



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 978**

51 Int. Cl.:  
**A61K 9/51** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03757174 .2**

96 Fecha de presentación : **11.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1531800**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2005**

54 Título: **Nanocápsulas lipídicas furtivas, procedimientos para su preparación y utilización de las mismas como vehículo para principio(s) activo(s).**

30 Prioridad: **11.06.2002 FR 02 07175**  
**09.09.2002 US 421112 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.10.2011**

73 Titular/es: **ETHYPHARM**  
**194 Bureaux de la Colline Bâtiment D**  
**92210 Saint-Cloud, FR**

72 Inventor/es: **Hoarau, Didier;**  
**Delmas, Pascal y**  
**Leroux, Jean-Christophe**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

**ES 2 366 978 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Nanocápsulas lipídicas furtivas, procedimientos para su preparación y utilización de las mismas como vehículo para principio(s) activo(s).

5 La presente invención se refiere a nanocápsulas que, pueden utilizarse como vehículo para el/los principio(s) activo(s), para el tratamiento de tumores cancerosos sólidos o circulantes, que presentan toxicidad reducida en comparación con el fármaco libre en solución, que presentan propiedades furtivas con respecto al sistema inmunitario del hospedador al que se administran y que son capaces no solamente de experimentar derrame de sangre en el tumor, sino también de liberar su contenido en el mismo. Este nuevo vehículo según la invención está mejor en forma de suspensión coloidal inyectable de nanocápsulas lipídicas que llevan en su superficie moléculas de fosfolípidos asociadas a moléculas de poli(etilenglicol).

15 La presente invención se refiere además al procedimiento para sintetizar estas nanocápsulas lipídicas furtivas, y en particular al procedimiento para insertar dichas moléculas que llevan grupos de poli(etilenglicol) en la envoltura lipídica de las nanocápsulas preformadas. Por último, la presente invención se refiere a una de las utilidades que puede hacerse de dicho vehículo, para la administración de principios activos en la sangre, en particular para el tratamiento de tumores sólidos o circulantes en personas, pero también para el tratamiento de inflamaciones o de cualquier otro estado patológico para el que se observa un aumento de la permeabilidad vascular (áreas inflamatorias, zonas infecciosas).

La presente invención se refiere además a las diversas composiciones farmacéuticas que comprenden nanocápsulas según la presente invención.

25 Ante todo, el término "vehículo" quiere decir cualquier entidad química que permita el transporte y administración, en el organismo al que se administra, de moléculas, y en particular de principios activos, tales como los productos medicinales.

30 Además, el término "coloidal" quiere decir cualquier dispersión estable de elementos sólidos con un tamaño inferior a 1 micrómetro en una fase líquida.

35 El término "furtivo" utilizado para describir el vehículo según la presente invención indica la capacidad de las nanocápsulas para no ser detectadas y después secuestradas y/o degradadas, o para ser difícilmente detectadas y después secuestradas y/o degradadas, y/o para ser detectadas y a continuación secuestradas y/o degradadas después, por el sistema inmunitario del hospedador al que se administran.

40 El término "derrame de sangre" se utiliza para indicar la salida de un cuerpo del compartimento sanguíneo. Esta salida tiene lugar a través de los poros o "perforaciones", tangencialmente al eje del capilar sanguíneo. Este fenómeno se observa solamente en determinados órganos, cuyos capilares están perforados, de modo que el riñón o el hígado, por ejemplo, y en particular los tumores sólidos extracerebrales y los tejidos inflamados o infectados cuyos vasos sanguíneos presentan aumento de permeabilidad.

45 El término "nanocápsulas" quiere decir esferas con un diámetro inferior a 300 nm que comprende una pared circular más o menos rígida a temperatura ambiente y un componente central o núcleo, que, en el caso de la presente invención, contiene sustancias grasas.

El término "anfífilo" se utiliza para describir una molécula que lleva grupos que tienen una afinidad por las sustancias que son de naturaleza hidrófoba y grupos que tienen afinidad por sustancias que son de naturaleza hidrófila.

50 Por último, "% molar" expresa un porcentaje molar y la expresión "principio activo" indica un principio farmacéuticamente activo.

55 Las nanocápsulas lipídicas furtivas que son objeto de la presente invención constan de un núcleo esencialmente lipídico que es líquido o semilíquido a temperatura ambiente, y una envoltura lipídica externa que comprende por lo menos un tensioactivo hidrófilo que es de naturaleza lipídica, por lo menos un tensioactivo lipófilo que es de naturaleza lipídica y por lo menos un derivado anfífilo de poli(etilenglicol) (PEG), cuya masa molar del componente poli(etilenglicol) es superior o igual a 1.000 g/mol, preferentemente superior o igual a 2.000 g/mol.

60 El derivado anfífilo "pegilado" contribuye a proporcionar el aspecto furtivo en las nanocápsulas. El núcleo de las nanocápsulas permite mejorar la incorporación y transporte de muchas moléculas, y más específicamente de los principios activos que son los de naturaleza lipófila, tales como los agentes antineoplásicos, transportados en forma disuelta o dispersada. Las nanocápsulas según la invención son por tanto capaces de transportar productos medicinales antineoplásicos en el sistema sanguíneo, y más específicamente en los tumores que limitan el medio intersticial, durante periodos prolongados. Además, las nanocápsulas según la invención tienen un tiempo de circulación en la sangre suficientemente prolongado, permitiéndolas experimentar interacciones con las células tumorales circulantes y mayor derrame de sangre en los tumores sólidos.

Los tumores "sólidos" consisten en células tumorales organizadas en masas sólidas o en tejidos irrigados por la circulación sanguínea. Muchos tumores están irrigados por una red de capilares perforados. Estos capilares por lo tanto tienen tipos de poros que, dependiendo de su tamaño permiten pasar elementos sólidos fuera del compartimento sanguíneo. El tamaño de las perforaciones entre las células endoteliales de la membrana basal de los vasos tumorales varía de un tumor a otro. Sin embargo, las partículas coloidales inferiores a 300 nm de tamaño pueden experimentar derrame de sangre en algunos tumores. Esta penetración de las partículas coloidales al medio intersticial del tumor, se combina además con un aumento del efecto de retención debido al escaso drenaje linfático del tumor. Este doble fenómeno denominado EPR por *Enhanced Permeability and Retencion*, ha hecho posible prever el desarrollo de una terapia antitumoral basada en sistemas transportadores coloidales. Específicamente, EPR permite la acumulación significativamente prolongada, comparada con la que se observa en los tejidos sanos, de partículas coloidales y de macromoléculas en el área alrededor del tumor.

Este fenómeno de EPR se ha aprovechado por lo tanto para formar vehículos coloidales destinados a transportar principios activos antineoplásicos. Sin embargo, con objeto de que sean verdaderamente eficaces, dichos vehículos deben ser capaces de circular en el compartimento sanguíneo durante un tiempo suficiente antes de ser detectados y después destruidos por el sistema inmunitario del hospedador. Por lo tanto, los objetos coloidales no furtivos son rápidamente detectados por determinados efectores del sistema inmunitario, en particular tal como macrófagos, y no pueden alcanzar los tumores en cantidades suficientes para ser eficaces.

De hecho, los macrófagos constituyen uno de los componentes más importantes del sistema inmunitario y desempeñan una función predominante en la eliminación de partículas extrañas procedentes de la circulación sanguínea, incluyendo liposomas y otras partículas coloidales.

La expresión reconocida para designar esta serie de monocitos circulantes y sedentarios que constituyen el sistema de defensa inespecífico implicado en capturar nanopartículas es "sistema de fagocitos mononucleares" (MPS).

A nivel molecular, la eliminación de partículas inyectadas tiene lugar en dos etapas: opsonización mediante la deposición de proteínas del suero (u "opsoninas") en la superficie de las partículas seguida de reconocimiento y captura de las partículas opsonizadas por macrófagos.

La modificación de la superficie de las nanopartículas con cadenas de polímeros hidrófilos y flexibles, generalmente del tipo poli(etilenglicol), les proporciona una protección estérica evitando que las opsoninas alcancen la superficie de las partículas y dando lugar a la eliminación de las mismas por las células del MPS. La eficacia de estas cadenas de polímero para proporcionar una naturaleza furtiva depende tanto de su longitud como de su densidad. Por lo tanto, Mori *et al.* (*FEBS Lett.*, 284: 263, 1991) han realizado estudios comparativos con fosfolípidos que comprenden cadenas de PEG 750, 2.000 y 5.000 g/mol, presentes en la superficie de liposomas de 200 nm. A igual porcentaje molar, PEG 750 demostró ser completamente ineficaz *in vitro* en dar protección estérica frente a la opsonización. Por otra parte, las cadenas de PEG más largas presentan una eficacia contra la opsonización que está relacionada con su longitud. Este comportamiento *in vitro* se correlaciona con las vidas medias de los liposomas, después de la inyección intravenosa en ratones, que son menos de 30 minutos, aproximadamente 2 horas y más de 3 horas para PEG 750, PEG 2000 y PEG 5000, respectivamente.

Otros estudios (Allen *et al.*, *BBA*, 1066: 29, 1991) demostraron que, por debajo de 1.000 g/mol, las cadenas de poli(etilenglicol) aun cuando están a la concentración de saturación en la superficie de las nanopartículas, no les permiten proporcionar una protección estérica suficiente y por consiguiente propiedades furtivas.

El diseño de vehículos furtivos destinados a transportar principios activos antineoplásicos les permite no solamente aumentar su efecto terapéutico, sino también garantizar así una cierta invisibilidad con respecto al fenómeno de opsonización y al sistema inmunitario. Además, este aumento en su vida media en la sangre (consecuencia del efecto furtivo) puede servir también para aumentar la toxicidad de los principios activos transportados, que principalmente serán liberados en el tejido intersticial del tumor con muy limitada difusión en los tejidos sanos.

De hecho, los principios activos antineoplásicos, son generalmente moléculas que son de pequeño tamaño y que presentan una gran citotoxicidad, particularmente pronunciada en las células en división. Además, su concentración terapéutica eficaz es a veces no muy diferente de la concentración en el plasma en el que se vuelven tóxicas en el organismo al que se administran. Este estrecho intervalo de concentración requiere la utilización de vehículos para la administración de dichos compuestos. La utilización de vehículos furtivos les permite acumularse en el tejido intersticial de los tumores y liberar sus agentes activos en éstos. Debido a esta acumulación, la concentración intratumoral del principio activo es muy alta, mucho mayor que la concentración que puede alcanzarse utilizando vehículos convencionales o con el principio activo solo (Allen, *Trends, Pharm. Sci.*, 15: 215, 1994). Los sistemas coloidales furtivos por consiguiente permiten utilizar dosis mayores de agentes antineoplásicos, mayores de las que es posible administrar con los principios activos solos debido a su gran toxicidad.

La acumulación de nanopartículas en los tumores y el efecto terapéutico resultante depende de las vidas medias de su eliminación de la circulación sanguínea. Por lo tanto, se han comparado varias formulaciones de liposomas de

tipo convencional o que presentan circulación continua basándose en sus características de eliminación en la sangre y en su acumulación en los tumores en ratones (Gabizon A. y Papahadjopoulos D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85: 6949, 1988). De este modo, una formulación furtiva que tiene una vida media de aproximadamente 8 horas presenta una acumulación superior al 10% de la dosis inyectada en los tumores después de 24 horas. Las formulaciones de referencia que tienen vidas medias ligeramente inferiores a una hora, presentan acumulaciones en los tumores que son mucho menores que las observadas para la formulación furtiva. Específicamente, las concentraciones intratumorales de las formulaciones de referencia, a las 24 h, representan solamente del 4 al 16% de la cantidad ensayada en lo tumores en el caso de la formulación furtiva. Estos resultados demuestran que las formulaciones que tienen vidas medias del orden de una hora o menos de una hora se acumulan poco en los tumores.

Los sistemas coloidales tales como los liposomas o las nanopartículas, es decir, que consisten en partículas en suspensión que tienen un diámetro de 25 nm a 1  $\mu$ m, conducen al desarrollo y a la comercialización de varias formas farmacéuticas coloidales.

De este modo, la patente US nº 5.811.119 describe la utilización de liposomas para la administración de productos medicinales antineoplásicos derivados de carotenoides. Esta formulación liposómica en particular permite disminuir la toxicidad *in vivo* de estos principios activos. Los carotenoides destinados a tratar tumores se combinan aquí con un agente que estimula el intercalado que permite su carga en el liposoma. El transporte de estos principios activos lipófilos en un liposoma, cuyo núcleo es de naturaleza hidrófila, es posible debido a la presencia de compuestos anfífilos tales como los triglicéridos. Estos "agentes estimulantes del intercalado" permiten transportar carotenoides en una relación de 10 moles de triglicéridos a un mol de carotenoide.

Dicho vehículo permite prever el transporte de agentes antineoplásicos a la vez que disminuye su toxicidad, pero tiene una baja tasa de encapsulación y, además, no permite una orientación precisa de los tumores ni un aumento de la vida de estos vehículos en el compartimento sanguíneo. Específicamente, el inconveniente principal del sistema de tipo liposoma es su poca estabilidad en la circulación debida, en particular, a su rápida biodegradación por enzimas circulantes.

La patente US nº 5.527.528 describe la utilización de liposomas modificados para transportar y administrar productos medicinales antineoplásicos. Los liposomas descritos son de un tamaño entre 50 y 120 nm, contienen un compuesto antitumoral tal como citarabina y tienen, en su superficie, cadenas moleculares de poli(etilenglicol) a una concentración suficiente para aumentar de manera significativa el tiempo de circulación de dichos liposomas en el compartimento sanguíneo del hospedador al que se administran. Además, estos liposomas transportan también, en su superficie, anticuerpos específicos para determinados antígenos tumorales, permitiendo la orientación activa de los liposomas contra los tumores.

Este documento da a conocer un vehículo que proporciona tanto el transporte continuo de principios activos en la circulación como una determinada orientación al tipo de tumor contra el que se dirigen.

Sin embargo, este tipo de vehículo tiene un inconveniente principal. Específicamente, es especialmente ventajoso para los agentes antineoplásicos que sean de naturaleza hidrófila, tal como, por ejemplo, la citarabina o la gentamicina. Aquí de nuevo, está limitado el transporte de los principios activos lipófilos, y en particular de los agentes antineoplásicos tales como, por ejemplo, la daunomicina. Estos compuestos se transportan por incorporación en la doble capa de fosfolípido de los liposomas. Debido a esto, el rendimiento de la incorporación continúa siendo bajo ya que el volumen del núcleo del liposoma no se utiliza para el transporte. El principal inconveniente de estos sistemas está representado por una capacidad limitada de incorporación para los productos medicinales lipófilos debido a la relación desfavorable de los volúmenes del compartimento acuoso a los volúmenes del compartimento lipófilo.

Además, la incorporación en la membrana de los principios activos dependerá de su grado disolución en el medio lipídico de esta doble capa de fosfolípido. Es difícil modular la naturaleza lipófila en esta bicapa dado que la selección de sus componentes, en este caso los fosfolípidos, está limitada. Este tipo de transportador no permite por consiguiente ajustar el BLH\* (balance lipófilo hidrolítico) del medio de transporte con respecto a la liposolubilidad del principio activo transportado con tanta facilidad como el núcleo de las nanocápsulas según la invención para las que la selección de los constituyentes del núcleo ofrece mayor versatilidad. Los rendimientos de la incorporación dependen por consiguiente del grado de solubilidad del principio activo en la membrana liposómica. Por lo tanto, los liposomas son generalmente incapaces de incorporar más del 5% molar (más generalmente del 1 al 2%) de los principios activos hidrófobos en su membrana en relación con todos los lípidos que constituyen la composición de la bicapa lipídica (Lasic, *Trends Biotechnol.* 16: 307, 1998).

\*El índice HLB, o balance hidrófilo/lipófilo, está definido por C. Larpent en el tratado K. 342 de las publicaciones "*Techniques de l'ingénieur*".

Los liposomas comercializados bajo la marca comercial Doxil<sup>®</sup> y destinados a transportar doxorubicina son también objetos que presentan ciertas propiedades furtivas en el compartimento sanguíneo. Estos liposomas tienen, en su superficie, moléculas de PEG insertadas en la doble capa de fosfolípido, y por lo tanto proporcionan orientación

pasiva con respecto a los tumores.

El principio activo se "carga" en los liposomas mediante un mecanismo de "carga activa" que procede del acomplejamiento de la doxorubicina a medida que se difunde en el núcleo acuoso. El gradiente de pH permite introducir a la doxorubicina en los liposomas, donde este principio activo se cambiará a continuación en la forma de un gel. Este mecanismo de relleno permite obtener un alto rendimiento de la carga del principio activo.

Sin embargo, este mecanismo puede explotarse solamente para determinados principios activos que son de naturaleza anfifila e ionizable, que pueden difundirse fácilmente a través de la bicapa lipídica (por consiguiente pequeñas moléculas) y que tienen propiedades de precipitación o acomplejamiento, tales como la doxorubicina o mitoxantrona, y no es aplicable para la mayoría de los agentes antineoplásicos. Los principios activos que no pueden beneficiarse de este mecanismo presentan bajos rendimientos de carga y requieren etapas posteriores de separación en una columna y de reciclado de los principios activos.

Además, la utilización de liposomas como vehículos para principios activos adolece de otros inconvenientes. En particular, la presencia de la doble capa de fosfolípido limita físicamente el tamaño de los liposomas obtenidos, que pueden, con dificultad, alcanzar tamaños menores de aproximadamente 50 nm debido al valor limitativo del radio de curvatura que esta membrana puede alcanzar.

La utilización de vehículos liposómicos por consiguiente conlleva determinados inconvenientes principales, en particular en su capacidad para transportar varias sustancias anticancerosas, pero también con respecto a la facilidad con la que pueden utilizarse y almacenarse.

Específicamente, dichos vehículos liposómicos no pueden liofilizarse fácilmente sin perder sus propiedades estructurales y su capacidad para transportar cuando la solución coloidal se reconstituye. Como resultado, las suspensiones liposómicas pueden presentar muy poca solubilidad y tiempos de conservación relativamente breves.

Para intentar superar estos inconvenientes que limitan la eficacia de este tipo de vehículo, se han desarrollado vehículos coloidales no liposómicos. Las micelas a base de polímeros de hecho ofrecen una buena alternativa a los liposomas desde el punto de vista del transporte de principios activos lipófilos, y en particular de los agentes cancerosos.

De este modo, el documento WO 02/00194 describe un vehículo coloidal en forma de micelas a base de polímeros. Este vehículo permite, entre otros el transporte y liberación de principios activos antineoplásicos tal como la doxorubicina o el metotrexato, por ejemplo. Las micelas reivindicadas comprenden un componente hidrófobo central en el que puede insertarse un agente antineoplásico lipófilo, y una "carcasa" externa que es de naturaleza hidrófila. Estas micelas de hecho corresponden a un montaje de polímeros dibloque que comprenden una mitad hidrófila a base de poli(vinilpirrolidona) y una mitad hidrófoba consistente en poli(ácido láctico). El componente hidrófobo central corresponde al venidero junto de los componentes hidrófobos centrales de las moléculas de polímero que constituyen estas micelas. Este vehículo, además de su capacidad para transportar moléculas hidrófobas, permite proporcionar partículas que son de tamaño muy pequeño, y en particular inferiores a 10 nm, que es difícil de conseguir en el caso de los liposomas.

Se han desarrollado además otros tipos de micelas poliméricas con la ayuda de principios activos vehiculantes en la sangre durante periodos prolongados (Stolnik, *et al.*, *J. Drug Target.*, 9:361, 2001). Este tipo de vehículo tiene además una estructura de tipo polímero dibloque, estando constituido el componente hidrófobo por poli(ácido láctico) (PAL) y estando representados los componentes hidrófilos por PEG. Dependiendo de la longitud de cada uno de los bloques, las micelas de PAL y PEG obtenidas tienen varios tamaños, más generalmente de aproximadamente 75 nm. La inyección intravenosa de estas micelas en las ratas pone de manifiesto determinadas propiedades furtivas con una media de eliminación de entre 1 y 2 horas; el 25% de la dosis inyectada está todavía presente en la sangre después de 3 horas.

Por otra parte, los vehículos a base de micelas tienen el inconveniente de que son relativamente inestables en el organismo y pueden disociarse rápidamente en dilución. De hecho, la estabilidad de las micelas depende de la concentración crítica de la micela (CCM), por debajo de la cual las moléculas poliméricas que las forman se desensamblan. Esta estabilidad relativa hace uso industrial de micelas para la administración terapéutica de sustancias anticancerosa delicadas.

De este modo, se han desarrollado otros vehículos a base de nanopartículas, aparte de los liposomas, con objeto de superar la falta de estabilidad de los sistemas coloidales existentes y/o su escasa eficacia para transportar moléculas que son de naturaleza lipófila.

De este modo, la patente WO 01/64328 describe dichas nanocápsulas lipídicas que comprenden una superficie lipídica rígida o un núcleo líquido o semilíquido compuesto por ésteres de ácidos grasos y de triglicéridos. La superficie rígida de estas nanocápsulas está compuesta, en parte, de Lipoide® S 75-3, que corresponde a una mezcla de varias lecitinas, y de Solutol® HS 15. Este tipo de vehículo permite prever el transporte de principios

activos hidrófobos, y en particular de agentes antineoplásicos. En dichas nanopartículas, el principio activo lipófilo, está presente en forma disuelta dentro del núcleo, cuya composición puede modificarse para ajustar el HLB en función de la liposolubilidad del principio activo seleccionado. Las nanocápsulas lipídicas según la patente WO 01/64328 han sido objeto de una evaluación de su comportamiento en la sangre *in vivo*, posterior a la inyección intravenosa de las mismas en ratas (Cahouet, *et al.*, *Int. J. Pharm.*, 242: 367, 2002). Solutol® HS 15 que constituye la superficie de estas nanopartículas es una molécula constituida por un componente hidrófobo y una cadena corta de poli(etilenglicol) de 660 g/mol que sobresale en la parte exterior. Como se mencionó anteriormente, las cadenas de PEG que son tan cortas, incluso a alta densidad, no son suficientemente eficaces para proporcionar en las nanopartículas una protección estérica contra la opsonización y por consiguiente las propiedades furtivas. Por lo tanto, la vida media de estas nanocápsulas lipídicas es breve ya que es aproximadamente de 45 minutos, Estas nanocápsulas lipídicas circulan, sin embargo, durante un período más prolongado que las moléculas pequeñas tales como los marcadores radioactivos solos. La vida media de las nanocápsulas lipídicas según la patente WO 01/64328 no sería suficiente por consiguiente para permitirles circular durante periodos prolongados con objeto de poderse acumular en los tumores (en otros órganos aparte del hígado y del bazo) como se mencionó anteriormente.

Otros tipos de nanocápsulas lipídicas que presentan, este periodo, un determinado periodo largo de circulación en los ratones, y que se destina a transportar principios activos antineoplásicos, ha sido producido y descrito por Mosqueira *et al.* (*Pharm. Res.*, 18: 1411, 2001). Dichas nanocápsulas lipídicas poseen ambas un núcleo compuesto por sustancias grasas lo que permite a los principios activos lipófilos, en particular agentes antineoplásicos, disolver y por consiguiente ser transportadas, y una capa rígida externa de polímeros sobre las que las cadenas de PEG se injertan, proporcionándolas algunas propiedades furtivas con respecto al sistema inmunitario.

Estas nanocápsulas, de aproximadamente 200 nm de diámetro, presentan un periodo de circulación en la sangre que es significativamente mayor que las de las mismas nanopartículas que carecen de dichas moléculas en la superficie. Sin embargo, estos resultados fueron obtenidos en ratones, cuyo sistema inmunitario tiene una capacidad de opsonización que es inferior a la observada en las ratas o en las personas, por ejemplo. Su eficacia relativa en escapar del sistema inmunitario de ratones no permite por consiguiente extrapolar estos resultados a los sistemas inmunitarios de ratas o de personas que son más potentes desde el punto de vista de la capacidad para la opsonización (Liu D. *et al.*, *BBA*, 1240: 277, 1995).

Además, su diámetro relativamente grande no les permitiría experimentar fácilmente derrame de sangre en los tumores más sólidos. Por lo tanto, aun cuando el tiempo de residencia en el compartimento sanguíneo ha aumentado, la orientación al tumor continúa siendo baja, lo que limita cada vez más su eficacia terapéutica.

Se han desarrollado también nanoesferas compuestas de polímeros constituidos por una estructura dibloque de PLA-PEG, que presentan propiedades furtivas en ratas, con una vida media de la eliminación de 6 horas, (Verrecchia *et al.*, *J. Control. Rel.*, 36: 49, 1995). El componente hidrófobo del polímero consiste en PLA de 30.000 g/mol, y la cadena hidrófila está compuesta por PEG de 2.000 g/mol. Estas nanopartículas tienen una superficie que es relativamente desfavorable para la activación del complemento, cuya consecuencia es disminuir los fenómenos de opsonización y la fagocitosis por las células del MPS.

Sin embargo, el principal inconveniente de este tipo de nanopartículas a base de polímeros sólidos del tipo PLA reside en su escasa capacidad para liberar rápidamente el principio activo, una vez en el área en torno a la masa de células tumorales. Específicamente, la capa rígida externa de estas nanopartículas está compuesta de PLA y se degrada relativamente lentamente por hidrólisis. Esta débil bioerosión implica una liberación lenta de los principios activos contenidos en estas nanocápsulas. Actualmente, la eficacia terapéutica de dichos vehículos antineoplásicos, procede, en primer lugar, de su capacidad para escapar del sistema inmunitario y, en segundo lugar, de su capacidad para liberar rápidamente, es decir, en menos de 24 horas, su contenido en el área alrededor del tumor. Actualmente, las nanopartículas descritas por Mosqueira o Verrecchia están prácticamente sin degradar una vez han estado en el organismo durante un periodo de 24 horas, lo que no permite prever un tratamiento óptimo de los tumores sólidos.

La presente invención proporciona de este modo un nuevo vehículo para el o los principios activos, que permite tanto evitar la mayoría de los inconvenientes observados con respecto a los vehículos liposómicos, como mejorar la eficacia de la orientación y la liberación del o de los principios activos al o en el tumor en comparación con los vehículos coloidales no liposómicos existentes.

El objetivo de la presente invención consiste también en proporcionar un nuevo tipo de vehículo furtivo para el o los principio(s) activo(s) que permite el tratamiento más eficaz de los cánceres, en particular de los tumores sólidos o circulantes aumentando su índice terapéutico.

El índice terapéutico es la relación de la dosis de fármaco que produce un efecto no deseado a la dosis que produce los efectos deseados.

Debido a su reducida toxicidad, ya que el fármaco está encapsulado y no en solución, sus propiedades de

5 circulación prolongada y las capacidades de orientación al tumor, las nanocápsulas según la presente invención proporcionan el fármaco con un índice terapéutico mejorado. De hecho se ha demostrado que la encapsulación de principios activos en vehículos de fármaco coloidal reduce su volumen de distribución. Esta alteración en las características farmacocinéticas conduce a un aumento de eficacia y/o una reducción de toxicidad y permite que se administren cantidades mayores de fármaco.

10 Específicamente, las nanopartículas según la presente invención, como vehículo para principio(s) activo(s), puede(n) utilizarse para el tratamiento de los tumores sólidos ya que las características de tamaño y furtivas de las nanocápsulas según la invención permiten a estas nanocápsulas aproximarse y penetrar en estos tumores por un fenómeno de derrame de sangre. En este caso se hace referencia a la orientación pasiva a los tumores. De este modo, para crédito del solicitante, ha podido diseñarse un vehículo compuesto de nanopartículas lipídicas furtivas que permiten la orientación pasiva a los tumores a los que se dirige.

15 Además, las nanopartículas según la presente invención, como vehículo para el o los principio(s) activo(s), pueden utilizarse para el tratamiento de tumores circulantes mediante un fenómeno de orientación activa. Esta orientación activa se produce acoplado, a la superficie de dichas nanocápsulas, moléculas o "ligandos" específicos para determinadas moléculas superficiales de los tumores circulantes. El acoplamiento de dichas moléculas superficiales se realiza mejor durante el procedimiento para sintetizar las nanocápsulas, por posinserción, como se describe más adelante. En general, las nanocápsulas según la invención, como vehículo para el o los principio(s) activo(s), pueden utilizarse para el tratamiento de tumores que son de naturaleza sólida o circulante, por orientación activa, cuando tienen receptores que pueden ser reconocidos por un ligando, o por orientación pasiva (sin la implicación de un receptor).

20 Las nanocápsulas según la presente invención, como vehículo para el o los principio(s) activo(s), también presentan una liberación rápida y por consiguiente más eficaz de este (estos) principio(s) activo(s) en el entorno inmediato del tumor. La biorresorción rápida de los constituyentes permite dicha liberación rápida de dichas nanocápsulas, en particular debido a la acción de las enzimas presentes en el organismo.

25 Esta característica de biodegradación, en particular por digestión enzimática, es una ventaja adicional de la presente invención, que permite mejorar la eficacia terapéutica de los principios activos administrados de esta manera. El vehículo según la invención también presenta propiedades furtivas ventajosas con respecto al sistema inmunitario y biodegradabilidad completa combinada con una falta total de toxicidad. De hecho, todos los constituyentes del vehículo según la invención son biodegradables y pueden ser asimilados rápidamente en el organismo, son todos objeto de una aprobación para utilización parenteral y se formulan también sin ningún disolvente orgánico. Por lo tanto, esta toxicidad "intrínseca" de las nanocápsulas es muy baja o ni siquiera existe.

30 Además, las nanocápsulas según la presente invención pueden transportar un contenido relativamente alto de principio activo potencialmente tóxico (como agentes antineoplásicos) por el organismo presentando toxicidad reducida en comparación con el fármaco libre en solución.

35 Este aspecto de la presente invención, se muestra en el Ejemplo 10, parte F) de la memoria y en la figura 7 (evolución del peso corporal medio relativo de ratones después de tres inyecciones intravenosas de docetaxel) y en la figura 8 (número medio de días para alcanzar el 15% de pérdida de peso corporal para diferentes formulaciones de docetaxel administrado a ratones).

40 Por lo tanto, su toxicidad intrínseca muy baja, combinada con su toxicidad reducida cuando se transporta sustancia potencialmente tóxica, permite a las nanocápsulas según la presente invención convertirse en un vehículo muy seguro de agentes antineoplásicos en mamíferos.

45 El nuevo vehículo coloidal furtivo según la invención presenta además la ventaja de ser fácilmente liofilizable y esterilizable sin perder sus propiedades cuando se reconstituye en forma de suspensión.

50 Este vehículo también permite administrar, por vía vascular, productos medicinales destinados al tratamiento de la inflamación de tejidos.

55 Las nanocápsulas lipídicas según la presente invención tienen ventajosamente un diámetro comprendido entre 50 y 150 nm, preferentemente entre 80 y 120 nm.

60 El tamaño de dichas nanopartículas desempeña una función en la orientación pasiva de los agentes tumorales antineoplásicos. Específicamente, el efecto EPR observado en el tumor permite el paso en el medio intersticial que rodea el tumor sólido, y la retención en el mismo, de los elementos presentes en la sangre, cuyo diámetro es suficientemente pequeño para permitir este derrame de sangre. Las nanocápsulas según la invención se preparan utilizando un procedimiento que permite ventajosamente modular su tamaño. Además, presentan propiedades de circulación continua que les proporciona una vida media en el compartimento sanguíneo de más de dos horas. Estas dos características permiten de manera ventajosa activar el fenómeno del derrame de sangre aumentando el número de pasos realizados por las nanocápsulas en la región de las perforaciones de los capilares del tumor.

El fenómeno de derrame de sangre se presenta en el ejemplo 11, parte G) (véase también las figuras 9 y 10) donde la acumulación de nanocápsulas radiomarcadas cargadas con docetaxel en los tumores se demuestra que es significativamente más importante para las nanocápsulas furtivas (S-LN) que para las nanocápsulas no pegiladas (LN).

La naturaleza furtiva de las nanocápsulas según la invención es también capaz de activar los contactos con las células malignas presentes en la circulación sanguínea, en el caso de tumores circulantes.

El derrame de sangre corresponde a un fenómeno de filtración tangencial, que significa que un tumor con poros de un diámetro de 200 nm permitirá circular objetos con el mismo diámetro que pasan solamente con dificultad. Además, el tamaño de las nanocápsulas según la invención, las permite impedir la captura por derrame de sangre a nivel de las células del hígado. De hecho, las perforaciones de los capilares sinusoidales del hígado permiten el derrame de sangre de partículas de aproximadamente 50 nm. Por último, dichas nanopartículas deben tener un tamaño inferior a 200 nm con objeto de impedir el fenómeno de filtración observado en el bazo para partículas mayores de este tamaño. Por lo tanto, el tamaño definido de las nanopartículas es responsable tanto del fenómeno de orientación pasiva activada por EPR, como del aumento en la duración en que dichas nanopartículas persisten en la circulación sanguínea permitiéndolas evitar el fenómeno de filtración y de derrame de sangre hepático.

El diámetro de las nanopartículas puede ajustarse en función del tipo de tumor que debe tratarse y puede, cuando proceda, ser ligeramente inferior o superior al intervalo mencionado anteriormente.

El tamaño de las nanocápsulas debe ajustarse de hecho al tamaño de las perforaciones de los tumores que deben destruirse, variando este tamaño posiblemente a lo largo del tiempo, dependiendo de la madurez del tumor, y en el espacio, en el mismo tumor. Como resultado, la orientación pasiva del vehículo según la invención puede ser previsto solamente a nivel terapéutico si el tamaño de las nanocápsulas según la invención puede ajustarse con precisión. Actualmente, el solicitante ha desarrollado ventajosamente un procedimiento para sintetizar con precisión nanocápsulas furtivas de tamaño variable y controlable. El presente vehículo comprende de este modo capacidades para adaptarse al medio tumoral que le hace completamente el más eficaz.

La envoltura lipídica externa de las nanocápsulas según la invención, comprende un tensioactivo lipófilo que es de naturaleza lipídica. Este tensioactivo está ventajosamente en forma de una lecitina, cuya proporción de fosfatidilcolina es por lo menos igual al 95%, preferentemente superior al 99%.

El solicitante ha observado que la constitución de las nanocápsulas que comprenden un contenido en fosfatidilcolina superior al 95%, permite aumentar de manera significativa en ratas el tiempo de circulación en la circulación sanguínea. De este modo, impurezas, tales como otros fosfolípidos, por ejemplo, fosfatidiletanolamina, lisofosfolípidos o ácidos grasos libres, pueden contribuir a aumentar el fenómeno de opsonización de estas nanopartículas. Además, el solicitante ha observado también que el rendimiento de inserción de las moléculas de lípido acopladas a las moléculas de PEG es mejor cuando el tensioactivo lipófilo presenta una concentración inicial en fosfatidilcolina superior al 95%.

De este modo, el tiempo de circulación largo observado de las nanocápsulas según la invención puede proceder del hecho de que la superficie externa de estas nanocápsulas está constituido por un fosfolípido prácticamente puro a base de fosfatidilcolina, que limita la opsonización. El grado de pureza en cuanto a fosfatidilcolina desempeña una función en los mecanismos para evitar la opsonización.

El tensioactivo lipófilo que es de naturaleza lipídica representa ventajosamente un porcentaje molar entre el 5 y el 30% mol de las moléculas de lípido que constituyen dicha envoltura lipídica externa.

Este tensioactivo tiene preferentemente una temperatura de transición de la fase gel al líquido superior al 25°C, preferentemente superior a 37°C; esto significa que, a temperatura ambiente, dicho tensioactivo está en forma de gel y solamente cambia a forma líquida a una temperatura superior a 25°C, preferentemente superior a 37°C. La temperatura de transición gel/líquido desempeña una función en la rigidez de la envoltura lipídica externa de dichas nanocápsulas. La rigidez de la temperatura externa ofrece a las nanocápsulas según la invención una estabilidad fisicoquímica considerable, tanto en medio acuoso cuando están en suspensión, pero también cuando se administran en el compartimento sanguíneo. De hecho, la rigidez de dicha envoltura externa da a las nanocápsulas una cohesión que les permite resistir modificaciones medioambientales tales como las variaciones de pH o de presión osmótica, lo que sucede durante la inyección.

De manera ventajosa, el tensioactivo lipófilo es un fosfolípido que lleva cadenas a base de carbono saturadas, preferentemente dos cadenas, comprendiendo cada una de estas cadenas por lo menos 16 átomos de carbono. Como resultado de esto, un fosfolípido puede seleccionarse preferentemente de entre DSPC (distearoilfosfatidilcolina) C<sub>18</sub>-C<sub>18</sub>, HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada) C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> y DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub>. Preferentemente HSPC puede utilizarse en un grado de pureza superior al 99% a fin de obtener mejor rigidez y mejores propiedades furtivas. Este último compuesto es parte de la composición de

una formulación liposómica inyectable comercializada bajo la marca registrada Doxil®.

Además, dicha envoltura lipídica externa comprende un tensioactivo hidrófilo que es de naturaleza lipídica, preferentemente aprobado para uso parenteral. Este tensioactivo hidrófilo se selecciona ventajosamente de entre ésteres alquílicos de poli(etilenglicol) y éteres alquílicos de poli(etilenglicol) y mezclas de los mismos.

El tensioactivo hidrófilo representa preferentemente entre el 60 y el 90% mol de las moléculas de lípido que constituyen dicha envoltura lipídica externa. El tensioactivo se utiliza preferentemente en una proporción molar de aproximadamente 80% mol de las moléculas lipídicas que constituyen la envoltura lipídica externa.

Este tensioactivo hidrófilo se utiliza, con el tensioactivo lipófilo, para la formación de la emulsión aceite/agua requerida para preparar las nanocápsulas según la invención. De hecho asegura la estabilización de las gotitas de grasa formadas a partir de la mezcla de triglicéridos durante el procedimiento de síntesis de dichas nanocápsulas. Además, este tensioactivo asegura también la cohesión de dicha envoltura lipídica externa. La proporción relativamente alta de tensioactivo hidrófilo en la envoltura de dichas nanocápsulas permite obtener una baja tensión interfacial, que le permite preparar nanocápsulas en las que cuanto mayor es la proporción de tensioactivo hidrófilo, menor es el diámetro.

Se utilizarán preferentemente los tensioactivos no iónicos, comercializados bajo las denominaciones: Solutol® HS15 (BASF), Brij® (Uniquema) o Mapeg® (BASF). Se hará uso preferentemente de Solutol® HS15, que corresponde a 12-hidroxiestearato de poli(etilenglicol)-660, que comprende una cadena corta de 15 unidades de etilenglicol correspondiente a un peso molecular de 660 g/mol. Este tensioactivo está aprobado ventajosamente para uso parenteral, y más particularmente para administración intravenosa; además, proporciona buenos resultados desde el punto de vista de cohesión.

Por último, dicha envoltura lipídica externa comprende un derivado anfífilo de PEG que contribuye eficazmente a prolongar el tiempo de circulación de dichas nanocápsulas. Específicamente, el derivado anfífilo de PEG permite de una vez aumentar el fenómeno de opsonización de las nanocápsulas, para mejorar la estabilidad de la solución coloidal y prolongar el tiempo de residencia para estas nanocápsulas en la circulación sanguínea.

El derivado anfífilo de PEG comprende ventajosamente un componente hidrófobo que le permite anclarse en dicha envoltura lipídica externa y un componente hidrófilo del tipo PEG que está orientado al exterior de dichas nanocápsulas lipídicas, proporcionando propiedades hidrófilas a la superficie de las mismas.

Los derivados anfífilos de PEG están insertados en la envoltura externa de dichas nanocápsulas por su extremo hidrófobo. En consecuencia, el componente PEG está orientado hacia el exterior de dichas nanocápsulas y forma una carcasa hidrófila protectora que rodea cada una de las nanocápsulas. El extremo hidrófobo permite el anclaje en la superficie de la envoltura externa. Este anclaje es proporcionado por las fuerzas de enlace de baja energía que enlazan los componentes hidrófobos de los de los lípidos pegilados a los de los tensioactivos presentes en la superficie de dicha envoltura lipídica. Específicamente, la cohesión de la envoltura lipídica externa de las nanocápsulas según la invención procede de las fuerzas de Van der Waals que se ejercen entre los grupos hidrófobos, y en particular las cadenas alquilo de las moléculas que constituyen esta envoltura. Estos enlaces de baja energía hacen posible de una vez mantener suficiente cohesión entre los componentes de la envoltura para evitar una degradación demasiado rápida de las nanocápsulas según la invención cuando se introducen en el compartimento sanguíneo, pero proporcionándoles, sin embargo, suficiente fragilidad para asegurar su biodegradabilidad y por consiguiente una liberación terapéuticamente eficaz de los principios activos transportados.

De hecho, a diferencia de las cadenas poliméricas del APL (ácido poliláctico) o de tipo PLAGA (ácido poliláctico-co-glicólico) que constituyen la superficie de las nanocápsulas descrita por Mosqueira, y que están en forma sólida a cualquier temperatura en condiciones fisiológicas, las cadenas grasas que forman la envoltura de las nanocápsulas según la invención no están unidas por enlace covalente a ninguna otra, y por consiguiente están más sometidas a desensamblaje. Específicamente, la bioerosión es un fenómeno superficial que es consecuencia del ataque enzimático o de la biodegradación natural (o biorresorción) ligada a las condiciones de pH locales y a la presencia de agua. Esta erosión es responsable de la pérdida de fosfolípidos en la superficie de las nanocápsulas lo que facilita la salida de los principios activos.

Las cadenas poliméricas de las nanocápsulas a base de PLA o de PLAGA son largas (45.000 g/mol para las nanocápsulas descritas por Mosqueira) y constituyen una superficie fina que es tanto rígida como lisa. La biodegradación de la misma es por consiguiente la más lenta. Por lo tanto, más de 24 horas (o incluso varias semanas) son necesarias para que la biodegradación de las nanocápsulas a base de PLA o de PLAGA sea completa. Los fosfolípidos presentes en la superficie de las nanocápsulas según la invención son entidades distintas y permiten ventajosamente la extracción de la superficie y la rápida biodegradación, necesarias para una liberación terapéuticamente eficaz de los principios activos transportados.

Por último, todos los constituyentes de la envoltura externa de las nanocápsulas son no solamente biodegradables y aprobados para uso parenteral e inyección intravenosa, sino que también pueden ser asimilados por el organismo.

Específicamente, los constituyentes tales como fosfatidilcolina o como fosfatidiletanolamina están normalmente presentes en los alimentos y son asimilados por el organismo de forma natural.

5 Por lo tanto, el tamaño de las cadenas que cubren la superficie de las nanocápsulas, y también la naturaleza de la misma y de la naturaleza de los enlaces químicos que les mantienen ensamblados, contribuyen a la preparación de las nanocápsulas según la invención, ambas estables en el compartimento sanguíneo durante más de una hora y rápidamente biodegradables y pueden ser asimiladas por las enzimas circulantes o las enzimas presentes en los fluidos intersticiales.

10 De manera ventajosa, la vida media de las nanocápsulas según la invención es superior a 2 horas. Idealmente, para las nanocápsulas según la invención, la intención será alcanzar una vida media plasmática comprendida entre 3 y 10 horas. Esta característica permite acumular ventajosamente las nanocápsulas según la invención en los tumores y liberar en ellos la mayoría de sus contenidos en periodos razonables. La eficacia del agente antineoplásico por consiguiente aumenta como resultado. Actualmente, la rapidez de la liberación del agente antitumoral es un factor primordial a tener en cuenta para eliminar los tumores sólidos, dada su gran velocidad de crecimiento.

15 Los derivados anfífilos de PEG utilizados en la presente invención preferentemente tienen, como grupo hidrófobo, una fosfatidiletanolamina. Son por consiguiente fosfolípidos pegilados. Por lo tanto, puede hacerse uso de fosfolípidos biodegradables, en particular seleccionados de entre

20 DPPE-PEG<sub>x</sub> (dipalmitoilfosfatidiletanolamina),  
DSPE-PEG<sub>x</sub> (diesteoilfosfatidiletanolamina),  
DOPE-PEG<sub>x</sub> (dioleoilfosfatidiletanolamina), y  
POPE-PEG<sub>x</sub> (palmitoiloleilfosfatidiletanolamina),

25 en las que x representa el tamaño de la molécula de PEG en g/mol y también mezclas de las mismas.

Preferentemente, como fosfolípido acoplado a una molécula de PEG, se utilizará DSPE-PEG<sub>x</sub> por sus cualidades de estabilidad en la envoltura externa de las nanocápsulas según la invención.

30 Ventajosamente, se utilizarán DSPE-PEG<sub>2000</sub>, DSPE-PEG<sub>3000</sub>, y DSPE-PEG<sub>5000</sub>.

35 Además, el efecto furtivo de las nanocápsulas según la presente invención puede obtenerse también con lípidos pegilados del tipo núcleo de esteroil-PEG, ceramida-PEG o tetraoleato de PEG<sub>2000</sub> sorbitan, o más generalmente de tipo alquil-PEG que tienen por lo menos una cadena de alquilo que proporciona anclaje hidrófobo a una molécula por lo menos de PEG en la envoltura externa.

40 El tamaño de la molécula de polímero PEG injertado al fosfolípido descrito anteriormente es también de importancia. Específicamente, será condición el impedimento espacial en la superficie de dichas nanopartículas y, en consecuencia, la accesibilidad a su superficie pero también la capacidad de estas nanocápsulas para escapar del MPS.

45 Las moléculas de PEG de los derivados anfífilos utilizados en la presente invención tienen preferentemente una masa molar superior o igual a 1.000 g/mol. Como se mencionó anteriormente, la presencia de cadenas de PEG menores de 1.000 g/mol de tamaño no proporciona suficiente protección contra la opsonización. En consecuencia, la cadena corta de PEG de 660 g/mol presente en la molécula de tensioactivo hidrófilo Solutol<sup>®</sup> HS15 mencionado anteriormente no podría proporcionar protección eficaz de la superficie contra la opsonización, y por consiguiente la circulación prolongada. Las moléculas de PEG de fórmula (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención pertenecen al grupo que comprende PEG<sub>5000</sub>, que comprenden 113 unidades de PEG, PEG<sub>3000</sub>, que comprenden 68 unidades de PEG y PEG<sub>2000</sub>, que comprenden 45 unidades de PEG. Estas cadenas largas pegiladas confieren una naturaleza hidrófila en la superficie de las nanocápsulas lipídicas.

50 La proporción molar del derivado anfílico de PEG integrado en la envoltura de dichas nanocápsulas está comprendida preferentemente entre el 0,5 y el 12% molar de las moléculas lipídicas que constituyen la envoltura lipídica externa, preferentemente entre 1 y 10% molar. Preferentemente, las moléculas de DSPE-PEG se utilizarán en una proporción molar de entre 1 y 10% molar de los lípidos totales de la envoltura.

55 En una forma de realización preferida, se utilizarán las moléculas de DSPE-PEG<sub>5000</sub> dado que su tamaño (tienen aproximadamente el doble de longitud de las moléculas DSPE-PEG<sub>2000</sub>) permite, para el mismo número de moléculas, obtener mayor repulsión por el efecto estérico y propiedades furtivas más significativas *in vivo*. Específicamente, las cadenas de PEG están en movimiento constante en la superficie de la envoltura lipídica, y por lo tanto, cuanto más largas son más cubren un gran espacio alrededor de las nanocápsulas lipídicas, lo que aumenta el impedimento estérico y disminuye todas las demás posibilidades para que las proteínas alcancen la superficie de estas nanocápsulas. La capacidad para evadir el fenómeno de opsonización es por consiguiente mayor en presencia de DSPE-PEG<sub>5000</sub>.

60

65

El núcleo de las nanocápsulas según la invención es un núcleo esencialmente lipídico compuesto de ésteres de ácido graso y/o de triglicéridos y/o de aceite como sustancia grasa y/o mezclas de los mismos. Los triglicéridos se seleccionan mejor de entre triglicéridos de cadena media que llevan de 6 a 14 átomos de carbono y/o triglicéridos caprílicos/cápricos y también mezclas de los mismos. Más preferentemente, se hará uso, como mezcla de sustancias grasas que constituyen el núcleo de las nanocápsulas según la invención, de Labrafac<sup>®</sup> cc, Miglyol<sup>®</sup> 812 N o Miglyol<sup>®</sup> 810 N que corresponden a las siguientes denominaciones en la Farmacopea: mezcla de triglicéridos de cadena media, aceite de coco fraccionado o triglicéridos caprílicos/cápricos. Los triglicéridos pueden estar compuestos de tricaprilato de glicerilo puro (8 carbonos en la cadena alquílica) como Tricaprilina. Los triglicéridos pueden utilizarse solos o mezclados con otros aceites o ésteres de ácido graso farmacéuticos que también son objeto de aprobación para uso parenteral, con objeto de maximizar la cantidad de fármaco que debe disolverse en el núcleo.

Los ésteres de ácido graso que constituyen esencialmente dicho núcleo lipídico se seleccionan ventajosamente de entre los ácido grasos de cadena media que llevan de 8 a 18 átomos de carbono, tales como palmitato de etilo, oleato de etilo, miristato de etilo, miristato de isopropilo o miristato de octildodecilo, y también mezclas de los mismos.

Desde luego, la composición y las propiedades de cada uno de estos constituyentes pueden modularse y ajustarse en función del equilibrio hidrófilo/lipófilo (o HLB) deseado para la mezcla. De hecho, ya que la cara interna de la envoltura es de naturaleza lipófila, no existirá ninguna incompatibilidad entre la naturaleza de la envoltura y el contenido del núcleo.

Estos lípidos están en forma líquida o semilíquida a temperatura ambiente dependiendo del tamaño o del grado de saturación de las cadenas de carbono transportadas por los triglicéridos y los aceites que constituyen dicho núcleo. La presencia de sustancias grasas en el interior del núcleo de las nanocápsulas según la invención contribuye a actuar como disolvente para los agentes antineoplásicos transportados, pero también constituye una masa sólida que se utiliza para el mantenimiento y para la estabilidad relativa de estas nanocápsulas en el medio externo, si éste está en solución en un líquido acuoso o en el estado anhidro al final de la etapa de liofilización. A diferencia de los liposomas o de los demás vehículos coloidales que tienen una membrana lipídica y un interior acuoso, la presencia de un contenido en sustancia grasa proporciona por consiguiente las nanocápsulas según la invención con una cierta estabilidad (variación en la fuerza iónica o en la presión osmótica).

De manera ventajosa, la superficie externa de la envoltura lipídica externa de las nanocápsulas lipídicas furtivas que son el tema de la presente invención es de naturaleza hidrófila y el núcleo esencialmente lipídico es de naturaleza lipófila.

Por lo tanto, la combinación de lípidos biodegradables que pueden asimilarse, que constituyen el núcleo y la envoltura, ambos permiten prever una liberación rápida de los principios activos transportados, y además proporciona las nanocápsulas con una estabilidad física que les permite liofilizarse e incluso esterilizarse pasándolas a través de un filtro de 0,45 a 0,22  $\mu\text{m}$ . Las nanocápsulas según la invención pueden esterilizarse por consiguiente y, opcionalmente, almacenarse en forma anhidra durante periodos prolongados. El nuevo vehículo según la invención ofrece de este modo una cierta facilidad de utilización que le hace un producto que es fácilmente explotable en la industria.

De manera ventajosa, el núcleo esencialmente lipídico de las nanocápsulas lipídicas furtivas que son objeto de la presente invención representa entre el 20 y el 60%, preferentemente entre el 25 y el 50%, en peso con relación al peso total de dichas nanocápsulas.

De manera ventajosa, la fase acuosa o la fase dispersante, en la que las nanocápsulas (o fase dispersa) según la invención pueden prepararse, contienen inicialmente una determinada concentración de sales, mejor de NaCl. Esta concentración está comprendida entre el 4 y el 8%, mejor dentro del intervalo entre 4,4 y 5,2%. Al final del procedimiento de síntesis, pueden añadirse agentes osmóticos, agentes crioprotectores o agentes lioprotectores y, opcionalmente, agentes conservantes a esta fase acuosa.

El solicitante ha observado de hecho que esta concentración de sales permite instantáneamente obtener una temperatura de inversión de fase (o TIF) que es inferior que en ausencia de sales, para permitir una incorporación más masiva de moléculas de fosfolípido acopladas a PEG en el caso del procedimiento convencional de preparación (descrito a continuación) y, por último, disminuir de manera significativa el tamaño de las nanocápsulas obtenidas.

La mezcla de sustancia grasa que constituye dicho núcleo permite prever el transportar débil a fuertemente principios activos lipófilos, y más específicamente sustancias anticancerosas. Específicamente, dependiendo de la liposolubilidad de cada principio activo, se ajustará el HLB para permitir la disolución completa del principio activo. La presente invención permite incluso el transporte de una mezcla de principios activos de diferente solubilidad, para la que se aplicará un HLB intermedio, asegurando por lo menos la solubilidad parcial de cada agente antineoplásico.

De manera ventajosa, las nanocápsulas lipídicas furtivas, que son temas de la presente invención contienen uno o

más principios activos, que son en particular de naturaleza lipófila.

El o los principio(s) activo(s) puede disolverse o dispersarse en el núcleo lipídico de la nanocápsula.

5 De este modo, pueden utilizarse, solos o mezclados, los siguientes principios activos antineoplásicos, que son principalmente de naturaleza lipófila: paclitaxel y sus derivados tales como docetaxel, camptotecina y derivados de los mismos tales como irinotecán, topotecán o rubitecán, busulfán, clorambucilo, ftalocianinas, carotenoides o daunomicina en particular.

10 Además, los principios activos antineoplásicos que son de naturaleza anfífila, tal como citarabina, ciclofosfamida, metrotexato, derivados del fluor tales como 5-fluorouracilo o 5-fluorouridina, o doxorubicina en particular, pueden transportarse también por las nanocápsulas según la invención. Los principios activos se disolverán de antemano en los ésteres de ácido graso o los triglicéridos o en aceites farmacéuticos y sustancias grasas que son de grado inyectable. Los cosolventes orgánicos, aprobados para administración parenteral, pueden utilizarse con objeto de  
15 disolver principios activos que son poco solubles en aceites farmacéuticos; la solución obtenida puede mezclarse a continuación con estos aceites. Las soluciones de principio activo preparadas de este modo pueden utilizarse directamente en el procedimiento o pueden ser el tema de diluciones posteriores en mezclas de triglicérido, antes de ser utilizadas.

20 Por último, es completamente posible prever el transporte de cualquier otro tipo de principio activo, y en particular de agentes para el tratamiento de inflamaciones o puntos de infecciones en los tejidos. Por lo tanto, las nanocápsulas según la invención, en virtud de sus propiedades furtivas y el hecho de que su tamaño pueda modularse, son particularmente adecuadas para transportar y administrar productos medicinales a los tejidos en los que existe inflamación. Específicamente, durante la inflamación, como se observa en formas de artritis por ejemplo, las  
25 perforaciones de los capilares que irrigan el área inflamada se vuelven alargadas a fin de permitir el aumento de transporte de determinados elementos presentes en la sangre, en particular de proteínas. Lo mismo es cierto para los tejidos en que existen zonas de infección. Como resultado, aun cuando la acumulación en estas áreas es menos marcada que en los tumores, es posible prever que la liberación de principios activos adecuados, en una zona cerrada a la inflamación o a la infección, por nanocápsulas según la invención permite reducir las consecuencias de dichos cuadros patológicos. De este modo, es completamente posible prever el transporte, por las nanocápsulas según la invención, de sustancias antiinflamatorias, tales como la prostaglandina E1, antiinflamatorios no esteroideos tales como ibuprofeno, cetoprofeno, indometacina o corticoides tales como dexametasona y también  
30 antibióticos, analgésicos y agentes antiinfecciosos tales como anfotericina B o cetoconazol.

35 El núcleo de las nanocápsulas según la invención está compuesto por consiguiente de una fase grasa, cuya composición variable permite ajustar la capacidad de las nanocápsulas para solubilizar un agente antineoplásico dado.

40 De manera ventajosa las nanocápsulas lipídicas furtivas que constituyen el tema de la invención son capaces de reducir la toxicidad (y gravedad de los efectos adversos) del o de los principio(s) activo(s), permitiendo que se administren mayores cantidades de fármaco y mejorando de este modo el índice terapéutico de fármacos potentes pero muy tóxicos. Además, debido a sus propiedades de circulación prolongada y a su tamaño, las nanocápsulas lipídicas furtivas según la invención son capaces de acumular y por lo tanto aumentar la cantidad de fármaco en los  
45 tejidos tumorales en comparación con las soluciones convencionales de agentes antineoplásicos. La eficacia del tratamiento tumoral es de esperar que aumente considerablemente ya que puede administrarse más fármaco (debido a la toxicidad reducida frente a los tejidos sanos) y puede suministrarse más fármaco al tejido tumoral (debido al derrame de sangre específico en la zona del tumor).

50 Un objetivo adicional de la presente invención consiste en la utilización de las nanocápsulas de la presente invención para la preparación de un medicamento en el que se reduce la toxicidad del o de los principio(s) activo(s) contra los tejidos sanos.

55 Un asunto de la presente invención es además las composiciones farmacéuticas que comprenden las nanocápsulas según la presente invención, que contienen uno o más principios activos. Estas composiciones farmacéuticas están ventajosamente en forma de suspensión acuosa coloidal que contiene dichas nanocápsulas.

60 Dicho vehículo puede administrarse por vía parenteral, y en particular intravenosa, intrarterial, intraperitoneal, intrarticular e intramuscular, pero también puede preverse inyectarlo por vía subcutánea. De hecho, la inyección subcutánea permitirá alcanzar los vasos linfáticos que pueden garantizar la acumulación de las nanocápsulas según la invención en los ganglios linfáticos. Esta vía de acceso es por consiguiente particularmente importante para el tratamiento de los alimentos del ganglio linfático, y más específicamente los tumores de ganglio linfático.

#### 1) Tratamiento de tumores sólidos y circulantes

65 La presente invención puede utilizarse, en primer lugar, en terapias anticancerosas a través de la sangre.

Las nanocápsulas según la invención pueden utilizarse para tratar tumores sólidos en seres humanos.

Además, pueden utilizarse para tratar tumores circulantes de leucemia o de tipo linfoma. De hecho, como se ha mencionado anteriormente, la orientación a células tumorales circulantes solamente puede obtenerse si las partículas del sistema coloidal tienen un tiempo en circulación suficiente para favorecer encuentros con las células tumorales antes de cualquier captura por el hígado o por las células MPS circulantes. Por lo tanto, las nanocápsulas según la invención son particularmente adecuadas para el tratamiento de tumores circulantes.

Estas nanocápsulas pueden tener también capacidades para la orientación activa mediante el acoplamiento de ligandos con afinidad específica para moléculas de tipo receptor situadas en la superficie de las células cancerosas.

De manera ventajosa, las nanocápsulas lipídicas furtivas que son objeto de la presente invención llevan en su superficie, ligandos específicos que les confieren capacidad para dirigir activamente las células que tienen receptores para estos ligandos, en particular células tumorales.

Preferentemente, el ligando se seleccionará para no estimular, o estimular ligeramente, los fenómenos de eliminación de las partículas.

De manera ventajosa, dicho ligando es de tipo sacárido u oligosacárido, o de tipo vitamina, o alternativamente de tipo oligopéptido, fragmento de anticuerpo o anticuerpo monoclonal.

Los ligandos del tipo sacárido u oligosacárido o de tipo vitamina (folato, riboflavina) e incluso de tipo oligopéptido, fragmento de anticuerpo o anticuerpo monoclonal, pueden utilizarse de manera ventajosa. Por lo tanto, dichos ligandos se acoplarán, de ante mano, al extremo reactivo de moléculas de tipo fosfolípido pegilado activado o cualquier otro lípido que puede comprender un componente hidrófobo, capaz de anclarse en la superficie de las nanocápsulas, una cadena hidrófila de tipo PEG y una función química reactiva al final de esta cadena hidrófila. Estos ligandos, una vez acoplados al final de estas cadenas, se introducirán utilizando preferentemente la técnica de posinserción como se describe a continuación. El procedimiento de posinserción de hecho permite introducir un tipo específico de ligando o ligandos que son de naturaleza diferente con especificidades diversas capaces de proporcionar una serie de propiedades específicas en el vehículo según la invención.

Por consiguiente, un objetivo adicional de la presente invención consiste en la utilización de nanocápsulas lipídicas de la presente invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de cánceres, en particular de tumores sólidos o circulantes, por administración intravenosa, o para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de tumores circulantes o sólidos por orientación activa, o para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de tumores sólidos, por orientación pasiva posterior al derrame de sangre de dichas nanocápsulas a través de los capilares del tumor.

## 2) Tratamiento de tejidos inflamados (en particular artritis) y tejidos infectados

Puede también preverse la utilización de nanocápsulas según la invención con el propósito de tratar infecciones y/o inflamaciones del tejido, en particular en seres humanos. Específicamente, tal como se describió anteriormente, durante las inflamaciones o infecciones del tejido, los capilares que irrigan el área sometida a inflamación experimentan un aumento de permeabilidad. Esta permeabilidad temporal puede aprovecharse de la misma manera que para el tratamiento de los tumores sólidos, utilizando el fenómeno de derrame de sangre para introducir en el interior del tejido inflamado sustancias bioactivas capaces de disminuir o eliminar las causas y/o consecuencias de la inflamación. De este modo, es posible prever, en particular, el transporte, por las nanocápsulas según la invención, de principios activos destinados a atenuar la inflamación, tal como antiinflamatorios, analgésicos o antibióticos, por ejemplo. En el caso de la artritis, por ejemplo, que corresponde a la inflamación de determinadas articulaciones se administrará preferentemente una inyección intrarticular de las nanocápsulas según la invención. Esto es porque la orientación del vehículo directamente a su lugar de actuación se estimula de este modo, y la pérdida por dilución de las nanocápsulas en la circulación sanguínea completa, además, está limitada. Por otra parte, las propiedades furtivas de las nanocápsulas según la invención deberían permitirles no ser reconocidas ni eliminadas de los puntos de inflamación por el gran número de células de la MPS y del sistema inmunitario presentes en estos puntos.

Por consiguiente, un objetivo adicional de la presente invención consiste en la utilización de nanocápsulas lipídicas según la presente invención para la preparación de un medicamento destinado a tratar inflamaciones y/o infecciones de tejidos.

## 3) Desintoxicación

De manera ventajosa, las nanocápsulas lipídicas que son los temas de la presente invención pueden utilizarse para absorber moléculas hidrófobas presentes en la circulación sanguínea después de un caso de envenenamiento.

Después de casos de envenenamiento agudo con un principio activo que es de naturaleza hidrófoba, las nanocápsulas lipídicas furtivas que no se han cargado con un principio activo pueden administrarse por vía

intravenosa. De este modo, en virtud de su periodo de circulación prolongado y de su núcleo lipídico hidrófobo, las nanocápsulas según la invención pueden absorber los principios activos presentes en la circulación sanguínea a fin de disminuir su concentración libre y, en consecuencia, su toxicidad. Posteriormente, estos principios activos serían liberados gradualmente con la degradación del vehículo, a concentraciones inferiores a las concentraciones exentas de tóxico.

Por consiguiente, un objetivo adicional de la presente invención consiste en la utilización de las nanocápsulas de la presente invención para la preparación de un medicamento destinado a absorber moléculas hidrófobas en la circulación sanguínea después de un caso de envenenamiento.

#### 4) Filtración esterilizante

Por último, las nanocápsulas según la presente invención tienen la ventaja de que pueden esterilizarse por filtración esterilizante a través de un filtro con un diámetro de 0,45 µm e incluso de 0,22 µm, teniendo lugar posiblemente esta etapa directamente después de la etapa de enfriamiento final del procedimiento descrito a continuación. De hecho, el solicitante ha observado que las nanocápsulas según la invención son suficientemente sólidas en suspensión para pasar a través de este tipo de filtro sin experimentar ninguna modificación mayor y especialmente sin perder sus propiedades furtivas y biodegradabilidad. Esta característica permite a dichas nanocápsulas ser empleadas fácilmente y con seguridad para uso parenteral, lo que les hace un vehículo de selección para utilización en masa, por ejemplo, en hospitales o industrial.

#### 5) Utilización en forma de filtración en seco

Las nanocápsulas según la invención pueden liofilizarse y a continuación redisolverse en forma de suspensión coloidal. De este modo pueden conservarse fácilmente durante periodos prolongados. Una suspensión de nanocápsulas según la invención puede redisolverse de hecho a partir de una forma anhidra improvisadamente, justo antes de su uso. Dicha liofilización puede tener lugar directamente después de una etapa de filtración esterilizante tal como se describió anteriormente.

La liofilización de dicha sobrenadante consiste en eliminar el agua de las preparaciones por un fenómeno de sublimación. Una cantidad adecuada (aproximadamente 5% m/m) de un agente crioprotector o lioprotector tal como manitol o trehalosa, por ejemplo, puede añadirse a continuación a la suspensión de nanocápsulas que debe liofilizarse. Después que estos compuestos se han disuelto completamente, las suspensiones elegidas experimentan una primera etapa de congelación rápida a alrededor de -50°C. Estas suspensiones se liofilizan a continuación por el paso directo del agua en forma de vapor a baja temperatura a presión reducida. Las nanocápsulas en forma anhidra pueden almacenarse a continuación en forma estéril durante periodos prolongados antes de su uso.

#### 6) Otras administraciones

Es posible prever la utilización de nanocápsulas según la invención, como vehículo para principios activos, para tratar otros tipos de trastornos aparte de tumores o inflamaciones. Específicamente, una de las cualidades de este vehículo coloidal es su capacidad para escapar del sistema inmunitario del hospedador y en particular las células del MPS, tales como los macrófagos. Es posible por consiguiente la utilización de nanocápsulas furtivas de la invención en áreas del organismo en las que la utilización de vehículos convencionales es particularmente inapropiada. Dichas áreas ricas en macrófagos existen, por ejemplo, en los alvéolos pulmonares y en los ganglios linfáticos. De este modo es posible prever la administración de dicho vehículo por las vías para las que la fagocitosis y/o la opsonización constituyen un límite para la eficacia de la forma farmacéutica.

#### Procedimientos para preparar las nanocápsulas

Las nanocápsulas que constituyen el vehículo coloidal furtivo según la invención pueden sintetizarse mejor utilizando dos procedimientos. El primer procedimiento es "convencional" ya que se utiliza normalmente para sintetizar nanocápsulas lipídicas. El segundo procedimiento ha sido desarrollado por el solicitante y es adecuado para las nanocápsulas según la invención. En particular permite obtener niveles de incorporación de fosfolípidos "pegilados" que son mayores que los obtenidos utilizando el procedimiento convencional y también ofrece la posibilidad de incorporar fosfolípidos acoplados a ligando para proporcionar orientación activa. Estos dos procedimientos se detallan sucesivamente a continuación.

#### 1) Procedimiento convencional para sintetizar las nanocápsulas

El procedimiento para sintetizar el vehículo coloidal furtivo según la invención está ventajosamente exento de cualquier disolvente orgánico. Además, es un procedimiento sencillo y relativamente rápido que no requiere ningún material específico. Además, este procedimiento solamente utiliza compuestos biodegradables aprobados para utilización parenteral y que pueden asimilarse de forma natural por el organismo, por un fenómeno de "bioresorción" en particular. Por último, el procedimiento según la invención permite sintetizar nanocápsulas de diámetro definido seleccionadas por el usuario dentro de un intervalo de diámetro que oscila entre 40 y 200 nm. Ajustando el tamaño

de las nanocápsulas sintetizadas será posible adaptar el vehículo a los diversos tipos de tumor que deben tratarse.

Ante todo, la emulsión aceite/agua está constituida por agua, sal, tensioactivo hidrófilo, tensioactivo lipófilo, sustancias grasas requeridas para construir el núcleo de dichas nanocápsulas, las moléculas de lípidos acopladas a las moléculas de PEG y el/los principio(s) activo(s) destinados a ser transportados por las nanocápsulas según la invención. El principio activo se disolverá de antemano en la fase grasa aceitosa que debe constituir el núcleo de las nanocápsulas según la invención.

La primera etapa consiste, por consiguiente, en pesar todos los constituyentes y en calentarlos a una temperatura superior a la temperatura de fusión del tensioactivo lipófilo, con agitación suave, por ejemplo agitación magnética, hasta que se obtiene una emulsión de aceite/agua homogénea. La mezcla se lleva inicialmente a 65°C cuando el tensioactivo lipófilo está representado por HSPC.

La inversión de fase de esta emulsión de aceite/agua da lugar a continuación a que se transforme en una emulsión de agua/aceite. Para hacer esto, la temperatura de la mezcla se aumenta hasta una temperatura T2 superior a la temperatura de la inversión de fase (TIF) de la mezcla constituida de este modo. La temperatura de la mezcla se disminuye a continuación hasta una temperatura T1.

La inversión de fase puede opcionalmente seguirse mediante la desaparición de la conductividad de la formulación cuando se forma la emulsión agua/aceite, pero generalmente puede ser visible a simple vista como se describe a continuación. T1 es una temperatura a la cual la conductividad es por lo menos igual al 90-95% de la conductividad medida a 20°C. T2 es la temperatura a la que desaparece la conductividad.

Esta operación se repite realizando por lo menos un ciclo de modificación de la temperatura en torno a la zona de inversión de fase entre T1 y T2 hasta que aparece una solución translúcida. Específicamente, la organización del sistema en forma de nanocápsulas se refleja a la vista por un cambio en la aparición del sistema inicial, que cambia de blanco-opaco a blanco-translúcido. Este cambio se produce cuando la temperatura disminuye por debajo de la temperatura de inversión de fase (TIF). Esta temperatura está generalmente comprometida entre 6 y 15°C por debajo de la TIF.

El número de ciclos aplicados a la emulsión depende de la cantidad de energía necesaria para formar las nanocápsulas. La inversión de fase entre la emulsión de aceite/agua y la emulsión de agua/aceite produce una disminución de la conductividad cuando aumenta la temperatura, hasta que desaparece. La temperatura media de la zona de inversión de fase corresponde a la temperatura de inversión de fase (TIF).

La emulsión aceite/agua puede enfriarse a continuación, es decir enfriarse bruscamente, a fin de obtener nanocápsulas estables. Esta operación tiene lugar con agitación magnética, diluyendo la emulsión entre 3 y 10 veces utilizando agua desionizada a 2°C ± 1°C funden rápidamente en la emulsión fina. Esta etapa de enfriamiento permite extraer las nanocápsulas de la forma de emulsión, para lo cual los lípidos que les absorben son fluidos, para la forma de suspensión, para la cual están en una serie más y por consiguiente en un estado estructuralmente muy estable. Las partículas obtenidas de este modo se agitan durante 5 minutos. En el caso de una aplicación industrial, es posible prever llevar a cabo el enfriamiento brusco de la preparación circulándola en un sistema de intercambiadores térmicos por ejemplo. En este caso específico, se evita la dilución de la preparación.

De manera ventajosa, la fase grasa es Labrafac® cc, el tensioactivo lipófilo es HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada) y el tensioactivo hidrófilo es Solutol® HS15. El derivado anfífilo de PEG es el fosfolípido pegilado de DSPE-PEG<sub>2000</sub> o -PEG<sub>5000</sub>. En estas condiciones T1 = 60°C, T2 = 85°C y el número de ciclos es igual a 3.

En cuanto a los constituyentes de la envoltura de las nanocápsulas, el porcentaje molar del tensioactivo lipófilo que es de naturaleza lipídica está comprendido entre 5 y 30% molar. Está comprendido entre 60 y 90% molar para el tensioactivo que es de naturaleza hidrófila y está comprendido entre el 0,5 y 5% molar para el fosfolípido pegilado.

Un ejemplo ventajoso del porcentaje molar de los diversos constituyentes de la envoltura lipídica externa de dichas nanocápsulas puede ser el siguiente:

- HSPC: 15,46% molar
- Solutol® HS15: 81,2% molar
- DSPE-PEG<sub>2000</sub>: 3,34% molar

En este ejemplo, la concentración salina de la emulsión inicial es del 4,4% (m/m), y la masa de Labrafac® cc que constituye el núcleo de las nanocápsulas lipídicas representa el 44% (m/m) de todos los constituyentes que son de naturaleza lipídica o de los tensioactivos presentes en la preparación. Esta serie de constituyentes se denominará lípidos totales (otros componentes aparte del agua y del cloruro sódico); esta expresión en particular incluye el fosfolípido pegilado. La relación de los constituyentes de la superficie lipídica externa (mencionada anteriormente) a los lípidos totales es por consiguiente del 56%.

En general, cuanto mayor es la relación de la masa de lípidos que absorbe la envoltura externa de dichas nanocápsulas a los lípidos totales que las constituyen, menores serán las nanocápsulas. Por lo tanto, el tamaño de las nanocápsulas según la invención puede modularse fácilmente en el momento que se sintetizan, seleccionando una relación de masa adecuada de los lípidos de la envoltura a los lípidos totales.

Por el contrario, el tamaño de las partículas aumenta cuando la proporción de los lípidos que constituyen el núcleo de las mismas aumenta.

Además, el tamaño de las partículas disminuye cuando aumenta la proporción de tensioactivo hidrófilo y cuando aumenta la proporción de tensioactivos (hidrófilos y lipófilos). El tensioactivo produce una disminución en la tensión interfacial y por consiguiente en la estabilización del sistema, que favorece la producción de partículas pequeñas. Específicamente, cuanto menor es la tensión interfacial, más estable será la suspensión de nanocápsulas lipídicas en una solución acuosa. Para las cantidades fijadas de tensioactivos hidrófilos y lipófilos, y también de ésteres de ácido graso, la adición de cantidades crecientes de lípidos pegilados produce un aumento del tamaño de las partículas. Es posible obtener varios intervalos de tamaño y varios contenidos de fosfolípido pegilado al seleccionar cantidades dadas de Solutol<sup>®</sup> HS15 y de DSPE-PEG (debe hacerse referencia a la figura 1 del Ejemplo 4).

Según una forma de realización preferida, la fase grasa es Labrafac<sup>®</sup> cc, el tensioactivo lipófilo que es de naturaleza lipídica es HSPC (Northern Lipids), el tensioactivo hidrófilo no iónico es Solutol<sup>®</sup> HS15 y el lípido acoplado a las moléculas de PEG es DSPE-PEG<sub>2000</sub>. Estos compuestos tienen las características siguientes:

- Labrafac<sup>®</sup> cc (Gattefossé, Saint Priest, Francia) es un aceite compuesto de triglicéridos caprílicos/cápricos de cadena media (C<sub>8</sub> y C<sub>10</sub>). La densidad del mismo es de 0,930 a 0,960 a 20°C. El índice HLB del mismo es aproximadamente 1. La composición del mismo es idéntica a la de Miglyol<sup>®</sup> 812N (Sasol, Alemania). Labrafac<sup>®</sup> cc está incluido en la composición de preparaciones para nutrición parenteral.
- Solutol<sup>®</sup> HS15 (BASF, Ludwigshafen, Alemania). Es un 12-hidroxiestearato de poli(etilenglicol)-660. Por consiguiente desempeña la función de tensioactivo hidrófilo en la formulación. Puede utilizarse por inyección (en ratones por IV LD<sub>50</sub> > 3,16 g/kg, en ratas 1,0 < LD<sub>50</sub> < 1,47 g/kg).
- DSPE-PEG<sub>2000</sub> (Northern Lipids Inc., Vancouver, Canadá). Es N-(carbamoilmetoxi poli(etilenglicol) 2000)-1,2-distearoil-*sn*-3-fosfoetanolamina en forma de sal sódica. Proporciona a las nanocápsulas lipídicas sus propiedades furtivas. Las cadenas largas de poli(etilenglicol) permiten proteger las superficie de las nanocápsulas, mediante su efecto estérico, impidiendo a las proteínas de la circulación sanguínea que se depositen sobre las mismas (opsonización). Puede utilizarse por inyección y está incluida en la preparación liposómica Doxil<sup>®</sup> (Alza, Mountain View, USA).

La fase acuosa de la emulsión de aceite/agua inicial puede contener también 4 a 8% de una sal tal como cloruro sódico. La modificación de la concentración salina conduce a un desplazamiento de la zona de inversión de fase. Cuanto mayor es la concentración salina, menor será la temperatura de inversión de fase. Este fenómeno presenta ventajas para la encapsulación de los principios activos hidrófobos termosensibles. La incorporación de la misma puede tener lugar a continuación a una temperatura inferior.

El diámetro de las nanocápsulas se ajusta de forma ventajosa ajustando las proporciones de sal y de tensioactivo hidrófilo, y la pureza del tensioactivo lipófilo en la mezcla de partida del procedimiento de síntesis.

## 2) Procedimiento para sintetizar las nanocápsulas furtivas por posinserción

Las nanocápsulas lipídicas furtivas que son objeto de la presente invención se preparan de manera ventajosa según un procedimiento por posinserción.

Este procedimiento comprende una etapa de preformación de nanocápsulas que carecen de derivado anfífilo de poli(etilenglicol), y a continuación una etapa de posinserción de dichos derivados anfífilos de poli(etilenglicol) en la superficie de estas nanocápsulas.

Según este procedimiento, dicha etapa de preformación comprende de manera ventajosa la síntesis de nanocápsulas que carecen del derivado anfífilo de PEG, según la inversión de fase de una emulsión de aceite/agua producida mediante varios ciclos de aumento y disminución de temperatura, tal como se describió anteriormente en el procedimiento convencional.

El procedimiento desarrollado por el solicitante está también exento de cualquier disolvente orgánico y permite obtener un mejor rendimiento de incorporación de fosfolípidos "pegilados" en la superficie de las nanocápsulas según la invención.

Por ejemplo, es posible obtener nanocápsulas en las que la proporción molar de DSPE-PEG con relación a los lípidos de la envoltura sea mayor del 5% molar, y preferentemente del orden del 10% molar. Dicha proporción

proporciona a las nanocápsulas según la invención buenas propiedades furtivas. Actualmente, es difícil obtener dichas proporciones según el procedimiento convencional de síntesis descrito anteriormente. Además, el procedimiento de síntesis por preformación de nanocápsulas sin PEG seguido de la posterior incorporación de DSPE-PEG por inserción permite ajustar con precisión el tamaño de las nanocápsulas, y de este modo adaptarlas al tipo de tumores que deben tratarse ajustando la proporción y la longitud de las cadenas hidrófilas del derivado anfífilo. Además la inserción de la mayor proporción de moléculas de DSPE-PEG, es posible prever, utilizando esta técnica de posinserción, incorporar derivados de fosfolípidos que comprenden ligandos al final de una cadena pegilada. Estos ligandos pueden proporcionar a las nanocápsulas según la invención propiedades de orientación activa y específica de las células de interés (tumores sólidos y circulantes). Este procedimiento de posinserción es particularmente apropiado para moléculas termosensibles ya que se lleva a cabo a una temperatura que no excede de 60°C.

Por ejemplo, las nanocápsulas a base de HSPC, pero que carecen de DSPE-PEG, se preparan de antemano según el procedimiento descrito anteriormente.

Dicha etapa de posinserción comprende con ventaja una primera etapa de coincubación de las nanocápsulas preformadas en presencia del derivado anfífilo de poli(etilenglicol) y a continuación una segunda etapa de "enfriamiento" durante la cual el derivado anfífilo de la mezcla de poli(etilenglicol)/nanocápsulas preformadas obtenidas de este modo se enfría bruscamente a fin de alcanzar una temperatura entre 0 y 5°C.

Por ejemplo, se añade agua a la preparación que contiene las nanocápsulas que carecen de DSPE-PEG descritas anteriormente a fin de llevarla hasta un volumen exacto en un matraz volumétrico. De este modo, se conoce la concentración exacta de los lípidos en mg/ml y puede utilizarse como base para calcular las cantidades de DSPE-PEG<sub>2000</sub> y PEG<sub>5000</sub>, por ejemplo, que deben añadirse en orden para alcanzar, por ejemplo, 6% molar en relación con todos los lípidos (incluyendo DSPE-PEG) que constituyen la composición de la envoltura externa de las nanocápsulas lipídicas de la invención. De manera ventajosa, la preparación de nanocápsulas y de soluciones micelares de DSPE-PEG se lleva, posteriormente, a 60°C, y se mantiene a esta temperatura, durante un periodo de 15 minutos.

La etapa de coincubación del derivado anfífilo de la mezcla de poli(etilenglicol)/nanocápsulas preformadas se realiza a una temperatura muy ligeramente superior a la de la temperatura de transición de la fase gel/líquido de dicho tensoactivo lipófilo que es de naturaleza lipídica, pero inferior a la de la temperatura de inversión de fase del derivado anfífilo de la mezcla poli(etilenglicol)/nanocápsulas preformadas, con objeto de evitar cualquier desorganización del sistema debido al fenómeno de inversión de fase. Volviendo a hacer referencia al ejemplo anterior, se observa que, a 60°C, la superficie de las nanocápsulas lipídicas es mucho más fluida y permite la inserción de fosfolípidos adicionales. El volumen requerido de solución micelar de DSPE-PEG se introduce a continuación en la preparación de nanocápsulas. Éste se deja incubar durante 1 h 30 min. a 60°C, agitando intensamente cada cuarto de hora. Al final de este periodo de incubación, las preparaciones se sumergen en un baño con hielo durante un minuto a fin de colocar bruscamente la envoltura de las nanocápsulas y atrapar en éstas las moléculas de DSPE-PEG insertadas.

Este procedimiento de posinserción permite obtener nanocápsulas según la invención, cuyo contenido en DSPE-PEG es mayor que el que es posible alcanzar utilizando el procedimiento convencional. De hecho, las nanocápsulas preparadas de este modo presentan, *in vivo* una naturaleza furtiva mucho mayor en comparación con la que es posible obtener con las nanocápsulas preparadas según el procedimiento convencional.

También es posible llevar a cabo la posinserción de DSPE-PEG a temperaturas menores (37-50°C) pero durante periodos de incubación mayores. Por lo tanto, este procedimiento de inserción a baja temperatura puede ser adecuado para la incorporación de derivados de fosfolípidos pegilados, que tienen, al final de la cadena de PEG, grupos termosensibles tales como, por ejemplo, determinados oligopéptidos y proteínas. Estos últimos compuestos pueden utilizarse como grupos de dirección para la preparación de nanocápsulas según la invención pero permitiendo la orientación activa a células tumorales.

Además, dicho procedimiento de posinserción permite introducir, además de las moléculas de DSPE-PEG, fosfolípidos activados del tipo PDP-PEG<sub>2000</sub>-DSPE (piridilditiopropionilamino-PEG<sub>2000</sub>-DSPE) o MPB-PEG<sub>2000</sub>-DSPE (p-(maleimidofenil)butaroilamino-PEG<sub>2000</sub>-DSPE) (Northern Lipids Inc., Vancouver, Canadá) que comprende funciones reactivas al final de las cadenas pegiladas. Estas funciones reactivas permiten el acoplamiento, una vez se han obtenido las nanocápsulas según la invención, de compuestos que son de naturaleza peptídica y que comprenden grupos tiol, tales como oligopéptidos o proteínas de tipo anticuerpo, con objeto de proporcionar las propiedades de orientación activa.

## Figuras

En los ejemplos descritos a continuación se hará referencia a las siguientes figuras:

- Figura 1: Evolución del tamaño de las nanocápsulas preparadas utilizando HSPC, en función del porcentaje

molar de DSPE-PEG<sub>2000</sub>

- 5 - Figura 2: Evolución del tamaño de las nanocápsulas preparadas utilizando HSPC, que carece de DSPE-PEG, en función de la relación de lípidos superficiales/lípidos totales
- Figura 3: Evolución del tamaño de las nanocápsulas para varias formulaciones obtenidas utilizando el procedimiento de posinserción
- 10 - Figura 4: Comparación de las propiedades furtivas (cinética de la desaparición en la sangre) para las formulaciones de nanocápsulas preparadas utilizando DSPE-PEG<sub>2000</sub> o DSPE-PEG<sub>5000</sub>.
- Figura 5: Comparación de las propiedades furtivas (cinética de la desaparición en la sangre) para las formulaciones de nanocápsulas preparadas utilizando DSPE-PEG<sub>2000</sub> o DSPE-PEG<sub>5000</sub> o de nanocápsulas preparadas utilizando la técnica anterior.
- 15 - Figura 6: Comparación de las propiedades furtivas (cinética de desaparición en la sangre) de varias formulaciones de nanocápsulas preparadas utilizando el procedimiento convencional o utilizando el procedimiento de posinserción.
- 20 - Figura 7: Evolución del peso corporal medio relativo de ratones después de tres inyecciones intravenosas de docetaxel (flechas). Los valores representan el peso corporal relativo medio, siete ratones por grupo.
- Figura 8: Número medio de días para alcanzar el 15% de pérdida de peso corporal para diferentes formulaciones de docetaxel administradas a ratones (n = 7).
- 25 - Figura 9: Acumulación de nanocápsulas lipídicas cargadas con docetaxel (expresada en % de [<sup>3</sup>H] inyectado es decir, el vehículo) en tumores C26 a diferentes tiempos tras la administración intravenosa a ratones (n = 5).
- Figura 10: Acumulación de docetaxel (ng) en tumores C26 a diferentes tiempos tras la administración intravenosa a ratones (n = 5).

A) Ejemplos de preparación de nanocápsulas furtivas según el procedimiento convencional

En los ejemplos siguientes:

- 35 % de masa = porcentaje de masa con relación al peso total de la preparación
- % p/p = porcentaje de masa con relación al peso total de la nanocápsula
- % molar = porcentaje molar con relación a la envoltura externa de la nanocápsula
- 40 % m/env. = porcentaje en masa con relación al peso total de la envoltura externa de la nanocápsula

**Ejemplo 1: Preparación que comprende DSPE-PEG<sub>2000</sub>**

Producción de una preparación que comprende DSPE-PEG<sub>2000</sub> a razón de 2,86% molar para un total de aproximadamente 1 gramo de lípidos según el procedimiento convencional.

Los constituyentes requeridos para sintetizar las nanocápsulas según la invención se introducen en un vial de centelleo de 20 ml, en las cantidades dadas en la Tabla 1.

Tabla 1

	Masa (mg)	% en masa	Número de moles	% Mol	%m/env.
HSPC	75	1,50%	9,843E-05	16,98%	13,25%
DSPE-PEG	46	0,92%	1,658E-05	2,86%	8,13%
Solutol HS15	445	8,90%	4,645E-04	80,15%	78,62%
Labrafac	504	10,08%			
NaCl	220	4,40%			
Agua	3710	74,20%			
				Lípidos totales	1070
				Env./Total	52,90%

Total                    5.000            100,00%

55 En general, durante la pesada, se permiten variaciones del máximo (referentes a los valores diana) de ± 1,5% para la lecitina y el DSPE-PEG de ± 0,2 a 0,5% para el tensioactivo hidrófilo (Solutol<sup>®</sup> HS15) y los triglicéridos, y de ± 3% para la sal. La cantidad de agua introducida es por lo menos igual al valor dado y al menos mayor del valor dado por el 2%. De hecho, como se explicó anteriormente, los tamaños de las nanocápsulas obtenidas dependen principalmente de la relación de la suma de los lípidos que constituyen la envoltura de las partículas a la masa total

de lípidos (*Envoltura/Total*).

Tras la pesada, la temperatura se aumenta gradualmente hasta 60°C y la agitación se mantiene durante unos pocos minutos, durante los cuales se asegura que los agregados de lecitina o de DSPE-PEG se han disgregado. La temperatura se aumenta a continuación hasta 80-85°C. Posteriormente, el vial se transfiere a una placa no calentada y la temperatura se deja descender, todavía con agitación, hasta 60°C. A continuación pueden iniciarse tres ciclos de aumento de temperatura a 80°C y de disminución a 60°C. Durante el segundo aumento de temperatura, es posible observar el fenómeno de inversión de fase (por debajo de la temperatura de inversión de fase (TIF), la solución es translúcida, y a continuación se vuelve opaca y tiene un aspecto cremoso por encima de la TIF).

Al final del tercer ciclo, se lleva a cabo el enfriamiento añadiendo un volumen de agua fría a 1°C (12,5 ml) cuando la temperatura desciende por debajo de 10°C de la temperatura a la que el cambio de aspecto ocurrió, tal como se observó durante el segundo y durante el tercer aumento de temperatura. Después del enfriamiento, se mantiene la agitación durante un período de 5 minutos. En el ejemplo citado, la temperatura a la que ocurrió el cambio de aspecto es de 75°C, la temperatura máxima a la que la preparación se tomó es de 82°C y el enfriamiento se realizó a 62°C.

Posteriormente, el análisis del perfil de distribución de tamaño por dispersión dinámica de la luz puede llevarse a cabo después de la filtración de la preparación a través de un filtro con una porosidad de 0,2 µm. La preparación citada como ejemplo permite obtener nanocápsulas según la invención que tienen un tamaño de  $87,5 \pm 14$  nm. El contenido en DSPE-PEG<sub>2000</sub> es 2,86% molar con relación a todos los constituyentes de la superficie. Las demás proporciones se describieron anteriormente en la Tabla 1.

La proporción máxima de DSPE-PEG<sub>2000</sub> que es posible alcanzar utilizando el procedimiento de preparación convencional es 3,34% molar. La adición de una cantidad adicional de este fosfolípido pegilado produce la inestabilidad de las preparaciones obtenidas después del enfriamiento final.

#### **Ejemplo 2: Preparación que contiene DSPE-PEG<sub>5000</sub>**

Producción de una preparación que contiene DSPE-PEG<sub>5000</sub> a 1,41% molar para un total de aproximadamente 0,6 gramos de lípidos, según el procedimiento convencional.

El procedimiento es idéntico al descrito en el ejemplo anterior con la excepción de las cantidades utilizadas, que se proporcionan en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2

	Masa (mg)	% en masa	Número de moles	% Mol	%m/env.
HSPC	37,5	1,50%	4,921E-05	15,54%	11,89%
DSPE-PEG	25,8	1,03%	4,461E-06	1,41%	8,18%
Solutol HS15	252	10,08%	2,630E-04	83,05%	79,92%
Labrafac	252	10,08%			
NaCl	116	4,64%			
Agua	1816,7	72,67%			
				Lípidos totales	567,3
				Env./Total	55,58%

Total                      2.500              100,00%

Para esta preparación, el cambio de aspecto de opaco a translúcido se produce alrededor de 72°C, la temperatura máxima alcanzada durante los ciclos es de 81°C y el enfriamiento se realizó por debajo de 65°C con un volumen de 6 ml de agua helada.

El tamaño medio de las nanocápsulas obtenidas, por dispersión dinámica de la luz es de  $63,2 \pm 9,83$  nm después de la filtración de la preparación a través de un filtro con una porosidad de 0,2 µm.

La proporción máxima de DSPE-PEG<sub>5000</sub> que es posible alcanzar utilizando el procedimiento de preparación convencional es 1,49% molar.

De éste modo, la cantidad de fosfolípidos incorporados utilizando el procedimiento convencional es completamente la más limitada ya que estas moléculas tienen cadenas de PEG más largas.

#### **B) Ejemplos de producción de nanocápsulas según la invención por posinserción**

#### **Ejemplo 3: Preparación de nanocápsulas según el procedimiento de inserción de DSPE-PEG en nanocápsulas preformadas**

La Tabla 3 proporciona un ejemplo de cantidades de los diversos constituyentes, que permiten obtener formulaciones de nanocápsulas lipídicas que tienen diámetros de alrededor de 80 nm, utilizando la técnica de inserción de DSPE-PEG en nanocápsulas preformadas.

- 5 La preparación original de nanocápsulas preformadas sin DSPE-PEG se prepara según el procedimiento convencional. Las cantidades introducidas se dan en la Tabla 3: Después del enfriamiento, la preparación se transfiere a un matraz volumétrico y el volumen se lleva a 25 ml con agua destilada.

Tabla 3

10

	Masa (mg)	% en masa	Número de moles	% Mol	% molar/env.
HSPC	75	1,50%	9,843E-05	17,48%	14,42%
DSPE-PEG	0	0,00%	0,00	0,00%	0,00%
Solutol HS15	445	8,90%	4,645E-04	82,52%	85,58%
Labrafac	504	10,08%			
NaCl	220	4,40%			
Agua	3756	75,12%			
				Lípidos totales	1024
				Env./Total	50,78%
Total	5.000	100,00%			

Las soluciones micelares de DSPE-PEG<sub>2000</sub> y de DSPE-PEG<sub>5000</sub> se prepararon de antemano pesando 75 mg de fosfolípidos "pegilados", añadiendo una cantidad suficiente de agua destilada para producir la disolución y llevando el volumen, después de la disolución total, a un volumen total exacto de 5 ml.

15

Se distribuyen a continuación volúmenes de 2 ml de preparación original en tubos de hemólisis tapados que se colocan en un baño de agua a 60°C. Las soluciones micelares se colocan también en el baño de agua. Las preparaciones de nanocápsulas lipídicas y las soluciones micelares de DSPE-PEG se incuban previamente por separado a 60°C durante 15 minutos. Después de este período, los volúmenes requeridos se añaden a fin de obtener una proporción teórica de 6% molar de fosfolípidos asociados a las moléculas de PEG en la envoltura de las nanocápsulas. De este modo, con los volúmenes y las concentraciones de las soluciones micelares dadas anteriormente, se añaden 532 µl de DSPE-PEG<sub>2000</sub> o 1.108 µl de DSPE-PEG<sub>5000</sub>. Se prepara además una referencia añadiendo 800 µl de agua caliente.

20

- 25 Una vez se han añadido estas cantidades, se dejan las soluciones durante 1 h 30 min. a 60°C y se agitan cada cuarto de hora. Después de este período de incubación, las preparaciones se sumergen en un baño con hielo.

Los tamaños de las nanocápsulas lipídicas obtenidas se proporcionan en la Tabla 4.

30

Tabla 4

Preparación	Tamaño de nanocápsula (nm)
Preparación original sin incubar	69 ± 12,9
Referencia calentada	69,9 ± 14,2
DSPE-PEG <sub>2000</sub>	77,9 ± 14
DSPE-PEG <sub>5000</sub>	78,4 ± 13

La preparación de referencia, incubada en las mismas condiciones, tiene partículas con un tamaño próximo a las de la preparación original sin incubar a 60°C. Las preparaciones que se han incubado en presencia de DSPE-PEG presentan un aumento sustancial en el diámetro medio de las partículas, lo que sugiere la inserción de los fosfolípidos pegilados en la superficie de las nanocápsulas.

35

#### C) Influencia de varios parámetros sobre el tamaño de las nanocápsulas según la invención

#### 40 Ejemplo 4: Control del tamaño de las nanocápsulas preparadas según el procedimiento convencional

Las preparaciones se producen según el procedimiento convencional tal como se describe en el Ejemplo 1. Las preparaciones se producen con una cantidad de lípidos de alrededor de 1 g. La figura 1 representa la evolución del tamaño de las nanocápsulas, en función de la proporción de DSPE-PEG<sub>2000</sub> añadido, para cantidades de tensioactivo hidrófilo, Solutol<sup>®</sup> HS15, fijado respectivamente, en 414 mg (413,5 ± 0,50), 446 mg (445,85 ± 0,01) o 504 mg (504,4 ± 0,27). Las cantidades de HSPC, Labrafac<sup>®</sup> cc y NaCl se mantienen constantes para todas las preparaciones, respectivamente en 76 mg, 504,5 mg y 220 mg.

45

En general, el tamaño aumenta para cantidades decrecientes de Solutol<sup>®</sup> HS15. En la misma serie, para una cantidad dada de Solutol<sup>®</sup> HS15, el tamaño aumenta con las proporciones crecientes de DSPE-PEG añadido.

50

**Ejemplo 5: Control del tamaño de las nanocápsulas preparadas según el procedimiento de posinserción**

5 Cuando la intención es obtener tiempos de circulación particularmente largos o introducir ligandos, es necesario hacer uso del procedimiento de posinserción tal como se describe en el Ejemplo 3. De este modo, se generan nanocápsulas de antemano, que están exentas de DSPE-PEG y para las que es posible ajustar el tamaño variando la relación de masa del total de los lípidos y tensioactivos que constituyen la superficie de las partículas al total de todos los lípidos y tensioactivos que constituyen la composición de la preparación (superficie + núcleo). La relación entre esta proporción de lípido superficial/lípido total y el tamaño de las nanocápsulas obtenidas, adecuada para el procedimiento de posinserción, se presenta en la figura 2.

10 Las formulaciones presentadas en la figura 2 se prepararon para una cantidad de aproximadamente 1 g de lípidos. Las cantidades de HSPC, Labrafac<sup>®</sup> cc y NaCl son constantes y corresponden a las utilizadas en el Ejemplo 4. Las cantidades de Solutol<sup>®</sup> HS15 utilizadas y las correspondientes relaciones de lípido superficial/lípido total (relación S/T) se dan en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5

Solutol <sup>®</sup> HS15 (mg)	Relación S/T
400,6	48,6%
413,2	49,2%
445,9	50,9%
504,2	53,5%

20 Posteriormente, es posible introducir el DSPE-PEG de fosfolípido pegilado utilizando el procedimiento de posinserción, con objeto de obtener las nanocápsulas furtivas según la invención.

El procedimiento de posinserción se lleva a cabo según el Ejemplo 3 para una producción total final de 6% molar de DSPE-PEG 2000 ó 5000.

25 Los tamaños obtenidos para las formulaciones originales (serie SM), exenta de DSPE-PEG que tiene respectivamente 504, 446 y 401 mg de Solutol<sup>®</sup> HS15, y las formulaciones derivadas según la invención, que han sido objeto de incorporación de DSPE-PEG 2000 y 5000 utilizando dicho procedimiento de posinserción están representadas en la figura 3.

30 De este modo, la inserción de DSPE-PEG<sub>2000</sub> produce un aumento en el diámetro de 7,2 nm de promedio. El aumento de tamaño es más marcado para el DSPE-PEG<sub>5000</sub>, que presenta un aumento medio de 9,1 nm en el diámetro de las partículas.

35 Basándose en estos aumentos de diámetro, que reflejan la inserción eficaz de fosfolípidos pegilados en la superficie de las nanocápsulas lipídicas, y en el conocimiento de la evolución del tamaño de las nanocápsulas exentas de PEG en función de la relación lípidos superficiales/totales (figura 2) es posible ajustar el tamaño de las nanocápsulas según la invención a fin de facilitar el derrame de sangre a través de las perforaciones presentes en el endotelio de capilares tumorales específicos.

40 D) Resultados de experimentos de eliminación realizados *in vivo* con las nanocápsulas furtivas según la invención

**Ejemplo 6: Cinética de la desaparición del vehículo (datos comparativos de PEG<sub>2000</sub>/PEG<sub>5000</sub>)**

45 La eliminación en la sangre de las nanocápsulas según la invención se evaluó en un estudio comparativo entre una formulación de nanocápsulas a base de 3,34% molar de DSPE-PEG<sub>2000</sub> (curva "2k-3,34") y una formulación de nanocápsulas a base de DSPE-PEG<sub>5000</sub>, cuya proporción molar de DSPE-PEG<sub>5000</sub> es 1,41% molar ("5k-1,41"). Estas formulaciones se prepararon según dicho procedimiento convencional como se describe en los Ejemplos 1 y 2.

50 Para realizar esto, se inyectaron por vía intravenosa en ratas macho (Sprague-Dawley, 325 g) soluciones de nanocápsulas según la invención en una proporción de 4 ratas por formulación. Las dosis inyectadas de lípidos se seleccionaron a fin de que fueran aproximadamente 10 veces menores que las dosis de partida en las que pueden tener lugar fenómenos de "saturación del MPS" (que produciría tiempos de circulación prolongados debido a que la capacidad para purgar está sobrepasada). De este modo, se inyectó en cada rata una solución de nanocápsulas que contiene una cantidad total de lípidos de 2 mg en un volumen de 400 µl.

55 Las nanocápsulas según la invención se marcaron de antemano con un trazador radioactivo tritiado: éter hexadecílico de [<sup>3</sup>H]-colesterol que es un marcador no intercambiable. La dosis de marcador radioactivo representa 3 microCurie (µCi) por rata. Se tomaron 9 muestras de sangre sucesivas después de la inyección de las nanocápsulas a los 5, 15 y 30 minutos y a continuación a las 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas.

Las muestras de sangre se digieren en presencia de Soluene 350 (Canberra Packard, Mississauga, Canadá) durante una hora a 50°C. Tras la digestión, las muestras de sangre se decoloran utilizando peróxido de hidrógeno acuoso al 30%. El fluido de centelleo Hionic Fluor (Canberra) se añade a continuación y las muestras se dejan en reposo durante la noche. La cantidad de nanocápsulas marcadas presentes en la sangre en varios tiempos se ensayan a continuación haciendo el recuento de la radioactividad utilizando un contador de centelleo. Los controles de ensayo permiten determinar el número de dpm (desintegraciones por minuto) correspondientes al 100% de la dosis. El volumen de sangre total en ratas es de 75 ml/kg. De este modo, es posible expresar los resultados en porcentaje de la dosis total inyectada. Los perfiles sanguíneos obtenidos de este experimento se resumen en la figura 4.

La Tabla 6 proporciona la denominación, el tamaño medio y la proporción molar de DSPE-PEG incorporada, según el procedimiento convencional, en la envoltura externa de dichas nanocápsulas lipídicas.

La nomenclatura utilizada describe la masa molar del componente PEG (2k, 5k para 2000 ó 5000) y el porcentaje molar de DSPE-PEG con relación al total de los lípidos superficiales.

Tabla 6: Descripción de las formulaciones utilizadas

Denominación	Tamaño (nm)	DSPE-PEG
2k-3,34	77 ± 15	3,34% molar
5k-1,41	61 ± 15	1,41% molar

Estos resultados demuestran que la vida media plasmática de las nanocápsulas según la invención está comprendida entre 2 y 3 horas en las ratas tanto para las nanocápsulas a base de DSPE-PEG<sub>2000</sub> a 3,34% molar como las nanocápsulas a base de DSPE-PEG<sub>5000</sub> a 1,41% molar. Sin embargo, es importante observar el efecto furtivo mayor proporcionado por las cadenas de DSPE-PEG<sub>5000</sub>. Específicamente para un número de moles que es más de dos veces inferior al número de moles de DSPE-PEG<sub>2000</sub> en la superficie de las nanocápsulas, las cadenas de PEG más largas de hecho proporcionan un efecto protector comparable al proporcionado por las cadenas que tienen un masa de 2.000 g/mol.

#### **Ejemplo 7: Estudio comparativo de las nanocápsulas de la invención comparadas con las nanocápsulas de la técnica anterior**

Se llevó a cabo un estudio similar al mostrado en el Ejemplo 6, con objetivo de comparar las velocidades de desaparición en la sangre de las nanocápsulas lipídicas según la invención y de las nanocápsulas lipídicas descritas en la técnica anterior en la patente WO 01/64328. Los resultados obtenidos para las formulaciones 1 a 4 se obtuvieron en ratas en condiciones idénticas a los resultados proporcionados en la figura 4. Las formulaciones representadas se describen brevemente a continuación y los datos obtenidos se indican en la figura 5. Esta figura comprende también, a modo de comparación, los datos obtenidos por Stolnik *et al.* (disponible solamente para 3 horas de cinética sanguínea) y también por Cahouet *et al.*

*Formulación 1:* Nanocápsulas convencionales tal como se describe en la patente WO 01/64328: el tensioactivo lipófilo es Lipoïd® S75-3, que no es una lecitina pura (70% de fosfatidilcolina) y las partículas carecen de PEG;

*Formulación 2:* Nanocápsulas a base de Lipoïd® S75-3, pero que comprenden DSPE-PEG<sub>2000</sub> (1,65% molar) introducido según el procedimiento convencional;

*Formulación 3:* Nanocápsulas a base de HSPC (> 99% de fosfatidilcolina) y de DSPE-PEG<sub>5000</sub> (1,41% molar), nanocápsulas según la invención a base de PEG<sub>5000</sub> introducidas según el procedimiento convencional;

*Formulación 4:* Nanocápsulas de DSPE-PEG<sub>2000</sub> (3,34% molar), nanocápsulas según la invención a base de PEG<sub>2000</sub>, cantidad máxima que puede incorporarse según el procedimiento convencional para HSPC;

*FS:* Formulación de Stolnik: micelas de PLA-PEG en la proporción 13:5 (teniendo el componente PEG una masa molar de 2.000 g/mol), cuyo diámetro es del orden de 75 nm. Los datos de la mejor formulación se toman del gráfico contenido en el artículo publicado (Stolnik *et al.*, *J. Drug Target.*, 9: 361, 2001). Estos datos se obtienen también después de la inyección intravenosa en ratas de una cantidad de nanocápsulas que no saturan el MPS;

*NL A.A.:* Formulación convencional en nanocápsulas de la técnica anterior. Estos datos se tomaron del estudio de Cahouet *et al.* (*Int. J. Pharm.*, 242: 367, 2002). Estos resultados se obtuvieron también después de la inyección intravenosa (dosis desconocida) en ratas de nanocápsulas lipídicas preparadas por los autores mencionados anteriormente según una formulación a base de Lipoïd® S75-3 descrito en la patente WO 01/64328.

Las formulaciones 1 y 2 representan, respectivamente, formulaciones de nanocápsulas convencionales, cuya superficie comprende Lipoïd® S75-3 (lecitina que contiene impurezas), y estas mismas nanocápsulas, cuya superficie también contiene 1,65% molar de DSPE-PEG<sub>2000</sub>. Este nivel es próximo al contenido máximo que puede

incorporarse para las nanocápsulas que contienen Lipoïd® S75-3, preparado según el procedimiento convencional. El contenido en DSPE-PEG<sub>2000</sub> de la formulación 4 está también en su máximo en virtud del procedimiento convencional. La falta de impurezas y la homogeneidad de la fosfatidilcolina HSPC permite incorporar dichos contenidos de DSPE-PEG en las nanocápsulas según la invención (prácticamente hasta el doble con Lipoïd® S75-3).

Estos resultados demuestran que las nanocápsulas según la invención (formulaciones 3 y 4) presentan una eliminación significativamente menor que las nanocápsulas lipídicas de la técnica anterior (formulación 1, tal como se describe en la patente WO 01/64328) que son eliminadas muy rápidamente del compartimento sanguíneo. Por lo tanto, para la formulación 1, solamente el 10% de la dosis inyectada está todavía presente en la sangre después de una hora. Las nanocápsulas de la técnica anterior por consiguiente no presentan propiedades furtivas. Además, la incorporación de DSPE-PEG<sub>2000</sub> en las nanocápsulas de la técnica anterior (formulación 2) solamente mejoraron muy ligeramente su persistencia en la circulación sanguínea: su vida media es también inferior a una hora. De hecho, los aumentos respectivos en las AUC (del inglés Área bajo la curva entre 5 minutos y 24 horas) con relación a la formulación 1 ( $AUC_{Form\ x} / AUC_{Form\ 1}$ ) son:

- Formulación 2: 1,09
- Formulación 3: 2,31
- Formulación 4: 2,68

Además, como se mencionó en la descripción de la técnica anterior, las nanocápsulas según la patente WO 01/64328 han sido también el tema de un estudio *in vivo* en ratas por Cahouet *et al.* La cinética de la eliminación de la sangre de estas nanocápsulas presenta un perfil (formulación NL A. A. en la figura 5) que es ligeramente superior al obtenido para la formulación 1 y relativamente similar al de la formulación 2, debido probablemente a la diferencia en la dosis inyectada (NL A. A.: dosis desconocida). La vida media de las nanocápsulas de Cahouet *et al.* (NL A. A.) es inferior a una hora (exactamente, 45 minutos). El perfil obtenido por el solicitante para la formulación 1 es por lo tanto relativamente similar al proporcionado en el estudio de la técnica anterior. Estas dos formulaciones de referencia, que no contienen ninguna cadena de PEG mayor de 1.000 g/mol, demuestran la ineficacia de las cadenas cortas de PEG de Solutol® HS15 (660 g/mol) en proporcionar protección contra la rápida eliminación en la circulación sanguínea. Por lo tanto, estas dos formulaciones no presentan propiedades furtivas ni una circulación mantenida (10% de la dosis inyectada en la 2ª hora) y puede considerarse que son referencias no furtivas para evaluar el efecto de las modificaciones a la composición de los vehículos (utilización de una lecitina con fosfatidilcolina de alta pureza), en particular la adición de cadenas largas de PEG.

La figura 5 representa también los datos de la técnica anterior tal como se proporcionan en la publicación de Stolnik *et al.* (leyenda FS). Su formulación de micelas de PLA-PEG presenta una naturaleza furtiva con ligeramente menos del 40% de la dosis inyectada todavía presente en la circulación sanguínea después de dos horas. Sin embargo, la naturaleza furtiva de esta preparación coloidal es inferior a las de las nanocápsulas según la invención, que presentan más del 50% y más del 60% de la dosis inyectada después de la 2ª hora para las 3 formulaciones (DSPE-PEG<sub>5000</sub>) y 4 (DSPE-PEG<sub>2000</sub>), respectivamente. Dado que la proporción de nanocápsulas según la invención (formulaciones 3 y 4) presentes en la circulación sanguínea durante las primeras 4 horas después de la inyección es claramente mayor que la de las nanopartículas furtivas de la técnica anterior (formulación FS) la cantidad de vehículo propenso a alcanzar las células de tumor sólido y/o circulante aumentarán de manera ventajosa, incrementando de este modo las probabilidades de éxito del tratamiento.

#### **Ejemplo 8: Potenciación de las propiedades furtivas proporcionadas por el procedimiento de posinserción**

Se llevó a cabo un estudio *in vivo*, realizado en las mismas condiciones que los estudios anteriores con 4 formulaciones diferentes. De este modo, para evaluar la ventaja del procedimiento posinserción, el solicitante comparó la naturaleza furtiva de tres formulaciones preparadas según dicho procedimiento de posinserción, con la naturaleza furtiva de la mejor formulación preparada según el procedimiento convencional. Las cuatro formulaciones que eran objeto de este estudio *in vivo* son las siguientes:

Formulación 2k-3,34: Nanocápsulas de HSPC-PEG<sub>2000</sub> (3,34% molar), nanocápsulas según la invención a base de PEG<sub>2000</sub>, cantidad máxima que puede incorporarse según el procedimiento convencional para HSPC. Esta formulación corresponde a la formulación 4 del Ejemplo 7 inyectada a un nuevo grupo de 4 ratas;

Formulación 2k-6%: Nanocápsulas a base de HSPC que han sido objeto de incorporación de una cantidad de DSPE-PEG<sub>2000</sub> correspondiente al 6% molar de los lípidos totales de la superficie de las nanocápsulas de acuerdo con la invención según el procedimiento de posinserción, tal como se detalla en el Ejemplo 3;

Formulación 5k-6%: Nanocápsulas a base de la misma formulación original que comprende HSPC, preparadas para la producción de las nanocápsulas de la formulación 2k-6%, pero que han sido objeto de incorporación de DSPE-PEG<sub>5000</sub> por el procedimiento de posinserción, nanocápsulas según la invención;

Formulación 2k-10%: Nanocápsulas a base de la misma formulación original que comprende HSPC, preparadas para la producción de las nanocápsulas de la formulación 2k-6%, pero que han sido objeto de incorporación de 10%

molar de DSPE-PEG<sub>2000</sub> por el procedimiento de posinserción, nanocápsulas según la invención;

Los resultados obtenidos para la eliminación de la sangre de las tres formulaciones detalladas anteriormente se dan en la figura 6.

Los datos proporcionados en la figura 6 demuestran la ventaja del procedimiento de posinserción. Específicamente, dicho procedimiento de posinserción permite obtener nanocápsulas según la invención, cuyas propiedades furtivas son claramente superiores a las de las nanocápsulas según la invención pero preparadas según el procedimiento convencional. Además, este estudio demuestra también la estabilidad y la conservación de las propiedades furtivas, a lo largo del tiempo, de las nanocápsulas según la invención. La formulación 2k-3.34 se preparó 3 meses antes y se inyectó otra vez para el presente estudio. Los perfiles obtenidos son comparables (una cantidad ligeramente mayor del 22% de la dosis inyectada se encuentra al final de la 4ª hora, como en la figura 4). Las formulaciones mostradas en la figura 6 presentan propiedades furtivas pronunciadas. Las formulaciones de las nanocápsulas de referencia (sin DSPE-PEG) o (la formulación 1 del ejemplo anterior y la del estudio de la técnica anterior) presentan menos del 10% de la dosis residual después de dos horas.

El procedimiento de posinserción permite incorporar cantidades de DSPE-PEG que son mayores de las que pueden incorporarse según el procedimiento convencional, tal como se muestra mediante los perfiles de la sangre de la figura 6, que permiten mejorar el tiempo de circulación de las preparaciones y adaptarlas a aplicaciones que requieren mayores proporciones de nanocápsulas en la sangre durante las primeras 12 horas después de su inyección. Por lo tanto, las formulaciones preparadas según dicho procedimiento de posinserción presentan todas aproximadamente el 60% de la dosis inyectada al final de la 4ª hora. En la 8ª hora, la dosis residual de nanocápsulas de la formulación 2k-6% es más del 18%. La misma proporción del 6% molar de DSPE-PEG, pero teniendo cadenas más largas de PEG (DSPE-PEG<sub>5000</sub>) permite obtener más del 40% de la dosis inyectada en la 8ª hora. Cuando se introduce más DSPE-PEG<sub>2000</sub>, hasta el 10% molar, es posible obtener un perfil ligeramente superior al de la formulación 5k-6%, con 50% de la dosis inyectada en la 8ª hora. Las propiedades furtivas de las formulaciones de nanocápsulas según la invención preparadas de acuerdo con el procedimiento de posinserción son por lo tanto claramente mayores que las observadas para las nanopartículas sólidas "furtivas" tal como se describe en la bibliografía.

#### E) Ejemplos de preparación de nanopartículas furtivas cargadas con fármacos antineoplásicos

##### **Ejemplo 9: Preparación de nanocápsulas lipídicas furtivas de paclitaxel y docetaxel**

Paclitaxel y docetaxel pueden incorporarse en nanocápsulas lipídicas según el procedimiento convencional y a continuación las nanocápsulas cargadas con fármaco obtenidas pueden pegilarse por el procedimiento de posinserción para proporcionar propiedades furtivas.

Una solución de docetaxel o paclitaxel en triglicéridos, que constituirá el núcleo interno de las nanocápsulas lipídicas, se prepara disolviendo el fármaco en el triglicérido a 75°C. la cantidad de fármaco se ajusta para obtener soluciones que no recristalicen en el enfriamiento a temperatura ambiente. En el caso de paclitaxel y docetaxel, los triglicéridos con cadenas alquílicas cortas demuestran una mejor solubilidad que aquellas con cadenas alquílicas largas (> C8). Las soluciones de paclitaxel y docetaxel en triglicéridos, que varían en la composición del éster C8, se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: Soluciones en triglicérido de paclitaxel y docetaxel

Denominación /suministrador	Triglicérido		Solubilidad (% p/p)*	
	Especificaciones	Contenido en C8	Paclitaxel	Docetaxel
Labrafac <sup>®</sup> concentración (Gattefossé)	C8: 50-80% C10: 20-50%	56,7%	1,6	2
Miglyol <sup>®</sup> 810N (Sasol)	C8: 65-80% C10: 20-35%	70,4%	2,7	3,9
Tricaprilina (Sigma)	C8: > 99% C10: NR	> 99%	6	7

\* porcentaje en peso de fármaco en la solución de triglicérido obtenida

La Tabla 7 demuestra que los triglicéridos con el contenido mayor de éster C8 (es decir, tricaprilato de glicerilo = tricaprilina) solubilizaban cantidades mayores de paclitaxel y docetaxel. Tricaprilina, compuesto de C8 puro, era el mejor disolvente para ambos fármacos. Las soluciones de paclitaxel al 6% o menos y de docetaxel al 7% o menos en tricaprilina pueden mantenerse a temperatura ambiente durante un largo periodo.

Como ejemplo, una solución al 6% de docetaxel en tricaprilina tiene la composición siguiente:

- Tricaprilina 552,0 mg
- Docetaxel 35,3 mg

La solución al 6% de docetaxel en tricapriline es estable durante meses a 25°C.

5 Las nanocápsulas lipídicas cargadas en el fármaco, sin DSPE-PEG, pueden prepararse a partir de las soluciones de paclitaxel o docetaxel en tricapriline según el procedimiento convencional. Cuando se utilizan soluciones en tricapriline de paclitaxel al 6% o docetaxel al 7% para preparar nanocápsulas lipídicas, aparecen cristales en el fármaco después de 10 días o de 118 días respectivamente. Este fenómeno de desestabilización es debido al hecho de que estas soluciones de tricapriline están próximas a la saturación. La estabilidad de las preparaciones de nanocápsulas lipídicas cargadas en el fármaco puede mejorarse aumentando la cantidad de fármaco en tricapriline. Las nanocápsulas lipídicas preparadas con paclitaxel al 5% en tricapriline son estables durante 32 días y las nanocápsulas lipídicas preparadas con docetaxel al 6% en tricapriline son estables durante por lo menos 7 meses a 25°C o a 5°C.

15 Las nanocápsulas lipídicas cargadas con paclitaxel o docetaxel preparadas con una "solución de tricapriline" de paclitaxel al 5% o de docetaxel al 6% pueden tener la siguiente composición:

- HSPC 75 mg
- 20 - Solutol® HS15 400 mg
- "Solución de tricapriline" 504 mg
- NaCl 220 mg
- Agua c. s. p. 5.000 mg

25 Las nanocápsulas cargadas con fármaco presentan las siguientes características (Tabla 8)

Tabla 8: Características de las nanocápsulas lipídicas cargadas con fármaco

Solución de tricapriline utilizada	Carga de fármaco (% p/p)	Tamaño (nm)
Sin fármaco	0	72
Paclitaxel al 5%	2,58%	73
Docetaxel al 6%	3,09%	77

30 Se prefirió docetaxel debido a la mejor carga del fármaco y a la mejor estabilidad que el paclitaxel. Sin embargo, las nanocápsulas lipídicas de paclitaxel al 2% p/p eran estables durante meses. La estabilidad de las nanocápsulas lipídicas de docetaxel al 3,09% p/p ("3%") es superior a 7 meses a 25°C.

35 La preparación original de nanocápsulas lipídicas cargadas con fármaco se utiliza a continuación para preparar nanocápsulas lipídicas furtivas cargadas con fármaco según el procedimiento de posinserción tal como se describe en el Ejemplo 3. En resumen, el volumen de la preparación obtenida de nanocápsulas lipídicas furtivas cargadas con fármaco se lleva a 25 ml. Se utilizan alícuotas de 2 ml para incubaciones (preincubación de 15 min. seguida de incubación de 90 min. a 60°C) con soluciones micelares de DSPE-PEG (véase la Tabla 9); las preparaciones se enfrían en un baño con hielo al final del periodo de posinserción. Las nanocápsulas lipídicas cargadas con fármaco objeto de la presente invención obtenidas después de la posinserción de DSPE-PEG eran estables durante varios meses (no se observó recristalización del fármaco incorporado ni variación significativa de tamaño). En la Tabla 9 se indican varias posinserciones de DSPE-PEG con nanocápsulas lipídicas cargadas con 3,5% de docetaxel.

45 Tabla 9: Características de las nanocápsulas lipídicas furtivas con 3,5% de docetaxel (p/p)

Preparación	Tamaño (nm)
LN* de referencia	72
LN-DPSE-PEG <sub>2000</sub> -6% molar	78
LN-DPSE-PEG <sub>5000</sub> -6% molar	79
LN-DPSE-PEG <sub>2000</sub> -10% molar	82
LN-DPSE-PEG <sub>5000</sub> -10% molar	83

\*nanocápsulas lipídicas (NL) que contienen 3,5% de docetaxel incubadas en las mismas condiciones sin posinserción

50 No se produjo recristalización de docetaxel en ninguna de las preparaciones. El aumento significativo de diámetro, comparado con la preparación de referencia, refleja la inserción eficaz de lípidos de DSPE-PEG en la superficie de las nanocápsulas lipídicas cargadas con docetaxel.

F) Resultados de los experimentos de toxicidad realizados *in vivo* con nanocápsulas furtivas cargadas con fármaco antineoplásico según la invención

**Ejemplo 10: Evaluación de toxicidad de las nanocápsulas cargadas con docetaxel frente a Taxotere® en ratones sanos.**

Se evaluó la toxicidad de docetaxel en ratones para varias formulaciones a diferentes dosis. La toxicidad de fármacos antineoplásicos puede evaluarse por medición de la pérdida de peso corporal de ratones tras la inyección intravenosa de las formulaciones. Se inyectó docetaxel como solución comercial inyectable, Taxotere® (Aventis)\*, o formulada en nanocápsulas lipídicas (NL) no pegiladas y nanocápsulas lipídicas furtivas (S-NL).

\*Taxotere® es una solución de docetaxel en polisorbato 80, etanol y agua.

Las nanocápsulas lipídicas y las nanocápsulas lipídicas furtivas se prepararon con objeto de proporcionar una carga de docetaxel al 3% p/p según el procedimiento descrito en el Ejemplo 9.

Estas preparaciones, que presentan más de 7 meses de estabilidad a 25°C, poseen las características siguientes:

Tabla 10: Características de NL y S-NL cargadas con docetaxel al 3% p/p

Denominación	Composición	Pegilación	Tamaño
NL	HSPC 75 mg	-	70 nm
S-NL	Solutol® HS 15 400 mg "Solucion de tricaprilina*" 504 mg	DSPE-PEG <sub>2000</sub> 6% molar	80 nm

\*Se utilizó una solución de docetaxel al 6% p/p en tricaprilina

Las formulaciones de docetaxel (Taxotere®, nanocápsulas cargadas con docetaxel al 3% p/p no pegiladas y las nanocápsulas de DSPE-PEG<sub>2000</sub> al 6% molar cargadas con docetaxel al 3% p/p) se diluyeron con solución salina fisiológica y se inyectaron en 20, 40 y 60 mg/kg de docetaxel. Debido a la alta toxicidad de la solución inyectable de docetaxel, la dosis de 60 mg/kg no se investigó para Taxotere®. Estas formulaciones de docetaxel se administraron a ocho grupos de ratones, más otro grupo de "referencia" recibieron inyecciones de solución salina fisiológica (Tabla 11).

Tabla 11: Formulaciones y dosis utilizadas para el estudio de toxicidad

Formulación/dosis	20 mg/kg	40 mg/kg	60 mg/kg
Nanocápsulas lipídicas (NL) cargadas con docetaxel al 3% p/p	NL-20	NL-40	NL-60
Nanocápsulas lipídicas furtivas (S-NL) cargadas con docetaxel al 3% p/p de DSPE-PEG <sub>2000</sub> -6% molar	S-NL-20	S-NL-40	S-NL-60
Taxotere®	TXT-20	TXT-40	-

Se emprendió el estudio de toxicidad en ratones BALB/c hembra sanos que pesaban 17 a 20 g (7 ratones por formulación, 8 formulaciones más 1 de referencia). Se administró a los ratones 250 µl de una formulación dada (o una solución salina fisiológica, para el grupo de referencia) en una sola dosis intravenosa. El peso de los ratones antes de la primera inyección (D0) se definió como peso de referencia. Se administró a los ratones 3 dosis los días 0 (D0), 5 (D5) y 10 (D10). Se pesaron los ratones y se comprobaron diariamente las reacciones secundarias aparentes hasta el D28 y a continuación el D30, D33 y D40.

La figura 7 presenta la evolución del peso corporal relativo (D/D0) de los nueve grupos de ratones (las barras de error no están representadas; todos los RSD fueron < 2,4%). Todas las formulaciones de docetaxel produjeron pérdidas de peso corporal que aumentaron con dosis crecientes. El grupo de referencia (Ctrl) presentaba un aumento de peso. Se interrumpió el estudio para el grupo TXT-40 el D10 antes de la tercera inyección porque 2 animales experimentaron atrofia y parálisis de las patas traseras. Los animales TXT-40 se sacrificaron el día 10 porque perdieron más del 15% de peso corporal y por lo tanto no tolerarían una tercera inyección.

Docetaxel cargado en NL o S-NL a 20 mg/kg produjo pérdidas de peso corporal (p.p.c.) menores en el punto más bajo (nadir) (D23) que la dosis correspondiente de docetaxel en la solución de Taxotere® (P < 0,05, prueba de Student). Además, una dosis de 40 mg/kg de docetaxel en Taxotere® (TXT-40) presentaba una toxicidad alta con 15% de p.p.c. alcanzada en 9,7 días; las p.p.c. eran mayores que las dosis correspondientes de NL-40 y S-NL-40 e incluso mayores que las dosis de 60 mg/kg (NL-60 y S-NL-60). Con objeto de comparar el efecto tóxico de las formulaciones, los días, tras los cuales se observaron 10% y 15% de p.p.c., están indicados en la Tabla 12 y en la figura 8 respectivamente.

Tabla 12: Día promedio correspondiente a la pérdida de peso corporal de 10% en ratones (n = 7) y dosis acumulada de docetaxel recibida

Grupo	Día promedio $\pm$ SD	Dosis acumulada (mg/kg)
TXT-40	6,4 $\pm$ 1,13	80
NL-60	8,3 $\pm$ 0,95	120
S-NL-60	9,4 $\pm$ 0,79	120
NL-40	10,7 $\pm$ 0,95	120
S-NL-40	11,1 $\pm$ 2,41	120
TXT-20	13,0 $\pm$ 1,53	60
NL-20	16,1 $\pm$ 3,08	60
S-NL-20	17,3 $\pm$ 3,33	60

- 5 La Tabla 12 y la figura 8 demuestran que las formulaciones con Taxotere<sup>®</sup> produjeron pérdida de peso corporal más rápidamente que las formulaciones de nanocápsulas a dosis equivalentes. El 15% del p.p.c. sucedió significativamente antes para TXT-40 que para cualquiera de las formulaciones NL-40 y S-NL-40 o NL-60 y S-NL-60 (prueba de Student P < 0,05).
- 10 En conclusión, la encapsulación de Docetaxel en nanocápsulas lipídicas o en nanocápsulas lipídicas furtivas no demostró ser eficaz en la reducción de toxicidad en este agente antineoplásico en comparación con la solución comercial de Taxotere<sup>®</sup> administrada por vía intravenosa a las mismas dosis. Además, la administración de una dosis acumulada de 80 mg/kg de Taxotere<sup>®</sup> (2 x 40) se observó que era muy tóxica con efectos secundarios graves mientras que era posible administrar dosis mayores de docetaxel en NL o en S-NL, es decir 180 mg/kg (3 x 60) con menos del 20% de p.p.c. en el punto más bajo y un aumento de peso corporal unas pocas semanas después de la última dosis. Por lo tanto, es posible administrar dosis mayores de docetaxel, u observar menos efectos tóxicos, cuando se formula el fármaco en nanocápsulas lipídicas o en nanocápsulas lipídicas furtivas frente a una solución.

20 G) Resultados de estudios de biodistribución *in vivo* realizados con nanocápsulas furtivas cargadas con fármaco antineoplásico, según la invención, administradas a ratones con tumor

**Ejemplo 11: Acumulación en el tumor de nanocápsulas cargadas con docetaxel frente a Taxotere<sup>®</sup> en ratones C26 con tumor**

- 25 La acumulación en el tumor de nanocápsulas lipídicas furtivas cargadas con fármaco antineoplásico según la invención se evaluó en un estudio comparativo entre una formulación de nanocápsulas lipídicas furtivas (S-NL) de DSPE-PEG<sub>2000</sub> 6% molar cargadas con docetaxel al 3% p/p, una formulación de nanocápsulas lipídicas (NL) al 3% p/p no pegiladas y la solución comercial de docetaxel, Taxotere<sup>®</sup> (TXT).

30 Preparación de las formulaciones

- 35 Se prepararon NL y S-NL cargadas con docetaxel según dicho procedimiento convencional y el procedimiento de posinserción utilizando los mismos ingredientes y en las mismas proporciones relativas descritas en el Ejemplo 10 (Tabla 10). Ambas formulaciones de nanocápsulas se radiomarcaron con éter hexadecílico con [<sup>3</sup>H]-colesterol (para seguir las nanocápsulas) y [<sup>14</sup>C]-docetaxel (para seguir el fármaco). Se utilizó también [<sup>14</sup>C]-docetaxel para marcar el Taxotere<sup>®</sup> en solución comercial de docetaxel. Las tres formulaciones NL, S-NL y TXT estaban diluidas de manera apropiada con solución salina fisiológica y se inyectaron iv. a una dosis de docetaxel de 1 mg/kg (150  $\mu$ l). Los grupos con nanocápsula recibieron 0,7  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H] y 0,2  $\mu$ Ci de [<sup>14</sup>C], y los ratones con Taxotere<sup>®</sup> se inyectaron con 0,35  $\mu$ Ci de [<sup>14</sup>C].

40 Ratones con tumor C26

- 45 Se realizaron experimentos en ratones BALB/c hembra (17 a 20 g) con tumores de carcinoma de colon 26 (C26). Antes de la implantación del tumor, se quitó el pelo en el lomo de los ratones por rasurado y depilación química. Se implantaron tres tumores C26 en el lomo de cada ratón por inyección subcutánea de 2 x 10<sup>6</sup> en suspensión en 50  $\mu$ l de medio de cultivo. Se ensayaron los ratones 10 días después de la inoculación de células cuando el diámetro del tumor alcanzó 8 mm de promedio (5 a 10 mm). Los ratones con tumor se agruparon a continuación en tres grupos (NL, S-NL y TXT) y se inyectaron por vía intravenosa con 150  $\mu$ l de formulación correspondiente a una dosis de 1 mg/kg de docetaxel. Se sacrificaron los animales (n = 5) 2, 6 y 12 horas después de la inyección.

- 50 Se pesaron los tumores antes del tratamiento. Los tumores se digirieron en presencia de Soluene 350, se blanquearon utilizando peróxido de hidrógeno al 30% y se añadió fluido de centelleo a la solución obtenida como se describe en el Ejemplo 6. La cantidad de nanocápsulas y docetaxel en los tumores se evaluó por recuento de radioactividad de [<sup>3</sup>H] y [<sup>14</sup>C], respectivamente, utilizando un contador de centelleo.

Evaluación de acumulación del tumor en diferentes periodos

5 La figura 9 presenta la acumulación de nanocápsulas lipídicas (NL) y nanocápsulas lipídicas furtivas (S-NL) en tumores en diferentes momentos. Debido a su circulación continua y a las propiedades furtivas, las nanocápsulas lipídicas con DSPE-PEG<sub>2000</sub> al 6% molar cargadas con docetaxel al 3% p/p según la invención presentaban acumulación en el tumor más elevada ( $P < 0,05$ , prueba de Student) que las nanocápsulas lipídicas convencionales cargadas con docetaxel al 3% p/p en cualquier momento. La cantidad de S-NL en los tumores, fue por lo menos 3 veces mayor que la de NL convencional 12 horas después de la administración.

10 La figura 10 representa la cantidad de docetaxel acumulado en los tumores para nanocápsulas lipídicas (NL), nanocápsulas lipídicas furtivas (S-NL) y la formulación comercial de Taxotere<sup>®</sup> (TXT) de referencia. Estadísticamente se calcularon diferencias significativas por análisis de varianza de una vía (entre las formulaciones en un momento dado y entre los tiempos diferentes para una formulación dada). Cuando el valor P se consideró significativo ( $P < 0,05$ ), se utilizó el análisis retrospectivo de Scheffé para comparaciones entre pares de medios. Dos  
15 horas después de la administración intravenosa, las cantidades de docetaxel acumuladas en los tumores no eran significativamente diferentes para las tres formulaciones ( $P = 0,954$ ). Seis horas después de la administración la cantidad de docetaxel acumulada en los tumores era significativamente mayor para S-NL que TXT. Diferencias mayores pudieron notarse 12 horas después de la administración: aunque las cantidades docetaxel entre TXT y NL se consideraron no significativamente diferentes, el S-NL permitía liberar más docetaxel en los tumores que el NL o el TXT (la cantidad de docetaxel en los tumores no fue sin embargo estadísticamente diferente entre TXT y NL). El  
20 análisis de los datos para cada formulación demostró que la cantidad de docetaxel administrada como la formulación TXT, no variaba con el tiempo ( $P = 0,995$ ). La cantidad de docetaxel, administrada en NL convencional aumentaba ligeramente con el tiempo en los tumores pero sin significación estadística ( $P = 0,069$ ). Sin embargo para las S-NL cargadas con docetaxel según la invención, la cantidad de docetaxel en los tumores aumentó significativamente con  
25 el tiempo.

En conclusión, se demostró que las nanocápsulas lipídicas furtivas cargadas con docetaxel según la invención se acumulan más en los tumores que la solución comercial de docetaxel (Taxotere<sup>®</sup>), cuando se administran en la  
30 misma dosis. Por otra parte, el solicitante ha notado que las nanocápsulas lipídicas furtivas cargadas en el fármaco de la presente invención, debido a sus propiedades de circulación continua, eran más eficaces que las nanocápsulas lipídicas convencionales por lo que se refiere a la cantidad de agente antineoplásico dirigido a la zona del tumor.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Nanocápsulas lipídicas furtivas con un diámetro inferior a 300 nm constituidas esencialmente por un núcleo lipídico que es líquido o semilíquido a temperatura ambiente, y una envoltura lipídica externa que comprende por lo menos un tensioactivo hidrófilo que es de naturaleza lipídica, por lo menos un tensioactivo lipófilo que es de naturaleza lipídica y por lo menos un derivado anfífilo de poli(etilenglicol), en las que la masa molar del componente poli(etilenglicol) es mayor o igual a 1.000 g/mol.
- 10 2. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 1, en las que la masa molar del componente poli(etilenglicol) es mayor o igual a 2.000 g/mol.
3. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 1 ó 2, en las que dicho tensioactivo lipófilo es una lecitina, cuya proporción de fosfatidilcolina es por lo menos igual al 95%, preferentemente superior al 99%.
- 15 4. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en las que dicho tensioactivo lipófilo presenta una temperatura de transición gel/líquido por lo menos igual a 25°C, preferentemente superior a 37°C.
- 20 5. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en las que dicho tensioactivo lipófilo es un fosfolípido que comprende cadenas de acilo de por lo menos 16 átomos de carbono.
- 25 6. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 5, en las que dicho tensioactivo lipófilo se selecciona de entre el grupo constituido por HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada), DSPC (distearoilfosfatidilcolina) y DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), también sus mezclas.
- 30 7. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en las que dicho tensioactivo lipófilo representa entre el 5 y el 30% molar de las moléculas que forman dicha envoltura lipídica externa.
8. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en las que dicho tensioactivo hidrófilo se selecciona de entre el grupo constituido por ésteres alquílicos de poli(etilenglicol) y éteres alquílicos de poli(etilenglicol) y además sus mezclas.
- 35 9. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 8, en las que dicho tensioactivo es un tensioactivo no iónico del tipo del 12-hidroxiestearato de poli(etilenglicol)-660, que comprende una cadena corta de 15 unidades de etilenglicol.
- 40 10. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en las que dicho tensioactivo hidrófilo representa entre el 60 y el 90% molar de las moléculas que forman dicha envoltura lipídica externa, preferentemente el 80% molar.
- 45 11. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en las que dicho derivado anfífilo de poli(etilenglicol) comprende un componente hidrófobo que le permite anclarse en dicha envoltura lipídica externa y un componente hidrófilo del tipo poli(etilenglicol) que está orientado hacia el exterior de dichas nanocápsulas lipídicas, proporcionando propiedades hidrófilas a la superficie de las mismas.
- 50 12. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en las que dicho derivado anfífilo de poli(etilenglicol) se selecciona de entre fosfolípidos biodegradables.
13. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 12, en las que dichos fosfolípidos biodegradables se seleccionan de entre el grupo constituido por
- 55 DPPE-PEG<sub>x</sub> (dipalmitoilfosfatidiletanolamina),  
 DSPE-PEG<sub>x</sub> (diestearoilfosfatidiletanolamina),  
 DOPE-PEG<sub>x</sub> (dioleoilfosfatidiletanolamina), y  
 POPE-PEG<sub>x</sub> (palmitoiloleilfosfatidiletanolamina),
- en las que x es mayor o igual a 1.000 g/mol, y también sus mezclas.
- 60 14. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 13, en las que dichos fosfolípidos biodegradables se seleccionan de entre el grupo constituido por DSPE-PEG<sub>2000</sub>, DSPE-PEG<sub>3000</sub> y DSPE-PEG<sub>5000</sub>, y también sus mezclas.
- 65 15. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en las que dicho tensioactivo anfífilo de poli(etilenglicol) representa entre el 0,5 y el 12% molar de las moléculas que forman dicha envoltura lipídica externa, preferentemente entre el 1 y el 10% molar.

16. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en las que dicho núcleo esencialmente lipídico representa entre el 20 y el 60% en peso con relación al peso total de dichas nanocápsulas, preferentemente entre el 25 y el 50%, en peso con relación al peso total de dichas nanocápsulas.
- 5 17. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en las que dicho núcleo esencialmente lipídico está compuesto de ésteres de ácido graso y/o de triglicéridos y/o de aceite, y/o sus mezclas.
- 10 18. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 17, en las que los triglicéridos que forman dicho núcleo esencialmente lipídico se seleccionan de entre los triglicéridos de cadena media que presentan de 6 a 14 átomos de carbono, triglicéridos caprílicos/cápricos y sus mezclas.
- 15 19. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 17, en las que los ésteres de ácido graso que forman dicho núcleo esencialmente lipídico se seleccionan de entre el grupo constituido por ácidos grasos de cadena media que presentan de 8 a 18 átomos de carbono.
- 20 20. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 19, en las que los ésteres de ácido graso que forman dicho núcleo esencialmente lipídico se seleccionan de entre el grupo constituido por palmitato de etilo, oleato de etilo, miristato de etilo, miristato de isopropilo, miristato de octildodecilo, y sus mezclas.
- 25 21. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, que presentan un diámetro comprendido entre 50 y 150 nm, preferentemente entre 80 y 120 nm.
- 30 22. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en las que la superficie externa de dicha envoltura lipídica externa es de naturaleza hidrófila, y el núcleo esencialmente lipídico es de naturaleza lipófila.
- 35 23. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, que llevan en su superficie, ligandos específicos que les confieren capacidad para dirigir activamente las células que tienen receptores para estos ligandos, en particular las células tumorales.
- 40 24. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 23, en las que dicho ligando se selecciona de entre los grupos constituidos por el tipo sacárido, oligosacárido, vitamina, oligopéptido, fragmento de anticuerpo y anticuerpo monoclonal.
- 45 25. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, que tienen una vida media de por lo menos 2 horas en el compartimento sanguíneo del hospedador al cual se administran.
- 50 26. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, que pueden liberar rápidamente la mayor parte de sus contenidos por degradación, y en particular por digestión enzimática.
- 55 27. Nanocápsulas lipídicas furtivas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, que contienen uno o más principios activos.
- 60 28. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 27, que contienen uno o más principios activos antineoplásicos que son principalmente de naturaleza lipófila.
- 65 29. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 28, en las que los principios activos antineoplásicos se seleccionan de entre el grupo constituido por paclitaxel y sus derivados, tales como docetaxel, camptotecina y derivados de los mismos tales como irinotecán, topotecán, rubitecán, y busulfán, clorambucilo, ftalocianinas, carotenoides y daunomicina.
30. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 27, que contienen uno o más principios activos antineoplásicos que son de naturaleza anfífila.
31. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 30, en las que los principios activos antineoplásicos se seleccionan de entre el grupo constituido por citarabina, ciclofosfamida, metrotexato, derivados del fluor, tales como 5-fluorouracilo o 5-fluorouridina, y doxorubicina.
32. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 27, que contienen uno o más principios activos seleccionados de entre el grupo constituido por antiinflamatorios, corticoides, antibióticos, analgésicos y agentes antiinfecciosos.
33. Nanocápsulas lipídicas furtivas según la reivindicación 32, que contienen dexametasona, indometacina, ibuprofeno, cetoprofeno, cetoconazol, prostaglandina E1 o anfotericina B.

34. Procedimiento para la preparación de nanocápsulas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, que comprende preformar nanocápsulas que carecen del derivado anfífilo de poli(etilenglicol), y a continuación insertar posteriormente dichos derivados anfífilos de poli(etilenglicol) en la superficie de estas nanocápsulas.
- 5 35. Procedimiento según la reivindicación 34, en el que dicha etapa de preformación comprende la síntesis de nanocápsulas que carecen del derivado anfífilo de poli(etilenglicol), según la inversión de fase de una emulsión de aceite/agua producida mediante varios ciclos de aumento y disminución de la temperatura.
- 10 36. Procedimiento según la reivindicación 34, en el que dicha etapa de posinserción comprende una primera etapa de coincubación de las nanocápsulas preformadas en presencia del derivado anfífilo de poli(etilenglicol) y a continuación una segunda etapa de "enfriamiento" durante la cual el derivado anfífilo de la mezcla de poli(etilenglicol)/nanocápsulas preformadas obtenida de este modo se enfría bruscamente para alcanzar una temperatura comprendida entre 0 y 5°C.
- 15 37. Procedimiento según la reivindicación 36, en el que la etapa de coincubación del derivado anfífilo de la mezcla de poli(etilenglicol)/nanocápsulas preformadas se realiza a una temperatura muy ligeramente superior a la de la temperatura de transición de la fase gel/líquido de dicho tensioactivo lipófilo que es de naturaleza lipídica, pero inferior a la de la temperatura de inversión de fase del derivado anfífilo de la mezcla poli(etilenglicol)/nanocápsulas preformadas.
- 20 38. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 37, en el que el diámetro de las nanocápsulas es ajustado mediante el ajuste de la proporción y la longitud de las cadenas hidrófilas del derivado anfífilo cuando se introduce en la etapa de posinserción.
- 25 39. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, en el que el diámetro de las nanocápsulas es ajustado mediante el ajuste de las proporciones de sal y de tensioactivo hidrófobo, y la pureza del tensioactivo lipófilo, en la mezcla de partida del procedimiento convencional de síntesis.
- 30 40. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 39, que está exento de cualquier disolvente orgánico y que utiliza solamente compuestos biodegradables aprobados para uso parenteral.
41. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 40, en el que dichas nanocápsulas se esterilizan por filtración esterilizante a través de un filtro con un diámetro comprendido entre 0,45 µm y 0,22 µm.
- 35 42. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 41, en el que dichas nanocápsulas se liofilizan y a continuación se reconstituyen improvisadamente en forma de una suspensión coloidal.
- 40 43. Composición farmacéutica que comprende las nanocápsulas lipídicas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33.
44. Composición farmacéutica según la reivindicación 43, que está en forma de una suspensión acuosa coloidal que contiene dichas nanocápsulas lipídicas.
- 45 45. Utilización de nanocápsulas lipídicas según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de cánceres, en particular de tumores sólidos o circulantes, por administración intravenosa.
46. Utilización según la reivindicación 45, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de tumores circulantes o sólidos, por orientación activa.
- 50 47. Utilización según la reivindicación 45, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de tumores sólidos mediante la orientación pasiva posterior al derrame de dichas nanocápsulas a través de los capilares del tumor.
- 55 48. Utilización de nanocápsulas lipídicas según la reivindicación 32 ó 33 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de inflamaciones y/o infecciones de los tejidos.
- 60 49. Utilización de nanocápsulas lipídicas según cualquiera de las reivindicaciones 45 a 48, en la que el producto medicinal es administrado por vía parenteral, o se inyecta en la circulación de un paciente por vía intravascular, en particular por vía intravenosa o intrarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o intrarticular.
50. Utilización de las nanocápsulas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, para la preparación de un medicamento destinado a absorber moléculas hidrófobas presentes en la circulación sanguínea después de un caso de envenenamiento.
- 65 51. Utilización de nanocápsulas lipídicas según cualquiera de las reivindicaciones 45 a 50, caracterizada porque se

reduce la toxicidad del o de los principios activos contra los tejidos sanos.

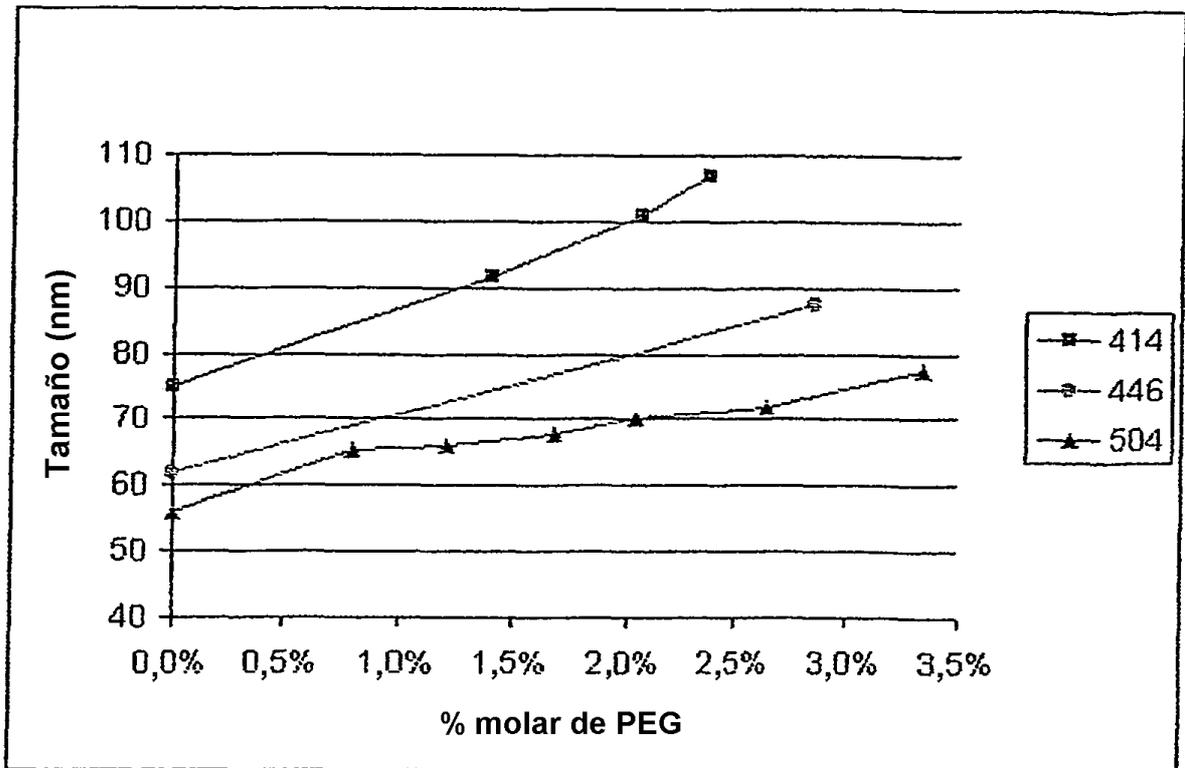


Figura 1

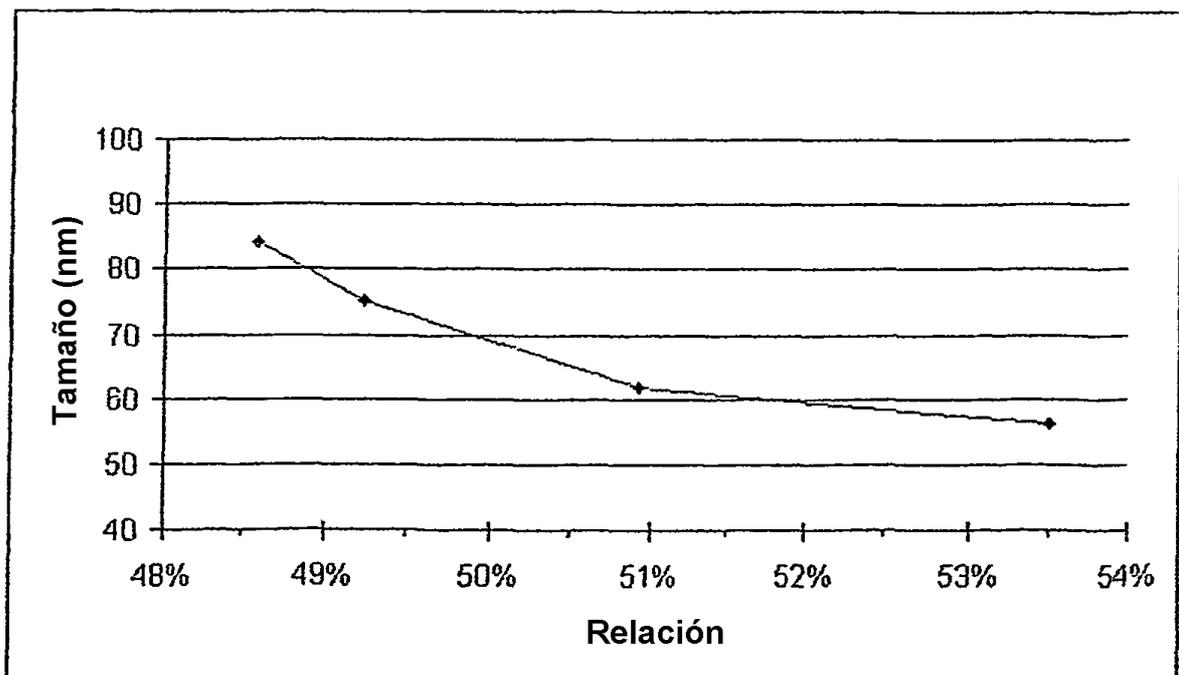


Figura 2

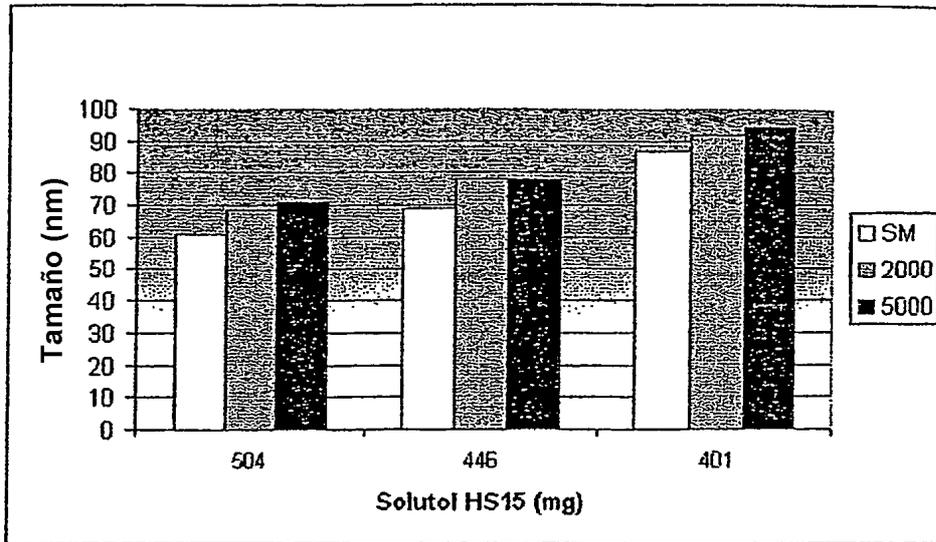


Figura 3

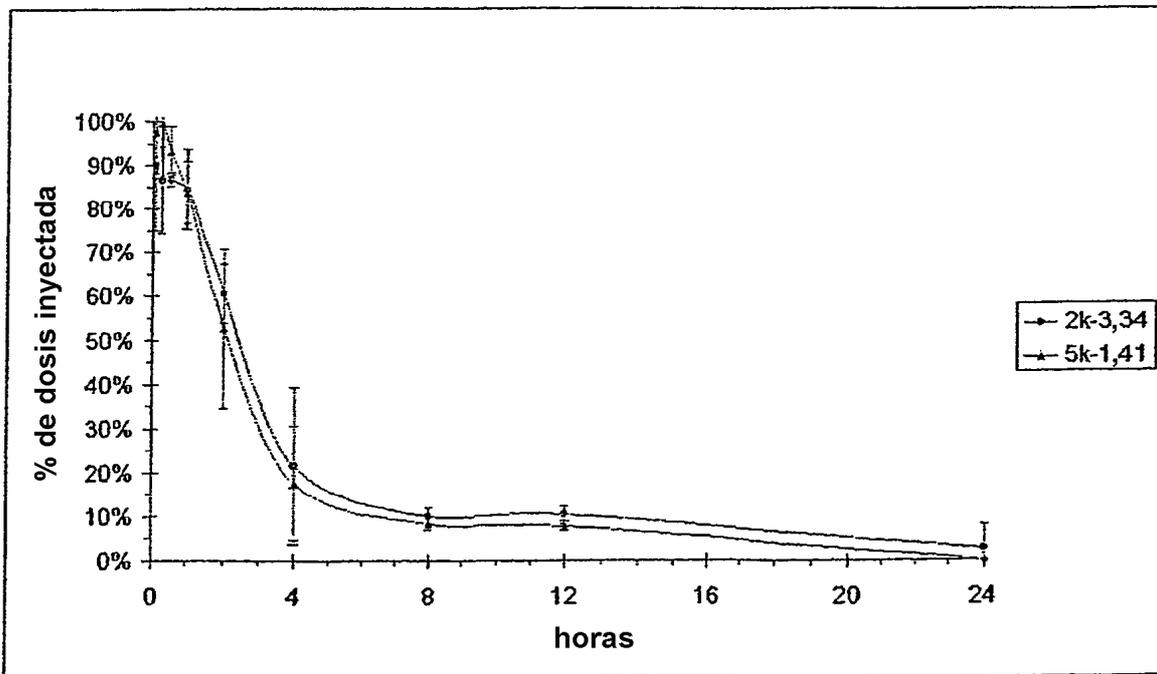


Figura 4

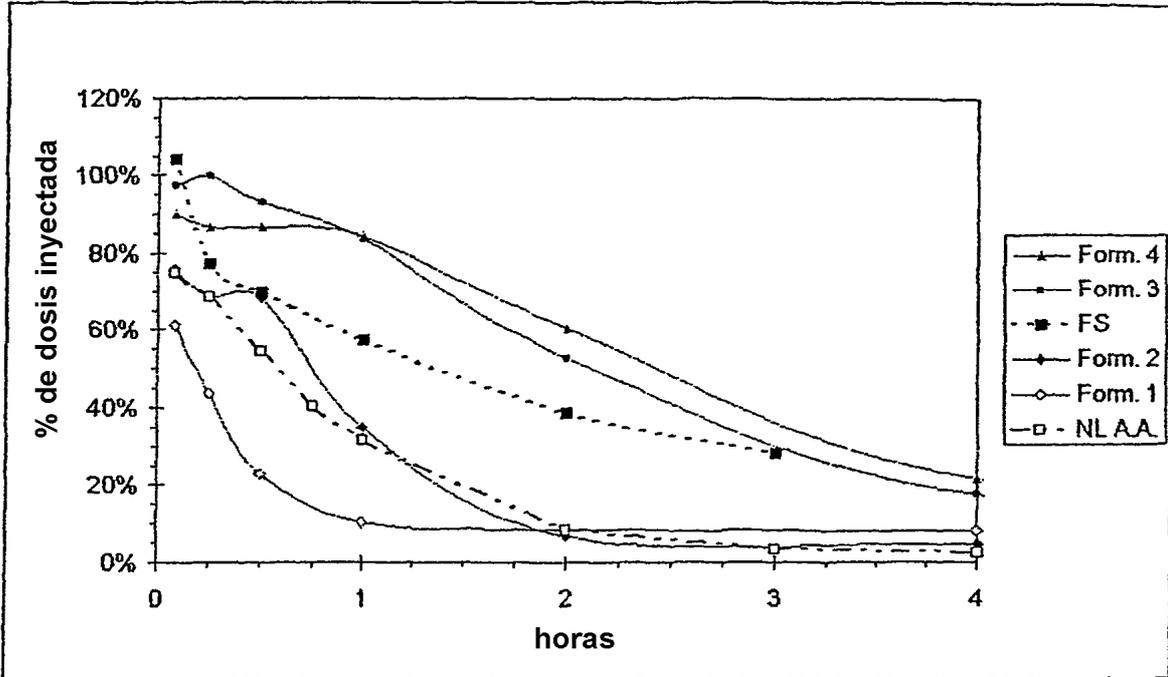


Figura 5

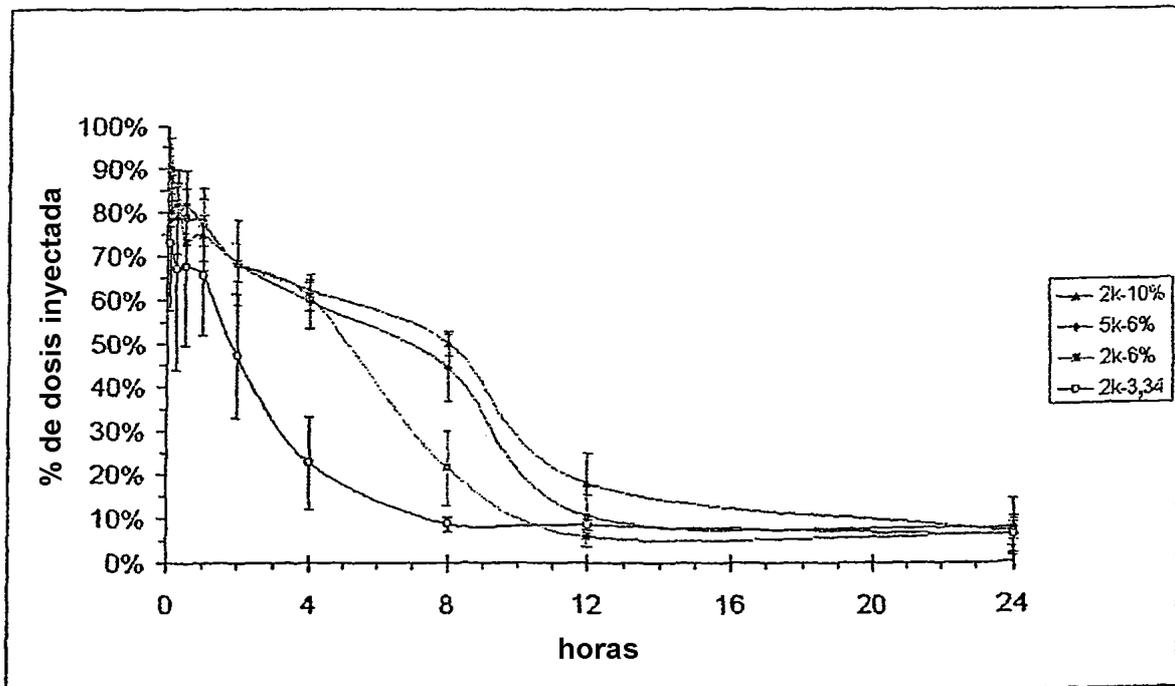


Figura 6

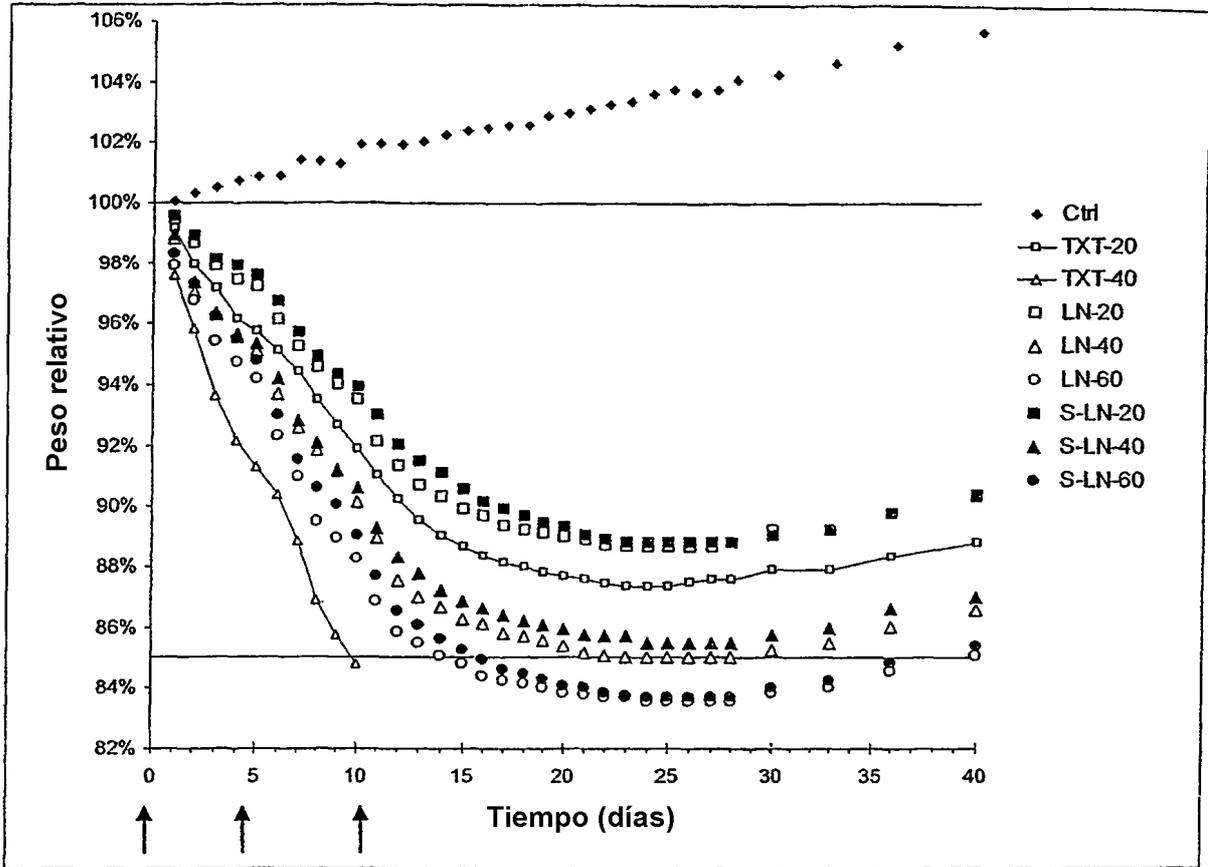


Figura 7

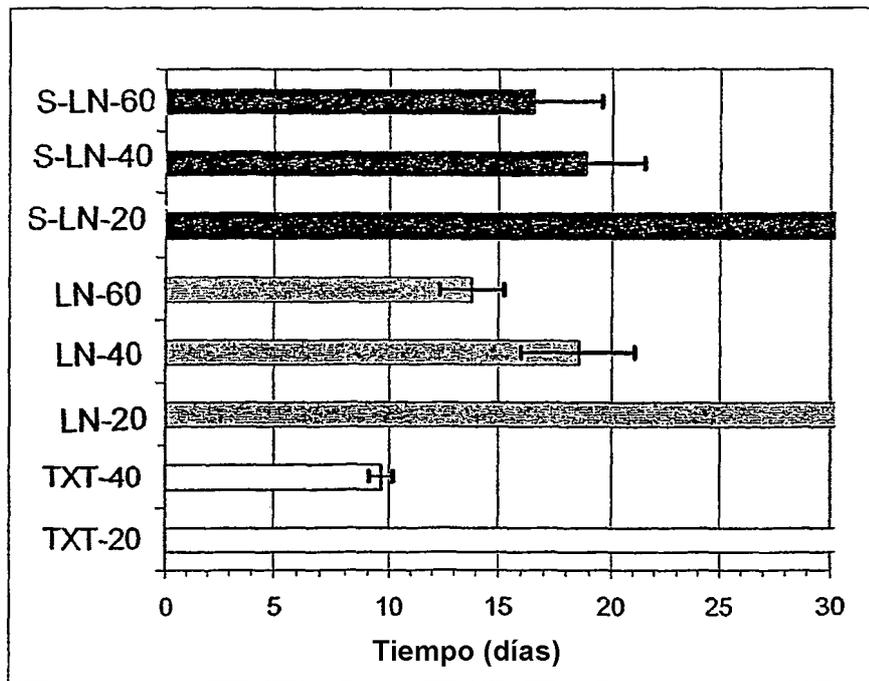


Figura 8

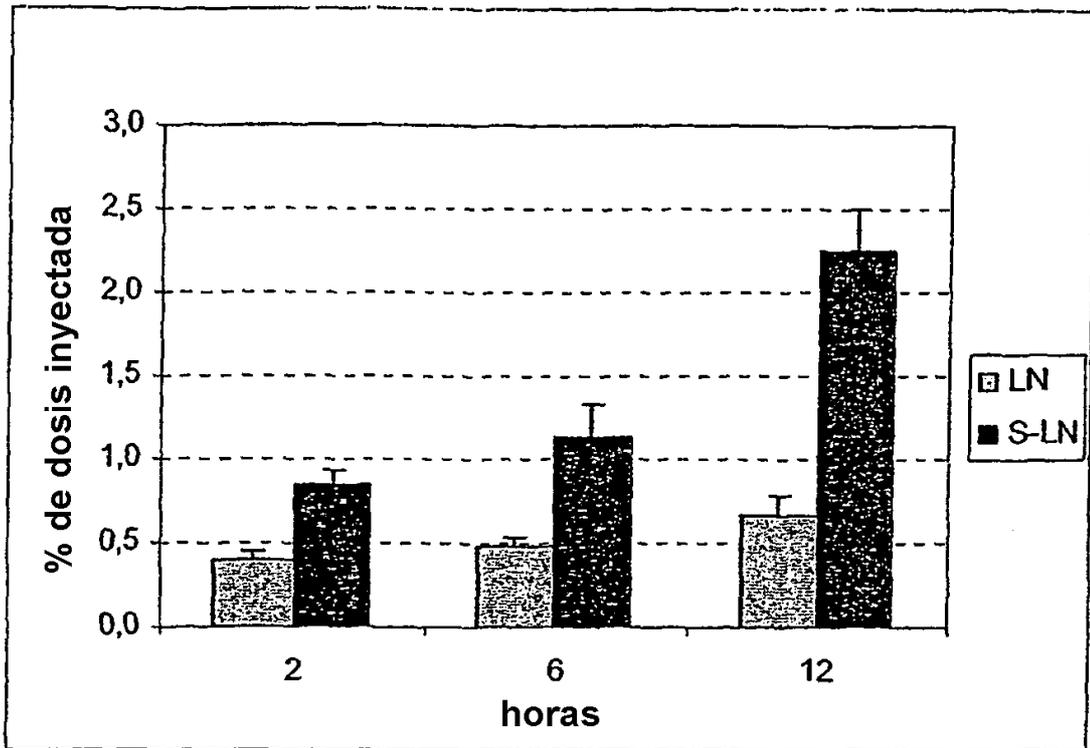


Figura 9

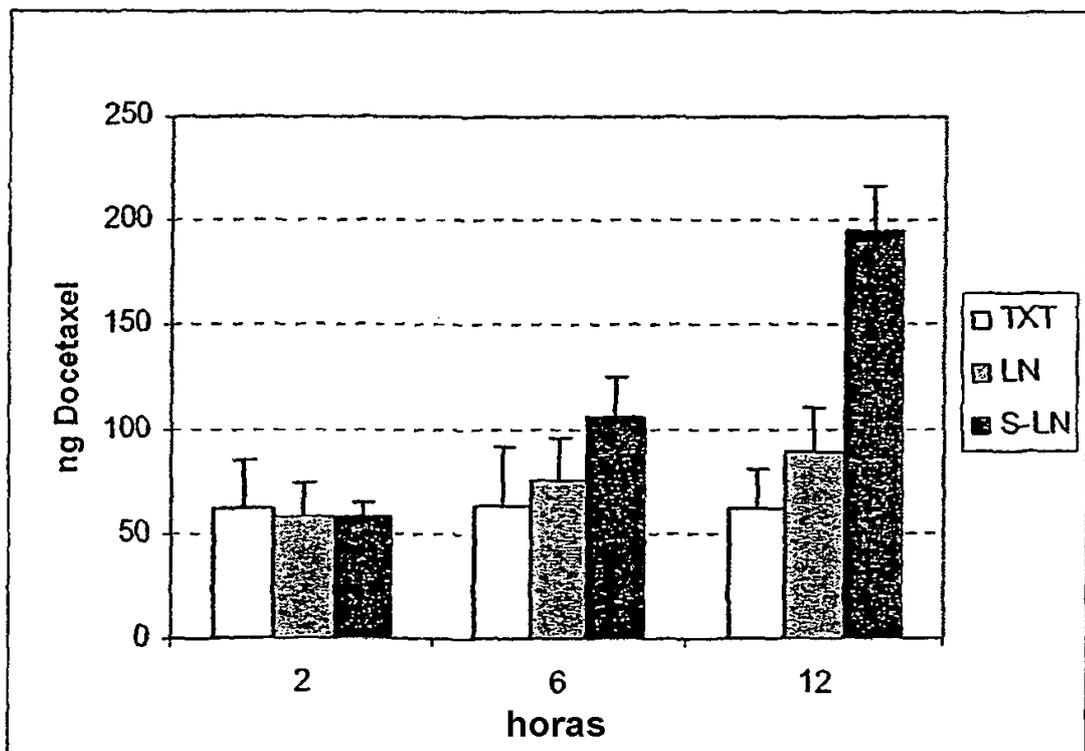


Figura 10