

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 712**

21 Número de solicitud: 201130122

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **31.01.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **28.08.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
28.08.2012

71 Solicitante/s:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD
Avda. de la Constitución 18
41071 Sevilla, ES y
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

72 Inventor/es:

**PRADOS SALAZAR, JOSÉ CARLOS;
ARÁNEGA JIMÉNEZ, ANTONIA;
MELGUIZO ALONSO, CONSOLACIÓN;
ORTIZ QUESADA, RAÚL;
RUÍZ MARTÍNEZ, ADOLFINA;
GALLARDO LARA, VISITACIÓN;
ARIAS MEDIANO, JOSÉ LUIS;
RAMA BALLESTEROS, ANA ROSA;
DELGADO PÉREZ, JUAN RAMÓN;
LUQUE CARO, RAQUEL y
GONZÁLEZ FLORES, ENCARNACIÓN**

74 Agente/Representante:

Pons Ariño, Ángel

54 Título: **DESARROLLO Y USO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS QUE COMPRENEN
POLI(ε-CAPROLACTONA) Y DOXORRUBICINA.**

57 Resumen:

Desarrollo y uso de nanopartículas poliméricas que comprenden poli(ε-caprolactona) y doxorubicina. La presente invención se refiere a nanopartículas poliméricas con un tamaño medio inferior a 200 nm, que comprende uno o más polímeros biodegradables, uno o más principios activos y al menos un tensoactivo, donde al menos un polímero biodegradable es poli(ε-caprolactona) y donde al menos un principio activo es doxorubicina, y al uso de dichas nanopartículas para la preparación de medicamentos para el tratamiento de cáncer, preferiblemente cáncer de mama.

ES 2 386 712 A1

DESCRIPCIÓN

**DESARROLLO Y USO DE NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS QUE
COMPRENDEN POLI(ε-CAPROLACTONA) Y DOXORRUBICINA**

La presente invención se refiere a nanopartículas poliméricas con un tamaño
5 medio inferior a 200 nm, que comprende uno o más polímeros biodegradables,
uno o más principios activos y al menos un tensoactivo, donde al menos un
polímero biodegradable es poli(ε-caprolactona) y donde al menos un principio
activo es doxorubicina, y al uso de dichas nanopartículas para la preparación
de medicamentos para el tratamiento del cáncer, preferiblemente cáncer de
10 mama. Por lo tanto, la presente invención se engloba en el campo de la técnica
de productos farmacéuticos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La doxorubicina es un fármaco anticancerígeno perteneciente al grupo de los
análogos de los nucleósidos, cuya eficacia antitumoral ha sido ampliamente
demostrada en el tratamiento de una amplia variedad de tumores sólidos. Sin
embargo, a pesar de su gran eficacia terapéutica, este agente quimioterápico
presenta numerosos inconvenientes que condicionan seriamente una amplia
20 utilización clínica. En concreto, el desarrollo de resistencias por las células
cancerosas, y un perfil farmacocinético muy deficiente (muy corta semivida
plasmática, consecuencia de su rápido metabolismo). Todo esto determina que
sean necesarias grandes dosis para obtener un efecto terapéutico adecuado, lo
que lleva asociada la aparición de efectos adversos severos (Grosse PY,
25 Bresolle F, Rouanet P, Joulia JM, Pinguet F. Int. J. Pharm. 180 (1999) 215).

La enorme necesidad de encontrar nuevas estrategias terapéuticas para el
tratamiento del cáncer ha determinado el desarrollo de coloides biodegradables
para el transporte selectivo de fármacos al tejido tumoral.

- Por ejemplo, N. Chiannikulchai et al. (*Doxorubicin-Loaded Nanoparticles: Increased Efficiency in Murine Hepatic Metastases*. Sel. Cancer Ther. 5 (1989) 1) desarrollan partículas de poli(isohexilcianoacrilato) de un tamaño de 250 nm, por lo que las dichas nanopartículas pueden tener problemas en la
- 5 extravasación en la masa tumoral (ver Maeda et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 71 (2008) 409; y Decuzzi et al., Pharm. Res. 26 (2009) 235). Además, en la bibliografía se ha descrito la enorme toxicidad de los poli(alquilcianoacrilatos) *in vivo*. Este trabajo no incluye ningún tipo de estudio preclínico *in vitro* realizado sobre cultivos celulares y el único dato aportado en relación a la asociación de
- 10 la nanopartícula-doxorrubicina es el de la modificación del número de metástasis que las células pueden originar pero no con el efecto de este compuesto sobre la propia célula tumoral ni siquiera con el del volumen de la masa tumoral primaria.
- 15 Por otro lado, Loredana Serpe (*Conventional Chemotherapeutic Drug Nanoparticles for Cancer Treatment*. Nanotechnologies for the Life Sciences, vol. 6, Nanomaterials for Cancer Therapy. 2006 Wiley-Vch Verlag GmbH y Co. KGaA, Weinheim) describe el uso nanopartículas de: copolímeros de poli(D,L-lactida) y polietilén glicol (PEG); copolímeros de PEG y poli(isobutil-2-
- 20 cianoacrilato); y copolímeros metoxiPEG y hexadecilcianoacrilato. En este documento se hace referencia a la utilización de caprolactona como transportador de fármacos. Sin embargo, el polímero biodegradable ha sido ensayado con tamoxifeno y no con doxorrubicina (ver referencia Charla y Amiji. *Cellular uptake and concentrations of tamoxifen upon administration in poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles*, AAPS Pharm. Sci. 5 (2003) E3; y también la referencia Shenoy y Amiji. *Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer*, Int. J. Pharm. 293 (2005) 261).
- 30 Otros trabajos que describen nanopartículas poliméricas son el artículo titulado *Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly(butyl*

cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma (Toxicol. Lett. 126 (2002) 131), donde se describen nanopartículas de poli(butilcianoacrilato) recubiertas con polisorbato 80 y cargadas con doxorubicina. Su tamaño medio es 270 ± 30 nm. En el artículo titulado *In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates* (J. Control. Release 68 (2000) 419) se describen nanopartículas de poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) cargadas con doxorubicina, siendo su tamaño medio de 200 nm. En *Negative preclinical results with stealth nanospheres-encapsulated doxorubicin in an orthotopic murine brain tumor model* (J. Control. Release 100 (2004) 29) se describen nanopartículas de poli(hexilcianoacrilato) recubiertas con PEG y cargadas con doxorubicina. Presentan una capacidad de carga (*drug loading*) de doxorubicina de entre solamente 5,7 y 9,4 %. Además, su tamaño medio se encuentra entre 150 y 200 nm. Debido a los tamaños medios, estas nanopartículas presentan los mismos inconvenientes que las descritas por N. Chiannikulchai et al.

En *Proceedings of the 3rd International Conference on the Development of BME* (Vietnam, 11-14 enero 2010, 158-161) se describe un trabajo titulado *Doxorubicin Delivery by Copolymeric Nanoparticle for Treatment of Breast Cancer*, donde se describe una compleja metodología para preparar un copolímero de metoxi-PEG y poli(ϵ -caprolactona). En concreto, en el caso de este trabajo es necesario neutralizar el clorhidrato de doxorubicina con trietilamina para poder incorporarla en este copolímero. Esto obliga a, una vez finalizada la síntesis, eliminar la trietilamina mediante diálisis durante 24 horas.

En el trabajo titulado *Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted drug delivery* (Biomaterials 28 (2007) 1889) se describen nanopartículas de PLGA cargadas con doxorubicina y cuya superficie ha sido modificada con restos de folato y de vitamina E. Además de ser una síntesis compleja, la vehiculización de doxorubicina obtenida mediante esta estrategia es baja y la carga de fármaco es muy baja teniendo una carga

nunca superior al 3,97 % (en el caso de este polímero). Por último, el tamaño de partícula (≈ 360 nm) resultaría en los mismos problemas como los descritos en N. Chiannikulchai et al.

- 5 Las nanopartículas descritas en el trabajo titulado *Nano-Sized Micelles of Block Copolymers of Methoxy Poly(ethylene glycol)-Poly(ϵ -caprolactone)-Graft-2-Hydroxyethyl Cellulose for Doxorubicin Delivery* (J. Nanosci. Nanotechnol. 8 (2008) 2362) están compuestas de un copolímero de metoxi-PEG, poli(ϵ -caprolactona) e hidroxietilcelulosa cargado con doxorubicina. Su tamaño
10 medio es mucho mayor (340,7 nm).

- También se ha estudiado la doxorubicina asociada a nanopartículas para mejorar sus características biológicas en células de estirpe tumoral por Shuaia y cols. (*Micellar carriers based on block copolymers of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery* (J. Controlled Rel. 98 (2004) 415)).
15 Este estudio está realizado en la línea MCF-7 de cáncer de mama. Los resultados de los autores demuestran que mediante el uso del copolímero poli(ϵ -caprolactona) y PEG se produce un incremento de la entrada de la doxorubicina en el interior de la célula tumoral. Sin embargo, Shuaia y cols.
20 indica que la mayor parte de la droga se localiza en el citoplasma. Según estos autores, la dosis inhibitoria (IC_{50}) de la doxorubicina unida a la nanopartícula (0,033-0,048 μ M) es mayor que la determinada para la doxorubicina libre (0,001 μ M).

- 25 Cuong y cols. utilizan copolímeros de poli(varepsilon-caprolactona)-polifosfoester asociados a doxorubicina para el tratamiento de células tumorales (*Doxorubicin-Loaded Nanosized Micelles of a Star-Shaped Poly(varepsilon-Caprolactone)-Polyphosphoester Block Co-polymer for Treatment of Human Breast Cancer*. J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 2010, doi:
30 10.1163/092050610X510533). En esta misma situación se encuentran los estudios realizados con PEG-*b*-poli(2-hidroxietilmetacrilato-*g*-poli(ϵ -

caprolactona) (Zhang et al. Amphiphilic Toothbrushlike Copolymers Based on Poly(ethylene glycol) and Poly(ϵ -caprolactone) as Drug Carriers with Enhanced Properties (Biomacromolecules 11 (2010) 1331) ya que siguen utilizando copolímeros para los ensayos con doxorubicina y en células de carcinoma de vejiga urinaria y no en células de carcinoma de ovario. La acumulación máxima de doxorubicina en el núcleo de las células en cultivo tras el tratamiento con el complejo nanopartícula-droga ocurre a las 24 horas, medido mediante fluorocitometría. Además, como indica el autor, la concentración de doxorubicina unida a las nanopartículas con el que se alcanza la IC₅₀ fue relativamente más alta que la dosis de doxorubicina libre con la que se consigue el mismo efecto.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención trata de nanopartículas poliméricas que comprenden poli(ϵ -caprolactona) y doxorubicina, de ahora en adelante las nanopartículas de la invención. Los presentes inventores han descubierto que sorprendentemente las nanopartículas de la invención se comportan como un excelente sistema transportador de doxorubicina. Las nanopartículas de la invención permiten una elevada vehiculización del agente anticanceroso, alcanzan una muy elevada extravasación en la masa tumoral y, a su vez, una liberación de éste más controlada. Además, los estudios de eficacia antitumoral *in vitro* han demostrado un incremento muy significativo de la actividad antitumoral de este fármaco cuando es vehiculizado a través de las nanopartículas de la invención. Una de las razones de la efectividad de las nanopartículas contra el cáncer es la gran cantidad de droga real (en este caso, doxorubicina) que se incorpora al interior celular tumoral una vez administrado el fármaco, determinación que es cuantitativa gracias a la aplicación de la técnica de fluorocitometría. Además, los resultados demuestran un fácil intercambio de droga hacia el núcleo en donde este agente posee su acción esencial. Otra ventaja asociada a la invención es que se consigue una

liberación controlada y prolongada del principio activo, reduciendo los efectos secundarios asociados al tratamiento.

Además, las nanopartículas de la invención modulan la IC_{50} , o sea la
5 concentración de fármaco que es capaz de reducir al 50 % el número de
células tumorales cuando se aplica a un cultivo celular, de la doxorubicina en
células de cáncer de mama y ayudan a la incorporación de este agente al
interior de la célula tumoral. Estos resultados son ventajosos en comparación
con otros sistemas similares, permitiendo reducir la cantidad necesaria para
10 alcanzar la IC_{50} en la línea MCF-7 hasta más de 5 veces en algunas
realizaciones. Incluso las nanopartículas de la invención permiten una alta
capacidad de carga de doxorubicina (*drug loading*) de hasta en algunos casos
el $18,7 \pm 0,9$ %.

15 Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una nanopartícula
polimérica con un tamaño medio inferior a 200 nm, preferiblemente inferior a
190 nm, que comprende uno o más polímeros biodegradables, uno o más
principios activos y al menos un tensoactivo, donde al menos un polímero
biodegradable es poli(ϵ -caprolactona) y donde al menos un principio activo es
20 doxorubicina.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un proceso para la síntesis de
una nanopartícula polimérica con un tamaño medio inferior a 200 nm,
preferiblemente inferior a 190 nm, que comprende uno o más polímeros
25 biodegradables, uno o más principios activos y al menos un tensoactivo, donde
al menos un polímero biodegradable es poli(ϵ -caprolactona) y donde al menos
un principio activo es doxorubicina. Las nanopartículas poliméricas de la
invención son sintetizadas preferiblemente mediante el método de disposición
interfacial del polímero, consistente en:

i) la disolución de poli(ϵ -caprolactona) en un disolvente orgánico, preferiblemente diclorometano;

ii) la adición de la disolución obtenida en (i) sobre una mezcla que comprende un antisolvente y un tensoactivo;

5 iii) el aislamiento de la partícula obtenida;

donde se incorpora el principio activo doxorubicina mediante asociación superficial sobre la nanopartícula obtenida después de la etapa (iii) o mediante asociación en el interior de la matriz polimérica durante la etapa (i).

10 Un tercer aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende las nanopartículas de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Una de las ventajas de las composiciones de la presente invención es que se reduce la toxicidad del medicamento al prevenir sus efectos en los tejidos no cancerosos.

15

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso terapéutico de la nanopartícula de la invención o de la composición farmacéutica que comprende la nanopartícula de la invención según los aspectos primero y/o segundo o cualquiera de sus realizaciones particulares de dichos aspectos.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

Diferentes métodos han sido descritos en la literatura para la preparación de nanopartículas que incluyen drogas como por ejemplo, el método de polimerización en emulsión continua en la fase acuosa, el método de polimerización en emulsión continua en la fase orgánica, la polimerización interfacial, la disposición interfacial del polímero con evaporación de disolventes, la desolvatación de macromoléculas y los métodos de diálisis (Marty et al. Nanoparticles - a new colloidal drug delivery system (Pharm Acta Helv 53 (1978) 17)). Como ya se ha comentado con anterioridad las nanopartículas de la invención son sintetizadas preferiblemente mediante el

25

30

método de disposición interfacial del polímero. La disposición interfacial de polímeros es un procedimiento para la preparación de nanopartículas, o nanoesferas, biodegradables. En este método, el polímero biodegradable se disuelve primero en un disolvente orgánico, por ejemplo acetona o diclorometano. La solución orgánica resultante se vierte bajo agitación en el agua que contiene surfactante, como por ejemplo un polaxámero, con que la fase acuosa de inmediato se convierte en una solución lechosa, indicando la formación de nanopartículas. El disolvente orgánico es eliminado a presión reducida. La suspensión coloidal formada se concentra al volumen deseado.

10

El uso de la disposición interfacial de polímeros para la síntesis de las nanopartículas de la invención conlleva varias ventajas. Además de ser una síntesis sencilla y rápida, permite obtener nanopartículas con unas características muy relevantes como: un sistema coloidal de tamaño muy pequeño con tamaños medios muy bajos, y polidispersiones también muy bajas (llegando a diámetros medio de hasta 95 ± 7 nm). El proceso permite una carga de fármaco muy superior, lo que entre otras ventajas posibilita que la cantidad de material polimérico administrada sea menor. Todo esto permite: i) que la masa a administrar de sistema transportador no sea muy elevada para obtener un efecto antitumoral significativo (p. ej., con sólo 200 mg de polímero biodegradable se logra la vehiculización de un $64,1 \pm 2,9$ % de la cantidad de fármaco utilizada), en comparación con lo que ocurre con otros coloides previamente propuestos en otros trabajos; y, además, ii) un contacto íntimo y muy prolongado entre la molécula anticancerosa y las células tumorales.

25

En concreto, el procedimiento de síntesis de nanopartículas de la invención de poli(ϵ -caprolactona) se basa en el método de disposición interfacial de polímeros.

En una realización particular del primer aspecto de la invención, la nanopartícula polimérica se obtiene por el procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- 5 i) la disolución de poli(ϵ -caprolactona) en un disolvente orgánico, preferiblemente diclorometano;
 - ii) la adición de la disolución obtenida en (i) sobre una mezcla que comprende un antisolvente y un tensoactivo;
 - iii) el aislamiento de la partícula obtenida;
- 10 donde se incorpora el principio activo doxorubicina mediante asociación superficial sobre la nanopartícula obtenida después de la etapa (iii) o mediante asociación en el interior de la matriz polimérica durante la etapa (i).

15 La asociación superficial consiste en la incorporación mediante adsorción del fármaco antitumoral doxorubicina en la superficie de las nanopartículas poliméricas previamente obtenidas.

En la asociación en el interior de la matriz polimérica, el agente quimioterápico es incorporado en el interior de las nanopartículas mediante absorción. Este proceso es muy similar con la única diferencia de que el antisolvente también
20 comprende doxorubicina, normalmente disuelta a una concentración molar de fármaco hasta 0,01.

En una realización preferida el procedimiento además comprende una etapa de evaporación del disolvente orgánico, preferiblemente a presión reducida.

25

La etapa (iii) se puede llevar a cabo mediante una centrifugación, preferiblemente a menos de 30.000 r.p.m., más preferiblemente de entre 5.000 y 15.000 r.p.m.

30 El procedimiento además puede comprender etapas consecutivas de redispersión de las nanopartículas poliméricas y nueva centrifugación, hasta

que la conductividad del sobrenadante sea menor o igual a 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$. La conductividad del sobrenadante obtenido se determinó a $25,0 \pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$ utilizando un conductímetro Crison micropH 2001 (España). La redispersión del sedimento obtenido tras la centrifugación de las nanopartículas se puede
5 realizar mediante adición de agua bidestilada a este sedimento y exposición de esta mezcla (a $25,0 \pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$) a ultrasonidos (450 W, baño de ultrasonidos Branson 5200E4, EE.UU.).

La etapa (ii) del procedimiento se realiza preferiblemente de manera
10 secuencial.

Los antisolventes utilizados en la etapa (ii) preferidos son agua o mezclas de agua y un disolvente orgánico, preferiblemente un $\text{C}_1\text{-C}_4$ alcohol. Más preferiblemente el antisolvente es agua.

15

La temperatura a la que se lleva a cabo la asociación en el interior de la matriz polimérica durante la etapa (i) es preferiblemente inferior a 60 $^{\circ}\text{C}$, más preferiblemente inferior a 35 $^{\circ}\text{C}$, y aun más preferiblemente a aproximadamente a 25 $^{\circ}\text{C}$. El procedimiento de adsorción en superficie suele tener una duración
20 de 24 horas. La incorporación en matriz (absorción) se puede realizar en 1 hora (tiempo notablemente más corto). Es interesante resaltar que el procedimiento de absorción de fármaco en el interior de las nanopartículas permite obtener una mayor vehiculización de doxorubicina.

25 Buenos resultados se han obtenido con nanopartículas que tienen un tamaño de partícula medio de entre 65 y 150 nm, más preferiblemente entre 75 y 125 nm, aun más preferiblemente de entre 85 y 115 nm, y todavía aun más preferiblemente de aproximadamente 95 nm.

Preferiblemente el tensoactivo y la poli(ϵ -caprolactona) no están unidos covalentemente, es decir el tensoactivo y la poli(ϵ -caprolactona) son dos compuestos químicos diferentes e independientes.

5 El tamaño del polímero biodegradable de poli(ϵ -caprolactona) no está restringido, pero buenos resultados se obtienen cuando este tiene un peso molecular inferior a 100.000 Daltons, preferiblemente entre 5.000 y 45.000 Daltons, y aun más preferiblemente de entre 7.000 y 20.000 Daltons, y todavía más preferiblemente es de aproximadamente unos 10.000 Daltons.

10

La poli(ϵ -caprolactona) y la doxorubicina están en un ratio suficiente para mantenerse asociados. El ratio suficiente para mantenerse asociados la poli(ϵ -caprolactona) y la doxorubicina varía normalmente de entre 1000:1 y 1:50 p/p respectivamente, más preferiblemente es un ratio de entre 1:5 y 1:15 p/p.

15

En una realización preferida, la nanopartícula polimérica comprende un polímero biodegradable que consiste en poli(ϵ -caprolactona), es decir, se utilizan exclusivamente polímeros de caprolactona y nunca copolímeros. Preferiblemente comprende únicamente como polímero biodegradable poli(ϵ -caprolactona).

20

En otra realización preferida la nanopartícula polimérica comprende únicamente doxorubicina como principio activo, y más preferiblemente la nanopartícula además comprende un polímero biodegradable que consiste en poli(ϵ -caprolactona).

25

En otra realización preferida la nanopartícula polimérica comprende únicamente un polímero biodegradable que consiste en poli(ϵ -caprolactona).

La cantidad de doxorrubicina en la nanopartícula polimérica de la invención está preferiblemente comprendida entre un 0,1 % y un 25 % p/p, más preferiblemente entre un 15 % y un 20 % p/p.

- 5 La cantidad de poli(ϵ -caprolactona) en la nanopartícula polimérica de la invención está preferiblemente comprendida entre un 70 % y un 99,8 % p/p, más preferiblemente entre un 79 % y un 84,5 % p/p.

10 La cantidad de tensoactivo en la nanopartícula polimérica de la invención está preferiblemente comprendida entre un 0,1 % y un 2 % p/p, más preferiblemente entre un 0,5 % y un 1 % p/p.

15 Otra realización de la presente invención hace referencia a una nanopartícula polimérica con un tamaño medio de entre 65 y 150 nm, que comprende entre un 70 % y un 99,8 % p/p de poli(ϵ -caprolactona), entre un 0,1 % y un 25 % p/p de doxorrubicina, y entre un 0,1 % y un 2 % p/p de tensoactivo, donde el tensoactivo y la poli(ϵ -caprolactona) no están unidos covalentemente.

20 Otra realización de la presente invención hace referencia a una nanopartícula polimérica obtenible por el procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- i) la disolución de poli(ϵ -caprolactona) en un disolvente orgánico, preferiblemente diclorometano;
- ii) la adición de la disolución obtenida en (i) sobre una mezcla que comprende un antisolvente, donde el antisolvente es agua o mezclas de agua y un
- 25 disolvente orgánico, preferiblemente un C₁-C₄ alcohol, y un tensoactivo;
- iii) el aislamiento de la partícula obtenida;

donde se incorpora donde se incorpora doxorrubicina mediante asociación en el interior de la matriz polimérica durante la etapa (i) se lleva a cabo a temperatura inferior a 60 °C.

La composición farmacéutica de la invención comprende:

- una nanopartícula polimérica según se ha descrito en la invención; preferiblemente una nanopartícula obtenida por el procedimiento de la invención descrito;
- 5 - al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización particular de la presente invención, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable que es un diluyente. Preferentemente, el
10 diluyente es agua. En otra realización el diluyente es celulosa microcristalina, lactosa o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización particular, la composición farmacéutica de la invención está particularmente adaptada para su uso parental, preferiblemente para su uso
15 intravenoso, intraarterial, intratumoral, intramuscular o subcutáneo. Las composiciones parenterales preferiblemente comprenden agua. Aún más preferiblemente las nanopartículas de la invención se encuentran dispersadas en una solución acuosa.

20 En otra realización la composición farmacéutica de la invención está en forma sólida oral, preferiblemente en comprimidos o cápsulas. En este caso, la composición farmacéutica preferiblemente además comprende celulosa microcristalina, lactosa o cualquiera de sus combinaciones.

25 Otra realización de la presente invención hace referencia a una composición farmacéutica para su uso parental que comprende: una nanopartícula polimérica con un tamaño medio de entre 65 y 150 nm, que comprende entre un 70 % y un 99,8 % p/p de poli(ϵ -caprolactona), entre un 0,1 % y un 25 % p/p de doxorubicina, y entre un 0,1 % y un 2 % p/p de tensoactivo; y un excipiente
30 farmacéuticamente aceptable.

Tanto la nanopartícula polimérica de la invención y la composición farmacéutica de la invención son útiles en métodos terapéuticos. Preferiblemente, son útiles para elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer, preferiblemente linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de testículos, leucemia aguda, sarcoma de los tejidos suaves, 5 cáncer de pulmón, cáncer de vejiga urinaria, cáncer gástrico, cáncer de las tiroides, hepatocarcinoma, tumor de Wilms o neuroblastoma, entre otros, y más preferiblemente cáncer de mama.

10 **Definiciones:**

El método utilizado para la medición del tamaño de partícula de la nanopartículas de la invención es la espectroscopía de correlación de fotones (PCS: Photon Correlation Spectroscopy).

15

El término polímero biodegradable hace referencia a una macromolécula orgánica (constituida por pequeñas moléculas llamadas monómeros) que es susceptible de ser destruida (degradada) *in vivo* bajo determinadas condiciones fisiológicas. De esta manera, es metabolizada y eliminada del organismo. Esta 20 destrucción se produce principalmente bajo la acción de determinados enzimas o sistemas enzimáticos, p. ej., fosfolipasa A₂, fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol, transglutaminasa, fosfatasa alcalina, metaloproteinasa, esterases, etc. Algunos polímeros biodegradables son sensibles también a pHs ligeramente ácidos (p. ej., pH ≈ 6,6 característico del intersticio tumoral) o a la 25 temperatura.

Como se utiliza aquí, el término “disolvente orgánico” se refiere a cualquier compuesto orgánico, o mezclas de compuestos orgánicos, capaz de disolver la poli(ε-caprolactona). Los ejemplos representativos incluyen alcoholes, 30 hidrocarburos, compuestos halogenados, éteres y acetona. Ejemplos particulares de disolventes orgánicos son acetato de etilo, acetona,

acetonitrilo (MeCN), benceno, cloroformo, cloruro de metileno, diclorometano (DCM), mezclas 1:1 de diclorometano:cloroformo, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), 1,4-dioxano, disolventes polares próticos, éter dietílico, tetrahidrofurano (THF), tolueno y (etanol, metanol, n-butanol, n-propanol e isopropanol (IPA)). Preferiblemente el disolvente orgánico es diclorometano.

El término "antisolvente" se refiere a un líquido que al mezclarse con un disolvente en el que un soluto se disuelve, es decir la poli(ϵ -caprolactona), reduce la capacidad del solvente orgánico para disolver el soluto. Así, cuando un antisolvente se mezcla con una solución de un soluto en un disolvente orgánico, la solubilidad del soluto se puede reducir hasta el punto en el que precipita en la solución. El antisolvente debe ser lo suficientemente miscible con el disolvente orgánico. Se apreciará que la miscibilidad puede ser controlada mediante la variación de uno o más parámetros, dentro de los que la solvencia entre el sistema y el antisolvente podrá mantenerse a una temperatura suficientemente baja como para que los dos líquidos no sean particularmente miscibles (durante el almacenamiento, por ejemplo), y al aumentar la temperatura los dos líquidos pasen a ser miscibles y así puedan formarse las nanopartículas. El antisolvente preferido es una solución acuosa, si bien también pueden ser prefijadas soluciones acuosas aciduladas, como por ejemplo una solución de ácido acético al 2 % (v/v) en agua.

El término "C₁-C₄ alcohol" hace referencia a una cadena de alquílica lineal o ramificada, que comprende de 1 a 4 de átomos de carbono y uno o más grupos hidroxilo. Ejemplos de "C₁-C₄ alcohol" son metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, *n*-butanol, isobutanol o *tert*-butanol, entre otros.

El término agente "tensoactivo", o surfactante, hace referencia a los agentes activos de superficie que tienen una estructura caracterizada por un grupo polar hidrófilo y una cola hidrófoba. Estas moléculas superficiales activas tienen

generalmente una cadena larga con al menos ocho átomos de carbono. Los tensoactivos son eficaces en la modificación de las propiedades de la interfase, como la tensión interfacial, a concentraciones muy bajas. Los tensoactivos también se caracterizan por ser capaces de modificar las propiedades termodinámicas superficiales (p. ej., hidrofobia), las propiedades de dispersión de la luz y la solubilización de solutos. En concreto, un aumento en la concentración de tensoactivo tiende a reducir significativamente la tensión superficial, hasta alcanzar un punto de interrupción conocido como concentración micelar crítica (CMC).

10

Cualquier agente tensoactivo eficaz puede ser utilizado en la práctica de la presente invención, incluyendo los tensoactivos aniónicos, no iónicos y catiónicos. Tensoactivos específicos útiles para la presente invención son polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 80, polivinil alcohol de peso molecular alto o bajo, polivinil pirrolidona, fosfatidil colina, lecitinas, poloxámeros, solutol HS15, glicocolato sódico, taurocolato sódico, tauroglicocolato sódico, taurodeoxicolato sódico, hemisuccinato de colesterilo y tiloxapol, preferiblemente polisorbato 80.. Los tensoactivos más preferidos son los polaxámeros, preferiblemente un copolímero de poli(óxido de propileno) y de poli(óxido de etileno), y más preferiblemente pluronic[®] F-68.

20

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

25

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. (a) Microfotografía SEM de las nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) con doxorubicina incorporada en matriz preparada según el procedimiento descrito en los ejemplos. Figura insertada: detalle de una nanopartícula. Longitud de barra: 100 nm. (b) Eficiencia de vehiculización de doxorubicina (%) de las nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) preparadas según el procedimiento descrito en los ejemplos en función de la concentración de fármaco en el equilibrio. La vehiculización de doxorubicina se realizó mediante adsorción superficial (\square) o mediante incorporación en el interior de la matriz polimérica (absorción, \blacksquare). (c) Liberación de doxorubicina adsorbida (\square) o absorbida (\blacksquare) desde las nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) en un medio de incubación (tampón de fosfatos, pH = $7,4 \pm 0,1$) y a $37,0 \pm 0,5$ °C.

Figura 2. Imagen representativa de la microscopía de fluorescencia de células de cáncer de mama MCF-7 expuestas a doxorubicina en la que se puede observar la incorporación de esta droga al citoplasma y núcleo de las células tumorales cuando es asociada a la nanopartícula (polímero de ϵ -caprolactona) preparada según el procedimiento descrito en los de ejemplos de absorción en matriz y cuando se administra de forma libre (B). Como se aprecia en la imagen, la intensidad de la fluorescencia fue claramente superior en las células expuestas a doxorubicina asociada a polímero que en las células expuestas al fármaco libre.

Figura 3. A. Análisis mediante FASCcan de presencia de doxorubicina en el interior de las células MCF-7 tras tratamiento con doxorubicina libre (DOX) y doxorubicina asociada a nanopartícula de ϵ -caprolactona (DOX+POL) preparada según el procedimiento descrito en los ejemplos de absorción en matriz durante 0,5 (a y b), 1,5 (c y d), 2 (e y f) y 4 horas (g y h). B. Representación gráfica de la modulación de la media de intensidad de fluorescencia emitida por la doxorubicina en células MCF-7 tratadas con

doxorubicina libre o doxorubicina asociada a nanopartícula de ϵ -caprolactona preparada según el procedimiento descrito en los ejemplos de absorción en matriz.

5 **EJEMPLOS**

En los ejemplos se han utilizado las siguientes abreviaturas: IC₅₀: dosis inhibitoria 50; MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol; PCS: espectroscopía de correlación de fotones; p/p: peso/peso; p/v: peso/volumen; r.p.m: revoluciones por minuto. SEM: microscopía electrónica de barrido.

Procedimiento de obtención de nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) mediante el método de disposición interfacial de polímeros

15

Las nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) se prepararon mediante el método de disposición interfacial del polímero (Arias et al., Colloids Surf. B: Biointerfaces 75 (2010) 204) Se prepara una disolución al 2 % (p/v) de polímero biodegradable en diclorometano mediante agitación mecánica. Esta fase orgánica se añade secuencialmente a 50 mL de una disolución acuosa que contiene 1 gramo de agente tensioactivo pluronic[®] F-68 [poloxámero: copolímero de poli(óxido de propileno) y de poli(óxido de etileno)]. En estas condiciones se produce la formación instantánea de las nanopartículas. La eliminación del disolvente orgánico se realiza mediante evaporación a $37,0 \pm 0,5$ °C y a presión reducida, utilizando un rotavapor. La suspensión acuosa de nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) se somete finalmente a ciclos repetidos de centrifugación (10700 r.p.m. durante 30 minutos) y redispersión en agua bidestilada hasta que la conductividad del sobrenadante es ≤ 10 μ S/cm. La caracterización de la morfología (forma y tamaño) de las nanopartículas se realiza mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS). Las

20
25
30

nanopartículas obtenidas tienen un tamaño medio de 95 ± 7 nm). La carga de fármaco es de $64,1 \pm 2,9$ %)

5 La cuantificación de la cantidad de fármaco vehiculizada se realizó mediante un procedimiento espectrofotométrico previamente validado (para demostrar su linealidad, precisión y exactitud). La longitud de onda de medida fue la de máxima absorbancia (481 nm). Se desarrollaron dos estrategias para la incorporación del fármaco antitumoral doxorubicina en las nanopartículas poliméricas. La primera de ellas, adsorción superficial, consiste en la puesta en
10 contacto de las nanopartículas ya formadas con el fármaco antitumoral durante 24 horas a temperatura ambiente. Por el contrario, la segunda de las estrategias, absorción en el interior de la matriz polimérica, implica la incorporación de la molécula quimioterápica en la fase orgánica que contiene el polímero biodegradable disuelto, antes de su adición a la solución acuosa de
15 agente tensioactivo. El estudio de la liberación de doxorubicina desde las nanopartículas se realizó mediante el método de diálisis, y su cuantificación se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico previamente mencionado. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

20 El tamaño de partícula se determinó por triplicado y a temperatura ambiente mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS), y fue confirmado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). La determinación de la cantidad de fármaco vehiculado se realizó mediante una técnica analítica espectrofotométrica previamente validada ($\lambda = 481$ nm). La incorporación de
25 doxorubicina en las nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) se ensayó mediante dos procedimientos de vehiculización. El primero de ellos consiste en la adsorción del fármaco antitumoral en la superficie de las nanopartículas. En concreto, se incubó una suspensión de nanopartículas de polímero (concentración del 2 % (p/v)) con concentraciones crecientes de doxorubicina
30 (hasta 0,01 M), durante 24 horas a $25,0 \pm 0,5$ °C y bajo agitación mecánica (50 r.p.m.). La segunda metodología (absorción en matriz) es muy parecida al

procedimiento de preparación de las nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) arriba descrito, con la única diferencia de que una cantidad apropiada de fármaco (hasta 0,01 M) es incorporada en la disolución orgánica de polímero antes de su adición a la solución acuosa de agente tensioactivo. En cuanto a la liberación *in vitro* de fármaco, el método utilizado fue el de diálisis, utilizando como medio de liberación un tampón de fosfatos de pH = $7,4 \pm 0,1$ (Arias JL et al., J. Drug Target. 17 (2009) 586). Para ello, 12 horas antes del experimento se introdujeron las bolsas de diálisis en el medio de liberación a $25,0 \pm 0,5$ °C. Las características de estas bolsas (tamaño de poro: 2000 Daltons, Spectrum® Spectra/Por® 6 dialysis membrane tubing, EE.UU.) hacen que las nanopartículas poliméricas queden retenidas en su interior y que sólo el principio activo sea capaz de difundir hacia el medio de liberación. Tras esas 12 horas, 2 mL de la suspensión de nanopartículas (conteniendo 3 mg/mL de doxorubicina) se introdujeron en las bolsas de diálisis, cuyos extremos se cerraron con pinzas. Las bolsas (con la suspensión en su interior) se depositaron en un vaso de precipitado que contenía 100 mL de medio de disolución bajo agitación mecánica (200 r.p.m.). La temperatura se mantuvo a $37,0 \pm 0,5$ °C durante todo el ensayo de liberación (realizado por triplicado). A partir de este momento, y a intervalos prefijados (0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas), se tomaron 2 mL de medio para analizar su contenido mediante la técnica espectrofotométrica previamente validada ($\lambda = 481$ nm). Un volumen igual de medio de liberación (calentado a $37,0 \pm 0,5$ °C) se añadió al vaso de precipitado tras cada toma de muestra.

En la figura 1(a) se pueden observar que las nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) obtenidas son estables, de morfología esférica y con una distribución de tamaños dentro del rango coloidal (tamaño medio: 95 ± 7 nm).

La cantidad de doxorubicina vehiculizada es mucho mayor cuando se utiliza el método de absorción en matriz (eficiencia de vehiculización ≈ 64 %), en comparación con el método de adsorción superficial (eficiencia de

vehiculización $\approx 26\%$). Como puede apreciarse en la figura 1b, existe un efecto beneficioso de la cantidad de fármaco utilizada sobre la capacidad de vehiculización. El perfil de liberación de la doxorubicina desde las nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) es bifásico (figura 1C): en una primera
5 etapa la liberación ocurre de forma rápida (hasta $\approx 37\%$ tras 6 horas, probablemente consecuencia de la liberación del fármaco localizado a nivel superficial), mientras que la cantidad restante se libera muy lentamente en las siguientes 90 horas. La liberación del antitumoral vehiculado mediante adsorción superficial es mucho más rápida, siendo ésta total tras menos de 12
10 horas. Esto puede deberse a una muy pobre adsorción física de este fármaco hidrófilo en la superficie hidrófoba del polímero.

Los ensayos *in vitro* han sido realizados utilizando la línea de cáncer de mama humana MCF-7. En esta línea se determinó la toxicidad de las nanopartículas y la IC_{50} de la doxorubicina libre y de la doxorubicina encapsulada en poli(ϵ -
15 caprolactona). El estudio se realizó a las 72 horas y la inhibición del crecimiento se determinó utilizando el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). El estudio de incorporación de doxorubicina a la célula cancerosa fue realizado utilizando citometría de flujo y microscopia de
20 fluorescencia tras la incubación de MCF-7 durante 0,5, 1, 1,5, 2 y 4 horas a una concentración de 25 μ M.

Los ensayos *in vitro* han demostrado que la doxorubicina asociada a nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona), tiene una IC_{50} cinco veces inferior en la
25 línea de cáncer de mama MCF-7 a la de la doxorubicina libre, siendo la IC_{50} de 0,1 y 0,5 mM, respectivamente. Por tanto, la doxorubicina unida al poli(ϵ -caprolactona) disminuye su IC_{50} . El análisis de la incorporación celular de doxorubicina también mostró que la incorporación fue 6,7 veces superior en el
30 caso de la doxorubicina asociada a las nanopartículas (media de fluorescencia de 1222 a las 4 h) que cuando se incubó con doxorubicina libre (media de fluorescencia de 181 a las 4h). Estos resultados sugieren que la

encapsulación de doxorubicina en las nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) incrementa la actividad antitumoral del fármaco, por lo que podría utilizarse para disminuir su toxicidad (figura 2). Además, la incorporación celular es superior cuando se usa poli(ϵ -caprolactona) comparada a cuando se usan otros
5 polímeros como poli(butilcianoacrilato).

REIVINDICACIONES

- 1.- Una nanopartícula polimérica con un tamaño medio inferior a 200 nm, preferiblemente inferior a 190 nm, que comprende uno o más polímeros biodegradables, uno o más principios activos y al menos un tensoactivo, donde al menos un polímero biodegradable es poli(ϵ -caprolactona) y donde al menos un principio activo es doxorrubicina.
- 5
- 2.- La nanopartícula polimérica según la reivindicación anterior, obtenible por el procedimiento que comprende las siguientes etapas:
- 10
- i) la disolución de poli(ϵ -caprolactona) en un disolvente orgánico, preferiblemente diclorometano;
- ii) la adición de la disolución obtenida en (i) sobre una mezcla que comprende un antisolvente y un tensoactivo;
- 15
- iii) el aislamiento de la partícula obtenida;
- donde se incorpora el principio activo doxorrubicina mediante asociación superficial sobre la nanopartícula obtenida después de la etapa (iii) o mediante asociación en el interior de la matriz polimérica durante la etapa (i).
- 20
- 3.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la nanopartícula tiene un tamaño de partícula medio de entre 65 y 150 nm.
- 4.- La nanopartícula polimérica según la reivindicación anterior, caracterizada porque la nanopartícula tiene un tamaño de partícula medio de de entre 75 y 125 nm, preferiblemente de entre 85 y 115 nm, y más preferiblemente de aproximadamente 95 nm.
- 25
- 5.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tensoactivo y la poli(ϵ -caprolactona) no están unidos covalentemente.
- 30

6.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polímero biodegradable de poli(ϵ -caprolactona) tiene un peso molecular inferior a 100.000 Daltons, preferiblemente entre 5.000 y 45.000 Daltons, y aun más preferiblemente de entre 7 y 20.000 Daltons, y
5 todavía más preferiblemente es de aproximadamente unos 10.000 Dantons.

7.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un polímero biodegradable que consiste en poli(ϵ -caprolactona).
10

8.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la poli(ϵ -caprolactona) y la doxorrubicina están en un ratio suficiente para mantenerse asociados.

9.- La nanopartícula polimérica según la reivindicación anterior, donde el ratio suficiente para mantenerse asociados la poli(ϵ -caprolactona) y la doxorrubicina es un ratio de entre 1000:1 y 1:50 p/p respectivamente, preferiblemente es un ratio de entre 1:5 y 1:15.
15

10.- La nanopartícula polimérica según la reivindicación anterior, que comprende un polímero biodegradable que consiste en poli(ϵ -caprolactona).
20

11.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende únicamente doxorrubicina como principio activo.
25

12.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende únicamente un polímero biodegradable que consiste en poli(ϵ -caprolactona).

- 13.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende entre un 0,1 % y un 25 % p/p de doxorubicina, preferiblemente entre un 15 % y un 20 % p/p.
- 5 14.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende entre un 70 % y un 99,8 % p/p de poli(ϵ -caprolactona), preferiblemente entre un 79 % y un 84,5 % p/p.
- 15 15.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende entre un 0,1 % y un 2 % p/p de tensoactivo, preferiblemente entre un 0,5 % y un 1 % p/p.
- 15 16.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tensoactivo se selecciona entre polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 80, polivinil alcohol de alto o bajo peso molecular, polivinil pirrolidona, fosfatidil colina, lecitinas, poloxameros de distintos tipos, solutol HS15, glicocolato sódico, taurocolato sódico, tauroglicocolato sódico, taurodeoxicolato sódico, hemisuccinato de colesterilo y tiloxapol, preferiblemente polisorbato 80.
- 20 17.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tensoactivo es un poloxámero, preferiblemente un copolímero de poli(óxido de propileno) y de poli(óxido de etileno).
- 25 18.- La nanopartícula polimérica según la reivindicación 2, donde el procedimiento además comprende una etapa de evaporación del disolvente orgánico, preferiblemente a presión reducida.
- 30 19.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 2 o anterior, donde la etapa (iii) se lleva a cabo mediante una centrifugación,

preferiblemente a menos de 30.000 r.p.m., más preferiblemente de entre 5.000 y 15.000 r.p.m.

5 20.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 2, 18 ó 19, donde el procedimiento además comprende una etapa de redispersión de la nanopartícula polimérica hasta que la conductividad del sobrenadante sea menor o igual a 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

10 21.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 18-20, donde la etapa (ii) del procedimiento se realiza de manera secuencial.

15 22.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 18-21, donde el antisolvente es agua o mezclas de agua y un disolvente orgánico, preferiblemente un $\text{C}_1\text{-C}_4$ alcohol.

23.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 18-22, donde el antisolvente es agua.

20 24.- La nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 18-23, donde la incorporación de doxorubicina mediante asociación en el interior de la matriz polimérica durante la etapa (i) se lleva a cabo a temperatura inferior a 60 $^{\circ}\text{C}$, preferiblemente inferior a 35 $^{\circ}\text{C}$, y aun más preferiblemente a aproximadamente a 25 $^{\circ}\text{C}$.

25 25.- Un procedimiento para la síntesis de una nanopartícula polimérica con un tamaño medio inferior a 200 nm, preferiblemente inferior a 190 nm, que comprende uno o más polímeros biodegradables, uno o más principios activos y al menos un tensoactivo, donde al menos un polímero biodegradable es poli(ϵ -caprolactona) y donde al menos un principio activo es doxorubicina:

30 i) la disolución de poli(ϵ -caprolactona) en un disolvente orgánico, preferiblemente diclorometano;

ii) la adición de la disolución obtenida en (i) sobre una mezcla que comprende un antisolvente y un tensoactivo;

iii) el aislamiento de la partícula obtenida;

5 donde se incorpora el principio activo doxorrubicina mediante asociación superficial sobre la nanopartícula obtenida después de la etapa (iii) o mediante asociación en el interior de la matriz polimérica durante la etapa (i).

26.- Una composición farmacéutica que comprende:

- 10 - una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24; y
- un excipiente farmacéuticamente aceptable.

27.- La composición farmacéutica según la reivindicación anterior, caracterizada porque comprende un diluyente.

15 28.- La composición farmacéutica según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, caracterizada porque comprende agua.

20 30.- La composición farmacéutica según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, caracterizada porque está en forma para su uso parental, preferiblemente para su uso intravenoso, intraarterial, intratumoral, intramuscular o subcutáneo.

25 30.- La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 26 ó 27, caracterizada porque comprende celulosa microcristalina, lactosa o cualquiera de sus combinaciones.

31.- La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 26, 27 o anterior, caracterizada porque está en forma sólida oral, preferiblemente en comprimidos o cápsulas.

32.- Uso de una nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 o de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 31 para la elaboración de un medicamento.

- 5 33.- Uso de una nanopartícula polimérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 o de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 31 para elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer, preferiblemente cáncer de mama.

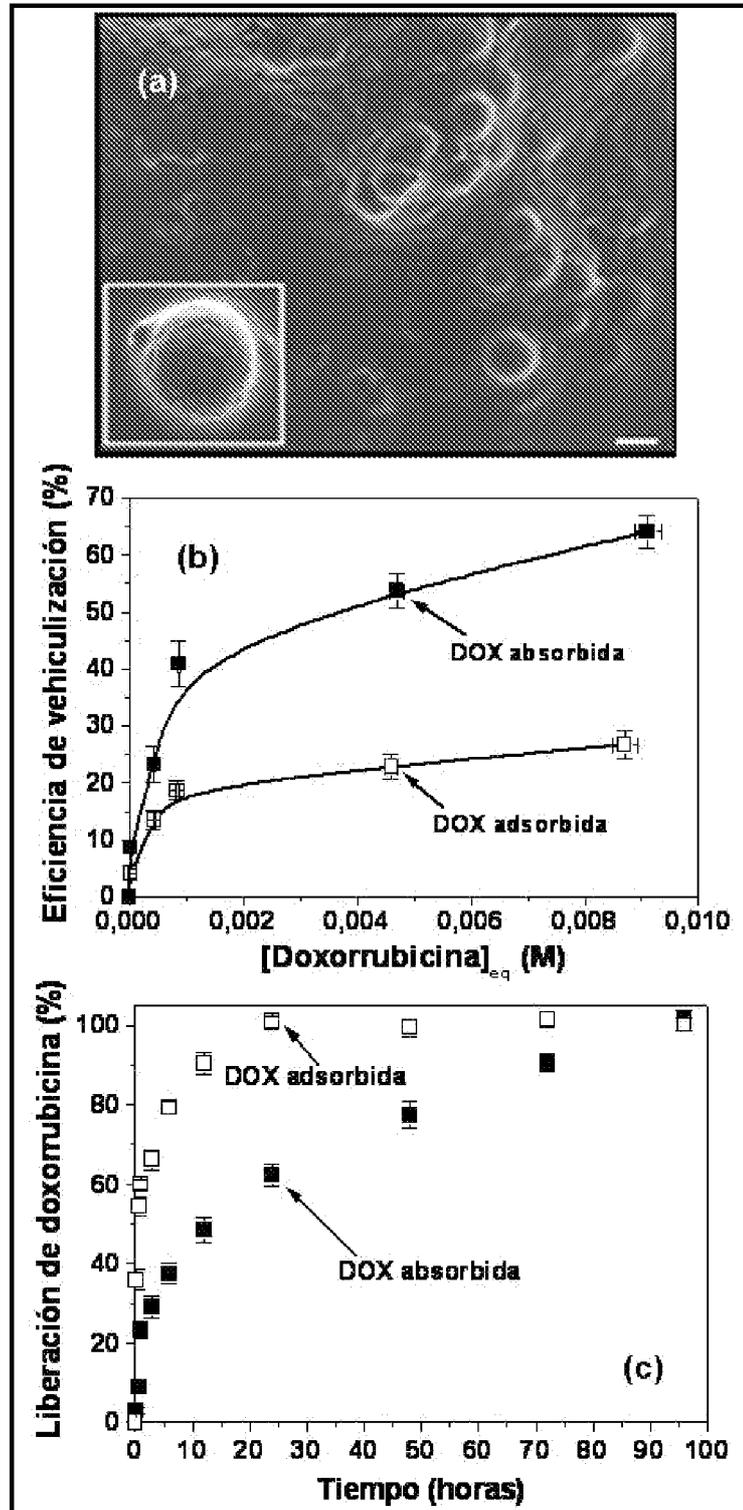


Fig. 1

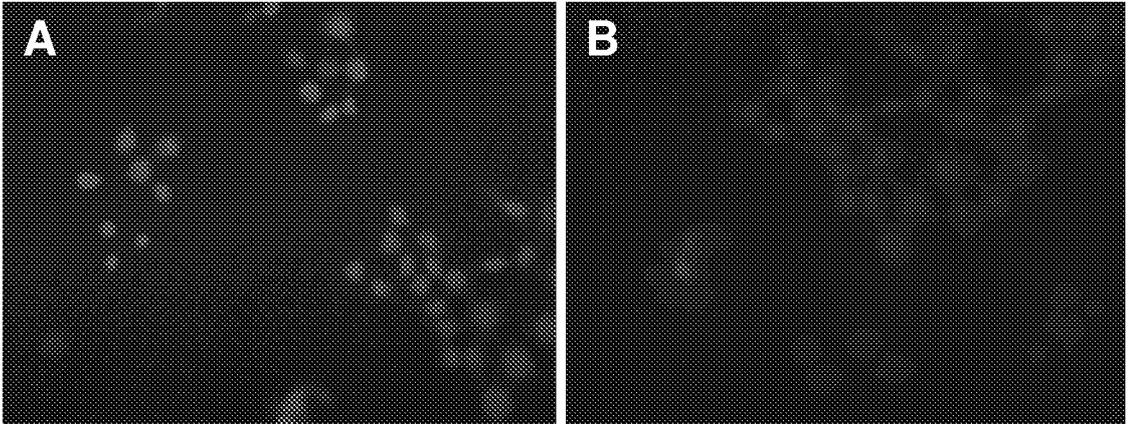


Fig. 2

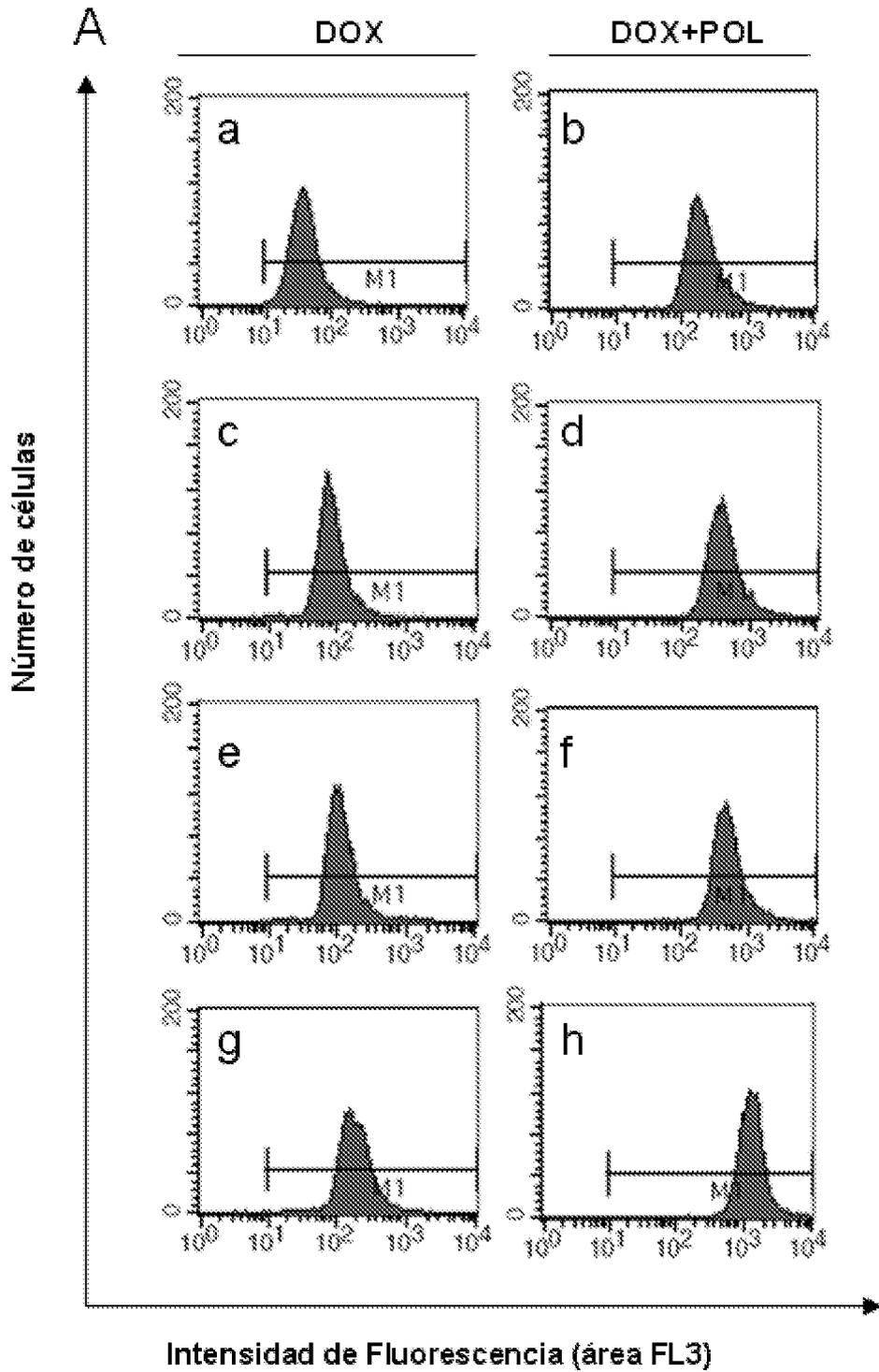


Fig. 3 A

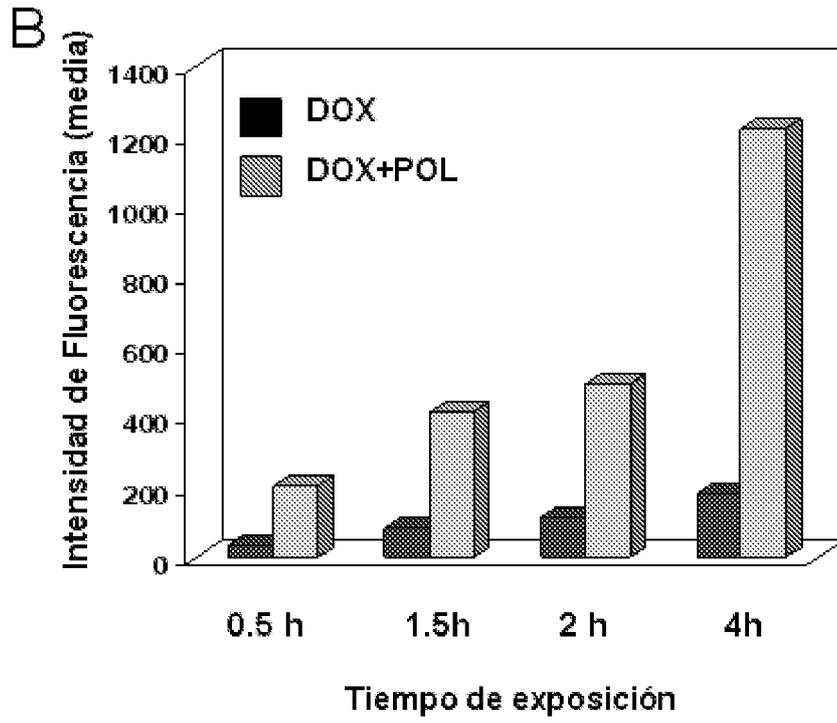


Fig. 3 B



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130122

②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.01.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	YADAV, A . K . et al .; D evelopment a nd characterization of hyaluronic acid-anchored P LGA nanoparticulate carriers of d oxorubicin; N anomedicine: N anotechnology, Biology and M edicine, volumen 3, páginas 246-257, 2007; ISSN 1549-9634.	1-33
Y	KUMARI, AVNESH et al.; Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems; Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, volumen 75, páginas 1-18, 201 0; ISSN 0 927-7765, apartado 5.	1-33
A	US 2008102127 A1 (GAO et al.) 01.05.2008, ejemplos; tabla 1; párrafos [0021]-[0050].	1-33
A	US 2009061009 A1 (SCHWARZ et al.) 05.03.2009, tabla 9; ejemplos 97-103.	1-33
A	MORA-HUERTAS, C .E. e t a l.; Po lymer-based nanocapsules for dr ug de livery; I nternational Journal of Pharmaceutics, volumen 385, páginas 113-142, 2010; ISSN 0378-5173; Tabla 2, apartado 3.1.	1-33

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
11.04.2012

Examinador
N. Vera Gutierrez

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K9/51 (2006.01)

A61K31/704 (2006.01)

A61K47/34 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

A61P35/00 (2006.01)

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

A61K, B82Y, A61P

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.04.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-33	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-33	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	YADAV, A . K . et al .; Development and characterization of hyaluronic acid-anchored PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin; Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, volumen 3, páginas 246-257, 2007; ISSN 1549-9634.	2007
D02	KUMARI, AVNESH et al.; Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems; Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, volumen 75, páginas 1-18, 2010; ISSN 0927-7765, apartado 5.	2010
D03	US 2008102127 A1 (GAO et al.)	01.05.2008
D04	US 2009061009 A1 (SCHWARZ et al.)	05.03.2009
D05	MORA-HUERTAS, C.E. et al.; Polymer-based nanocapsules for drug delivery; International Journal of Pharmaceutics, volumen 385, páginas 113-142, 2010; ISSN 0378-5173; Tabla 2, apartado 3.1.	2010

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

La invención se refiere a una nanopartícula polimérica con un tamaño medio inferior a 200 nm, que comprende uno o más polímeros biodegradables, uno o más principios activos y al menos un tensioactivo, donde al menos un polímero biodegradable es poli (epsilon-caprolactona) y donde al menos un principio activo es doxorubicina.

El documento D01 divulga nanopartículas de copolímero de ácido láctico-glicólico (PLGA) como vehículo para la administración de doxorubicina. En el artículo se realiza una comparación entre dos tipos de nanopartículas: las que llevan doxorubicina en un copolímero de ácido hialurónico-polietilenglicol-PLGA (HA-PEG-PLGA) y las que llevan doxorubicina y monometoxi(polietilenglicol)-PLGA ((MPEG)-PLGA). Las nanopartículas se preparan por el método de nanoprecipitación: se parte de una solución del polímero en acetona, a la que se añade el principio activo. Esta solución se vierte gota a gota sobre una solución de agua y Pluronic F-68. El disolvente se elimina por evaporación a temperatura ambiente y la suspensión resultante se somete a centrifugación.

La diferencia del documento D01 con la reivindicación 1 de la solicitud radica en el uso de poli (epsilon-caprolactona) como polímero biodegradable.

El problema técnico planteado en la solicitud es la preparación de nanopartículas que incluyan una sustancia biológicamente activa, en concreto el antitumoral doxorubicina, que se comporten como sistema transportador de la misma y sean capaces de aumentar su biodisponibilidad. Esto se consigue mediante la elección de poli (epsilon-caprolactona) como polímero biodegradable.

En el estado de la técnica es conocido el empleo de poli (epsilon-caprolactona) en la preparación de nanopartículas como sistemas vectoriales en la administración de principios activos. Así, en D02 se describe un estudio sobre las nanopartículas poliméricas biodegradables más frecuentemente utilizadas, entre las que figuran aquellas a base de poli (epsilon-caprolactona), sus ventajas terapéuticas, síntesis y proceso de encapsulación de principios activos antitumorales (apartado 5). Se considera que un experto en la materia intentaría combinar el uso de poli (epsilon-caprolactona) como polímero en estos sistemas de administración de principios activos con las características principales del documento D01 con una expectativa razonable de éxito.

Por tanto, se considera que la invención tal como se define en las reivindicaciones 1-33 de la solicitud no implica actividad inventiva (Artículo 8.1 L.P.).