005; ISSN 0928-0987.	1-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.04.2011

Examinador
N. Vera Gutiérrez

Página
1/4

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

A61K

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.04.2011

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 21, 22

SI

Reivindicaciones 1-20

NO**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones

SI

Reivindicaciones 1-22

NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2006014626 A2 (CELATOR PHARMACEUTICALS, INC.; THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY)	09.02.2006
D02	US 6322817 B1	27.11.2001

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a una nanopartícula pegilada que comprende un polímero biocompatible, un polietilenglicol o un derivado del mismo, y una molécula biológicamente activa. Se refiere asimismo a su procedimiento de preparación y a la composición farmacéutica que la contiene.

El documento D01 divulga composiciones particuladas que comprenden un copolímero anfifílico y un principio activo ligado a un resto hidrofóbico (párrafo [0002]). En los ejemplos 3 y 4 se preparan nanopartículas que contienen metoxipolietilenglicol, policaprolactona y un complejo de paclitaxel (con vitamina E o con policaprolactona).

En el documento D02 se describen formulaciones de nanopartículas de micelas poliméricas que contienen paclitaxel o sus derivados. En el ejemplo III se preparan nanopartículas de micelas poliméricas con paclitaxel, a partir de vinil pirrolidona, N-isopropilacrilamida y éster de polietilenglicol y anhídrido maleico.

A la vista de los documentos citados, se considera que las reivindicaciones 1-20 no son nuevas (Artículo 6.1 L.P.).

Respecto a las reivindicaciones 21, 22, se considera que no implican actividad inventiva puesto que las características técnicas de dichas reivindicaciones son simplemente alguna de las posibilidades que el experto en la materia podría seleccionar, sin esfuerzo inventivo, para solucionar el problema planteado (Artículo 8.1 L.P.).