(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 425 075**

(51) Int. CI.:

C08F 220/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2006 E 09015722 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 2172497**

(54) Título: **Polímero no tóxico, no biodegradable, biocompatible, útil para composiciones farmacéuticas con nanopartículas**

(30) Prioridad:

28.12.2005 IN KO11902005

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2013

(73) Titular/es:

FRESENIUS KABI ONCOLOGY LIMITED (100.0%)
B- 310, SOM DATT CHAMBERS - I BHIKAJI CAMA PLACE
NEW DELHI 110 066, IN

(72) Inventor/es:

BURMAN, ANAND C.;
MUKHERJEE, RAMA;
KHATTAR, DHIRAJ;
MULLICK, SANJOY;
JAGGI, MANU;
SINGH, MANOJ KUMAR;
KUMAR, MUKESH;
PRUSTHY, DEEPAK;
GUPTA, PAWAN KUMAR;
PRAVEEN, RAJENDRAN y
SINGH, SHOBHIT

(74) Agente/Representante:

RUO, Alessandro

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

Polímero no tóxico, no biodegradable, biocompatible, útil para composiciones farmacéuticas con nanopartículas

Campo de la invención

[0001] La presente invención proporciona un polímero biocompatible y no biodegradable de alta pureza, sustancialmente libre de contaminantes monoméricos y un proceso para la preparación del mismo.

[0002] La presente invención además proporciona composiciones farmacéuticas de fármacos poco solubles en agua o compuestos en forma de nanopartículas que utilizan dicho polímero de la invención.

[0003] Además, la presente invención describe un método altamente selectivo para la preparación de composiciones farmacéuticas de fármacos poco solubles en agua o compuestos en forma de nanopartículas, así como un método de administración de las mismas a pacientes que así lo requieran.

[0004] El polímero de la presente invención no es tóxico y es seguro, por esa razón hace que las composiciones farmacéuticas de nanopartículas de fármacos poco solubles en agua o compuestos que comprenden dicho polímero sean también menos tóxicos y más seguros para su administración.

Antecedentes de la invención

[0005] En los últimos años se ha visto un interés cada vez mayor en la aplicación de nuevos materiales en los campos médico y farmacéutico, ya sea como prótesis o en dispositivos médicos diseñados para entrar en contacto con el entorno biológico de un cuerpo vivo. De estos materiales, los polímeros, principalmente polímeros sintéticos, son con mucho las clases más diversas que se ha descubierto que imparten beneficios considerables para el cuidado de la salud del paciente.

[0006] Las aplicaciones de los polímeros en los campos médico y farmacéutico están ampliándose. En el campo médico, los polímeros se emplean como implantes o materiales de soporte tales como órganos artificiales, injertos vasculares, lentes intraoculares, articulaciones artificiales, prótesis mamarias, materiales de sutura, terapias extracorporales u otros materiales de soporte tales como aquellos que se usan en la hemoperfusión, oxigenadores de sangre, catéteres, tubos de vía, material para cubrir heridas y quemaduras, tablillas, lentes de contacto, etc. En el campo farmacéutico, los polímeros se han utilizado particularmente en el desarrollo de sistemas de distribución de nanopartículas y en sistemas de distribución de liberación controlada. Se están llevando a cabo amplios estudios para desarrollar fármacos con sistemas de distribución en el sitio deseado. Además, los polímeros han sido de gran utilidad en otras aplicaciones, tales como parches transdérmicos de liberación de fármaco, microesferas, bioprocesos tales como enzimas e inmovilización celular, etc.

[0007] Entre tales aplicaciones, se han realizado estudios más extensos sobre los sistemas de distribución de fármacos de nanopartículas y se han estudiado extensivamente vehículos nanoméricos de fármacos con superficies hidrófilas, especialmente aquellos compuestos que comprenden dos regiones esféricas concéntricas de micelas poliméricas - un núcleo densamente empaquetado de material hidrófobo, que es responsable de capturar un fármaco o compuesto hidrófobo, y una cubierta exterior hecha de material hidrófilo. Se han descubierto que estos sistemas evaden el reconocimiento y la captación por los sistemas reticuloendoteliales (RET) para así poder circular en la sangre durante mucho tiempo. Además, debido a su tamaño extremadamente pequeño (una micela polimérica generalmente consiste en varios cientos copolímeros de bloque y tiene un diámetro de aproximadamente 20 nm a 50 nm), las partículas se vacían en los sitios patológicos, tales como tumores sólidos a través de mecanismos pasivos de dirección.

[0008] El campo de acción de las propiedades atribuibles a los polímeros deriva de sus características químicas y estructurales. Las cadenas poliméricas pueden ser esencialmente lineales, ramificadas o estar reticuladas con cadenas adyacentes. Además, estas cadenas pueden estar desordenadas, ordenadas u orientadas en una sola dirección. Estas características estructurales combinadas con la composición química, otorgan una variedad de propiedades a los polímeros, que tienen como resultado una variedad de aplicaciones de uso final. Además, estas características estructurales combinadas con la composición química pueden añadir o quitar al polímero resultante, biocompatibilidad y resistencia a la biodegradación por parte del entorno del tejido huésped. Estos factores también influyen en otras propiedades como la solubilidad y en los métodos de procesamiento y moldeado.

[0009] Además, cuando se inyecta el polímero en mamíferos, normalmente, éste desaparece lentamente del sitio de administración, sin embargo, esta desaparición ocurre en respuesta a una reacción química tal como la hidrólisis, que normalmente es parte de un proceso de biotransformación y dicho polímero se metaboliza y se elimina del cuerpo. Sin embargo, en algunas ocasiones esto produce metabolitos innecesarios, que causan efectos indeseados en varios sistemas biológicos. Así, los polímeros, que son inertes en el entorno de uso y se eliminan o extraen intactos del sitio de administración, además de servir esencialmente de barrera limitante para el transporte y

liberación del fármaco desde ellos, pueden ser de gran importancia basándose en las funciones previstas. Una vez más, la biodegradabilidad de un polímero depende de las propiedades mecánicas y químicas del polímero. Una variedad de polímeros naturales, sintéticos, y biosintéticos son biodegradables y degradables medioambientalmente. Un polímero basado en un esqueleto C-C tiende a no ser biodegradable, mientras que los polímeros que contienen esqueletos de heteroátomos confieren biodegradabilidad. Por lo tanto, la no biodegradabilidad/biodegradabilidad pueden modificarse en los polímeros mediante la decisión de eliminar o añadir enlaces químicos tales como enlaces anhídrido, éster o amida entre sí. Los ejemplos comunes de materiales poliméricos no biodegradables incluyen polietileno acetato de vinilo, polidimetil siloxano, poliéter uretano, etilcelulosa, acetato de celulosa, polietileno y cloruro de polivinilo.

[0010] Existe una confusión en los informes disponibles acerca de los intentos realizados en las últimas décadas, aproximadamente, con respecto al desarrollo de sistemas de distribución de nanopartículas para una gran variedad de fármacos utilizando polímeros. Para nombrar unas cuantas, se incluyen las descripciones de:

i) Sakurai et al en el documento US 5.412.072, en que se ha descubierto que un complejo compuesto por un fármaco con un enlace covalente a un polímero compuesto de fragmentos hidrófilos e hidrófobos hacía que dicho complejo fuera soluble en agua y por lo tanto, fuera adecuado para su administración. Los fármacos utilizados en el presente documento son, en general, compuestos menos solubles en agua o insolubles y se ha notificado que el complejo fármaco-polímero formaba micelas poliméricas en soluciones acuosas y se convertían en fármacos polimerizados de alto peso molecular, solubles en agua, útiles y adecuados para su administración.

ii) Yokayama et al en el documento US 5.449.513, en el que se presenta una micela polimérica, que a diferencia de la indicada por Sakurai et al en el documento US 5.412.072, no es un complejo en el que un fármaco está enlazado covalentemente a un polímero, sino uno en el que el fármaco está inmovilizado dentro del polímero. Los fármacos que se utilizan para el atrapamiento son de naturaleza hidrófoba. La micela polimérica se prepara, a su vez, mediante el atrapamiento de fármacos hidrófobos dentro de la cubierta polimérica a través de métodos convencionales, tales como ultrasonidos, seguido de la purificación de las micelas obtenidas de esta manera a través de diálisis.

iii) Desai et al, en los documentos US 5.439.686; US 5.362.478; US 5.916.596; US 6.096.331; US 6.537.579 y US 6.749.868, en los que se preparan micelas poliméricas de compuestos sustancialmente insolubles en agua. Se indica que el compuesto insoluble en agua está inmovilizado dentro de la cubierta polimérica en un grado significativo y adecuado para su administración a un paciente que lo necesite, ya sea en forma soluble o suspendida.

[0011] Los polímeros utilizados por Sakurai et al en el documento US 5.412.072 son, en general, aquellos que comprenden un segmento hidrófilo seleccionado entre polietilenglicol, polisacáridos, poliacrilamida, etc. y un segmento hidrófobo seleccionado entre ácido poliaspártico, ácido poliglutámico, polilisina, etc.

[0012] Los polímeros utilizados por Yokayama et al en el documento US 5.449.513 son, en general, aquellos que comprenden un segmento hidrófilo seleccionado entre óxido de polietileno, ácido polimálico, ácido poliaspártico, ácido poliglutámico, polilisina, polisacáridos etc., y un segmento hidrófobo seleccionado entre poli (β-bencil L-aspartato), poli (γ-bencil L-glutamato), poli (β-aspartato sustituido), poli (γ-glutamato sustituido), poli (L-leucina), poli (L-valina), poli(L-fenilalanina), poliaminoácidos hidrófobos, poliestireno, polimetacrilato, poliacrilato, polimetacrilamida, poliacrilamida, poliamida, poliéster, óxido de polialquileno y poliolefinas hidrófobas.

[0013] Los polímeros utilizados por Desai et al en los documentos US 5.439.686; US 5.362.478; US 5.916.596; US 6.096.331; US 6.537.579 y US 6.749.868 son, en general, aquellos que esencialmente llevan grupos sulfhidrilo o enlaces disulfuro dentro de su estructura, por ejemplo, Albúmina (que contiene 35 restos de cisteína), Insulina (que contiene 6 restos de cisteína), Hemoglobina (que contiene 6 restos de cisteína por cada unidad $\alpha_2\beta_2$), Lisozima (que contiene 8 restos de cisteína), Inmunoglobulinas, α-2 Macroglobulina, Vitronectina, Fibrinógeno, etc. Estos polímeros están sustancialmente reticulados a través de la formación de enlaces disulfuro. Estos polímeros incluyen tanto polímeros naturales como sintéticos, los cuales, como se ha mencionado anteriormente, llevan grupos sulfhidrilo o enlaces disulfuro dentro de su estructura. Se ha notificado que los grupos sulfhidrilo o enlaces disulfuro pueden existir previamente, o bien, pueden obtenerse a través de la modificaciones químicas adecuadas. Se ha notificado que se prefieren los polímeros naturales e incluyen proteínas de albúmina, oligopéptidos, ácidos polinucleicos, etc.

[0014] Sin embargo, la desventaja con las micelas poliméricas descritas por Sakurai et al, Yokayama et al y Desai et al, es la de que todas ellas utilizan tanto polímeros naturales como sintéticos, que son biodegradables. Se puede mencionar que los polímeros biodegradables, aunque son capaces de influir en el patrón de liberación de fármacos así como en la cinética de liberación del fármaco administrado, sin embargo no son particularmente preferidos para los sistemas de liberación de fármacos porque:

a) Tienen una vida media plasmática baja debido a su rápida captura por parte del sistema de las células del sistema de fagocitos mononucleares (SFM);

b) Carecen de respuesta a cambios fisiológicos;

c) Carecen de una cinética de liberación del fármaco uniforme, lo cual puede ocasionar pérdidas económicas y terapéuticas del fármaco, así como otros efectos adversos; y
d) Pueden incrementar la toxicidad o la inmunogenicidad, ya que la encapsulación de fármacos proteicos implica disolventes orgánicos, que pueden provocar desnaturalización de las proteínas.

[0015] En las siguientes referencias se utilizan y describen sistemas de liberación en los que los polímeros no son biodegradables:

i) Maitra et al en el documento US 5.874.111, en el que el fármaco está inmovilizado dentro del polímero, formándose una nanopartícula, altamente monodispersa, polimérica e hidrófila. Los polímeros utilizados son aquellos que comprenden monómeros como la vinilpirrolidona (VP) o mezclas de vinilpirrolidona y fumarato de polietilenglicol (PEGF), etc.
ii) Maitra et al en el documento US 6.322.817, en el que los polímeros utilizados comprenden al menos un tipo de monómero anfífilo seleccionado del grupo que consiste en vinilpirrolidona, ácido acrílico, acrilatos de alquilo que tienen un polietilenglicol funcionalizado con una longitud de cadena de C_3 a C_6, de un peso molecular de 2.000 a 6.000, N-alquilacrilamida con una longitud de cadena de C_3 a C_6 y alquilcianoacrilato con una longitud de cadena de C_3 a C_6. Los fármacos inmovilizados dentro de las micelas poliméricas son derivados de taxano, en particular Paclitaxel.
iii) Lowe et al, en el documento US 2005/0169882, en el que los polímeros utilizados comprenden un segmento inteligente (no biodegradable) y un segmento biodegradable. Más específicamente, el segmento no biodegradable, inteligente, comprende poli(N-isopropilacrilamida), poli(N-alquilacrilamida), poli(N-n-propilacrilamida), poli(N-isopropilmetacrilamida), poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno), polipéptidos tipo elastina o derivados de los mismos, y el segmento biodegradable comprende polisacáridos, dextrano, poliéster, polilactida, poli(L-ácido láctico), poli(D,L-ácido láctico), poli(lactida-co-glicolidas), poli(etilenglicol-bloque-ácido láctico) biotinilado, etc.

[0016] En el caso de los polímeros descritos en el documento US 5.874.111, cabe señalar que dichos polímeros se preparan a través de la polimerización de los respectivos monómeros y el material polimérico obteniendo de esta manera se purifica y aísla de un medio acuoso que lo contiene a través de un método de diálisis.

[0017] En el caso de los polímeros descritos en el documento US 6.322.817, los polímeros también se preparan a través de la polimerización de los respectivos monómeros y se purifica y se aísla de un medio acuoso a través de un método de diálisis.

[0018] De manera similar, los polímeros descritos por Lowe et al en el documento US 2005/0169882 también se purifican y se aíslan de un medio acuoso que lo contiene a través de un método de diálisis.

[0019] En relación con los compuestos o fármacos descritos por Maitra et al en el documento US 5.874.111, para la inmovilización dentro de los polímeros descrita en el presente documento, éstos son principalmente antígenos, suero bovino etc. En el caso del documento US 6.322.817, los fármacos que se inmovilizan dentro de los polímeros descritos en el presente documento son principalmente derivados de taxano insolubles en agua, especialmente Paclitaxel, mientras que Lowe et al, en el documento US 2005/0169882, describen una amplia serie de fármacos que pueden inmovilizarse en la cubierta polimérica descrita en el presente documento.

[0020] Además de todo lo anterior, en el documento US 6.365.191 Burman et al enseñan una composición farmacéutica que comprende el polímero descrito en el documento US 6.322.817 y, más específicamente, una composición farmacéutica de derivados del taxano, especialmente Paclitaxel. En el mismo, dicha composición farmacéutica se prepara añadiendo una solución de Paclitaxel en etanol a un vehículo de infusión que comprende solución de dextrosa, a la que se le ha añadido una solución de polímero en agua que contiene un tensioactivo aniónico y un agente tamponante. Además, Burman et al reivindican que la composición farmacéutica es estable durante más de 12 horas sin ninguna precipitación del fármaco desde el fluido de perfusión y que más del 90% (tal y como se analizó por HPLC) del fármaco se inmoviliza en la micela polimérica incluso después de 24 horas de la preparación del fluido de perfusión.

[0021] Aún así, Burman et al, en el documento US 6.365.191, reivindican que la composición farmacéutica descrita en el mismo se encuentra en forma de nanopartículas, sin embargo, no hay mención en la memoria descriptiva del tamaño de la forma de nanopartículas reivindicada. La única mención sobre el tamaño de la partícula de las micelas poliméricas que contienen Paclitaxel se puede encontrar en la descripción del documento US 6.322.817 de Maitra et al, en el que se notifica que dichas nanopartículas que contienen Paclitaxel tienen un diámetro en el intervalo de 30-150 nm. De manera similar, no existe mención sobre el tamaño de partícula de las micelas poliméricas de las composiciones descritas por Lowe et al en el documento US 2005/0169882.

[0022] Es importante señalar que los polímeros descritos en los documentos US 5.874.111; US 6.322.817; US 6.365.191 y US 2005/0169882 se preparan a partir de uno o más monómeros, que incluyen vinilpirrolidona y N-isopropilacrilamida. Además, es importante señalar que la vinilpirrolidona y la N-isopropilacrilamida son compuestos tóxicos, cuya presencia en una composición farmacéutica destinada al consumo humano o animal no solamente

está mal vista por las Autoridades Sanitarias de todo el mundo, sino que también tienen una calidad de adherencia estricta, con límites estrictos establecidos por los Foros Farmacopeicos de todo el mundo. Por ejemplo, el nivel de vinilpirrolidona monomérica en el polímero de polivinilpirrolidona, así como cualquier otro polímero que contenga vinilpirrolidona como monómero, tal como prescriben las Farmacopeas de Europa y Estados Unidos, no debe exceder un límite del 0,001% (por ejemplo <10 ppm).

[0023] Existe un grave riesgo de que en los métodos descritos en los documentos US 5.874.111; US 6.322,817; US 6.365.191 y US 2005/0169882 para la preparación y aislamiento de polímeros utilizando vinilpirrolidona como uno de los monómeros, dicho monómero, por ejemplo vinilpirrolidona pueda estar presente en límites mayores del 0,001% (por ejemplo >10 ppm).

[0024] Igualmente existe un grave peligro de que las composiciones farmacéuticas que contienen dichos polímeros, que utilizan vinilpirrolidona como uno de los monómeros, puedan también contener vinilpirrolidona como un contaminante monomérico y que dicho monómero, es decir, vinilpirrolidona, pueda también estar presente en límites mayores del 0,001% (es decir >10 ppm).

[0025] Esto puede ser verdad especialmente en relación con las composiciones farmacéuticas descritas en los documentos US 6.322.817; US 6.365.191 y US 2005/0169882.

[0026] No hace falta enfatizar que cualquier reacción química, incluyendo una reacción para la preparación de polímeros, nunca finaliza en el sentido que, invariablemente, en el producto queda uno o más de los reactivos. Esto podría aplicarse a reacciones de polimerización que implican a la vinilpirrolidona como monómero y, dependiendo de la proporción molar o de peso de la vinilpirrolidona utilizada, es muy posible que alguna cantidad de la vinilpirrolidona permanezca como un contaminante en los productos poliméricos preparados.

[0027] En relación con lo anterior, se observó que la preocupación de los presentes inventores era cierta, descubriéndose en el análisis de los polímeros preparados por polimerización de tres monómeros, particularmente vinilpirrolidona (VP), N-isopropilacrilamida (NIPA) y éster de anhídrido maleico y polietilenglicol (MPEG) exactamente como se indica en las descripciones proporcionadas en los Ejemplos I, II y III del documento US 6.322.817, que contenían una cantidad de N-isopropilacrilamida (NIPAM) y vinilpirrolidona (VP) como se resume en la Tabla-I.

Tabla-I: ***Cantidad De Monómeros Residuales En El Polímero Preparado Conforme Al Método Descrito En Los Ejemplos I, II y III Del Documento US*** **6.322.817**

Monómero	% p/p Detectado en el Polímero
NIPAM	0,066 - 0,076 (660 - 760 ppm)
VP	0,008 - 0,011 (80 - 110 ppm)

[0028] Resultaría claramente evidente que la cantidad de vinilpirrolidona encontrada en el polímero es al menos ocho veces mayor que el límite tóxico del 0,001% (por ejemplo 10 ppm), siendo la composición farmacéutica que contiene dicho polímero muy insegura y altamente tóxica para su administración a seres humanos o animales.

[0029] Existe la necesidad, si bien no es imperativa, de proporcionar no solo un polímero sustancialmente libre de monómeros tóxicos, tal como N-isopropilacrilamida (NIPAM) y vinilpirrolidona (VP), sino también de proporcionar composiciones farmacéuticas que contengan un polímero que esté sustancialmente libre de contaminantes monoméricos tóxicos, tales como N-isopropilacrilamida (NIPAM) y vinilpirrolidona (VP).

[0030] También se puede señalar que se ha notificado que las composiciones farmacéuticas descritas por Burman et al en el documento US 6.365.191 tienen una estabilidad de solo aproximadamente 12 horas o más con un 90% o más del fármaco inmovilizado dentro de la micela polimérica después de 24 horas. Además, se ha notificado que las composiciones farmacéuticas descritas por Lowe et al en el documento US 2005/0169882 tienen una carga de las sustancias biológicamente activas de aproximadamente un 40% únicamente, con una liberación de la sustancia biológicamente activa en un periodo comprendido entre unas pocas horas y varios días.

[0031] Además existe la necesidad de composiciones farmacéuticas que tengan una estabilidad mayor, así como una carga mayor de fármaco, que además sean seguras y menos tóxicas.

[0032] La presente invención representa un paso hacia adelante no solo al proporcionar un polímero que está sustancialmente libre de contaminantes monoméricos tóxicos, sino también al proporcionar una composición farmacéutica, que comprende dicho polímero deseado, que es segura para su administración a seres humanos y animales y que tiene una estabilidad mayor.

Objetos de la invención

[0033] Un objeto de la presente invención es proporcionar un polímero biocompatible y no biodegradable de alta pureza, sustancialmente libre de contaminantes monoméricos.

[0034] Otro objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para la preparación de un polímero biocompatible y no biodegradable de alta pureza, sustancialmente libre de contaminantes monoméricos.

[0035] Sin embargo, otro objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas de fármacos o compuestos poco solubles en agua en forma de nanopartículas que comprenden polímeros biocompatibles y no biodegradables, de alta pureza y sustancialmente libres de contaminantes monoméricos.

[0036] un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método para la preparación de composiciones farmacéuticas de fármacos o compuestos poco solubles en agua en forma de nanopartículas que utilizan polímeros biocompatibles y no biodegradables, de alta pureza y sustancialmente libres de contaminantes monoméricos.

[0037] Sin embargo, otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas en forma de nanopartículas de fármacos o compuestos poco solubles en agua que comprenden polímeros biocompatibles y no biodegradables, de alta pureza y sustancialmente libres de contaminantes monoméricos, que son más seguras y menos tóxicas.

[0038] Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método altamente selectivo para la preparación de composiciones farmacéuticas en forma de nanopartículas, que comprenden fármacos o compuestos poco solubles en agua y un polímero biocompatible y no biodegradable de alta pureza y libre de contaminantes monoméricos.

[0039] Sin embargo, otro objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas de nanopartículas que comprenden un polímero biocompatible y no biodegradable de alta pureza y sustancialmente libre de contaminantes monoméricos, para pacientes que así lo requieran.

[0040] Sin embargo, otro objeto de la presente invención es proporcionar nanopartículas que contienen un polímero biocompatible y no biodegradable de alta pureza y libre de contaminantes monoméricos, que son estables durante periodos de tiempo más largos.

Abreviaturas utilizadas en la invención

VP = vinilpirrolidona o 1-vinilpirrolidin-2-ona

NIPAM = N-isopropilacrilamida

MPEG = Éster de anhídrido maleico y polietilenglicol

MBA = N,N'-metilenbisacrilamida

TMED = Tetrametiletilendiamina

APS = Persulfato de amonio

LCST = Temperatura inferior crítica de la solución

DSC = Calorimetría de exploración diferencial

TGA = Análisis termogravimétrico

CMC = Concentración micelar crítica

Breve Descripción de la Figuras

[0041]

Figura-1: El espectro ^{1}H-RMN del polímero de la presente invención.

Figura-2: El Espectro ^{13}C- RMN del polímero de la presente invención.

Figura-3: El espectro Infrarrojo de la Transformada de Fourier (FT-IR) del polímero de la presente invención.

Figura-4: Termograma de TGA del Polímero de la presente invención.

Figura-5: Termograma de DSC del polímero de la presente invención.

Figura-6: El Perfil Farmacocinético en Sangre del Polímero marcado con [^{14}C] de la presente invención.

Figura-7: Fotografías del sitio del Lóbulo de la Oreja de Conejo con tinción S&E después de 48 horas de la administración subcutánea de una solución de Dextrosa al 10% (Control).

Figura-8: Fotografías del sitio del Lóbulo de la Oreja de Conejo con tinción S&E después de 48 horas de la administración subcutánea de una solución acuosa del polímero de la presente invención.

Figura-9: Fotografías de Vena Marginal de la Oreja de Conejo con tinción S&E después de 24 horas de la administración intravenosa de una solución de dextrosa al 10% (Control).

Figura-10: Fotografías de Vena de la Oreja de Conejo con tinción S&E después de 24 horas de la administración intravenosa de una solución acuosa del polímero de la presente invención.

Figura-11: Una representación de un método típico para la preparación y administración a pacientes que lo necesitan de la Composición Farmacéutica en Nanopartículas que no forma parte de la invención.

Sumario de la invención

[0042] En su empeño, los inventores de la presente invención han descubierto que todos los objetivos fijados se pueden conseguir, resolviéndose la mayoría, si no todas las limitaciones de la técnica anterior.

[0043] En primer lugar, los inventores de la presente invención han descubierto que puede obtenerse un polímero que comprende una unidad monomérica tanto de NIPAM como de VP, en el que la cantidad de respectivos contaminantes monoméricos individuales en el polímero obtenido de esta manera está por debajo de los límites tóxicos preestablecidos.

[0044] En particular, los inventores de la presente invención han descubierto que puede obtenerse un polímero que comprende NIPAM, VP y MPEG como unidades monoméricas, sustancialmente libre de contaminantes monoméricos de NIPAM y VP tóxicos. Específicamente, los inventores de la presente invención han descubierto que puede obtenerse un polímero de este tipo, con alta pureza y que contiene dichos contaminantes de NIPAM y VP en niveles muy inferiores al 0,001% p/p.

[0045] El polímero que tiene las características deseadas podría obtenerse a través de un método altamente selectivo, que comprende someter una solución acuosa que contiene el polímero obtenido por polimerización de NIPAM, VP y MPEG a una etapa de diafiltración o ultrafiltración, a diferencia de los métodos de diálisis, como se enseñaba en la técnica anterior.

[0046] Por una comparación de los monómeros residuales contenidos en los respectivos polímeros, como se resume en la Tabla-II, podría entenderse que el polímero obtenido mediante el método de la presente invención es superior a los métodos de la técnica anterior, especialmente el método descrito en el documento US 6.322.817, que implica una etapa de diálisis.

Tabla-II: Comparación De Los Contaminantes Monoméricos Contenidos En El Polímero Que Se Obtiene Mediante El Proceso Descrito En El Documento US 6.322.817, Que Utiliza Diálisis, Con el Polímero Obtenido Según La Presente Invención, Utilizando Diafiltración

Parámetro	***Polímero Obtenido Según El Método Del Documento US 6.322.817***	***Polímero Obtenido Según El Método De La Presente Invención***
NIPAM Residual	0,066 - 0,076 % p/p (660-760 ppm)	< 0,001% p/p (<10 ppm)
VP Residual	0,008 - 0,011 % p/p (80-110 ppm)	< 0,001% p/p (<10 ppm)

[0047] Cabe señalar que la diálisis es un proceso que implica la separación lenta de moléculas más pequeñas de moléculas más grandes o de sustancias disueltas de partículas coloidales en una solución mediante difusión selectiva a través de una membrana semipermeable. En un método típico de diálisis, la solución polimérica para la purificación está contenida en una membrana semipermeable y los solutos de bajo peso molecular (monómeros) se eliminan colocando un disolvente puro, generalmente agua, fuera de la membrana. Este disolvente se cambia de manera periódica o continua hasta que se reduce la concentración de solutos difundibles (monómeros como NIPAM y VP) en la solución que contiene el polímero.

[0048] A diferencia del método de diálisis, la técnica de diafiltración implica el flujo mecánico de líquido por medio de una bomba a través de la membrana, por medio de la cual el líquido se bombea en dirección tangencial (por esta razón la diafiltración se conoce como Filtración de Flujo Tangencial), a lo largo de la superficie de la membrana. Una presión aplicada fuerza a una parte del líquido a difundirse selectivamente a través de la membrana hasta el lado del filtrado. Los componentes poliméricos retenidos no se acumulan en la superficie de la membrana semipermeable.

[0049] A diferencia del método de diálisis, en el que la cantidad o volumen inicial de la solución acuosa del polímero recogida para la purificación permanece tal cual o se diluye al final o cuando termina dicha operación, en el método de diafiltración, por otro lado, dado que la solución acuosa del polímero se arrastra por el flujo tangencial, al mismo tiempo ocasiona la concentración de dicha solución que contiene el polímero, dando como resultado una solución más concentrada del polímero. Por ejemplo, cuando una solución que contiene, por ejemplo, 100 mg del polímero en 5 litros de agua se somete a diálisis y diafiltración, respectivamente, al final del primer método se obtiene una solución que contiene 100 mg de polímero en 4,5 a 5,5 litros de agua, mientras que al final del último método, se produce una reducción o concentración del volumen inicial, generalmente a un punto comprendido entre una cuarta parte y una sexta parte (de 1/4 a 1/6) del volumen inicial, y finalmente se obtiene una solución de 100 mg de polímero en aproximadamente de 0,8 a 1,3 litros de agua.

[0050] Además, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, en el método de diálisis, el disolvente mantenido fuera de la membrana que contiene la solución polimérica necesita cambiarse periódicamente o de manera continua manualmente, mientras que en el método de diafiltración no es preciso realizar ninguna operación manual de cambios periódicos o continuos de ningún disolvente. Esto hace que el primer método sea tedioso y requiera una supervisión manual durante la operación, mientras que el segundo método es completamente automático y está regulado y, por lo tanto, resulta menos tedioso y más conveniente al no requerir supervisión manual durante la operación.

[0051] Asimismo, en virtud de que el método de diafiltración es operativo en un entorno cerrado en comparación con el método de diálisis, que funciona en un entorno abierto, en el primer método es mínima o inexistente la posibilidad de contaminación microbiana y, por lo tanto, se clasificaría como una operación en condiciones asépticas, cumpliendo así las Buenas Prácticas de Fabricación y las Normas Reguladoras de todo el mundo.

[0052] Además, debido a que no solo implica operaciones manuales sino también el principio intrínseco bajo el cual funciona el método de diálisis, el ciclo de tiempo para una operación unitaria es largo y generalmente tarda aproximadamente de 24 a 36 horas. En cambio, el método de diafiltración, en virtud del principio intrínseco bajo el que funciona, requiere un ciclo de tiempo muy corto y generalmente tarda menos de una hora para finalizarse. En otras palabras, el método de diafiltración es al menos veinticinco (25) veces más rápido que el método de diálisis y, por lo tanto, es más adecuado para el campo industrial.

[0053] Aunque el método de diálisis requiere un ciclo de tiempo bastante más largo para su operación y finalización, otra desventaja intrínseca de dicho método es que solo permite purificar un volumen/cantidad pequeña de una solución polimérica. Estas limitaciones no existen en el método de diafiltración y, en general, permite purificar un mayor volumen/cantidad, por ejemplo, al menos cuatro o cinco veces más de solución. Por ejemplo, si el método de diálisis tiene capacidad para purificar una solución de 100 g del polímero en 5,0 litros de agua en un ciclo, con el método de diafiltración es posible purificar entre 400 y 500 g de polímero en 20,0 a 25,0 litros de agua. No es necesario mencionar que la mayor capacidad de procesamiento del método de diafiltración es otra ventaja que ofrece además de las ya descritas anteriormente en el presente documento, es decir, un menor tiempo de operación, una operación automática y controlada, más comodidad y menos trabajo, concentración o reducción concurrente en el volumen de la solución inicial, cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación y las Normas Reguladoras, contaminación microbiana mínima o inexistente, etc.

[0054] Sin embargo, como se ha mencionado y analizado anteriormente en el presente documento, la ventaja más importante que el tiene método de diafiltración en comparación con el método de diálisis, es la pureza del polímero obtenido en cada uno de estos métodos, produciendo el primer método un polímero sustancialmente libre de contaminantes monoméricos y, por lo tanto, no tóxico y seguro para el consumo humano y animal (véase la Tabla-III).

[0055] Por último, pero no menos importante, otra ventaja intrínseca del método de diafiltración es que si se necesita/requiere aislar el polímero en forma sólida de la solución mediante la evaporación del disolvente, por ejemplo mediante liofilización, entonces, en virtud de dicho método que da como resultado una reducción o concentración del volumen inicial de la solución polimérica, generalmente, a un punto de aproximadamente una cuarta parte a una sexta parte (1/4 a 1/6) del volumen inicial, también se reduciría espectacularmente el ciclo de tiempo de evaporación/liofilización. En el método de diálisis, como no tiene lugar una reducción o concentración del volumen inicial, si se requiriera/necesitara aislar el polímero en forma sólida a partir de la solución, el ciclo de tiempo de evaporación/liofilización sería mucho mayor.

[0056] En resumen, en comparación con el método de diálisis, el método de diafiltración se puede aumentar a escala fácilmente hasta procesos de fabricación de gran tamaño, cumpliendo con las Buenas Prácticas de Fabricación y, por lo tanto, es industrialmente más viable y adecuado.

[0057] Las diferencias esenciales entre los métodos de diafiltración y diálisis se resumen en la Tabla-III, que se muestra como referencia rápida.

[0058] Aunque, en alguna medida, la técnica de diafiltración o ultrafiltración se aplica a varias purificaciones, sin embargo, su aplicación en el campo de los polímeros no se ha presentado hasta este momento y esto constituye el aspecto novedoso e inventivo de la presente invención.

[0059] Además, los inventores de la presente invención han caracterizado adicionalmente el polímero de alta pureza y sustancialmente libre de contaminantes monoméricos obtenido de esta manera, mediante varios métodos espectroscópicos como ^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN y espectroscopia Infrarroja de la transformada de Fourier (FT-IR) y han descubierto que tiene la estructura (I) que se muestra a continuación en el presente documento.

Además, en base a los estudios con polímeros radiomarcados en ratones Swiss albinos del sexo masculino, como resultaría evidente por los detalles que se exponen más adelante en la última parte de esta memoria descriptiva [véanse las Tablas-VI y VII y la Figura 6], se ha descubierto que el polímero de la presente invención no es biodegradable y se elimina rápidamente del cuerpo sin depositarse y degradarse en órganos vitales, lo cual sugiere la seguridad y utilidad del polímero para uso en animales/seres humanos.

Tabla-III: Comparación De Los Métodos De Diálisis y De Diafiltración En La Purificación De Una Solución Acuosa Del Polímero De La Presente Invención

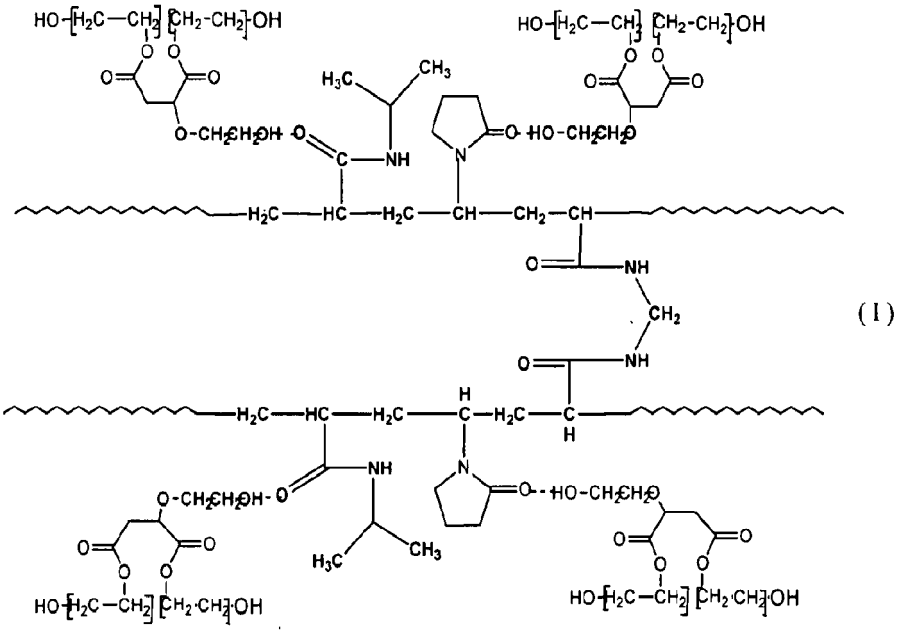
Parámetro	***Método de Diálisis***	***Método de Diafiltración***
Tamaño de Lote	Limitado, por lo que representa una desventaja (por ejemplo 100 g de polímero en 5 litros de agua)	Puede procesarse al menos 4 a 5 veces el Volumen/Cantidad (por ejemplo de 400 a 500 g de Polímero en 20,0 a 25,0 litros de agua)
Condiciones de Procesamiento	Ambiente Abierto	Ambiente Cerrado
Tiempo de Procesamiento	Duración (de 24 a 36 Horas)	Más Corto (< 1 Hora)
Operación y Conveniencia	Manual; Tedioso; Menos Conveniente	Automatizado y Controlado; Menos Tedioso; Muy Conveniente
Contaminación Microbiana	Posibilidades Altas	Mínimas o Inexistentes
Reducción/Concentración del Volumen Inicial de la Solución	Ninguna	Entre una cuarta y una sexta parte (de 1/4 a 1/6)
Ciclo de Tiempo de Liofilización de la Solución	Duración (90 - 110% del Volumen Inicial que se Liofiliza)	Más Corto (solo del 15 al 25% del Volumen inicial que se Liofiliza)
Contaminación Monomérica	Muy Alta	Por Debajo de los Límites de las Farmacopeas y Límites Tóxicos
Aumento a Escala y Viabilidad Industrial	Difícil; Menos Viable	Fácilmente aumentable a Escala; Cumple con las Buenas Prácticas de Fabricación, Muy Viable

[0060] Además, en base a los estudios de toxicidad extensos, tales como Toxicidad Localizada (Subcutánea e Intravenosa), Toxicidad de la Dosis en Órganos Diana de hasta 800 mg/kg de peso corporal en animales, Toxicidad de la Dosis en Ciclos de Seis Meses, etc., resultaría evidente por los detalles dados en la última parte de esta memoria descriptiva (hágase referencia a las Figuras 7 a 10), se ha descubierto que el polímero de la presente invención no es tóxico, es biocompatible y biológicamente seguro para su uso en composiciones farmacéuticas comercializables para su uso y administración humano y animal.

[0061] También se ha descubierto que el polímero de la presente invención, que es de alta pureza y sustancialmente libre de contaminantes monoméricos, es además biocompatible, no es biodegradable, es seguro y no es tóxico. Además, es particularmente útil en la preparación de composiciones farmacéuticas que comprenden

dicho polímero en forma de nanopartículas, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, que a su vez son seguros y menos tóxicos para su uso y administración humano y animal.

[0062] Especialmente, se ha descubierto, que el polímero biocompatible, no biodegradable, seguro y no tóxico de la presente inmoviliza por completo, o casi por completo, en su carcasa polimérica, un gran número de fármacos o compuestos poco solubles en agua y disponibles en forma de nanopartículas con tamaños de partícula entre 30-150 nm.

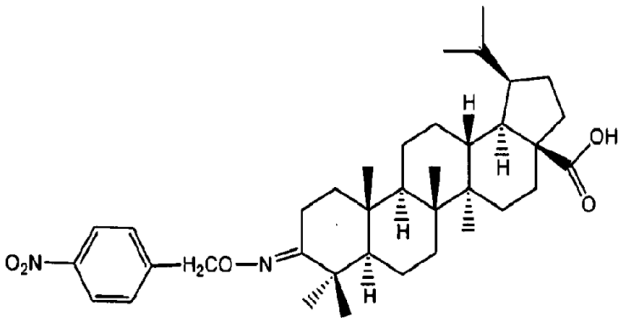


(I)

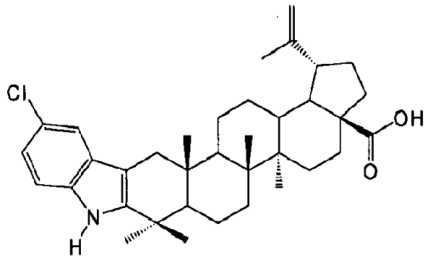
Estructura del polímero de la presente invención

[0063] En particular, se ha descubierto que era posible utilizar el polímero de la presente invención para preparar una composición farmacéutica en forma de nanopartículas, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables que inmovilizan por completo, o casi por completo, en su carcasa polimérica, un gran número de fármacos o compuestos poco solubles en agua. Estos fármacos o compuestos poco solubles en agua son aquellos que tienen una solubilidad en agua de menos de 10 mg/ml. Los ejemplos de estos fármacos o compuestos poco solubles en agua incluyen, aunque sin limitación: agentes anticancerosos, agentes antiinflamatorios, agentes antifúngicos, antieméticos, agentes antihipertensivos, hormonas sexuales, esteroides, antibióticos, inmunomoduladores, anestésicos, etc. Los ejemplos típicos de agentes anticancerosos que pueden quedar inmovilizados en la carcasa polimérica son: Paclitaxel, Docetaxel y otros derivados de taxano relacionados; Irinotecán, Topotecán y otros derivados de la Camptotecina relacionados; Doxorrubicina, Daunomicina y otros derivados de Antraciclina relacionados; Cisplatino, Oxaliplatino; 5-Fluorouracilo; Mitomicina; Metotrexato; Etopósido; Ácido Betulínico y sus derivados; y Wedelolactona y sus derivados. Los ejemplos típicos de agentes antiinflamatorios que pueden quedar inmovilizados en la carcasa polimérica incluyen: Indometacina, Ibuprofeno, Ketoprofeno, Flubiprofeno, Piroxicam, Tenoxicam y Naproxeno. Los ejemplos típicos de agentes antimicóticos que pueden quedar inmovilizados en la carcasa polimérica incluyen: Ketoconazol y Anfotericina B. Los ejemplos típicos de hormonas sexuales que pueden quedar inmovilizadas en la carcasa polimérica incluyen: Testosterona, Estrógeno, Progesterona y Estradiol. Los ejemplos típicos de esteroides que pueden quedar inmovilizados en la carcasa polimérica incluyen: Dexametasona, Prednisolona y Triamicinolona. Los ejemplos típicos de agentes antihipertensivos que pueden quedar inmovilizados en la carcasa polimérica incluyen Captopril, Ramipril, Terazosín, Minoxidil y Parazosín. Los ejemplos típicos de antieméticos que pueden quedar inmovilizados en la carcasa polimérica incluyen: Ondansetrona y Granisetrona. Los ejemplos típicos de antibióticos que pueden quedar inmovilizados en la carcasa polimérica incluyen Metronidazol y ácido Fusídico. Los ejemplos de inmunomoduladores que pueden quedar inmovilizados en la carcasa polimérica incluyen: Ciclosporina y ácido Bifenil-Dimetil-dicarboxílico. Los ejemplos típicos de anestésicos que pueden quedar inmovilizados en la carcasa polimérica incluyen: Propofol, Alfaxalona y Hexobarbital.

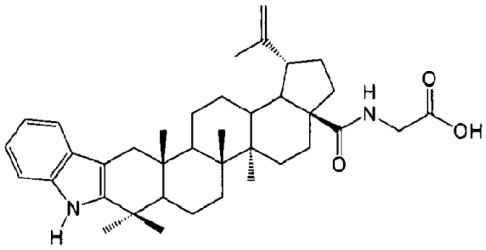
[0064] En relación con los agentes anticancerosos en particular, se ha descubierto que el polímero de la presente invención es capaz de inmovilizar por completo en su carcasa polimérica, fármacos o compuestos poco solubles en agua, como Paclitaxel, Docetaxel, Etopósido, y diversos derivados de ácido Betulínico, tales como los designados como MJ-1098, DRF-4012 y DRF-4015, que tienen las siguientes estructuras (II), (III) y (IV), que a su vez se describen en el documento US 6.403.816 y en nuestra Solicitud de Patente pendiente de India Nº 265/DEL/2005, presentada el 9 de febrero de 2005.



MJ-1098 (II), según se describe en el documento US 6.403.816



DRF-4012 (III), según se describe en la Solicitud de Patente de India Nº 265/DEL 2005



DRF-4015 (IV), según se describe en la Solicitud de Patente de India Nº 265/DEL 2005

[0065] Se ha descubierto que las composiciones farmacéuticas de nanopartículas de los fármacos o compuestos poco solubles en agua mencionadas anteriormente en el presente documento , y especialmente las composiciones farmacéuticas de nanopartículas de los fármacos o compuestos poco solubles en agua como Paclitaxel, Docetaxel y Etopósido y compuestos anticancerosos potentes como MJ-1098, DRF-4012 y DRF-4015, mencionados anteriormente en el presente documento, tienen una mayor estabilidad de más de 24 horas, en comparación con las composiciones farmacéuticas de nanopartículas de Paclitaxel, preparadas según el método de Burman et al., descrito en el documento US 6.365.191, que, como se reivindica en dicha patente, tiene una estabilidad de tan solo 12 horas. La referencia al término “estabilidad” se debe interpretar como el periodo en horas durante el cual un fármaco o compuesto poco soluble en agua permanece en solución en la composición farmacéutica que lo comprende, sin ninguna precipitación del fármaco o compuesto en la misma.

[0066] Además, en las composiciones farmacéuticas de nanopartículas de fármacos o compuestos poco solubles en agua, mencionadas anteriormente en el presente documento, y especialmente en las composiciones farmacéuticas de nanopartículas de los fármacos o compuestos poco solubles en agua como Paclitaxel, Docetaxel y Etopósido y compuestos anticancerosos potentes como MJ-1098, DRF-4012 y DRF-4015 mencionados anteriormente en el presente documento, se ha descubierto que dichos fármacos o compuestos quedan inmovilizados en la micela polimérica en una proporción mayor del 95%, incluso después de 24 horas. En comparación, en una composición farmacéutica de nanopartículas de Paclitaxel preparada según el método de Burman et al, que se describe en el documento US 6.365.191, se ha descubierto que el fármaco quedaba inmovilizado en la micela polimérica en una proporción de tan solo el 90%, incluso después de 24 horas.

[0067] En una comparación de las composiciones farmacéuticas de fármacos o compuestos poco solubles en agua en forma de nanopartículas, que comprenden el polímero de alta pureza y sustancialmente libre de contaminantes monoméricos de la presente invención, con la composición farmacéutica de Paclitaxel, también en forma de nanopartículas, según se describe en el documento US 6.365.191, resultaría evidente a partir de la comparación resumida en la Tabla IV.

Tabla IV: Comparación de la composición farmacéutica de fármacos o compuestos poco solubles en agua de la presente invención con la composición farmacéutica descrita en el documento US 6.365.191

Nº de jeringa	***Detalles***	***Divulgación contenida en el documento US 6.65.91***	***Presente invención***
1	Fármacos o compuestos poco solubles en agua mencionados	Derivados de Taxano, particularmente Paclitaxel	Un gran número de fármacos y compuestos
2	El polímero utilizado en la composición farmacéutica	Comprende unidades monoméricas de NIPAM, VP y MPEG	Comprende unidades monoméricas de NIPAM, VP y MPEG
3	Contaminantes monoméricos presentes en el polímero	NIPAM: 0,066-0,076% p/p VP: 0,008-0,011 % p/p	NIPAM: < 0,001% p/p VP: < 0,001% p/p
4	Tamaño de las nanopartículas en la composición farmacéutica	No especificado	30-150 nm
4	Estabilidad	Aproximadamente 12 horas	> 24 Horas
5	Inmovilización del fármaco en la micela polimérica después de 24 horas	90%	> 95%

[0068] Además de las ventajas que tienen, no solo del polímero de alta pureza y sustancialmente libre de contaminantes monoméricos obtenido por el método de la presente invención, sino también las ventajas de las composiciones farmacéuticas de los fármacos o compuestos poco solubles en agua, que comprenden el polímero de la presente invención, sobre las composiciones farmacéuticas de la técnica anterior, como se ha descrito más detalladamente anteriormente en el presente documento, los inventores de la presente invención, además descubrieron un método altamente selectivo para la preparación de composiciones farmacéuticas de los fármacos o compuestos poco solubles en agua, en el que dicho fármaco o compuesto poco soluble en agua queda inmovilizado en la carcasa polimérica del polímero utilizado en el mismo, se produce en forma de nanopartículas de tamaño consistente. Este método altamente selectivo constituye otro aspecto inventivo de la presente invención.

[0069] En primer lugar, puede indicarse que, a partir de la descripción contenida en los Ejemplos 1 a 40 y bajo los encabezados “La composición preferida” y “Formulación para infusión” en el documento US 6.365.191 de Burman et al, la composición farmacéutica de Paclitaxel se prepara, aparentemente, disolviendo en primer lugar la cantidad necesaria del polímero en una cantidad necesaria de un líquido de dilución (por lo general, una solución al 5% de dextrosa o al 10%), seguido de la adición de un tensioactivo aniónico para obtener una solución transparente, cuyo pH se ajusta de manera opcional, con un agente tamponante. A continuación, a la solución transparente resultante del polímero y el tensioactivo aniónico en el líquido de dilución, se añade una solución alcohólica de Paclitaxel para obtener concentraciones variables del fármaco, que van de 0,1 a 10 mg/ml, que se reivindica esencialmente que es la composición farmacéutica en forma de nanopartículas útil para su administración.

[0070] Como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, el documento US 6.365.191 no habla del tamaño aproximado de las nanopartículas que se obtienen de esta manera, sin embargo, los inventores de la presente invención han descubierto, que con los Ejemplos 1 a 40 y bajo los encabezados “La composición preferida” y “Formulación para infusión” en el documento US 6.365.191 de Burman et al, se producen nanopartículas de tamaños inconsistentes al tratar de preparar una composición farmacéutica de Paclitaxel.

[0071] En este contexto, los inventores de la presente invención han descubierto que la producción de nanopartículas de tamaños consistentes era altamente selectiva y dependía en gran medida de lo siguiente:

i) la proporción en la que se añade una solución alcohólica de Paclitaxel a una solución del polímero y otros excipientes en el líquido de dilución;
ii) el volumen de la solución alcohólica de Paclitaxel y el volumen de líquido de dilución, al que se añade el primero;
iii) el diámetro interno o el tamaño del agujero de la aguja a través de la cual se añade la solución alcohólica del Paclitaxel a una solución del polímero y los excipientes farmacéuticamente aceptables en el líquido de dilución; y
iv) la posición del recipiente, que contiene el líquido de dilución y el polímero y los excipientes farmacéuticamente aceptables en el momento en que se añade la solución alcohólica de Paclitaxel.

[0072] En particular, los inventores de la presente invención han descubierto que solo a través de:

a) adición de una solución alcohólica de Paclitaxel a través de una jeringa a una solución del polímero y otros excipientes en el líquido de dilución en un periodo de tiempo específico;
b) utilización de una aguja que tiene un diámetro interno de entre 0,305 mm a 0,356 mm, para adición de un volumen menor de la solución alcohólica de Paclitaxel a la solución del polímero y excipientes farmacéuticamente aceptables en el líquido de dilución; o
c) utilización de una aguja que tenga un diámetro interno de entre 0,559 a 0,711 mm, para adición de un volumen mayor de solución alcohólica de Paclitaxel a la solución del polímero y excipientes farmacéuticamente aceptables en el líquido de dilución;
d) inyección de una solución alcohólica de Paclitaxel a la solución del polímero y otros excipientes en el líquido de dilución, en la que la aguja de la jeringa a través de la cual se añade la solución alcohólica de Paclitaxel permanecerá sumergida en la solución del líquido de dilución; y
e) opcionalmente, manteniendo el recipiente que contiene dicho líquido de dilución en una posición invertida durante la inyección de la solución alcohólica de Paclitaxel a la solución del polímero y otros excipientes en el líquido de dilución,
puede conseguirse la producción de nanopartículas de tamaño consistente, con mínima o nula variación de tamaño y carga consistente del fármaco, en la carcasa polimérica.

[0073] Además se ha descubierto que solo a través del método selectivo es posible lograr una mayor estabilidad de las composiciones farmacéuticas.

[0074] Además se ha descubierto que el método altamente selectivo mencionado anteriormente en el presente documento, no se limita a la producción de nanopartículas de Paclitaxel, sino que también es igualmente eficaz en la producción de nanopartículas de tamaños de partícula consistentes de otros fármacos o compuestos poco solubles en agua, especialmente Docetaxel, Etopósido, ácido Betulínico, derivados de ácido Betulínico, anticancerosos potentes derivados de ácido Betulínico como MJ-1098 de fórmula (II), DRF-4012 de fórmula (III) y DRF-4015 de fórmula (IV) mencionados anteriormente en el presente documento.

[0075] Particularmente, se ha descubierto que si el tiempo de adición de un volumen menor, por ejemplo entre 1 y 5 ml de la solución del fármaco o compuesto poco soluble en agua a una solución (de aproximadamente 35 veces el volumen inyectado) del polímero y otros excipientes en el líquido de dilución, excede un tiempo de 4 segundos, o si el diámetro interno de la aguja (a través de la cual se inyecta la solución del fármaco o compuesto poco soluble en agua) está fuera del intervalo de 0,305 a 0,356 mm, entonces dicha adición da como resultado la producción de nanopartículas de tamaños de partículas inconsistentes de los fármacos o compuestos poco solubles en agua, así como composiciones farmacéuticas que poseen poca estabilidad, lo que significa que la solución no permanece transparente durante periodos prolongados de tiempo, sino que se hace opalescente en periodos de tiempo más cortos.

[0076] Asimismo, se ha descubierto particularmente que, si el tiempo de adición de un volumen mayor de solución del fármaco o compuestos poco solubles en agua, por ejemplo entre 5 y 15 ml, la solución (aproximadamente 35 veces el volumen inyectado) del polímero y otros excipientes en el líquido de dilución, excede un tiempo de 10 segundos, o si el diámetro interno de la aguja (a través de la cual se inyecta la solución del fármaco o compuesto poco soluble en agua) está fuera del intervalo de 0,559 a 0,711 mm, entonces tal adición da como resultado la producción de nanopartículas de tamaños de partícula inconsistentes del fármaco o compuesto poco soluble en agua y también se produce una composición farmacéutica que posee baja estabilidad, lo que significa que la solución no permanece transparente durante periodos prolongados de tiempo, sino que se hace opalescente en periodos de tiempo más cortos.

[0077] Esto puede ejemplificarse con respecto a las composiciones farmacéuticas de dos fármacos o compuestos anticancerosos poco solubles en agua, por ejemplo Paclitaxel y un derivado de ácido Betulínico, DRF-4012 de fórmula (III), en el que el efecto del tiempo de adición de una solución de dichos fármacos y los diámetros internos de las agujas a través de las cuales se añaden dichas soluciones a la solución del polímero y excipientes farmacéuticamente aceptables en el líquido de dilución se resumen en la Tabla V.

[0078] La composición farmacéutica se presenta de manera conveniente como un kit de dos viales:

a) uno que comprende una solución de un fármaco o compuesto poco soluble en agua, en un disolvente miscible en agua, o mezclas de los mismos a una concentración adecuada del dicho fármaco; y
b) el otro que comprende una solución del polímero de la presente invención, de alta pureza y sustancialmente libre de contaminantes monoméricos, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables en un disolvente acuoso, generalmente agua de calidad para inyección, siendo ambos viales estériles y estando fabricados y envasados en condiciones asépticas.

[0079] Los contenidos de los dos viales se añaden al líquido de dilución antes de su administración en seres humanos o animales.

[0080] Opcionalmente, el kit puede comprender además un líquido de dilución, una jeringa y una aguja que tiene un diámetro interno en el intervalo de 0,305 a 0,356 mm, si va a añadirse un volumen pequeño del vial a), por ejemplo 1-5 ml, a aproximadamente 35 veces su volumen de los contenidos del vial b), o una jeringa y una aguja que tiene un diámetro de 0,559 a 0,711 mm, si va a añadirse un volumen mayor de los contenidos del vial a), por ejemplo 10-15 ml, a aproximadamente 35 veces su volumen de los contenidos del vial b).

[0081] Especialmente en el caso de un kit que comprende Paclitaxel, para la administración en pacientes para el tratamiento del cáncer de mama, el kit de dos viales comprenderá:

a) un vial que contiene una solución de 400 mg de Paclitaxel en 20 ml de etanol;
b) el otro que contiene una solución de 200 mg del polímero de la presente invención, de alta pureza y sustancialmente libre de contaminantes monoméricos, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables en 20 ml de agua, y
opcionalmente, el kit puede comprender también un frasco de 500 ml de una solución al 10% de dextrosa, y una jeringa y una aguja que tiene un diámetro interno de 0.711 mm, para inyectar la solución del vial a) en el frasco de 500 ml de la solución de dextrosa al 10%, a la que se ha añadido la solución del vial b) en un periodo de tiempo que no mayor de 10 segundos, preferentemente en un periodo de tiempo de 6 segundos, para producir una composición farmacéutica adecuada para administración nanopartículas de tamaños de partícula consistentes, con variaciones mínimas o insignificantes de tamaño, y con una carga consistente del fármaco, en la carcasa polimérica, y mayor estabilidad.

Tabla-V: Efecto del tiempo durante el cual se añade una solución de fármacos o compuestos poco solubles en agua y el diámetro interno de las agujas a través de las cuales se añaden dichas soluciones a una solución del polímero y otros excipientes en un líquido de dilución.

Nº de jeringa	***Fármaco o compuesto poco soluble en agua, disolvente en el que se disuelve y volumen de la solución inyectada***	***Diámetro interno (en mm) de la aguja a través de la cual se añade la solución de fármaco o compuesto poco soluble en agua a la solución del polímero y excipientes en un líquido de dilución***	***Tiempo de adición (en s.) de la solución del fármaco o compuesto poco soluble en agua a la solución del polímero y excipientes en un líquido de dilución (ml)***	***Observaciones y Resultados***		
				Tamaño de partícula medio (nm)	***Estabilidad (h)***	***Transparencia de la solución***
1	Paclitaxel/ Etanol (1 ml)	0,305	3 s/≈35 ml	80	>24	Transparente
2	Paclitaxel/ Etanol (1 ml)	0,467	2 s/≈35 ml	90	20	Opalescencia muy ligera
3	Paclitaxel/ Etanol (1 ml)	0,711	2 s/≈35 ml	135	<10	Opalescencia ligera
4	Paclitaxel/ Etanol (1 ml)	1,270	2 s/≈35 ml	270	<4	Opalescente
5	Paclitaxel/ Etanol (1 ml)	0,305	6 s/≈35 ml	240	<4	Opalescencia ligera.
6	Paclitaxel/ Etanol (1 ml)	0,467	6 s/≈35 ml	280	<2	Muy opalescente
7	Paclitaxel/ Etanol (1 ml)	0,711	6 s/≈35 ml	285	<2	Muy opalescente
8	Paclitaxel/ Etanol (1 ml)	1,270	6 s/≈35 ml	2300	<0,5	Lechosa

Nº de jeringa	***Fármaco o compuesto poco soluble en agua, disolvente en el que se disuelve y volumen de la solución inyectada***	***Diámetro interno (en mm) de la aguja a través de la cual se añade la solución de fármaco o compuesto poco soluble en agua a la solución del polímero y excipientes en un líquido de dilución***	***Tiempo de adición (en s.) de la solución del fármaco o compuesto poco soluble en agua a la solución del polímero y excipientes en un líquido de dilución (ml)***	***Observaciones y Resultados***		
				Tamaño de partícula medio (nm)	***Estabilidad (h)***	***Transparencia de la solución***
9	DRF-4012 de Fórmula (III)/ Etanol (1 ml)	0,305	3 s/≈35 ml	70	>24	Transparente
10	DRF-4012 de Fórmula (III)/ Etanol (1 ml)	0,465	2 s/≈35 ml	90	20	Opalescencia muy ligera
11	DRF-4012 de Fórmula (III)/ Etanol (1 ml)	0,711	2 s/≈35 ml	100	<10	Opalescencia ligera
12	DRF-4012 de Fórmula (III)/ Etanol (1 ml)	1,270	2 s/≈35 ml	130	<6	Opalescente
13	DRF-4012 de Fórmula (III)/ Etanol (1 ml)	0,305	6 s/≈35 ml	200	<6	Opalescencia ligera
14	DRF-4012 de Fórmula (III)/ Etanol (1 ml)	0,467	6 s/≈35 ml	200	<4	Muy opalescente
15	DRF-4012 de Fórmula (III)/ Etanol (1 ml)	0,711	6 s/≈35 ml	240	<2	Muy opalescente
16	DRF-4012 de Fórmula (III)/ Etanol (1 ml)	1,270	6 s/≈35 ml	8100	<0,5	Lechosa
17	Paclitaxel/ Etanol (15 ml)	0,711	10 s/≈500 ml	85	>24	Transparente
18	Paclitaxel/ Etanol (15 ml)	0,711	15 s/≈500 ml	150	<15	Opalescencia ligera
19	Paclitaxel/ Etanol (15 ml)	0,330	18 s/≈500 ml	150	20	Transparente

[0082] En resumen, la presente invención, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, representa un avance en la búsqueda de una respuesta a la mayoría, si no todas las limitaciones de los métodos y técnicas anteriores en el campo de la tecnología de nanopartículas y proporciona:

i) un polímero que comprende tres unidades monoméricas seleccionadas de entre (NIPAM, VP y MPEG, de alta pureza y sustancialmente libres de contaminantes monoméricos, con un nivel tóxico de NIPAM y VP en el polímero <0,001%; que, además, se ha clasificado como biocompatible, no biodegradable, seguro y no tóxico para su uso en seres humanos y animales;

ii) un método altamente selectivo para la preparación del polímero que comprende tres unidades monoméricas seleccionadas entre NIPAM, VP y MPEG, de alta pureza y sustancialmente libres de contaminantes monoméricos, con un nivel de toxicidad de NIPAM y VP en el polímero <0,001%, que comprende someter una solución acuosa del polímero preparado de esta manera a diafiltración;

iii) Una composición farmacéutica de fármacos o compuestos poco solubles en agua en forma de nanopartículas, que comprende el polímero de alta pureza y sustancialmente libre de contaminantes monoméricos, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, que es segura y no tóxica y, por tanto,

adecuada para su uso y administración en seres humanos y animales;
iv) Un método altamente selectivo para la producción de una composición farmacéutica de fármacos o compuestos poco solubles en agua en forma de nanopartículas, que comprende el polímero de alta pureza y sustancialmente libre de contaminantes monoméricos junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, que tiene tamaños de partícula consistentes de las nanopartículas y una carga de fármaco consistente; y
v) Una composición farmacéutica de fármacos o compuestos poco solubles en agua en forma de nanopartículas, que comprende el polímero de alta pureza y sustancialmente libre de contaminantes monoméricos junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, que tiene tamaños de partícula consistentes de las nanopartículas con mayor carga de fármaco y una mayor estabilidad.

Descripción detallada de la invención

A. Preparación del polímero de la presente invención

[0083] El polímero de la presente invención comprende tres de las unidades monoméricas seleccionadas entre NIPAM, VP y MPEG, en las que las cadenas poliméricas están reticuladas con un agente reticulante, que no contiene ningún grupo sulfhidrilo ni enlaces disulfuro.

[0084] El agente reticulante desempeña un papel importante durante la polimerización, ya que proporciona reticulaciones en las cadenas poliméricas lineales y siempre que se utiliza es, en general, un derivado de vinilo bifuncional. Puede ser más que bifuncional, es decir, puede tener más de dos sitios reactivos. Un derivado de vinilo bifuncional preferido que puede emplearse ventajosamente es N, N'-metilenbisacrilamida (MBA).

[0085] El polímero de la presente invención puede prepararse por métodos generales normalmente adoptados para reacciones de polimerización.

[0086] En una realización particular, el polímero de la presente invención puede prepararse sometiendo los monómeros de N-isopropilacrilamida (NIPAM), 1-vinil-2-pirrolidona (VP) y polietilenglicol (peso molecular 6000) éster de anhídrido maleico (MPEG) para una polimerización de radicales libres en presencia de un activador, un iniciador de polimerización y un agente reticulante en un medio acuoso.

[0087] Podría utilizarse una combinación de monómeros, N-isopropil acrilamida (NIPAM) y Vinilpirrolidona (VP) en una proporción en peso que varíe entre 55:22 a 65:35, mientras que la composición comonomérica de (NIPAM + VP): MPEG que puede emplearse está en el intervalo de 80:20 a 95:5. Preferentemente, y más particularmente, se emplea una combinación de monómeros de N-isopropil acrilamida (NIPAM) y Vinilpirrolidona (VP) en una proporción en peso que varía de 58:32 a 62:28 y la composición comonomérica de (NIPAM + VP): MPEG empleada está en el intervalo de 90:10 ó 95:5, lo cual se ha descubierto que confiere el perfil de biocompatibilidad, no biodegradabilidad y de seguridad biológica deseado a los polímeros, ya que esta proporción particular da como resultado, sistemáticamente, la formación de una unidad co-polimérica aleatoriamente hiper-ramificada de NIPAM y VP, que se estabilizan gracias a una capa externa de recubrimiento formada a partir de enlaces de hidrógeno mediante el aducto diéster (mayor) y aducto monoéster (menor) del anhídrido maleico - polietilenglicol (MPEG).

[0088] Los iniciadores de polimerización juegan un papel importante en la iniciación de la formación de radicales libres. Los iniciadores que pueden utilizarse pueden ser compuestos de peróxido, tales como peróxido de diacilo, peróxido de benzoílo, peróxido de diacetilo, peróxidos de dialquilos, peróxido de butilo terciario y peróxido de amilo terciario o bien, puede tratarse de iniciadores de polimerización a base de nitrilo como 2,2'-azo-bis-isobutironitrilo (AIBN) o iniciadores de polimerización basados en sales inorgánicas, tales como perdisulfato de amonio o perdisulfato de amonio (APS), usados por separado o en combinación.

[0089] Entre los iniciadores de polimerización mencionados anteriormente, se prefiere el persulfato de amonio (APS).

[0090] Aunque los iniciadores de polimerización inician este proceso, sin embargo, se ha descubierto que la reacción de polimerización se acelera por la presencia de agentes activadores (conocidos a menudo como Activadores) que catalizan la formación de radicales libres a partir de iniciadores de polimerización. Dichos activadores pueden seleccionarse entre tetrametiletilen-diamina (TMED) y sulfato de amonio ferroso (FAS), pero se prefiere la combinación de TMED y FAS. En la reacción de polimerización puede emplearse cualquier combinación del iniciador de polimerización y el activador. También es posible usar dos o más iniciadores. De manera similar, pueden emplearse dos o más activadores.

[0091] Como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, el agente reticulante desempeña un papel importante durante la polimerización, proporcionando reticulaciones en las cadenas poliméricas lineales y generalmente se trata de un derivado de vinilo bifuncional, si se utiliza alguno. Puede ser más que bifuncional, es decir puede tener más de dos sitios reactivos. Un derivado preferido de vinilo funcional que puede usarse es N, N'-metilen-bis-acrilamida (MBA).

[0092] La polimerización se realiza en presencia de un gas inerte, que puede ser nitrógeno o argón.

[0093] Generalmente, la reacción de polimerización se realiza disolviendo en primer lugar cantidades adecuadas de los respectivos monómeros, es decir, N-isopropilacrilamida (NIPAM), 1-vinil-2-pirrolidona (VP) y polietilenglicol (peso molecular 6000) éster de anhídrido maleico (MPEG) en un disolvente acuoso, que por lo general es agua. A la solución acuosa de los respectivos monómeros obtenidos de esta manera, se añade sucesivamente una solución acuosa de un agente reticulante y un activador. La solución se des-oxigena burbujeando un gas inerte durante aproximadamente 30 a 60 minutos. A la solución des-oxigenada se le añade una solución acuosa de iniciadores de polimerización y se somete a polimerización a una temperatura de entre 25 ºC a 45 ºC, preferentemente a una temperatura entre 25 ºC a 35ºC con burbujeo continuo de gas inerte durante un periodo de tiempo hasta completar la polimerización.

[0094] El agente reticulante puede emplearse en cantidades en el intervalo de entre 1,3 - 1,5% p/p del contenido total de monómeros y más preferentemente en el intervalo entre 1,35 - 1,4% p/p del contenido total de monómeros.

[0095] Es posible emplear activadores en cantidades en el intervalo de 15 - 18% p/p del contenido total de monómeros y más preferentemente en el intervalo entre 15 - 16% p/p del contenido total de monómeros.

[0096] El iniciador de polimerización puede emplearse en cantidades en el intervalo de entre 20% - 30% p/p del contenido total de monómeros y más preferentemente en el intervalo de entre 23 - 25% p/p del contenido total de monómeros.

[0097] El avance de la reacción de polimerización se controla mediante HPLC y normalmente finaliza en aproximadamente 3 - 6 horas.

[0098] Después de finalizar la reacción de polimerización, la solución se somete a filtración a través de filtros de cápsula de membrana de polietersulfona de 2,54 cm (1") previamente esterilizados, desechables, de 0,2 mm, con tamaños de poro de 0,8 y 0,2 µm; del Tipo DPS-5101AA-201 (fabricante: M/s Advanced Microdevices Pvt Ltd, India). Los contenidos filtrados del recipiente de reacción se someten a diafiltración usando un dispositivo de diafiltración Proflux M12 (Millipore) para retirar los contaminantes monoméricos y otras impurezas de bajo peso molecular.

[0099] Por lo general, la diafiltración finaliza en menos de una hora y normalmente da como resultado, no sólo una solución sustancialmente sin contaminantes monoméricos, sino también una forma concentrada, normalmente de una cuarta a una o sexta (1/4 a 1/6) parte del volumen inicial de la solución sometida a diafiltración. Si fuera necesario, la solución concentrada obtenida de esta manera, que carece de contaminantes monoméricos, puede someterse a otro ciclo de diafiltración. La solución concentrada del polímero de la presente invención de alta pureza y sustancialmente sin contaminantes monoméricos puede someterse a una etapa de liofilización para obtener el polímero en forma sólida liofilizada, para la utilización en composiciones farmacéuticas o la solución concentrada como tal puede utilizarse directamente para la formulación de dichas composiciones farmacéuticas.

[0100] En una realización típica de la presente invención, la reacción de polimerización se realiza disolviendo una cantidad apropiada de los respectivos monómeros, es decir, N-isopropilacrilamida (NIPAM), 1-vinil-2-pirrolidona (VP) y polietilenglicol (peso molecular 6000) éster de anhídrido maleico (MPEG) en agua. A la solución acuosa de los monómeros obtenidos de esta manera se la añade un volumen de solución acuosa (aproximadamente 5% p/v) de un agente reticulante, N,N'-metilen-bis-acrilamida (aproximadamente 1,37% p/p del contenido total de monómeros) y una combinación de activadores, que comprende un volumen apropiado de Tetrametiletilendiamina (TMED, aproximadamente el 15,4% p/p del contenido total de monómeros) y una solución acuosa (0,5% p/v) de sulfato de amonio ferroso (aproximadamente 0,1% p/p del contenido total de monómeros). Es preferible añadir primero uno de los activadores y el otro se añade posteriormente, junto con el iniciador de la polimerización. La solución se des-oxigena aplicando burbujas de nitrógeno durante 30 minutos, aproximadamente. A la solución des-oxigenada se la añade un volumen apropiado de una solución acuosa (aproximadamente 80% p/v) de iniciadores de polimerización, Persulfato de amonio (aproximadamente 24% p/p del contenido total de monómeros) y la solución se somete a polimerización, a una temperatura preferentemente de entre 25° a 35 ºC con burbujeo continuo de nitrógeno, durante un periodo de tiempo necesario para finalizar la polimerización. Normalmente, la reacción de polimerización finaliza en 3-5 horas.

[0101] Una vez finalizada la polimerización, la solución se somete a filtración a través de un filtro de cápsula con una membrana de polietersulfona de 1 pulgada, previamente esterilizada y desechable de 0,2 µm (tamaño de poro 0,8 + 0,2 µm). El contenido del filtrado del recipiente de reacción se somete a diafiltración para retirar los contaminantes monoméricos y otras impurezas de bajo peso molecular.

[0102] En una realización típica de la presente invención, podría someterse a diafiltración una solución del polímero en agua, a una concentración de, por ejemplo, 1 g en 50 ml, con lo cual, después de la diafiltración, se obtiene una solución concentrada del polímero en aproximadamente de una cuarta a una sexta parte (1/4 a 1/6) del volumen inicial, es decir, 1 g del polímero en aproximadamente 12-13 ml de agua, lo cual contiene menos del 0,001% p/p

tanto de NIPAM como de VP.

[0103] La detección y cuantificación de los monómeros residuales, especialmente VP y NIPAM residuales, en el polímero, se realiza por HPLC. El sistema HPLC que puede usarse para detectar monómeros es la serie Agilent 1100 o equivalente, usando columnas de fase inversa RP-18 (C-18) [Lichrospher RP-18e, 5µ, 250 mm x 4 mm]. La fase móvil usada es una mezcla de agua y acetonitrilo en una proporción de 80:20, a un caudal de 1 ml/min., con un volumen de inyección de muestra de 50 µl.

[0104] El tiempo de procesamiento es de 10 minutos, la temperatura de la columna es de 30 °C y la longitud de onda del detector es de 226 nm.

[0105] En las condiciones anteriores, el tiempo de retención de NIPAM fue de aproximadamente 3 minutos, mientras que el de VP fue de 5 minutos aproximadamente.

[0106] La solución concentrada del polímero obtenida de esta manera es de alta pureza y sustancialmente sin contaminantes monoméricos, que puede someterse a una etapa de liofilización para obtener el polímero en forma sólida liofilizada para la utilización en composiciones farmacéuticas o la solución concentrada como tal puede utilizarse directamente para la formulación de dichas composiciones farmacéuticas. Sin embargo, se prefiere utilizar la solución concentrada del polímero tal cual para la formulación en composiciones farmacéuticas.

B. Caracterización del polímero de la presente invención

[0107] El polímero de la presente invención obtenido mediante el método mencionado anteriormente en el presente documento, se sometió a amplio análisis espectroscópico tal como ^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN, espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR), y análisis térmicos tales como calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA), etc., para aclarar la estructura del polímero obtenido de esta manera.

[0108] El espectro ^{1}H-RMN del polímero de la presente invención en $CDCl_3$, muestra picos en δ (ppm) de 1,14 (a -CH $(CH_3)_2$); 1,45 (a -CH_2-CH_2-N(anillo-VP); 1,63 (a -CH_2-CHC(=O)NH); 1,99 (a -CH C(=O)NH-), CH_2 (anillo- VP), 2,36 (CH_2, anillo-VP), 3.0 (- O - CH_2-CH_2-3.23(CH2-N-); 3,62-3,66 (a CH_2, PEG); 3,72 (NH-CH$(CH_3)_2$); 3,97 (a, CH). El espectro ^{1}H-RMN del polímero de la presente invención se resume en la Fig.1.

[0109] El espectro ^{13}C RMN del polímero de la presente invención muestra picos a 8 (ppm) de 174 (C = O); 76,6-77,6 (multiplete para $CDCl_3$ y CH para cadena principal polimérica); 70,6 (CH_2 PEG); 41.6 (CH para unidades isopropílicas); 31,8 (CH_2 para cadena principal polimérica); 22,6 (CH_3, isopropilo). El espectro ^{13}C RMN del polímero de la presente invención se resume en la Fig. 2.

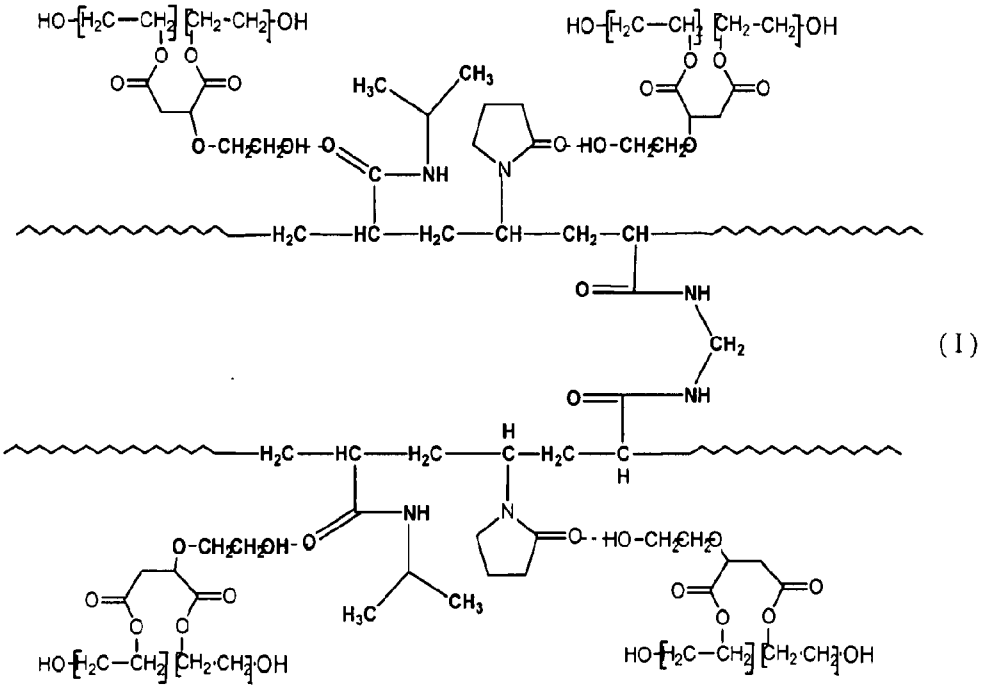
[0110] El espectro de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) del polímero de la presente invención muestra picos en los siguientes valores de frecuencia (cm^{-1}) de 3500 (s, OH); 3296 (s, NH, Amida secundaria); 2972-2933 (s, CH, CH_2CH_3); 1651 (a, picos divididos y fuertes, éster C = O y C = O de Amida primaria); 1546 (s, NH curvatura de Amida II y quizá C = O de ácido libre, menor); 1387, 1367 (doblete de grupos isopropilo, CH_3, deformación), 1172-1129 (m, O-C-O). El espectro de la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) del polímero de la presente invención se resume en la Fig. 3.

[0111] Estos estudios de caracterización confirman que el polímero de la presente invención tiene la estructura, que se representa a continuación en el presente documento, como fórmula (I):

Además, para caracterizar las propiedades fisicoquímicas del polímero con detalle, se evaluaron diversas propiedades del polímero, tales como propiedades térmicas, Concentración Micelar Crítica (CMC), solubilidad y pH, estabilidad durante el almacenaje.

[0112] El análisis termogravimétrico (TGA), mostró que existe una pequeña pérdida de peso entre 51 y 260 °C, lo que indica que podría estar ocurriendo una pérdida de disolvente y algunas reacciones macromoleculares, especialmente en las unidades MPEG del polímero antes de que se produzca el comienzo de la degradación a 310 °C aproximadamente. Esto indica que el polímero tiene alta estabilidad térmica, en buena medida gracias a las unidades de MPEG. El termograma TGA del polímero de la presente invención se resume en la Fig. 4.

[0113] Además, el perfil de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) del polímero, representado en la Fig. 5, no mostró ninguna temperatura de transición vítrea (Tv), sólo se observaron una temperatura de fusión (Tf) de 58 °C y una temperatura de punto de recristalización (T_C) de 38,4 °C. La ausencia de una Tv evidente podría indicar que se trata de una estructura sumamente rígida hiper-ramificada, lo cual también podría atribuirse a los amplios enlaces de hidrógeno con MPEG.



(I)

Estructura del polímero de la presente invención

[0114] La temperatura crítica inferior de la solución (LCST) del polímero tiene valores en la región de 50 a 60°C. Una vez más este es un parámetro importante para polímeros anfífilos en fase acuosa que se manifiesta en transiciones de fase termosensibles a una temperatura determinada denominada LCST. Por debajo de la LCST, el polímero presentaría una configuración de cadena extendida soluble, es decir, un comportamiento hidrófilo. Por encima de la LCST, el polímero pasa por una fase de transición para conformar un agregado hidrófobo e insoluble. Esta propiedad es útil para determinar la capacidad de formar micelas en el disolvente adecuado y para actuar en sistemas de administración de los fármacos en aplicaciones farmacéuticas.

[0115] La Concentración Micelar Crítica (CMC) es otro parámetro importante que define la capacidad de encapsulamiento de un nanotransportador y determina la estabilidad. Esta es la concentración más baja para que el polímero anfífilo o los monómeros formen una estructura micelar capaz de encapsular un fármaco en su núcleo hidrófobo. El valor de la CMC para el presente polímero es de aproximadamente 0,2 mg/ml. Además, el polímero que comprende monómeros termo-sensibles y sensibles al pH tales como la N-isopropilacrilamida (NIPAM) y 1-vinil-pirrolidin-2-ona (VP), bien conocidos por ser biocompatibles con proteínas y células sanguíneas. Además, las aplicaciones biomédicas del poli (NIPAM) son muy amplias debido a su transición de temperatura reversible, es decir, la LCST, a sus excelentes enlaces de hidrógeno y capacidades de formación de micelas e hidrogeles. De manera similar, los polímeros de polivinilpirrolidona (también conocido como povidona) son también altamente solubles en agua y forman abundantes enlaces de hidrógeno con agua. La aplicación que se le pretendió dar a este polímero era diseñar un nuevo sistema que incorporase las fuerzas de los diversos monómeros definidos anteriormente para conducir a la formación de nanopartículas poliméricas estables, termo-sensibles, sensibles al pH, que contengan grupos hidrófilos e hidrófobos para disolver los profármacos que son poco solubles en agua.

[0116] Muy sorprendentemente, se encontró que los perfiles deseados de biocompatibilidad, no biodegradabilidad y seguridad biológica para los polímeros se obtuvieron gracias a la formación de una unidad copolimérica aleatoriamente híper-ramificada que comprendía NIPAM y VP estabilizados mediante un recubrimiento de carcasa externo formado a partir de enlaces de hidrógeno por el aducto diéster (mayor) y aducto monoéster (menor) de anhídrido maleico - polietilenglicol (MPEG) que tiene la composición comonomérica de (NIPAM + VP): MPEG en el intervalo de 80:20 a 95:5, así como unidades NIPAM: VP en el intervalo de 55:22 y 65:35. Específicamente, se encontró que los mejores resultados (mayor LCST, mayor producción, liberación de nanopartículas de Paclitaxel), se obtuvieron cuando la composición de (NIPAM + VP): MPEG se encontraba en el intervalo de 90:10 ó 95:5 y las unidades de NIPAM: VP, se usaban en el intervalo de 58:32 a 62:28. La proporción del monómero usado también coincide con el polímero final y esto se confirma en diversos estudios, tales como ^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN y espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR)

C. Biocompatibilidad y no biodegradabilidad del polímero de la presente invención

[0117] Cuando se evaluó la farmacocinética, biodistribución y eliminación del polímero marcado con [^{14}C] en ratones macho suizos albinos, el perfil de concentración de radioactividad en sangre reveló una curva bifásica (Figura 6), con una corta semivida $T_{1/2}(\beta)$ de eliminación de 0,448 ± 0,157 horas (26,88 minutos) y una eliminación rápida de 54,7 ml/h. Los resultados de este estudio se resumen en las Tablas-VI y VII.

Tabla-VI: Parámetros farmacocinéticos del polímero de la presente Invención

Parámetro	***Cálculo ± DT***
$T_{1/2}$(K10)	0,152 ± 0,018 h
$T_{1/2}$(alfa)	0,065 ± 0,014 h
$T_{1/2}$(beta)	0,448 ± 0,157 h
C_{max}	82,96 ± 5,11 µg/ml
ABC	18,29 ± 1,62 h x µg/ml
EL	54,67 ± 4,86 ml/h
MRT	0,465 ± 0,13 h
V_{ss}	25,43 ± 5,2 ml

[0118] Se encontró que vía de eliminación dominante era la orina (orina, 66,91% frente a heces, 17,39% a las 48 horas) y los datos recuperados recogidos a las 48 horas representaron el 84,87% de la radioactividad inyectada. La distribución tisular fue despreciable. Se encontró que los riñones, hígado, piel e intestino eran los órganos diana. Sin embargo, el nivel de polímero en los tejidos se eliminó rápidamente mediante la orina y las heces.

Tabla-VII: Recuperación del polímero radio-marcado de la presente invención

	Porcentaje (%) de la dosis			
Tiempo	***0-10 min***	***0-1 h***	***0-24 h***	***0-48 h***
Orina	27,14	61,64	64,56	66,91
Heces	0,10	0,65	12,29	17,39
Tejidos	15,50	3,22	0,78	0,57
Aclarado	5,04	2,27	0,84	0,00
Total	47,16	67,78	78,47	84,87

[0119] De esta manera, como conclusión, se encontró que el polímero se elimina rápidamente del cuerpo sin quedar depositado ni degradado en órganos vitales, lo cual sugiere que es inocuo y útil para su uso en seres humanos.

D. Estudios de toxicidad en el polímero de la presente invención

[0120] Se realizaron estudios de toxicidad del polímero de fórmula (I) para evaluar:

(i) La Toxicidad Localizada (Subcutánea e Intravenosa);
(ii) La Toxicidad de la Dosis en Órganos Diana hasta 800 mg/kg de peso corporal animal; y
(iii) La Toxicidad de una Dosis Cíclica de Seis Meses

D (i) Toxicidad localizada (Subcutánea e Intravenosa)

[0121] La toxicidad del polímero se determinó después de una sola administración subcutánea de 100 µl de 75-mg/ml del polímero en la oreja del conejo, lo que provocó una ligera inflamación en el sitio de inyección, cuando se examinó 48 horas después de la inyección, lo que sugiere que el polímero de la presente invención no provoca ninguna toxicidad local en el sitio de administración después de administración subcutánea.

[0122] La toxicidad del polímero de la presente invención se determinó para una administración intravenosa continua durante 5 días, con 75 mg/ml del polímero de la presente invención a una dosis de 125 mg/kg en la vena de la oreja de un conejo y se obtuvieron resultados similares, confirmando además, que el polímero de la presente invención no provoca ninguna toxicidad local en el sitio de administración.

[0123] En la Fig. 7 se muestran fotografías representativas del sitio del lóbulo de la oreja del conejo teñido con S&E después de 48 horas de inyección subcutánea con solución de dextrosa al 10% y en la Fig. 8 se muestran

fotografías del sito del lóbulo de la oreja del conejo teñido con S & E después de 48 horas de inyección subcutánea con una solución acuosa del polímero.

[0124] En la Fig. 9 se muestran fotografías representativas del sitio de la vena de la oreja marginal del conejo teñido con S&E después de 24 horas de inyección intravenosa con solución de dextrosa al 10%. En la Fig. 10 se muestran fotografías del sitio de la Vena de la Oreja marginal del conejo teñido con S&E después de 24 horas de inyección intravenosa con una solución acuosa del polímero.

D (ii) Toxicidad de la dosis en órganos diana (hasta 800 mg/kg de peso corporal animal)

[0125] Además, se evaluó la toxicidad en posibles órganos (u órgano) diana especialmente en relación con aspectos microvasculares y se determinó mediante una sola administración intravenosa en embolada en Ratas Wistar. El polímero se administró a dos dosificaciones diferentes, es decir, 400 mg/kg y 800 mg/kg. En las condiciones del estudio, una sola administración intravenosa en embolada del polímero de la presente invención a cualquier dosis no produjo ninguna mortalidad ni ningún signo o síntomas tóxicos observables en las ratas. Los pesos corporales individual y medio de las ratas mostraron un incremento continuo tanto en el grupo tratado con polímero como en el grupo de control. No se observó ninguna diferencia significativa en cuanto al peso corporal de los animales tratados con ambas dosis en comparación con el del grupo de control.

[0126] En las ratas tratadas con el polímero, los parámetros hematológicos se encontraron dentro de los límites normales a lo largo del estudio. Los parámetros bioquímicos también se encontraron en los límites normales para los animales que tratados con ambas dosis. El ensayo foto-actométrico mostró que no había diferencias significativas entre la actividad locomotora entre los grupos de control y tratados los días 7 y 21 respectivamente, lo cual sugiere que el polímero no tiene ninguna actividad neurotóxica.

[0127] Los especímenes del grupo tratado y del grupo de control mostraron características histológicas similares. El estudio histológico se realizó en órganos vitales tales como el hígado, corazón, pulmones, riñones, bazo, estómago, colon, músculo del muslo y ojos. Todos los órganos estudiados mostraron una estructura normal al examinar con microscopía. El sistema microvascular de cada órgano se examinó de manera cuidadosa y no se observaron características patológicas en ninguno de los órganos. Además, no hubo cambios en el sistema microvascular de los animales tratados con el polímero.

[0128] A partir de las observaciones anteriores, resultó muy evidente que el polímero de la presente invención, a una dosis de bien 400 u 800 mg/kg de peso corporal administrada durante cinco días consecutivos, no ocasionó ninguna toxicidad general ni ninguna toxicidad hematológica significativa, lo cual indica que el polímero de la presente invención tiene un perfil biológicamente inocuo y no tóxico.

D (iii) Toxicidad de una dosis cíclica de seis meses

[0129] Además, se estudió la toxicidad de una dosis clínica de seis meses en ratas mediante inyección intravenosa del polímero usado en la formulación de nanopartículas. Se usaron ratas macho y hembra Wistar para el estudio y se administró una dosis por vía intravenosa en la vena lateral de la cola, cíclicamente cada tres semanas durante un periodo de 180 días (26 semanas aproximadamente). Los animales de los grupos tratados y de control permanecieron generalmente activos y sanos durante el período de estudio. Se descubrió que la concentración del polímero equivalente a 10 mg/kg de fármaco era inocua en los animales sometidos al estudio. Se observaron alteraciones mínimas en los parámetros hematológicos dentro del intervalo normal para las ratas Wistar y no se descubrió que tuviera relación con el tratamiento.

[0130] Los estudios mencionados anteriormente sugieren que el polímero sintetizado no es tóxico y es biológicamente inocuo para su uso en la preparación de composiciones farmacéuticas.

E. Composiciones farmacéuticas que comprenden el polímero de la presente invención

[0131] Tal y como se analizó anteriormente en el presente documento, el polímero de la presente invención de fórmula (I), de alta pureza y sustancialmente libre de contaminantes monoméricos, y que en particular tiene restos monoméricos de NIPAM y VP <0,001%, podría utilizarse de manera conveniente para la preparación de composiciones farmacéuticas de fármacos o compuestos poco solubles en agua en forma de nanopartículas, que sean seguros y no tóxicas para su administración o su uso en animales/seres humanos.

[0132] En particular, el polímero de la presente invención podría utilizarse para preparar una composición farmacéutica en forma de nanopartículas, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, inmovilizando una multitud de fármacos o compuestos poco solubles en agua, completamente o casi por completo en su carcasa polimérica.

[0133] Además, tal y como se analizó anteriormente, los fármacos o compuestos poco solubles en agua que pueden utilizarse en las composiciones farmacéuticas son los que generalmente tienen una solubilidad en agua menor de 10

mg/ml.

[0134] Los ejemplos de dichos fármacos o compuestos poco solubles en agua incluyen, pero no se limitan a: agentes anticancerosos, agentes antiinflamatorios, agentes antifúngicos; antieméticos, agentes antihipertensivos, hormonas sexuales, esteroides, antibióticos, inmunomoduladores, anestésicos, etc. Los ejemplos típicos de agentes anticancerosos que pueden quedar inmovilizados dentro de la carcasa polimérica son: Paclitaxel, Docetaxel y otros derivados de taxano similares; Irinotecan, Topotecan y otros derivados de Camptotecina relacionados; Doxorubicina, Daunomicina y derivados de Antraciclina similares; Cisplatino; Oxaliplatino; 5-Fluorouracilo; Mitomicina; Metotrexato; Etopósido; ácido Betulínico y sus derivados; y Wedelolactona y sus derivados. Los ejemplos típicos de agentes antiinflamatorios que pueden quedar inmovilizados dentro de la carcasa polimérica incluyen Indometacina, Ibuprofeno, Ketoprofeno, Flubiprofeno, Piroxicam, Tenoxicam y Naproxeno. Los ejemplos típicos de agentes antifúngicos que pueden quedar inmovilizados dentro de la carcasa polimérica incluyen: Ketoconazol y Amfotericina B. Los ejemplos típicos de hormonas sexuales que pueden quedar inmovilizadas dentro de la carcasa polimérica incluyen Testosterona, Estrógenos, Progesterona y Estradiol. Los ejemplos típicos de esteroides que pueden quedar inmovilizados dentro de la carcasa polimérica incluyen Dexametasona, Prednisolona y Triamcinolona. Los ejemplos típicos de agentes antihipertensivos que pueden quedar inmovilizados dentro de la carcasa polimérica incluyen Captopril, Ramipril, Terazosin, Minoxidil y Parazosin. Los ejemplos típicos de antieméticos que pueden quedar inmovilizados dentro de la carcasa polimérica incluyen Ondansetrona y Granisetróna. Los ejemplos típicos de antibióticos que pueden quedar inmovilizados dentro de la carcasa polimérica incluyen Metronidazol y ácido Fusídico. Los ejemplos típicos de inmunomoduladores que pueden quedar inmovilizados dentro de la carcasa polimérica incluyen Ciclosporina y ácido Bifenil dimetil dicarboxílico. Los ejemplos típicos de anestésicos que pueden quedar inmovilizados dentro de la carcasa polimérica incluyen Propopol, Alfaxalona y Hexobarbital.

[0135] Una composición farmacéutica de fármacos o compuestos poco solubles en agua normalmente comprende una presentación en kit de dos viales, comprendiendo, por una parte, un vial que contiene una solución de un fármaco poco soluble en agua en un disolvente miscible con agua, o mezclas del mismo, a una concentración adecuada de dicho fármaco o compuesto; y, por otra parte, un vial que contiene una solución del polímero de la presente invención, de alta pureza y sustancialmente libre de contaminantes monoméricos y excipientes farmacéuticamente aceptables en un disolvente acuoso, generalmente agua de calidad de inyección, siendo ambos viales estériles y fabricándose y envasándose en condiciones asépticas. Después, el contenido de los dos viales se añade en forma sucesiva a un líquido de dilución para su administración a seres humanos/animales. Cabe señalar, tal y como se analizó anteriormente en el presente documento y como se analizará posteriormente en el presente documento, que el fármaco o compuesto poco soluble en agua queda inmovilizado dentro de la carcasa polimérica del polímero que se utiliza y se produce en forma de nanopartículas de tamaño uniforme. La proporción entre la solución de un fármaco poco soluble en agua en un disolvente miscible con agua, o mezclas del mismo y la solución de un fármaco poco soluble en agua en un disolvente miscible con agua, o mezclas del mismo, contenidas en los dos viales, generalmente está comprendida entre 1:1 y 1:10 en volumen, preferentemente en una relación de 1:1.

[0136] De manera opcional, la presentación en el kit de dos viales también puede comprender un líquido de dilución y una aguja con una jeringa con un diámetro interno en el intervalo comprendido entre 0,305 y 0,356 o entre 0,559 y 0,711 mm, lo cual depende del volumen de la solución de fármaco y el volumen del líquido de dilución que contiene el polímero y los excipientes que se mezclarán para la administración a seres humanos/animales que lo requieran.

[0137] Los disolventes miscibles con agua que pueden utilizarse para disolver el fármaco o compuesto poco soluble en agua incluyen un alcohol alifático, especialmente etanol; dialquil amidas, especialmente dimetil formamida y dimetil acetamida; dialquil sulfóxidos, especialmente dimetil sulfóxidos y dietil sulfóxidos; polietilenglicoles de varios pesos moleculares; polipropilenglicoles de varios pesos moleculares; tensioactivos, especialmente polisorbato 80, polisorbato 20, aceite vegetal polioxietilado y aceite de ricino polietoxilado; glicerina etc.

[0138] Los excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse ventajosamente incluyen desoxicolato sódico; diversas sales biliares; polisorbatos de varios grados, especialmente polisorbato 80, polisorbato 20, aceite vegetal polioxietilado y aceite de ricino polietoxilado; polisacáridos como dextrosa, sacarosa, lactosa, manitol etc.; ésteres de sorbitán o span de varias calidades; myrj de varias calidades; poloxámeros de varias calidades y un agente tamponante para ajustar el pH. Puede emplearse cualquier agente tamponante conocido en la técnica para ajustar el pH de la solución y, en una realización preferida, es ventajoso utilizar citrato sódico como agente tamponante.

[0139] Entre los excipientes farmacéuticamente aceptables, se prefiere el desoxicolato sódico, ya que tiene un efecto sobre la estabilización de la composición farmacéutica, mientras que el agente tamponante se utiliza para ajustar el pH del líquido de perfusión en el intervalo de entre 6,0 a 8,5, lo cual también se ha descubierto que tiene un efecto en la estabilización de la composición farmacéutica.

[0140] La composición farmacéutica puede tener una carga o dosis adecuada del fármaco o compuesto poco soluble en agua y la selección de una carga o dosis óptima de dicho fármaco o compuesto depende, en gran medida, de la naturaleza de fármaco o compuesto, de su solubilidad así como del trastorno terapéutico para el cual se administra. En el caso de los excipientes farmacéuticamente aceptables, la proporción o cantidad que puede

utilizarse en la composición farmacéutica depende, a su vez, de la naturaleza y carga del fármaco o compuesto poco soluble en agua contenido en la composición.

[0141] La composición farmacéutica en forma de nanopartículas de fármacos o compuestos poco solubles en agua puede prepararse de la siguiente manera:

i) Preparación del concentrado del fármaco, que comprende la disolución del fármaco o compuesto poco soluble en agua en un disolvente miscible con agua o mezclas de los mismos;
ii) Preparación de un concentrado acuoso del polímero y los excipientes farmacéuticamente aceptables, que comprende las etapas de:

a) primera adición de la cantidad necesaria del polímero de fórmula (I), de alta pureza y sustancialmente libre de contaminantes monoméricos, especialmente con un nivel tóxico de NIPAM y VP <0,001% a una cantidad adecuada de agua para inyección, para obtener una solución;
b) adición de excipientes farmacéuticamente aceptables y un agente tamponante a la solución del polímero en agua;

iii) Mezcla de la solución de la etapa ii b) con un líquido de dilución para obtener una solución transparente;
iv) Utilización de una aguja con un diámetro interno de entre 0,305 y 0,356 mm, para añadir un volumen menor de la solución de la etapa i) a la solución de la etapa iii); o
v) Utilización de una aguja con un diámetro interno de entre 0,559 y 0,711 mm para añadir un volumen mayor de la solución de la etapa i) a la solución de la etapa iii);
vi) Inyección de la solución de la etapa i) en la solución de la etapa iii), en la que la aguja de la jeringa a través de la cual se añade la solución de la etapa i) permanece sumergida en la solución de la etapa iii); y
vii) De manera opcional, mantenimiento del recipiente que contiene la solución de la etapa iii) en una posición invertida durante la inyección de la solución de la etapa i),

para inmovilizar de esta manera el fármaco o compuesto poco soluble en agua completamente o casi completamente inmovilizado en la carcasa polimérica y producir nanopartículas del fármaco o compuesto con un tamaño de partícula de 30 a 150 nm. Este líquido de perfusión permanece estable durante más de 24 horas, permaneciendo cargado más del 95% del fármaco en las micelas poliméricas.

[0142] Cabe señalar en el presente documento que la selección del líquido de dilución depende en gran medida de la naturaleza del fármaco o compuesto poco soluble en agua utilizado, así como del trastorno para el cual se administra la composición farmacéutica. Los líquidos de dilución adecuados pueden seleccionarse entre, pero sin limitación: agua, solución salina, soluciones de dextrosa al 5% y al 10%, solución de dextrosa y cloruro sódico, solución de lactato sódico, solución Ringer con lactato, solución de manitol, solución de manitol con dextrosa o cloruro sódico, solución de Ringer, solución de cloruro sódico, agua estéril para inyección y soluciones de electrolitos múltiples que comprenden combinaciones diversas de electrolitos, dextrosa, fructosa y azúcar invertida. Preferentemente, el líquido de dilución es un líquido que comprende dextrosa y agua y, más preferentemente, soluciones de dextrosa al 5% y al 10%.

[0143] En la Figura 11 se muestra gráficamente el método preferido para preparar la composición farmacéutica de la presente invención en forma de nanopartículas de la presente invención y su administración a pacientes que lo necesiten.

[0144] La invención se describe aún con más detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitantes que, sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

[0145] Cabe señalar que en los ejemplos que se muestran a continuación en el presente documento, el equipo de diafiltración utilizado para purificar el polímero era un dispositivo de diafiltración Proflux M12 (Fabricante: Millipore) y el equipo de diálisis utilizado para purificar el polímero era la membrana de Celulosa D-9402 (Fabricante: Sigma).

Sección Experimental

Ejemplo de Referencia - 1

Preparación del polímero utilizando el método de diálisis

[0146] La reacción de polimerización se llevó a cabo en un recipiente de vidrio de 2 l. En aproximadamente 2 l de agua se añadieron 24 g de N-Isopropil acrilamida, 12 ml de 1-Vinil-2-pirrolidona destilada y 4 g de Polietilenglicol (peso molecular 6.000) éster de anhídrido Maleico (MPEG). A esto se le añadieron 11,2 ml de disolución acuosa de N,N'-Metilenbisacrilamida (MBA) [49 mg/ml] y 8 ml de Tetrametiletilendiamina (d = 0,77 g/ml). Se eliminó el aire de la solución burbujeando gas nitrógeno durante 30 minutos. A continuación se añadieron 8 ml de sulfato amónico ferroso (0,5% p/v) y 12 ml de persulfato amónico acuoso (80% p/v) y la reacción continuó durante 3 horas con

burbujeo continuo de nitrógeno. La polimerización se llevó a cabo a 34 ºC en un baño de agua con agitación a 80 rpm.

[0147] Se llenaron bolsas de diálisis con la solución y se sumergieron en agua (medio de diálisis). Se llevó a cabo la diálisis durante 24 horas cambiando el agua una vez. Después de las 24 horas, la solución se retiró de las bolsas de diálisis y se liofilizó en frascos de fondo redondo.

[0148] La detección y cuantificación de los monómeros residuales, especialmente de VP y NIPAM residual en el polímero, se llevaron a cabo mediante el sistema de HPLC Agilent serie 1100, usando columnas de Fase Inversa RP-18 (C-18) [Lichrospher RP-18e, 5 µ, 250 mm x 4 mm]. La fase móvil utilizada fue una mezcla de agua y acetonitrilo en una proporción de 80:20, a una velocidad de flujo de 1 ml/min, con un volumen de inyección de muestra de 50 µl. El tiempo de ensayo fue de 1 minuto, la temperatura de la columna fue de 30 ºC y la longitud de onda del Detector fue de 226 nm. Bajo las condiciones mencionadas, NIPAM tuvo un tiempo de retención de 3 minutos, mientras VP tuvo un tiempo de retención de 5 minutos.

[0149] Los Datos Analíticos: % de Monómeros Residuales i) NIPAM = 0,066% (660 ppm) y ii) VP = 0,011% (110 ppm).

Ejemplo -1

Preparación del polímero utilizando el método de diafiltración

[0150] La reacción de polimerización se llevó a cabo en dos recipientes de vidrio de 5 l para un tamaño de lote de 160 g (4 l x 2) del polímero. En cada recipiente se añadieron 48 g de N-Isopropilacrilamida, 23 ml de 1-Vinil-2-pirrolidona destilada y 8 g de Polietilenglicol (peso molecular de 6.000) éster de anhídrido Maleico (PEG) a aproximadamente 4 l de agua. A esta mezcla se le añadieron 22,4 ml de solución acuosa de N,N'-Metilenbisacrilamida (MBA) [49 mg/ml] y 16 ml de Tetrametiletilendiamina. Se extrajo el aire de la solución burbujeando gas nitrógeno durante 30 minutos. Después se añadieron 16 ml de sulfato amónico ferroso (0,5% p/v) y 24 ml de persulfato amónico acuoso (80% p/v) y la reacción se continuó durante 3 horas con burbujeo constante de nitrógeno. La polimerización se llevó a cabo a 34 ºC en un baño de agua con agitación a 80 rpm. Durante la polimerización, se extrajeron muestras en los puntos de tiempo adecuados (0, 15, 60 y 180 minutos) para supervisar la reacción.

[0151] Después de finalizarse la polimerización, la solución se filtró a través de filtros de cápsula de membrana de 2,54 cm (1") de polietersulfona, de 0,2 µm, desechables y previamente esterilizados, con un tamaño de poros de 0,8 y 0,2 µm (Tipo DPS-5101AA-201, fabricados por Advanced Microdevices Pvt Ltd, India). Los contenidos filtrados de ambos recipientes de reacción se reunieron y se sometieron a filtración de flujo tangencial utilizando un dispositivo de diafiltración Proflux M12 (Millipore) para retirar los monómeros residuales y otras impurezas de bajo peso molecular. El lote combinado de 8 l de la mezcla de reacción se concentró inicialmente a aproximadamente 2,2 l mediante diafiltracion y después el concentrado resultante se diafiltró usando aproximadamente 30 l de agua altamente purificada. Durante la diafiltración, la mezcla de reacción se concentró a aproximadamente 1 l. El tiempo total de procesamiento para la diafiltración de un lote con un tamaño de 160 g (8 l) es de 4 a 6 horas aproximadamente. Entonces, la solución de diafiltrada se sometió al proceso de liofilización.

[0152] La detección y cuantificación de monómeros residuales, especialmente VP residual y NIPAM en el polímero se llevaron a cabo con un sistema de HPLC Agilent serie 1100, utilizando columnas de fase inversa RP-18 (C-18) [Lichrospher RP-18e, 5 µ, 250 mm x 4 mm]. La fase móvil utilizada fue una mezcla de agua y acetonitrilo en una proporción de 80:20, a una velocidad de flujo de 1 ml/min, y con un volumen de la inyección de muestra de 50 µl. El tiempo de ensayo fue de 10 minutos, la temperatura de la columna fue de 30℃ y la longitud de onda del detector fue de 226 nm. En las condiciones anteriores, NIPAM tuvo un tiempo de retención de aproximadamente 3 minutos, mientras que VP tuvo un tiempo de retención de aproximadamente 5 minutos.

[0153] Datos analíticos: % de monómeros residuales i) NIPAM = < 0,001% (< 10 ppm) y ii) VP = < 0,001% (< 10 ppm)

[0154] El polímero tenía las siguientes características espectrales, particularmente

^{1}H RMN (300 MHz, Espectrómetro Bruker, $CDCl_3$. δ ppm): 1,15 (a, -CH $(CH_3)_2$); 1,45 (a, -CH_2-CH-N(anillo de VP); 1,63 (a, - CH_2- CHC(=O)NH); 1,99 (a, -CH C(=O)NH-), CH_2 (anillo de VP), 2,36 (CH_2, anillo de VP), 3,0 -(-O-CH_2-CH_2-), 3,23 (CH_2-N-); 3,62-3,66 (a, CH_2, PEG); 3,72 (NH-CH$(CH_3)_2$) 3,97 (a, CH)

^{13}C RMN (300 MHz, Espectrómetro Bruker, $CDCl_3$, δ ppm): 174 (C = O); 76,6-77,6 (multiplete de $CDCl_3$ y CH para el esqueleto del polímero), 70,6 (CH_2 $_M$PEG), 41,6 (CH para unidad de isopropilo), 31,8 (CH_2, esqueleto de polímero), 22,6 (CH_3, isopropilo)

FTIR (KBr Pellet, cm^{-1}): 3500 (s, OH); 3296 (s, NH, sec-Amida), 2972-2933 (s, CH, CH_2, CH_3), 1546 (s, enlace NH de Amida II y posiblemente C=O de ácido libre, minoritario), 1387, 1367 (doblete de grupos isopropilo, CH_3, deformación) 1172-1129 (m, C-O-O).

Ejemplo - 2

Preparación de composición farmacéutica de nanopartículas de Paclitaxel (reconstitución en pequeño volumen, es decir, hasta 40 ml)

[0155]

A] Preparación de una solución alcohólica del Paclitaxel (20 mg/ml): se disolvieron 200 mg de Paclitaxel en 10,0 ml de etanol.

B] Preparación del concentrado acuoso de polímero y excipientes: se disolvieron 100 mg del polímero obtenido en el ejemplo 1, 66,7 mg de desoxicolato sódico y 100 mg de citrato sódico en 10 ml de agua para proporcionar una solución transparente.

C] Preparación de nanopartículas de Paclitaxel (0,6 mg/ml): se disolvieron 1,0 ml del concentrado acuoso del polímero y excipientes de la etapa B] en 31,3 ml de solución de dextrosa al 10% para obtener una solución transparente. Se añadieron 1,0 ml de la solución alcohólica de Paclitaxel de la etapa A] a la solución anterior a través de una aguja con un diámetro interno de 0,330 mm en un periodo de 4 segundos para obtener nanopartículas de Paclitaxel a una concentración de 0,6 mg/ml.

La concentración farmacéutica preparada de esta manera tiene las siguientes características:

Líquido de dilución	Concentración de polímero. (mg/ml)	Concentración de desoxicolato sódico (mg/ml)	Concentración de citrato sódico (mg/ml)	Concentración de Paclitaxel (mg/ml)	Tamaño de partícula (nm)	Estabilidad
Dextrosa al 10%	0,3	0,2	0,3	0,6	~ 80	> 24 h

Ejemplo-3

Preparación de la composición farmacéutica de nanopartículas de Paclitaxel (reconstitución en gran volumen, es decir, hasta 500 ml)

[0156]

A] Preparación de una solución alcohólica de Paclitaxel (20 mg/ml): se disolvieron 400 mg de Paclitaxel en 20,0 ml de etanol.

B] Preparación del concentrado acuoso de polímero y excipientes: se disolvieron 200 mg del polímero obtenido en el ejemplo 1, 133,4 mg de desoxicolato sódico y 200 mg de citrato sódico en 20 ml de agua para proporcionar una solución transparente.

C] Preparación de nanopartículas de Paclitaxel (0,6 mg/ml): se disolvieron 15,0 ml del concentrado acuoso del polímero y excipientes de la etapa B] en 500 ml de solución de dextrosa al 10% para obtener una solución transparente. Se añadieron 15,0 ml de la solución alcohólica de Paclitaxel de la etapa A] a la solución anterior a través de una aguja con un diámetro interno de 0,711 mm en un periodo de 8 segundos para obtener nanopartículas de Paclitaxel a una concentración de 0,6 mg/ml

[0157] La composición farmacéutica preparada de esta manera tenía las siguientes características:

Líquido de dilución	Concentración de polímero. (mg/ml)	Concentración de desoxicolato sódico (mg/ml)	Concentración de citrato sódico (mg/ml)	Concentración de Paclitaxel (mg/ml)	Tamaño de partícula (nm)	Estabilidad
Dextrosa al 10%	0,3	0,2	0,3	0,6	~ 85	> 24 h

Ejemplo - 4

Preparación de composición farmacéutica de nanopartículas de un derivado de ácido betulínico [MJ -1098 de Fórmula (II)]

[0158]

A] Preparación de una solución de MJ-1098 (15 mg/ml): se disolvió MJ-1098 (15 mg) en una mezcla de 0,15 ml de N,N-dimetilacetamida, se añadieron 0,01 ml de polisorbato 80 y 0,84 ml de etanol a la solución anterior y se disolvieron por sonificación.

B] Preparación del concentrado acuoso de polímero y excipientes: se disolvieron 10 mg del polímero obtenido en el ejemplo 1, 6,67 mg de desoxicolato sódico y 10 mg de citrato sódico en 1 ml de agua para proporcionar una solución transparente.

C] Preparación de nanopartículas de MJ-1098 (0,75 mg/ml): se disolvieron 0,3 ml del concentrado acuoso

del polímero y excipientes de la etapa B] en 9,2 ml de una solución de dextrosa al 5% para obtener una solución transparente. Se añadieron 0,5 ml de la solución de MJ-1098 de la etapa A] a la solución anterior a través de una aguja con un diámetro interno de 0,330 mm en un periodo de 3 segundos para obtener nanopartículas de MJ-1098 a una concentración de 0,75 mg/ml.

La composición farmacéutica preparada de esta manera tenía las siguientes características:

Líquido de dilución	Concentración de polímero. (mg/ml)	Concentración de desoxicolato sódico (mg/ml)	Concentración de citrato sódico (mg/ml)	Concentración de Paclitaxel (mg/ml)	Tamaño de partícula (nm)	Estabilidad
Dextrosa al 5%	0,3	0,2	0,3	0,75	~ 62	> 24 h

Ejemplo - 5

Preparación de la composición farmacéutica de nanopartículas de un derivado del ácido betulínico [DRF-4012 de Fórmula (III)]

[0159]

A] Preparación de una solución de DRF-4012 (20 mg/ml): se disolvió MJ-DRF-4012 (20 mg) en una mezcla de 0,01 ml de polisorbato 80 y de 0,99 ml de etanol y se disolvió por tratamiento con ultrasonidos.

B] Preparación del concentrado acuoso del polímero y excipientes: se disolvieron 10 mg del polímero obtenido en el ejemplo 1, 6,67 mg de desoxicolato de sodio y 10 mg de citrato de sodio en 1 ml de agua para obtener una solución transparente.

C] Preparación de nanopartículas de DRF-4012 (0,60 mg/ml): se disolvieron 0,33 ml del concentrado acuoso del polímero y excipientes de la etapa B] en 10,44 ml de una solución de dextrosa al 5% para obtener una solución transparente. Se añadieron 0,33 ml de la solución de DRF-4012 de la etapa A] a la solución anterior a través de una aguja con un diámetro interno de 0,305 mm durante 3 segundos para obtener nanopartículas de DRF-4012 a una concentración de 0,6 mg/ml

La composición farmacéutica preparada de esta manera tenía las siguientes características:

Líquido de dilución	Concentración de polímero. (mg/ml)	Concentración de desoxicolato de sodio (mg/ml)	Concentración de citrato de sodio (mg/ml)	Concentración de DRF-4012 (mg/ml)	Tamaño de partícula (nm)	Estabilidad
Dextrosa al 5%	0,3	0,2	0,3	0,6	~ 70	> 24 h

Ejemplo - 6

Preparación de la composición farmacéutica de nanopartículas un derivado de ácido betulínico [DRF-4015 con la Fórmula (IV)]

[0160]

Preparación de la composición farmacéutica de nanopartículas de un derivado del ácido betulínico [DRF-4015 de Fórmula (IV)]

A] Preparación de una solución de DRF-4012 (20 mg/ml): se disolvió MJ-DRF-4012 (20 mg) en una mezcla de 0,01 ml de polisorbato 80 y de 0,99 ml de etanol y se disolvió por tratamiento con ultrasonidos.

B] Preparación del concentrado acuoso del polímero y excipientes: se disolvieron 10 mg del polímero obtenido en el ejemplo 1, 6,67 mg de desoxicolato de sodio y 10 mg de citrato de sodio en 1 ml de agua para obtener una solución transparente.

C] Preparación de nanopartículas de DRF-4015 (0,60 mg/ml): se disolvieron 0,33 ml del concentrado acuoso del polímero y excipientes de la etapa B] en 10,44 ml de una solución de dextrosa al 5% para obtener una solución transparente. Se añadieron 0,33 ml de la solución de DRF-4015 de la etapa A] a la solución anterior mediante una aguja con un diámetro interno de 0,305 mm durante 3 segundos para obtener nanopartículas de DRF-4015 a una concentración de 0,6 mg/ml

[0161] La composición farmacéutica preparada de esta manera tenía las siguientes características:

Líquido de dilución	Concentración de polímero. (mg/ml)	Concentración de desoxicolato de sodio (mg/ml)	Concentración de citrato de sodio (mg/ml)	Concentración de DRF-4015 (mg/ml)	Tamaño de partícula (nm)	Estabilidad
Dextrosa al 5%	0,3	0,2	0,3	0,6	~ 46	> 24 h

Ejemplo - 7

Preparación de una composición farmacéutica de nanopartículas de Docetaxel

[0162]

A] Preparación de una solución alcohólica de Docetaxel (40 mg/ml): se disolvieron 200 mg de Docetaxel en 5,0 ml de etanol.
B] Preparación del concentrado acuoso del polímero y excipientes: se disolvieron 400 mg del polímero obtenido en el ejemplo 1, se disolvieron 400 mg de desoxicolato de sodio y 400 mg de citrato de sodio en 10 ml de agua para obtener una solución transparente.
C] Preparación de las nanopartículas de Docetaxel (0,5 mg/ml): se disolvieron 4,0 ml del concentrado acuoso del polímero y excipientes de la etapa B] en 35,5 ml de una solución de dextrosa al 10% para obtener una solución transparente. Se añadieron 0,5 ml de la solución alcohólica de Docetaxel de la etapa A] a la solución anterior mediante una aguja con un diámetro interno de 0,330 mm durante 3 segundos para obtener nanopartículas de Docetaxel a una concentración de 0,5 mg/ml

[0163] La composición farmacéutica preparada de esta manera tenía las siguientes características:

Líquido de dilución	Concentración de polímero. (mg/ml)	Concentración de desoxicolato de sodio (mg/ml)	Concentración de citrato de sodio (mg/ml)	Concentración de Docetaxel (mg/ml)	Tamaño de partícula (nm)	Estabilidad
Dextrosa al 10%	4,0	4,0	4,0	0,5	~ 125	> 24 h

Ejemplo - 8

Preparación de una composición farmacéutica de nanopartículas de Etopósido

[0164]

A] Preparación de una solución de etopósido (20 mg/ml): se disolvieron 20 mg de etopósido en una mezcla de 0,10 ml de N, N-dimetil acetamida y 0,90 ml de etanol por tratamiento con ultrasonidos.
B] Preparación del concentrado acuoso del polímero y excipientes: se disolvieron 10 mg del polímero obtenido del ejemplo 1, 6,67 mg de desoxicolato de sodio y 10 mg de citrato de sodio en 10 ml de agua para dar una solución transparente.
C] Preparación de nanopartículas de etopósido (0,6 mg/ml): se disolvieron 0,3 ml del concentrado acuoso del polímero y excipientes de la etapa B] en 9,4 ml de una solución de dextrosa al 5% para obtener una solución transparente. Se añadieron 0,3 ml de la solución alcohólica de etopósido de la etapa A] a la solución anterior mediante una aguja con un diámetro interno de 0,330 mm durante 3 segundos para obtener nanopartículas de etopósido a una concentración de 0,6 mg/ml

La composición farmacéutica preparada de esta manera tenía las siguientes características:

Líquido de dilución	Concentración de polímero. (mg/ml)	Concentración de desoxicolato de sodio (mg/ml)	Concentración de citrato de sodio (mg/ml)	Concentración de Etopósido (mg/ml)	Tamaño de partícula (nm)	Estabilidad
Dextrosa al 5%	0,3	0,2	0,3	0,6	~ 50	> 24 h

Ejemplo-9

Determinación de la farmacocinética, biodistribución y eliminación del polímero marcado con [^{14}C] en ratones

[0165] De manera aleatoria, 30 ratones albinos suizos macho, de 6 a 8 semanas de vida y con un peso de 25 - 30 g aproximadamente, se dividieron en cinco grupos de seis animales cada uno. El polímero marcado con [^{14}C] se diluyó en agua desionizada a 5 mg/ml en base a la actividad específica del polímero. Todos los animales recibieron una

sola dosis del polímero marcado con [^{14}C] de 40 mg/kg por inyección intravenosa.

[0166] En el estudio farmacocinético, se extrajeron 100 µl de sangre de los animales por sangrado retro-orbital con anestesia a los puntos de tiempo de 3, 10, 30 min, 1, 2, 4, 8,16 y 24 horas posteriores a la administración en tubos que contenían EDTA. Para los estudios de excreción, se tomaron muestras de orina y de heces fecales de la caja metabólica o a la fuerza (10 minutos). Al finalizar (10 min, 60 min, 24 y 48 horas) se tomaron, aclararon y pesaron muestras adrenales, de cerebro, pulmones, hígado, corazón, riñones, bazo, estómago, intestino delgado, intestino grueso, heces fecales, orina, vejiga urinaria, ojos, piel, músculo de muslo y epidídimo.

[0167] Las concentraciones del polímero marcado con [^{14}C] en la sangre y en la orina se determinaron combinando 50 µl de sangre/orina con 5 ml de cóctel de centelleo líquido. Las heces fecales y los tejidos (no más de 0,5 g) se homogeneizaron en agua desionizada para obtener un homogeneizado al 20% antes de combinar 500 µl con 5 ml de cóctel de centelleo líquido. Las muestras se analizaron mediante un analizador de centelleo líquido. Los recuentos por minuto (RPM) se convirtieron a la cantidad de polímero marcado con [^{14}C] en µg/ml en base a la linealidad y a las curvas de inactivación.

[0168] El perfil radiactivo de concentración en sangre reveló una curva bifásica con una corta semivida $T_{1/2}$ (β) de eliminación 0,448 ± 0,157 horas (26,88 min) y eliminación rápida de 54,7 ml/hora.

[0169] Se encontró que la ruta de eliminación dominante era la orina (orina, 66,91% frente a heces, 17,39% a las 48 horas) y los datos recuperadas recogidos a las 48 horas representan el 84,87% de la radioactividad inyectada. La distribución tisular fue despreciable. Se encontró que el riñón, hígado, piel e intestino eran los órganos diana. Sin embargo, el nivel del polímero en los tejidos se eliminó rápidamente mediante la orina y heces fecales.

[0170] La distribución tisular fue despreciable en riñón, hígado, piel e intestino que presentaron los niveles más altos de radiactividad. Sin embargo, los niveles del polímero en los tejidos se eliminaron rápidamente mediante la orina y heces.

[0171] En conclusión, el estudio muestra que el polímero se elimina rápidamente del cuerpo sin quedar depositado en órganos vitales. Aunque se sabe que el polímero no es biodegradable, la eliminación rápida y eficaz, principalmente mediante la orina; sugiere que el polímero es inocuo y útil para su uso en seres humanos.

Ejemplo-10

Determinación de la posible toxicidad local, si la hubiere, en el sitio de administración a los cinco días de administración intravenosa en bolo de 125 mg/kg del polímero en conejos

[0172] Se administró por vía intravenosa la sustancia de ensayo, disuelta en dextrosa al 10% a una concentración de 75 mg/ml, con una jeringa desechable de 5 ml y una aguja de 23 G en la vena marginal de la oreja derecha de cada conejo a 125 mg/kg diarios durante cinco días consecutivos. La oreja izquierda sirvió como control y recibió dextrosa al 10% por la misma vía. El volumen de la dosis se ajustó a no más de 3,5 ml/kg de peso corporal del animal. Se realizaron observaciones periódicas para determinar la toxicidad local en el sitio de inyección a los 5 min, 10 min, 30 min, 60 min y 24 horas, cada día durante los días 1 a 5. Se extrajeron biopsias con punzón en el sitio de inyección de ambas orejas de cada uno de los seis conejos el día 7.

[0173] Un administración intravenosa continua durante 5 días de 75 mg/ml del polímero a una dosis de 125 mg/kg en la vena de la oreja del conejo causó tromboflebitis de leve a moderada en el sitio de inyección de los conejos a los que inyectó dextrosa al 10%. Se puede llegar a la conclusión de que la dosis del polímero seleccionado no causa ninguna toxicidad local en el sitio de administración.

Ejemplo-11

Determinación de la toxicidad del posible órgano (u órganos) diana con especial referencia al sistema microvascular después de cinco días de administración intravenosa en bolo de 400 mg/kg del polímero en ratas Wistar

[0174] La sustancia de ensayo se disolvió en dextrosa al 10% y se administró por vía intravenosa usando una jeringa desechable de 5 ml y una aguja de 23 G en la vena de la cola de cada rata a 400 mg/kg. Los animales de control recibieron solamente dextrosa al 0,5 % por la misma vía. El volumen de la dosis se ajustó a 5 ml/kg del peso corporal de los animales. Se realizaron observaciones periódicas (día 7, 14 y 21 post-tratamiento) con efectos secundarios (examen general y parámetros de laboratorio) y se registraron las muertes. Todos los animales se sacrificaron y en todos se realizó necropsia.

[0175] En las condiciones del estudio, la administración intravenosa en bolo durante cinco días del polímero a un nivel de dosis de 400 mg/kg de peso corporal no produce ninguna mortalidad o ningún signo o síntoma de toxicidad física en las ratas tratadas.

[0176] Los pesos corporales individuales y medios de las ratas, mostraron un incremento continuo en los grupos tratados con el polímero y el grupo de control. No se observó ninguna diferencia significativa en cuanto al peso corporal para los animales tratados en comparación con los del grupo de control.

[0177] En ratas tratadas con el polímero, los parámetros hematológicos se encontraron dentro de los límites normales a lo largo del estudio. Se detectaron diferencias significativas en el nivel basal para la bilirrubina total (p = 0,0471) y ácido úrico (p = 0,0157) para un grupo provisional y proteína total (p = 0,0005) y ácido úrico (p = 0,0404) para animales del grupo terminal sobre los animales de control. Sin embargo no todos los valores están dentro de los límites normales.

[0178] El ensayo foto-actométrico mostró que no había diferencia significativa entre la actividad locomotora entre los grupos de control y tratados los días 7 y 21 respectivamente, sugiriendo que el polímero no tiene ninguna neurotoxicidad.

[0179] Los especimenes de los grupos tratados y de control mostraron características histológicas similares. Todos los órganos estudiados mostraron una estructura normal en un examen realizado al microscópico. El sistema microvascular en cada órgano se examinó cuidadosamente y no se observaron características patológicas en ninguno de los órganos. Además, no hubo cambios en el sistema microvascular de los animales tratados con el polímero.

[0180] A partir de las observaciones anteriores, se ha observado que el polímero a una dosis de 400 mg/kg de peso corporal administrado durante cinco días consecutivos no causó ninguna toxicidad general ni ninguna toxicidad hematológica significativa. Sin embargo, la bilirrubina total fue significativamente mayor para el grupo terminal en comparación con la máxima del grupo de control el día 21.

Ejemplo 12

Determinación de la toxicidad del posible órgano (u órganos) diana con especial referencia al sistema microvascular después de una sola administración intravenosa en bolo de 800 mg/kg del polímero en ratas Wistar

[0181] La sustancia de ensayo disuelta en dextrosa al 10% se disolvió en Dextrosa al 10% y se administró usando una jeringa desechable de 1 ml y una aguja de 26 G en la vena de la cola de cada rata a 800 mg/kg. Los animales de control recibieron solo dextrosa al 10% por la misma vía. El volumen de dosis se ajustó a 5 ml/kg del peso corporal de los animales. Se realizaron observaciones periódicas (días 1, 3 y 7 posteriores al tratamiento) sobre los efectos adversos (examen general y parámetros de laboratorio) y se registraron las muertes. Todos los animales se sacrificaron y en todos se realizó necropsia.

[0182] En las condiciones del estudio, una sola administración intravenosa en bolo del polímero a un nivel de dosis de 800 mg/kg del peso corporal no produce ninguna mortalidad o ningún signo o síntomas tóxicos observables en ratas.

[0183] Los pesos corporales medios e individuales de las ratas muestran un incremento continuo en ambos grupos, de tratamiento y de control. En las ratas tratadas con el polímero, los parámetros hematológicos se encontraron dentro de los límites normales a lo largo del estudio. En las ratas tratadas con el polímero, los parámetros biomecánicos se encontraron en los límites normales a lo largo del estudio. Los estudios histopatológicos muestran que no hay diferencias significativas entre los grupos de ratas de control y tratado. Las fotomicrografías de las ratas tratadas con el polímero y sacrificadas el día 3 y día 7 después de la inyección muestran que no hay cambios aparentes en el sistema microvascular en los cuatro órganos examinados (cerebro, ojos, riñón y piel).

[0184] A partir de las observaciones anteriores, se observa que el polímero a una dosis de 800 mg/kg del peso corporal no causa ninguna toxicidad general o ninguna toxicidad hematológica significativa ni bioquímica ni cambios en el sistema microvascular y puede considerarse que es inocuo cuando se administra por vía intravenosa en ratas.

Ejemplo 13

Determinación de la posible toxicidad local, si la hubiere, en el sitio de administración (subcutáneo) del polímero en conejos.

[0185] Se administró una sola inyección de 0,1 ml de la sustancia de ensayo disuelta en dextrosa al 10% a una concentración de 75 mg/ml, por vía subcutánea con una jeringa desechable de 1 ml y aguja de 23G en el lóbulo de la oreja derecha de cada uno de los seis conejos. Los del grupo de control recibirán 0,1 ml de dextrosa al 10% por la misma vía en el lóbulo de la oreja izquierda de los seis conejos. Se realizaron observaciones periódicas para determinar la toxicidad local en el sitio de inyección a los 5 min, 10 min, 30 min, 60 min y 24 horas.

[0186] Una sola administración subcutánea de 100 µl de 75 mg/ml del polímero o 100 µl de dextrosa en la oreja del conejo causa una leve inflamación en el sitio de la inyección cuando se realizó el ensayo 48 horas después de la inyección. Se puede llegar a la conclusión de que el polímero seleccionado no causa ninguna toxicidad local en el sitio de administración después de la administración subcutánea.

Ejemplo 14

Determinación del estudio de toxicidad en dosis de seis meses por vía intravenosa del polímero en ratas

[0187] El polímero usado en la formulación de nanopartículas se administró a un nivel de dosis equivalente a 10 mg/kg de fármaco. Al grupo de control se le administró dextrosa (al 10%) por vía intravenosa en la vena lateral de la cola, cíclicamente, una vez cada tres semanas durante un período de 180 días (aproximadamente 26 semanas).Las observaciones comprendían mortalidad, signos clínicos, peso corporal, consumo de agua y alimento, investigaciones de laboratorio clínico, pesos de órganos e histopatología.

[0188] Los animales de los grupos tratados y de control permanecieron generalmente activos y sanos durante el período del estudio. No hubo mortalidad relacionada con el tratamiento excepto algunas muertes incidentales debidas a infecciones en ambos grupos, de tratamiento y control. Los animales de ambos sexos mostraron un incremento progresivo en el peso corporal y no hubo cambios en cuanto al consumo de alimento o de agua durante el estudio. Los parámetros hematológicos tanto en machos como en hembras, estuvieron en el intervalo normal descrito para ratas Wistar. Sin embargo, en el grupo de tratamiento, hubo una menor disminución, aún dentro de los límites normales, del recuento de leucocitos (WBC) y de neutrófilos en machos y recuento de neutrófilos en hembras. Se observó un ligero incremento en el recuento de reticulocitos tanto en el grupo de tratamiento como en el grupo de control.

[0189] Los parámetros bioquímicos sanguíneos tanto en machos como en hembras estaban en el intervalo normal, según lo descrito para las ratas Wistar. Los cambios menores incluyeron valores ligeramente más altos de los normales en glucosa, ALP y creatinina tanto en hembras como en machos de los grupos de tratamiento y de control. Se observó un ligero incremento en los triglicéridos de los machos del grupo de tratamiento a los 6 meses. Los parámetros de la orina, tanto en machos como en hembras, se encontraron en los límites normales.

REIVINDICACIONES

1. Un polímero que comprende tres unidades monoméricas, seleccionadas entre 1-vinilpirrolidona (VP), N-isopropilacrilamida (NI-PAM), y éster de anhídrido maleico y polietilenglicol (MPEG), reticuladas con un derivado de vinilo bi-funcional, de alta pureza, que contiene contaminantes monoméricos tóxicos respectivos en cantidades menores del 0,001 % p/p, en el que el polímero es biocompatible, no biodegradable y no tóxico, formándose dicho polímero mediante un proceso que usa un activador y un iniciador de polimerización a un nivel del 15 al 18 % y del 20 al 30 %, p/p del contenido de monómero total, respectivamente.

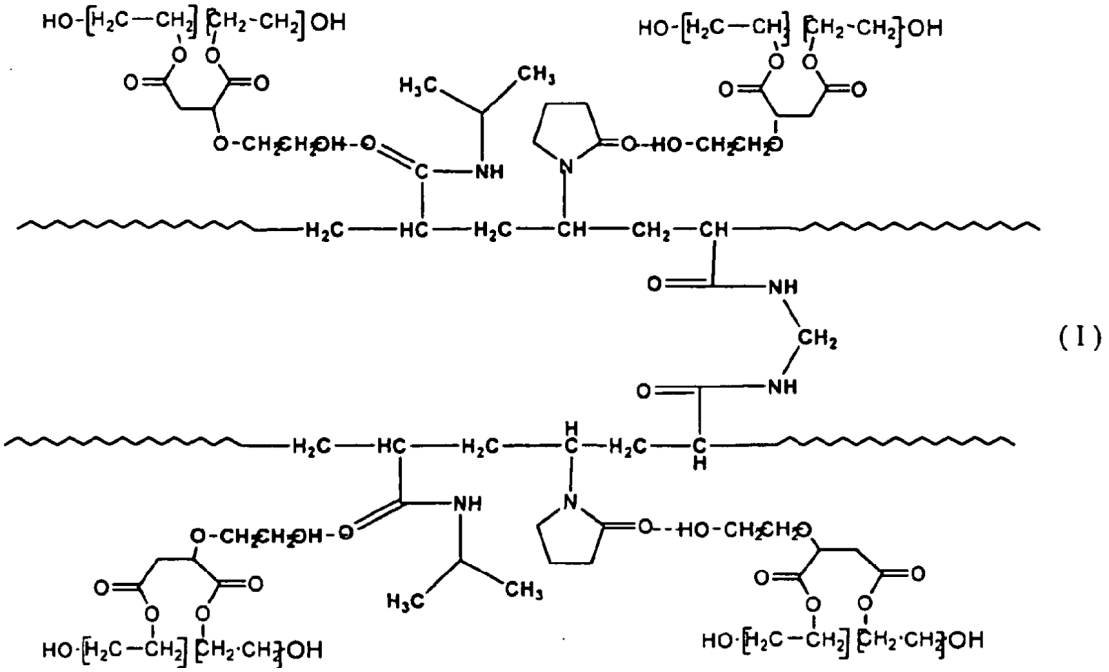
2. Un polímero de alta pureza de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente de reticulación de vinilo bi-funcional es N,N'-metilen bis acrilamida (MBA).

3. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proporción en peso de los monómeros, NIPAM:VP está en el intervalo entre 55:22 y 65:35 y la proporción en peso de monómeros, (NIPAM + VP):MPEG está en el intervalo entre 90:10 y 95:5.

4. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene picos de δ a 174, 76,6-77,6, 70,6, 41,6, 31,8, y 22,6 en su espectro de RMN de ^{13}C y que tiene picos de δ a 1,14, 1,45, 1,63, 1,99, 2,36, 3,0, 3,23, 3,62-3,66, 3,72, y 3,97 en su espectro de RMN de ^{1}H.

5. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene valores de frecuencia en cm^{-1} tales como 3500, 3296, 2972-2933, 1546, 1387, 1367, y 1172-1129 en su espectro FT-IR.

6. Un polímero de alta pureza de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene 1-vinilpirrolidona (VP) tóxica en cantidades menores del 0,001 % y N-isopropilacrilamida (NIPAM) tóxica en cantidades menores del 0,001 %, y que tiene una estructura de fórmula (I):



(I)

7. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene un valor T1/2 (K10) de 0,152 ± 0,018 horas; un valor T1/2 (α) de 0,065 ± 0,014 horas; un valor T1/2 (β) de 0,448 ± 0,0157 horas; un valor Cmáx de 82,96 ± 5,11 μg/ml; un valor de Área Bajo la Curva (AUC) de 18,29 ± 1,62 horas x μg/ml; un valor de Tiempo de Aclaramiento (CL) de 54,67 ± 4,86 ml/h; un valor de Tiempo de Residencia Medio (MRT) de 0,465 ± 0,13 horas; un valor de Distribución en Estado Estacionario (Vss) de 25,43 ± 2 ml/h; y que se elimina por la orina, heces, tejidos y se enjuaga.

8. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, aproximadamente el 84 % del cual se elimina por la orina, heces, tejidos y se enjuaga, 48 horas después de la dosificación.

9. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, que no provoca ninguna toxicidad local en el sitio de administración, 48 horas después de la administración subcutánea o 24 horas después de la administración intravenosa de una solución acuosa de dicho polímero en una oreja de conejo.

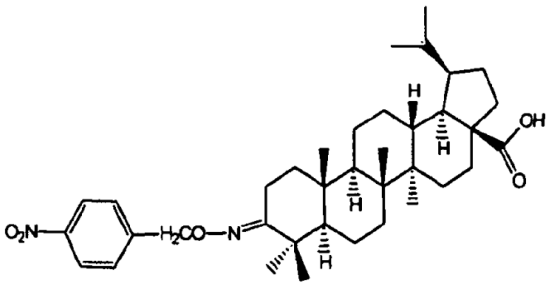
10. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, que no provoca ninguna toxicidad general o ninguna toxicidad hematológica significativa, cuando se administra por una vía de bolo intravenoso a ratas Wistar hasta cinco días consecutivos a una dosis entre 400 mg/kg y 800 mg/kg.

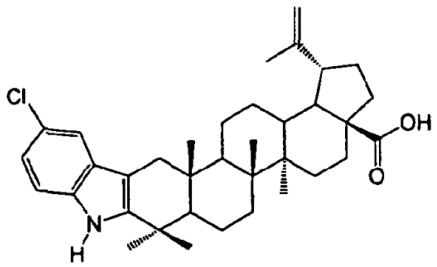
11. Un kit que comprende (a) un vial que contiene una solución de un fármaco o compuesto poco soluble en agua, que tiene una solubilidad en agua menor de 10 mg/ml en un disolvente miscible en agua, o mezclas de los mismos, y (b) otro vial que contiene una solución de un polímero de la reivindicación 1, de alta pureza y sustancialmente libre de contaminantes monoméricos y excipientes farmacéuticamente aceptables, en el que (a) y (b) se proporcionan en una proporción entre 1:1 y 1:10 en volumen, adecuada para la preparación de una composición farmacéutica de dichos fármacos o compuestos poco solubles en agua en forma de nanopartículas para administración a pacientes que lo necesiten.

12. El kit de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el fármaco o compuesto poco soluble en agua, se selecciona entre la clase de agentes anticancerosos, agentes anti-inflamatorios, agentes anti-fúngicos, antieméticos, agentes anti-hipertensores, hormonas sexuales, esteroides, antibióticos, anestésicos o inmunomoduladores.

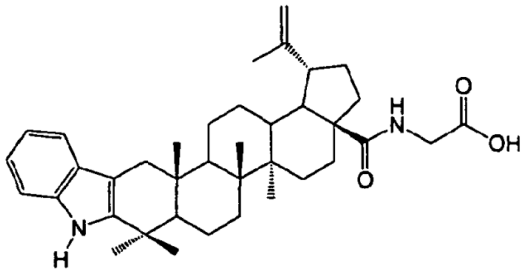
13. El kit de acuerdo con la reivindicación 12, en el que los agentes anticancerosos se seleccionan entre Paclitaxel, Docetaxel, y otros derivados de taxano relacionados; Irinotecán, Topotecán, y otros derivados de Camptotecina relacionados; Doxorubicina, Daunomicina, y derivados de Antraciclina relacionados; Cisplatino; Oxaliplatino; 5-Fluorouracilo; Mitomicina; Metotrexato; Etopósido; Ácido betulínico y sus derivados; y Wedelolactona y sus derivados; los agentes anti-inflamatorios se seleccionan entre Indometacina, Ibuprofeno, Ketoprofeno, Flubiprofeno, Piroxicam, Tenoxicam, y Naproxeno; los agentes anti-fúngicos se seleccionan entre Ketoconazol, y Anfotericina B; las hormonas sexuales se seleccionan entre Testosterona, Estrógeno, Progesterona, y Estradiol; los esteroides se seleccionan entre Dexametasona, Prednisolona, y Triamcinolona; los agentes anti-hipertensores se seleccionan entre Captopril, Ramipril, Terazosina, Minoxidil, y Parazosina; los antieméticos se seleccionan entre Ondansetrón y Granisetrón; los antibióticos se seleccionan entre Metronidazol, y Ácido Fusídico; los inmunomoduladores se seleccionan entre Ciclosporina; y Ácido bifenil dimetil dicarboxílico; y los anestésicos se seleccionan entre Propolol, Alfaxalona, y Hexobarbital.

14. El kit de acuerdo con la reivindicación 13, en el que los derivados de ácido betulínico se seleccionan entre MJ-1098 de fórmula (II), DRF-4012 de fórmula (III), y DRF-4015 de fórmula (IV).





(II) **(III)**



(IV)

15. El kit de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el disolvente miscible en agua, se selecciona entre etanol, dimetil formamida, dimetil acetamida, dimetil sulfóxido, dietil sulfóxido; polietilenglicoles de diversos pesos moleculares; polipropilenglicoles de diversos pesos moleculares; polisorbato 80, polisorbato 20, aceite vegetal polioxietilado, aceite de ricino polietoxilado o glicerina y mezclas de los mismos.

16. El kit de acuerdo con la reivindicación 11, en el que los excipientes farmacéuticamente aceptables se seleccionan entre desoxicolato sódico; sales biliares, polisorbato 80; polisorbato 20, aceite vegetal polioxietilado; aceite de ricino polietoxilado; polisacáridos como dextrosa, sacarosa, lactosa, y manitol; ésteres de sorbitano o spans de diversas calidades, myrj de diversas calidades, o poloxámeros de diversas calidades y mezclas de los mismos.

17. El kit de acuerdo con la reivindicación 16, en el que los excipientes farmacéuticamente aceptables comprenden adicionalmente un agente tampón, en el que el agente tampón es citrato sódico.

18. El kit de acuerdo con la reivindicación 11 que opcionalmente comprende un fluido de dilución, y una jeringa y una aguja que tiene un diámetro interno en el intervalo de 0,305 a 0,356 mm, si tiene que añadirse un volumen pequeño, por ejemplo 1-5 ml de los contenidos del vial a) a aproximadamente 35 veces su volumen que comprende los contenidos del vial b) en el fluido de dilución, o una jeringa y una aguja que tiene un diámetro interno en el intervalo de 0,559 a 0,711 mm, si tiene que añadirse un volumen mayor, por ejemplo 10-15 ml de los contenidos del vial a) a aproximadamente 35 veces su volumen que comprende los contenidos del vial b) en el fluido de dilución.

19. Una composición farmacéutica en forma de nanopartículas, que comprende un fármaco o compuesto poco soluble en agua, un disolvente miscible en agua, un polímero de acuerdo con la reivindicación 1 y excipientes farmacéuticamente aceptables, todos los cuales están contenidos en un fluido de dilución, adecuado para su administración a los pacientes que lo necesiten.

20. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19 en la que los fármacos poco solubles en agua son aquellos dados en las reivindicaciones anteriores 12 ,13 y 14; los disolventes miscibles en agua son aquellos dados en la reivindicación anterior 15; y los excipientes farmacéuticamente aceptables son aquellos dados en la reivindicación anterior 16.

21. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19 en la que el fluido de dilución se selecciona entre agua, solución salina, soluciones al 5 % y 10 % de dextrosa, solución de dextrosa y cloruro sódico, solución de lactato sódico, solución de Ringer tratada con lactato, solución de manitol, solución de manitol con dextrosa o cloruro sódico, solución de Ringer, solución de cloruro sódico, agua estéril para inyección y soluciones de múltiples electrolitos que comprenden combinaciones variadas de electrolitos, dextrosa, fructosa y azúcar invertido.

22. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19 en la que el fármaco o compuesto poco soluble en agua queda atrapado dentro de la carcasa polimérica en forma de nanopartículas; y en la que el tamaño de partícula de la forma de nanopartículas está en el intervalo entre 30 y 150 nm.

23. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19 que tiene un pH entre 6,0 y 8,5.

24. Un proceso para la preparación de la composición farmacéutica de fármacos o compuestos poco solubles en agua en forma de nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 19 que comprende las etapas de:

i) Preparación del concentrado fármaco/compuesto, que comprende disolver el fármaco o compuesto poco soluble en agua en un disolvente miscible en agua adecuado, o mezclas de los mismos;
ii) Preparación de un concentrado acuoso del polímero y excipientes farmacéuticamente aceptables, que comprende las etapas de:
iii) primera adición de la cantidad requerida del polímero de fórmula (I), de alta pureza y sustancialmente libre de contaminantes monoméricos, que especialmente tiene un nivel de NIPAM y VP tóxicos <0,001 % a una cantidad apropiada de agua para inyección para obtener una solución;
iv) adición de excipientes farmacéuticamente aceptables y un agente tampón a la solución del polímero en agua;
v) Mezclar la solución de la etapa ii b) con un fluido de dilución para conseguir una solución transparente;
vi) Utilización de una aguja que tiene un diámetro interno entre 0,305 y 0,356 mm, para añadir un menor volumen de solución de la etapa i) a la solución de la etapa iii) en 4 segundos; o
vii) Utilización de una aguja que tiene un diámetro interno entre 0,559 y 0,711 mm, para añadir un mayor volumen de la solución de la etapa i) a la solución de la etapa iii) en 10 segundos;
viii) Inyección de la solución de la etapa i) a la solución de la etapa iii), en la que la aguja de la jeringa a través de la cual se añade la solución de la etapa i) permanecerá sumergida en la solución de la etapa iii); y
ix) Opcionalmente, mantener el recipiente que contiene la solución de la etapa iii) en una posición invertida durante la inyección de la solución de la etapa i).

25. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 24 en el que los fármacos poco solubles en agua usados son aquellos dados en las reivindicaciones anteriores 12, 13 y 14; en el que los disolventes miscibles en agua son

aquellos dados en la reivindicación anterior 15; en el que los excipientes farmacéuticamente aceptables usados son aquellos dados en la reivindicación anterior 16; y en el que los fluidos de dilución usados son aquellos dados en la reivindicación anterior 21.

26. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 24 en el que el menor volumen de solución, de acuerdo con la etapa iv), hace referencia a un volumen de 1-5 ml de la solución de la etapa i) de la reivindicación 21; y en el que el mayor volumen de solución, de acuerdo con la etapa v), hace referencia a un volumen de 10-15 ml de la solución de la etapa i) de la reivindicación 21.

27. Uso de fármacos o compuestos poco solubles en agua de las reivindicaciones 12, 13 y 14 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de afecciones patológicas en seres humanos/animales que comprende la administración de una composición farmacéutica nano-particulada de dichos fármacos o compuestos poco solubles en agua de la reivindicación 19.

28. Uso de acuerdo con la reivindicación 27, que comprende inyecciones intravenosas, intramusculares, o subcutáneas.

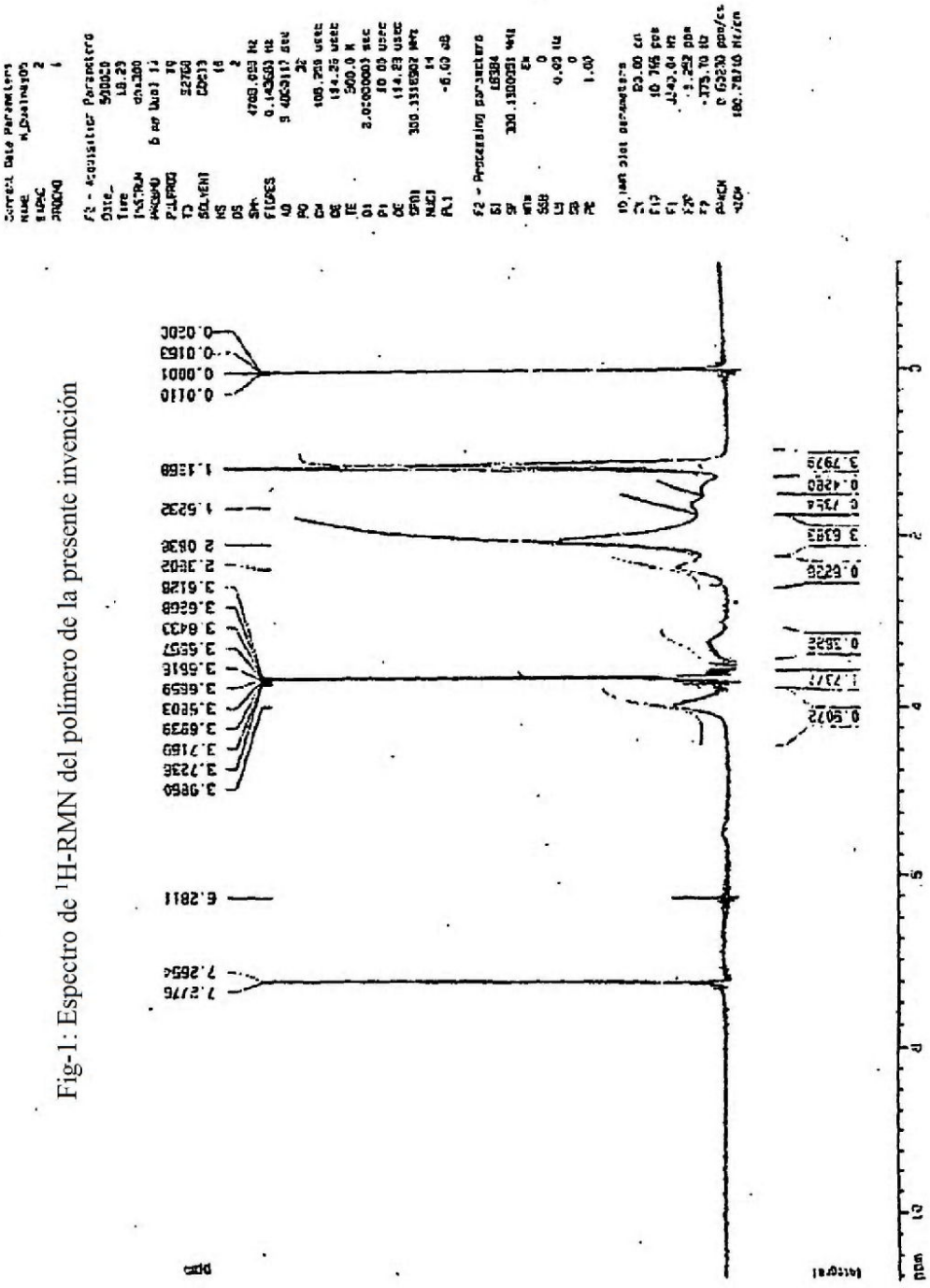
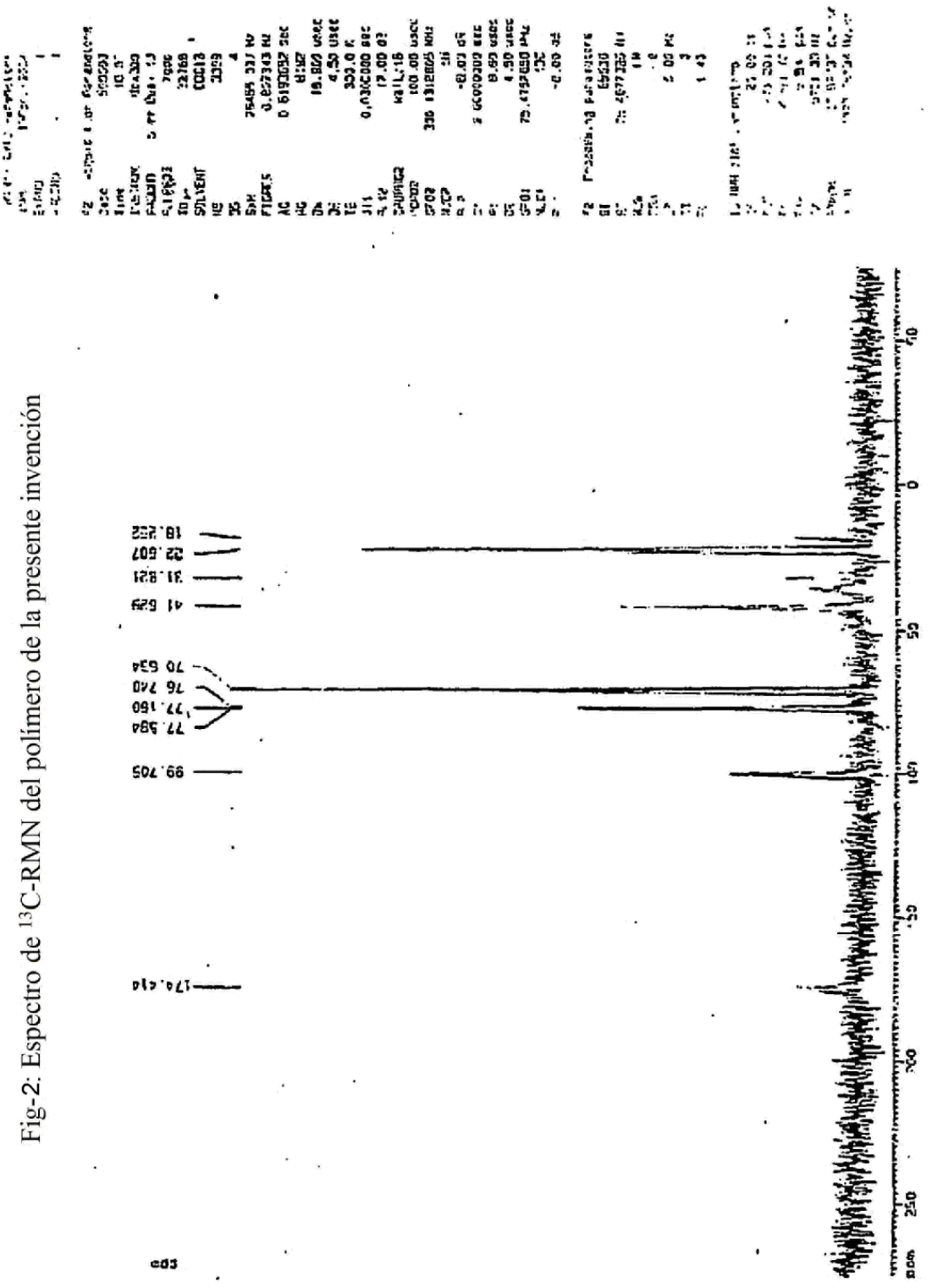


Fig-1: Espectro de ^{1}H-RMN del polímero de la presente invención

Fig-2: Espectro de ^{13}C-RMN del polímero de la presente invención



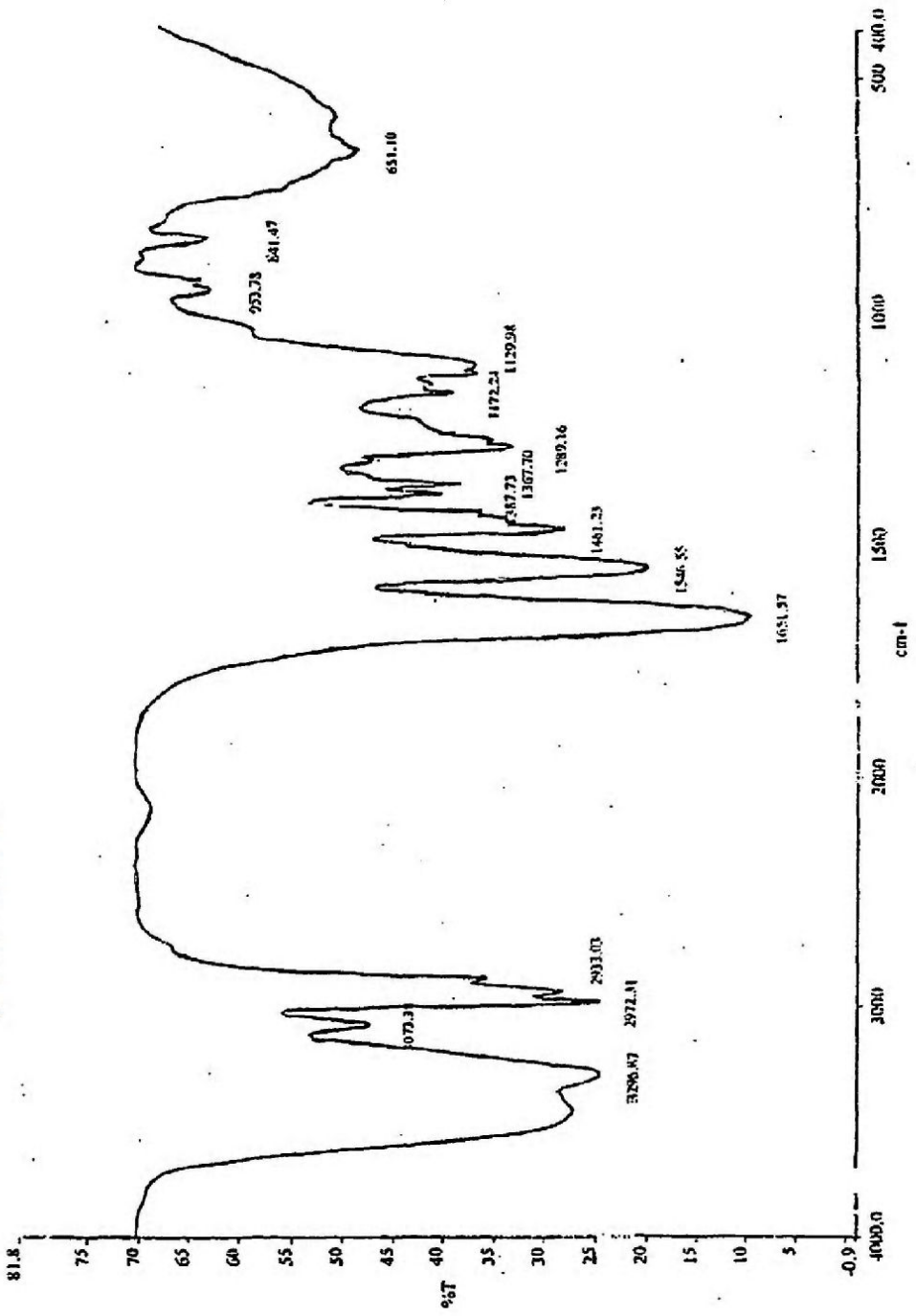


Fig-3: Espectro infrarrojo de Transformada de Fourier (FT-IR) del polímero de la presente invención

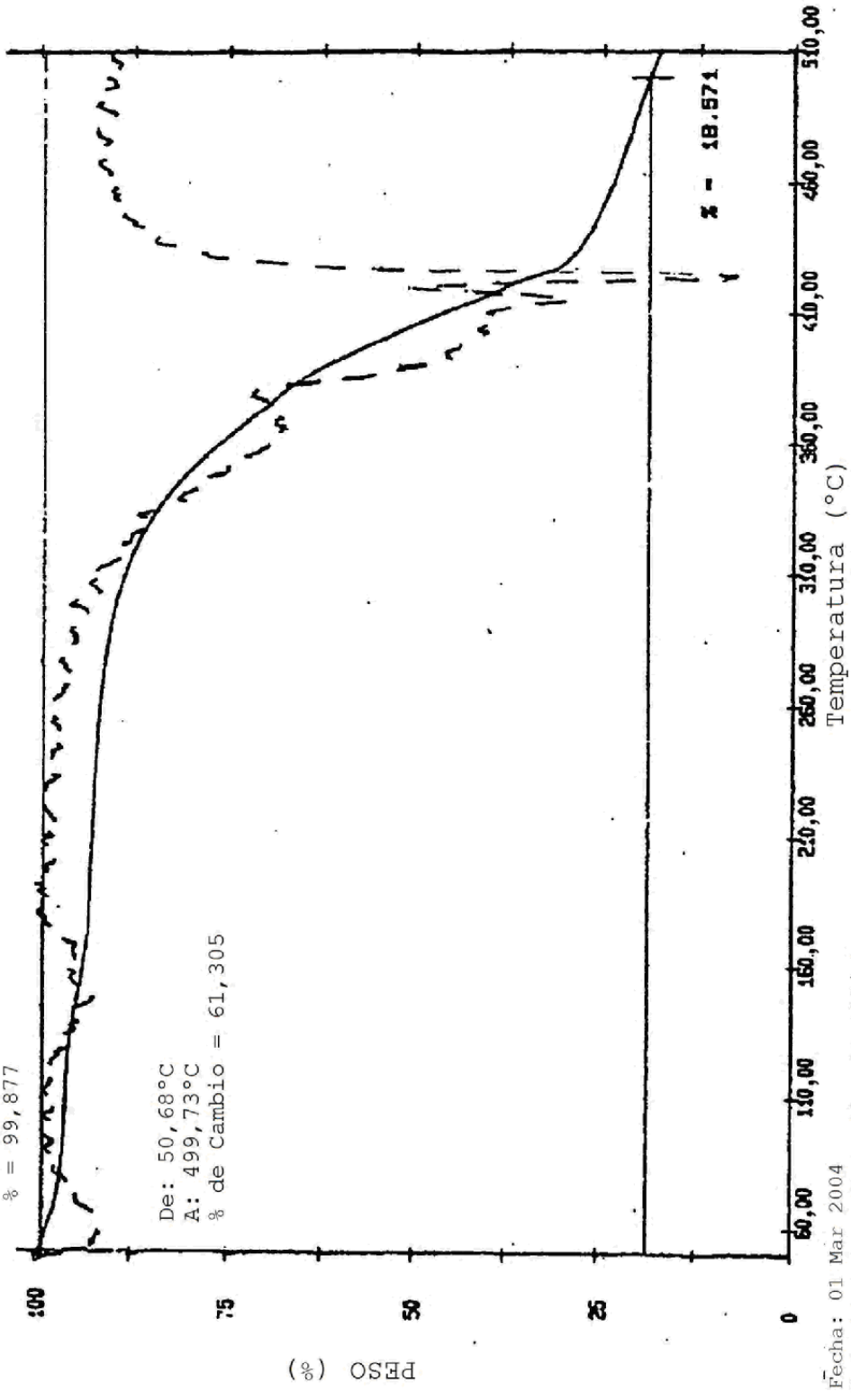


Fig-4: Termograma TGA del polímero de la presente invención

Fig-5 Termograma DSC del polímero de la presente invención

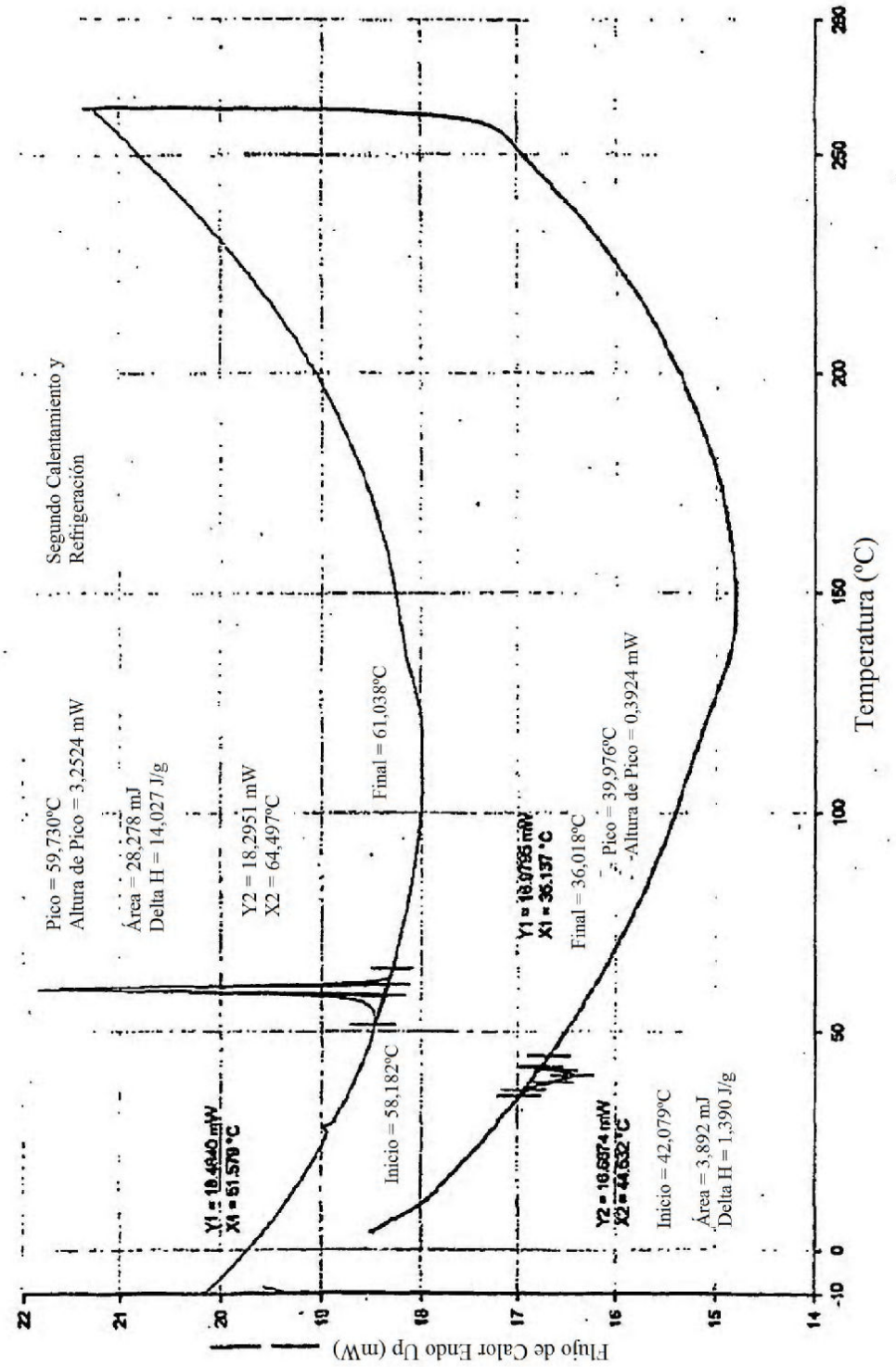


Fig-6: Perfil farmacocinético en sangre de polímero marcado con 14C de la presente invención

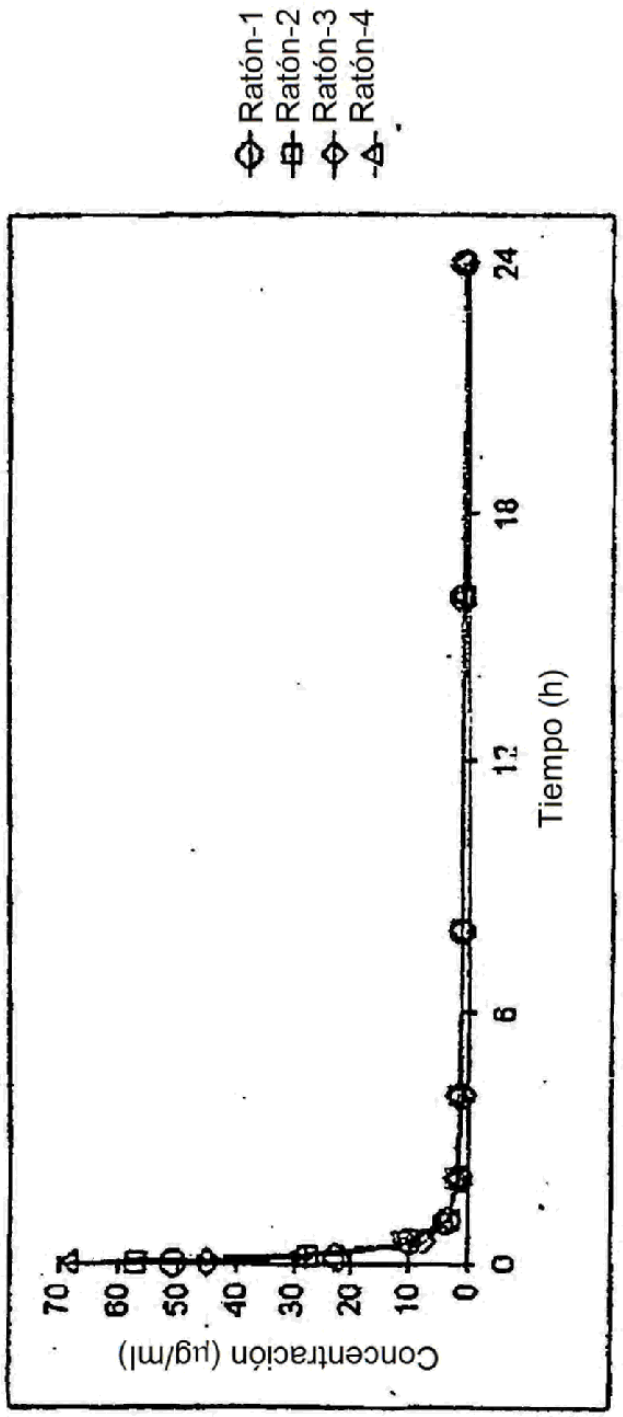
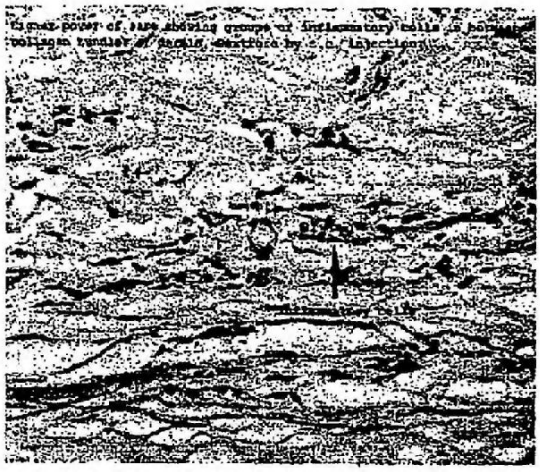
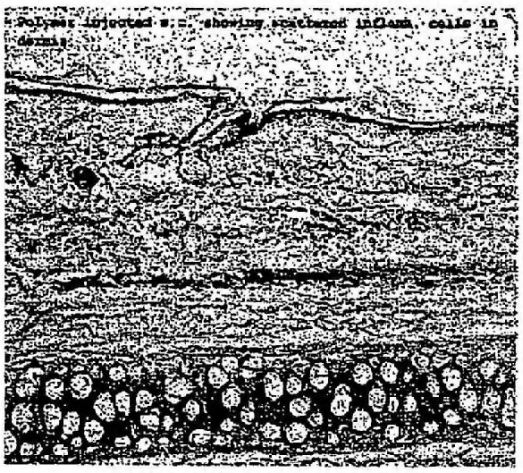


Fig-7: Fotografías de sitios de lóbulo de oreja de conejo marcado con S&E después de 48 horas de la inyección subcutánea de una solución de dextrosa al 10% (Control)





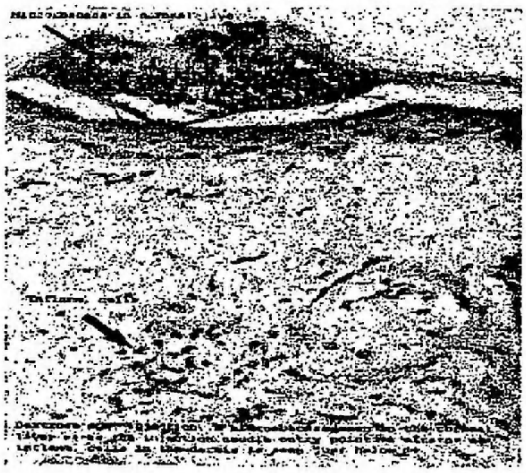
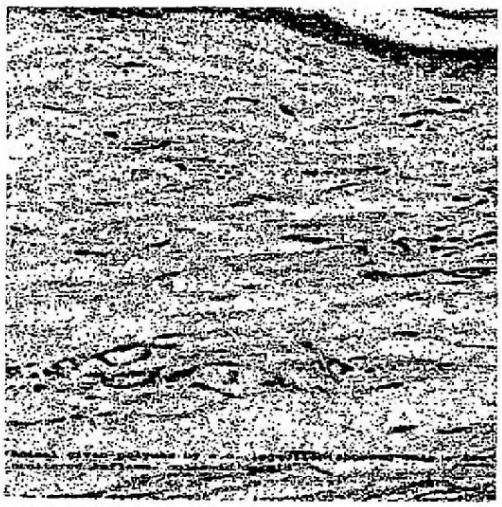
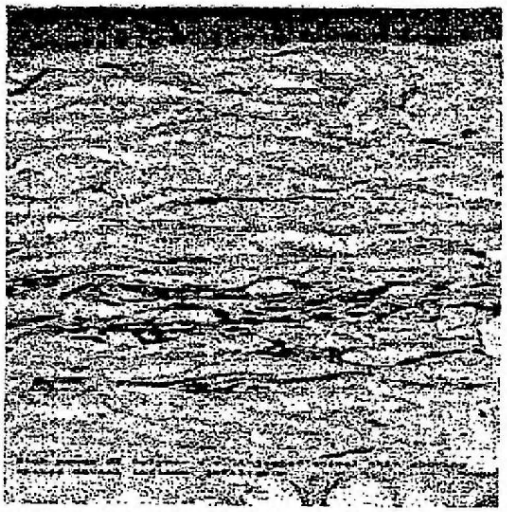


Fig-8: Ftografías de Sitio de Lóbulo de Oreja de Conejo Marcado con S&E después de 48 horas de la inyección subcutánea de una solución acuosa de polímero de la presente invención





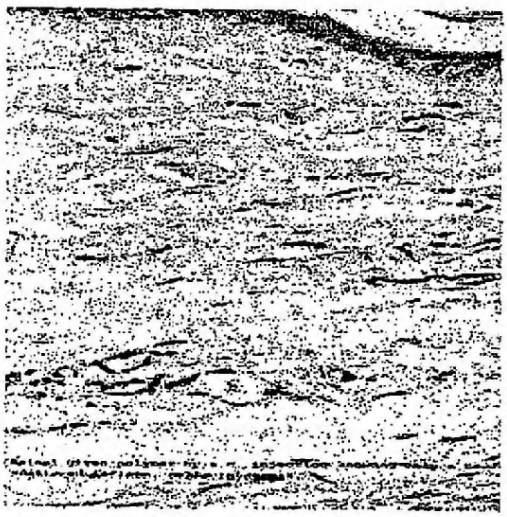


Fig-9: Fotografías de Sitio de Vena Marginal de la Oreja de Conejo marcado con S&E después de 24 horas de inyección intravenosa de una solución de dextrosa al 10% (Control)

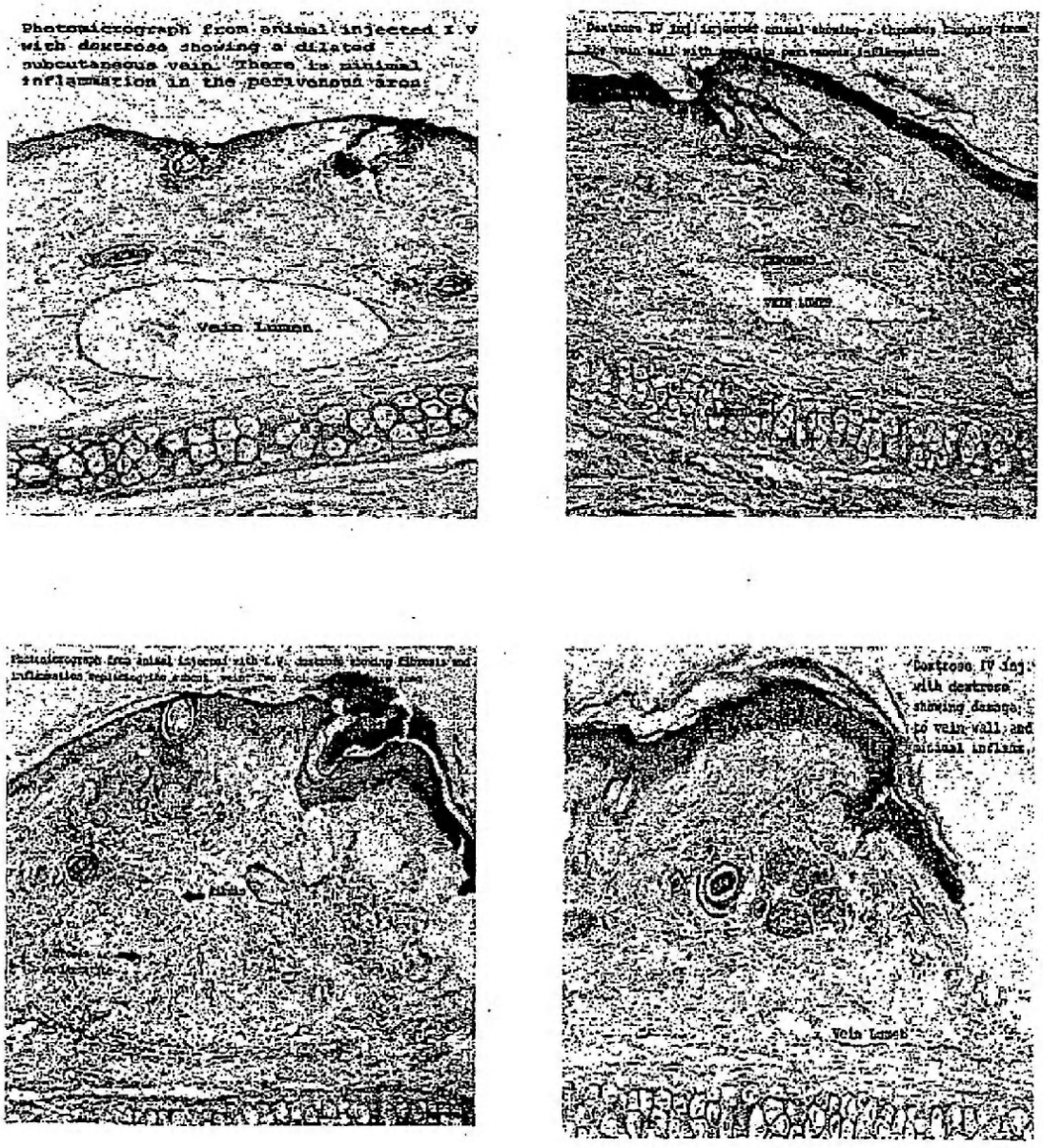


Fig-10: Fotografías de Sitio de Vena Marginal de la Oreja de Conejo Marcado con S&E después de 24 horas de inyección intravenosa de una solución apropiada de polímero de la presente invención

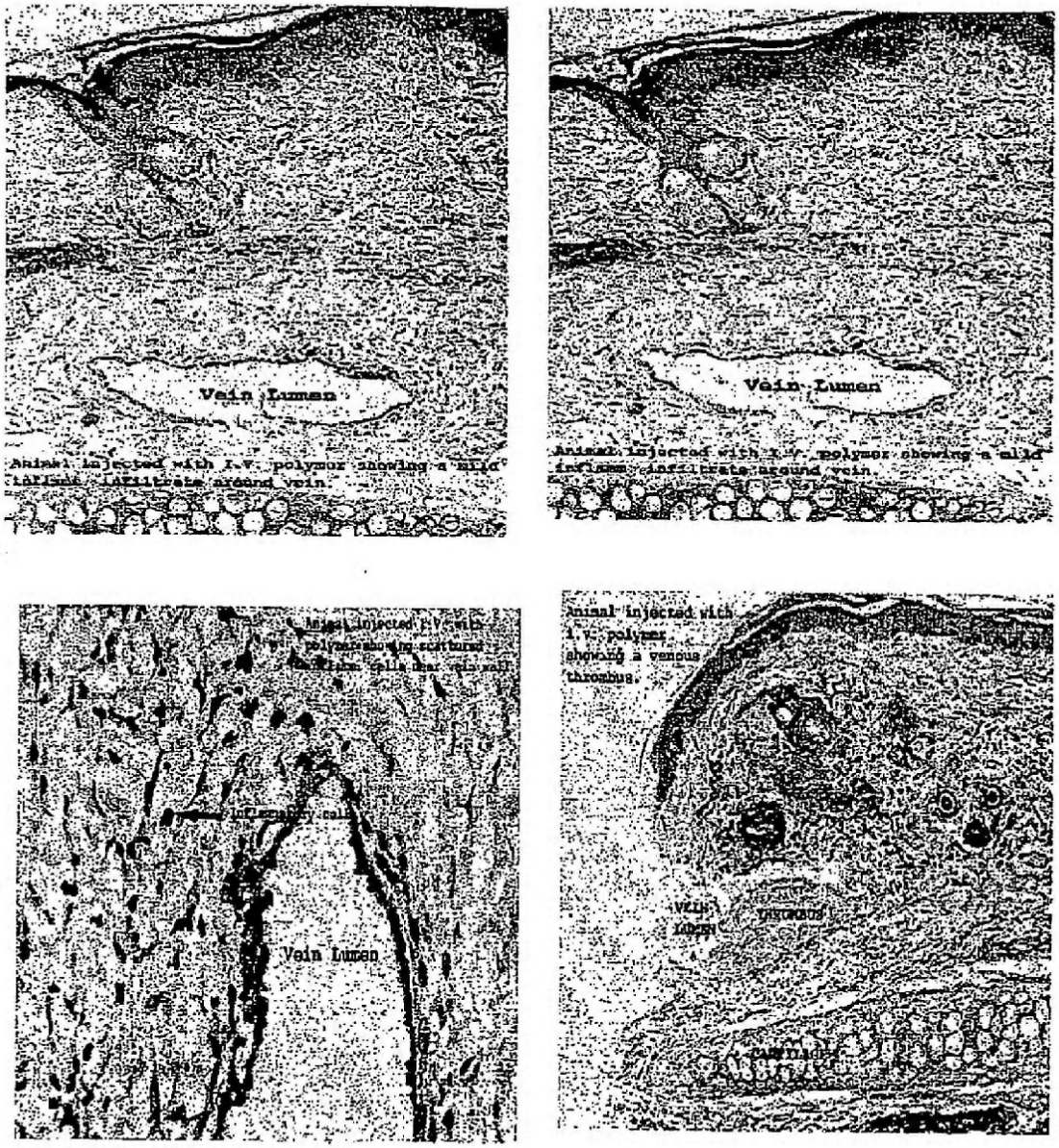
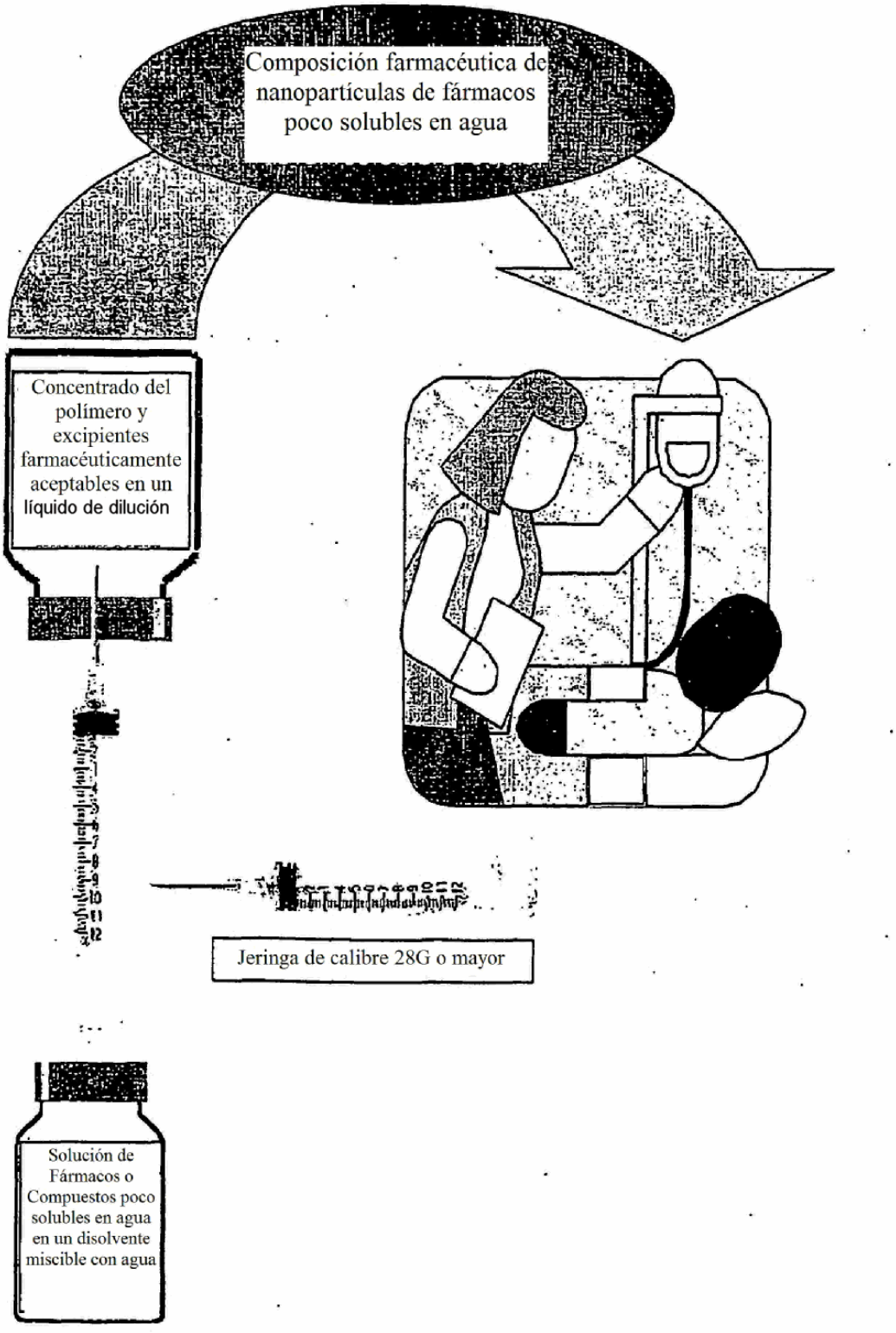



Fig-11: Un Método Típico para la Preparación y Administración a Pacientes que lo Necesiten de la Composición Farmacéutica de Nanopartículas de la Presente Invención