

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 944**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.1998 E 98932874 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1023050**

54 Título: **Nuevas formulaciones de agentes farmacológicos, métodos para su preparación y métodos para su uso**

30 Prioridad:

**27.06.1997 US 51021**  
**09.09.1997 US 926155**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.12.2013**

73 Titular/es:

**ABRAXIS BIOSCIENCE, LLC (100.0%)**  
**11755 Wilshire Boulevard, Suite 2100**  
**Los Angeles, CA 90025, US**

72 Inventor/es:

**DESAI, NEIL P.;**  
**SOON-SHIONG, PATRICK;**  
**MAGDASSI, SHLOMO y**  
**SAHADEVAN, DAVID C.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 435 944 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Nuevas formulaciones de agentes farmacológicos, métodos para su preparación y métodos para su uso

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a métodos para producir vehículos en partículas para la administración intravenosa de agentes farmacológicamente activos, así como a nuevas composiciones producidas de ese modo. En un aspecto particular, la invención se refiere a métodos para el suministro in vivo de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua (p. ej., el fármaco anticancerígeno paclitaxel). En otro aspecto, se proporcionan sistemas coloidales dispersables que contienen agentes farmacológicamente activos insolubles en agua. Las partículas suspendidas pueden estar formadas de 100% de agente activo, o pueden estar encerradas en una cubierta polimérica formulada a partir de un polímero biocompatible, y en general tienen un diámetro menor que 10 aproximadamente 1 micrómetro. Los sistemas coloidales de la invención se pueden preparar sin el uso de tensoactivo convencional o sin ninguna matriz de núcleo polimérico. En un aspecto actualmente preferido de la invención, se proporciona un método para preparar partículas extremadamente pequeñas que se esterilizan por filtración. La cubierta polimérica contiene partículas del agente farmacológicamente activo, y opcionalmente un agente dispersante biocompatible en el que el agente farmacológicamente activo se puede disolver o suspender. Por 15 lo tanto, la invención proporciona un sistema de suministro de fármacos en forma líquida o en forma de un polvo redispersable. Cualquiera de las formas proporciona tanto las moléculas de fármaco biodisponibles inmediatamente (es decir, moléculas de fármaco que están molecularmente unidas a una proteína) como partículas de fármaco puras recubiertas con una proteína.

20 La invención también se refiere al método de uso y preparación de composiciones (formulaciones) de fármacos tales como el agente anticancerígeno paclitaxel. En un aspecto, la formulación de paclitaxel, conocida como Capxol™, es significativamente menos tóxica y más eficaz que el Taxol®, una formulación de paclitaxel disponible en el comercio. En otro aspecto, la nueva formulación Capxol™ se localiza en determinados tejidos después de la administración parenteral, aumentando de esta forma la eficacia del tratamiento de los cánceres asociados con dichos tejidos.

**25 Antecedentes de la invención**

El suministro intravenoso de fármacos permite el equilibrio rápido y directo con la circulación sanguínea y lleva la medicación al resto del cuerpo. Para evitar los niveles máximos en el suero que se logran en un periodo de tiempo corto después de la inyección intramuscular, la administración de fármacos realizada dentro de vehículos estables permite la liberación gradual de los fármacos dentro del compartimento intravascular después de una inyección 30 intravenosa de bolo de las nanopartículas terapéuticas.

Las nanopartículas de liberación controlada inyectables pueden proporcionar una duración de la acción preprogramada, que va desde días a semanas a meses a partir de una inyección única. También pueden ofrecer varias ventajas profundas frente a medicamentos administrados de forma convencional, que incluyen el cumplimiento garantizado automático del paciente con el régimen de dosis, así como fármacos dirigidos a tejidos u 35 órganos específicos (Tice and Gilley, *Journal of Controlled Release* 2,:343-352 (1985)).

Las micropartículas y los cuerpos extraños presentes en la sangre en general se eliminan de la circulación mediante los "órganos de filtración de la sangre", en concreto el bazo, pulmones e hígado. La materia en partículas contenida en la sangre entera normal comprende glóbulos rojos (típicamente de 8 micrómetros de diámetro), glóbulos blancos (típicamente de 6-8 micrómetros de diámetro) y plaquetas (típicamente de 1-3 micrómetros de diámetro). La microcirculación en la mayoría de los órganos y tejidos permite el paso libre de estas células sanguíneas. Cuando se encuentran presentes microtrombos (coágulos sanguíneos) de tamaño mayor de 10-15 micrómetros en la circulación, se produce riesgo de infarto o bloqueo de los capilares, conduciendo a isquemia o privación de oxígeno y posible muerte tisular. Por lo tanto, debe evitarse la inyección en la circulación de partículas mayores de 10-15 40 micrómetros de diámetro. Sin embargo, una suspensión de partículas menores de 7-8 micrómetros es relativamente segura y se ha usado para el suministro de agentes farmacológicamente activos en forma de liposomas y emulsiones, agentes nutricionales y medios de contraste para aplicaciones de generación de imágenes.

El tamaño de las partículas y su modo de suministro determinan su comportamiento biológico. Strand et al. (en *Microspheres-Biomedical Applications*, ed. A. Rembaum, pp 193-227, CRC Press (1988)) han descrito que el destino de las partículas depende de su tamaño. Las partículas en el intervalo de tamaños de unos pocos nanómetros (nm) a 100 nm entran en los capilares linfáticos después de inyección intersticial, y se puede producir la fagocitosis dentro de los ganglios linfáticos. Después de inyección intravenosa/intraarterial, las partículas menores de aproximadamente 2 µm serán eliminadas rápidamente de la circulación sanguínea por el sistema reticuloendotelial (SRE), también conocido como sistema fagocítico mononuclear (SFM). Las partículas mayores de aproximadamente 7 µm, después de inyección intravenosa serán atrapadas en los capilares pulmonares. Después de inyección 55 intraarterial, las partículas son atrapadas en el primer lecho capilar alcanzado. Las partículas inhaladas son atrapadas por los macrófagos alveolares.

Los productos farmacéuticos que son insolubles en agua o poco solubles en agua y sensibles a los entornos ácidos

en el estómago no se pueden administrar de forma convencional (por ejemplo, por inyección intravenosa o administración oral). La administración parenteral de dichos productos farmacéuticos se ha logrado mediante emulsión del fármaco solubilizado en aceite con un líquido acuoso (tal como disolución salina normal) en presencia de tensioactivos o estabilizantes de emulsión para producir microemulsiones estables. Estas emulsiones se pueden inyectar por vía intravenosa, con la condición de que los componentes de la emulsión sean farmacológicamente inertes. La patente de EE.UU. nº 4.073.943 describe la administración de agentes farmacológicamente activos insolubles en agua disueltos en aceites y emulsionados con agua en presencia de tensioactivos tales como fosfátidos de huevo, Pluronic (copolímeros de polipropilenglicol y polietilenglicol), poli(oleato de glicerol), etc. La publicación internacional PCT nº WO85/00011 describe microgotas farmacéuticas de un anestésico recubierto con un fosfolípido tal como dimiristoilfosfatidilcolina que tiene dimensiones adecuadas para la inyección intradérmica o intravenosa.

Un ejemplo de un fármaco insoluble en agua es el paclitaxel, un producto natural aislado por primera vez del tejo del pacífico, *Taxus brevifolia*, por Wani et al. (*J. Am. Chem. Soc.* 93:2325 (1971)). Entre los agentes antimetabólicos, el paclitaxel, que contiene un esqueleto de carbonos de diterpeno, presenta un modo de acción único en las proteínas de los microtúbulos responsables de la formación del huso mitótico. A diferencia de otros agentes antimetabólicos tales como la vinblastina o colchicina, que previenen el ensamblaje de la tubulina, el paclitaxel es el único producto vegetal que se sabe que inhibe el procedimiento de despolimerización de la tubulina, previniendo así el proceso de replicación celular.

Se ha mostrado que el paclitaxel, un diterpenoide natural, tiene efectos antineoplásicos y anticancerígenos significativos en el cáncer de ovario refractario a fármacos. El paclitaxel ha mostrado una excelente actividad antitumoral en una amplia variedad de modelos de tumores tales como el melanoma B16, leucemias L1210, tumores mamarios MX-1 y xenoinjertos de tumor de colon CS-1. Varios comunicados de prensa recientes han denominado al paclitaxel como el nuevo fármaco maravilloso anticancerígeno. Realmente, el paclitaxel ha sido aprobado recientemente por la Administración Federal de Medicamentos para el tratamiento del cáncer de ovario. Sin embargo, la poca solubilidad acuosa del paclitaxel presenta un problema para la administración humana. Realmente, se puede perjudicar gravemente el suministro de fármacos que son inherentemente insolubles o poco solubles en un medio acuoso si el suministro oral no es eficaz. Por consiguiente, las formulaciones de paclitaxel usadas actualmente (es decir, Taxol®) requieren un cremaphor para solubilizar el fármaco. El intervalo de dosis clínico humano es 200-500 mg. Estas dosis se disuelve en una disolución de etanol:cremaphor 1:1 y se diluye con disolución salina hasta aproximadamente 300-1000 ml de fluido administrado por vía intravenosa. El cremaphor usado habitualmente es aceite de ricino polietoxilado. La presencia de cremaphor en esta formulación se ha asociado con reacciones de hipersensibilidad graves en animales (Lorenz et al., *Agents Actions* 7, 63-67 (1987)) y seres humanos (Weiss et al., *J. Clin. Oncol.*, 8, 1263-68 (1990)) y por consiguiente se requiere medicación previa de los pacientes con corticoesteroides (dexametasona) y antihistaminas. La gran dilución da como resultado volúmenes grandes de infusión (dosis típica de 175 mg/m<sup>2</sup>, o hasta 1 litro) y tiempos de infusión en el intervalo de 3 h a 24 h. Por lo tanto, es necesaria una formulación alternativa menos tóxica para el paclitaxel.

En los ensayos clínicos en fase I, el propio paclitaxel no mostró efectos tóxicos excesivos, pero los emulsionantes usados para solubilizar el fármaco produjeron reacciones alérgicas graves. El régimen actual de administración implica el tratamiento del paciente con antihistaminas y esteroides antes de la inyección del fármaco para reducir los efectos secundarios alérgicos del cremaphor.

Langer et al. *Seminars in Oncology* (1995) Vol. 22, No. 4, Suppl. 9, 18-29, Langer et al., *Seminars in Oncology* (1996), Vol. 23, No. 6, Suppl. 16, 35-41 y Paccagnella et al., *Seminars in Oncology* (1996), Vol. 23, No. 6, Suppl. 16, 76-79, describen todos los tratamientos de combinación del paclitaxel y carboplatino para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado. El paclitaxel se proporciona en forma de Taxol.

El documento EP-A-526666 describe microesferas lipídicas sólidas que tienen un diámetro menor de 1 micrómetro. Las microesferas lipídicas así formadas tienen una distribución de dimensiones estrecha. El documento W093/25195 describe un sistema de nanopartículas que comprende una disolución coloidal de nanosferas de ciclodextrina modificada que se pueden usar como un vehículo para productos farmacéuticos o químicos.

El documento W098/14174, publicado el 9 de abril de 1998 después de las fechas de prioridad de la presente solicitud, describe composiciones útiles para el suministro in vivo de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua, tales como el fármaco anticancerígeno paclitaxel. Se describen formulaciones de nanopartículas que comprenden nanopartículas del fármaco insoluble en agua recubiertas con una proteína tal como albúmina.

En un esfuerzo para mejorar la solubilidad en agua del paclitaxel, varios investigadores han modificado su estructura química con grupos funcionales que imparten una solubilidad en agua potenciada. Entre ellos están los derivados sulfonados (Kingston et al., Patente de EE.UU. nº 5.059.699 (1991)), y ésteres de aminoácidos (Mathew et al., *J. Med. Chem.* 35:145-151 (1992)) que muestran actividad biológica significativa. Las modificaciones para producir un derivado soluble en agua facilitan el suministro intravenoso del paclitaxel disuelto en un vehículo inocuo tal como disolución salina normal. Sin embargo, dichas modificaciones se añaden al coste de la preparación del fármaco, pueden inducir reacciones secundarias indeseadas y/o reacciones alérgicas y/o pueden disminuir la eficacia del

fármaco.

Las microesferas de proteína se han descrito en la bibliografía como vehículos de agentes farmacológicos o de diagnóstico. Las microesferas de albúmina se han preparado por desnaturalización con calor o reticulación química. Las microesferas desnaturalizadas con calor se producen a partir de una mezcla emulsionada (por ejemplo, albúmina, el agente que se va a incorporar y un aceite adecuado) a temperaturas entre 100°C y 150°C. Después, las microesferas se lavan con un disolvente adecuado y se almacenan. Leucuta et al. (*International Journal of Pharmaceutics* 41:213-217 (1988)) describen el método de preparación de microesferas desnaturalizadas con calor.

El procedimiento para preparar microesferas químicamente reticuladas implica el tratamiento de la emulsión con glutaraldehído para reticular la proteína, seguido de lavado y almacenamiento. Lee et al. (*Science* 213:233-235 (1981)) y la patente de EE.UU. nº 4.671.954 enseñan este método de preparación.

Las técnicas anteriores para preparar microesferas de proteínas como vehículos de agentes farmacológicamente activos, aunque son adecuadas para el suministro de agentes solubles en agua, son incapaces de atrapar los insolubles en agua. Esta limitación es inherente a la técnica de preparación que se basa en la reticulación o desnaturalización con calor del componente proteínico en la fase acuosa de una emulsión de agua en aceite. Cualquier agente soluble en agua disuelto en la fase acuosa que contiene proteína puede ser atrapado dentro de la matriz resultante de proteína reticulada o desnaturalizadas con calor, pero un agente poco soluble en agua o soluble en aceite no se puede incorporar en una matriz de proteína formada por estas técnicas.

Un método convencional para fabricar nanopartículas que contienen fármaco comprende disolver poli(ácido láctico) (u otros polímeros biocompatibles, insolubles en agua) en un disolvente inmiscible con el agua (tal como cloruro de metileno u otro disolvente clorado, alifático o aromático), disolver el agente farmacéuticamente activo en la disolución de polímero, añadir un tensioactivo a la fase de aceite o a la fase acuosa, formar una emulsión de aceite en agua por medios adecuados, y evaporar la emulsión lentamente a vacío. Si las gotitas de aceite son suficientemente pequeñas y estables durante la evaporación, se obtiene una suspensión del polímero en agua. Puesto que el fármaco está inicialmente presente en la disolución de polímero, por este método se puede obtener una composición en la que las moléculas de fármaco están atrapadas dentro de partículas compuestas de una matriz polimérica. La formación de microesferas y nanopartículas usando el método de evaporación del disolvente ha sido descrita por varios investigadores (véase, por ejemplo, Tice and Gilley, en *Journal of Controlled Release* 2:343-352 (1985); Bodmeier and McGinity, en *Int. J. Pharmaceutics* 4:179 (1988); Cavalier et al., en *J. Pharm. Pharmacol.* 38:249 (1985); y D'Souza et al., documento WO 94/10980) usando diferentes fármacos.

Bazile et. al., en *Biomaterials* 13:1093 (1992), y Spenlehauer et al., en la patente francesa 2660556, han descrito la formación de nanopartículas usando dos polímeros biocompatibles, uno (p. ej., polilactida) se disuelve en la fase orgánica, junto con un componente activo tal como un fármaco, y el otro polímero, tal como albúmina, se usa como el agente tensioactivo. Después de emulsión y eliminación del disolvente, se forman las nanopartículas, en las que el fármaco está presente dentro de la matriz polimérica de las partículas de polilactida.

Las propiedades de la disolución de polímero a partir de la cual se forma la matriz polimérica son muy importantes para obtener la emulsión adecuada en la primera etapa. Por ejemplo, la polilactida (el polímero usado habitualmente en la preparación de nanopartículas inyectables), tiene una actividad superficial que produce la rápida adsorción de la misma en la interfase de diclorometano-agua, produciendo una menor tensión interfacial (véase, por ejemplo, Boury et al., en *Langmuir* 11:1636 (1995)), lo cual a su vez mejora el proceso de emulsión. Además, los mismos investigadores encontraron que la albúmina de suero bovino (BSA) interacciona con la polilactida, y penetra en la monocapa de polilactida presente en la interfase de aceite-agua. Por lo tanto, basándose en la referencia anterior, se espera que la emulsión durante el método de evaporación del disolvente convencional se favorezca mucho por la presencia del polímero tensioactivo (polilactida) en la fase orgánica no acuosa. De hecho, la presencia de polilactida no es sólo una condición suficiente, sino que es realmente necesaria para la formación de nanopartículas de tamaño adecuado.

Otro procedimiento que se basa en el método de evaporación del disolvente comprende disolver el fármaco en un disolvente hidrófobo (p. ej., tolueno o ciclohexano) sin ningún polímero disuelto en el disolvente orgánico, añadir un tensioactivo convencional a la mezcla como emulsionante, formar una emulsión de aceite en agua mediante el uso de ultrasonidos o equipamiento de alta cizalladura, y después evaporar el disolvente para obtener partículas secas del fármaco (véase, por ejemplo, Sjostrom et al., en *J. Dispersion Science and Technology* 15:89-117 (1994)). Después de eliminar el disolvente no polar, se produce la precipitación del fármaco dentro de las gotitas de disolvente, y se obtienen partículas submicrométricas.

Se ha encontrado que el tamaño de las partículas es controlado principalmente por el tamaño inicial de las gotitas de emulsión. Además, es interesante indicar que se describe que el tamaño final de partículas disminuye con la disminución de la concentración de fármaco en la fase orgánica. Este descubrimiento es contrario a los resultados descritos en la presente memoria, en donde no se usa tensioactivo convencional para preparar nanopartículas (en algunas realizaciones de la invención). Además, los autores de la publicación de Sjostrom indican que el fármaco usado, el acetato de colesterilo, es tensioactivo en tolueno, y por lo tanto se puede orientar en la interfase de aceite-agua; por lo tanto, la concentración de fármaco en la interfase es mayor, aumentando así el potencial de

precipitación.

La formación de partículas submicrométricas también se ha logrado mediante un procedimiento de precipitación, como describen Calvo et al. en *J. Pharm. Sci.* 85:530 (1996). El procedimiento se basa en disolver el fármaco (p. ej., indometacina) y el polímero (policaprolactona) en cloruro de metileno y acetona, y después verter la disolución en una fase acuosa que contiene un tensioactivo (Poloxamer 188) para dar partículas de tamaño submicrométrico (216 nm). Sin embargo el procedimiento se lleva a cabo con concentraciones de disolvente a las que no se forma emulsión.

El paclitaxel es un compuesto natural que ha mostrado ser muy prometedor como un fármaco anticancerígeno. Por ejemplo, se ha encontrado que el paclitaxel es un agente activo frente al cáncer de ovario refractario a fármacos, de McGuire et al. Véase "Taxol: A Unique Anti-Neoplastic Agent With Significant Activity Against Advanced Ovarian Epithelial Neoplasms." *Ann. Int. Med.*, 111, 273-279 (1989). Todas las patentes, artículos científicos y otros documentos mencionados en la presente memoria se incorporan por referencia como si se reprodujeran en su totalidad a continuación.

Desgraciadamente, el paclitaxel tiene una solubilidad en agua extremadamente baja, lo que hace difícil proporcionar una forma farmacéutica adecuada. De hecho, en los ensayos clínicos en fase I, los emulsionantes administrados junto con el paclitaxel para compensar su baja solubilidad en agua produjeron reacciones alérgicas graves; al menos la muerte de un paciente fue causada por una reacción alérgica inducida por los emulsionantes. Las toxicidades limitantes de la dosis incluyen neutropenia, neuropatía periférica y reacciones de hipersensibilidad.

Brown et al., en "A Phase I Trial of Taxol Given by A 6-Hour Intravenous Infusion" *J. of Clin. Oncol.*, Vol. 9 No. 7, pp. 1261-1267 (July 1991), describen un ensayo en fase I en el que se proporcionaba Taxol como una infusión IV de 6 h cada 21 días sin medicación previa. 31 pacientes recibieron 64 tandas evaluables de Taxol. Un paciente tuvo una reacción de hipersensibilidad grave (o aguda), que requirió la interrupción de la infusión y el tratamiento inmediato para salvar la vida del paciente. Otro paciente experimentó una reacción de hipersensibilidad, pero no era grave como para requerir la interrupción de la infusión. La mielosupresión era limitante de la dosis, con dos muertes debidas a septicemia. La toxicidad no hematológica era de grado 1 y 2, excepto para un paciente con grado 3 de mucositis y dos pacientes con grado 3 de neuropatía. La neuropatía consistía en parestesia dolorosa reversible, que requirió interrupción de Taxol en dos pacientes. Se observaron 4 respuestas parciales (3 en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas, y una en un paciente con adenocarcinoma primario desconocido). La dosis máxima tolerada descrita era 275 mg/m<sup>2</sup>, y la dosis inicial en la fase II recomendada era 225 mg/m<sup>2</sup>. Se describió que la incidencia de la reacción de hipersensibilidad dependía del plan de administración, teniendo las infusiones de fármaco de 6 a 24 h de 0% a 8% de incidencia de reacciones de hipersensibilidad. También se describió que las reacciones de hipersensibilidad persistían con o sin medicación previa independientemente de la prolongación de los tiempos de infusión. Puesto que estos estudios en fase I se llevaron a cabo en pacientes enfermos terminales que padecían una variedad de cánceres, no se pudo determinar la eficacia de los tratamientos con Taxol.

En un estudio de Kris et al., se dio paclitaxel formulado con Cremaphor EL en alcohol deshidratado como una infusión IV de 3 h cada 21 días, con el intervalo de dosificación administrado de 15 a 230 mg/m<sup>2</sup> en 9 pasos de aumento. Kris et al. Concluyeron que "con la gravedad y la impredecibilidad de las reacciones de hipersensibilidad, el uso mayor de Taxol no está indicado con esta formulación de fármaco en este plan de administración". Véase, *Cancer Treat. Rep.*, Vol. 70, No. 5, May 1986.

Puesto que ensayos anteriores usando una inyección de bolo o infusiones cortas (1-3 h) indujeron reacciones anafilácticas u otras respuestas de hipersensibilidad, se llevaron a cabo más estudios en los que el Taxol se administraba sólo después de medicación previa con esteroides (tales como dexametasona), antihistaminas (tales como difenhidramina) y antagonistas de H<sub>2</sub> (tales como cimetidina o ranitidina), y el tiempo de infusión se prolongó a 24 h para intentar eliminar las reacciones alérgicas más graves. Se han publicado varios resultados de estudios en fase I y fase II usando infusiones de 24 h de Taxol con dosificaciones totales máximas de 250 mg/m<sup>2</sup>, repitiéndose en general el tratamiento cada 3 semanas. Los pacientes se trataron previamente con dexametasona, difenidramina y cimetidina para compensar las reacciones alérgicas. Véase, Einzig, et al., "Phase II Trial of Taxol in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma," *Cancer Investigation*, 9(2) 133-136 (1991), y A. B. Miller et al., "Reporting Results of Cancer Treatment," *Cancer*, Vol 47, 207-214 (1981).

Koeller et al., en "A Phase I Pharmacokinetic Study of Taxol Given By a Prolonged Infusion Without Premedication," *Proceedings of ASCO*, Vol. 8 (March, 1989), recomienda la medicación previa rutinaria para evitar el número significativo de reacciones alérgicas que se cree que son causadas por el cremophor (aceite de ricino polietoxilado) el vehículo usado para las infusiones de paclitaxel. Los pacientes recibieron dosis en el intervalo de 175 mg/m<sup>2</sup> a 275 mg/m<sup>2</sup>.

Wiernik et al. en "Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of Taxol," *Cancer Research*, 47, 2486-2493 (May 1, 1987), también describen la administración de paclitaxel en un vehículo cremophor por infusión IV a lo largo de un periodo de 6 h en un estudio de fase I. Las reacciones de hipersensibilidad de grado 3-4 ocurrieron en 4 de los 13 tratamientos. La dosis de partida para el estudio era 15 mg/m<sup>2</sup> (una tercera parte de la dosis tóxica más baja en perros). Las dosis se fueron aumentando, y se trató un mínimo de 3 pacientes con cada nivel de dosis hasta que se

identificó la toxicidad, y después se trataron 4-6 pacientes con cada nivel posterior. El estudio concluía que la neurotoxicidad y leucopenia eran limitantes de la dosis, y la dosis recomendada del ensayo en fase II era 250 mg/m<sup>2</sup> con medicación previa.

5 Otros estudios de ejemplo sobre el paclitaxel incluyen: Legha et al., "Phase II Trial of Taxol in Metastatic Melanoma," Vol. 65 (June 1990) pp. 2478-2481; Rowinsky et al., "Phase I and Pharmacodynamic Study of Taxol in Refractory Acute Leukemias," *Cancer Research*, 49, 4640-4647 (Aug. 15, 1989); Grem et al., "Phase I Study of Taxol Administered as a Short IV Infusion Daily For 5 Days," *Cancer Treatment Reports*, Vol. 71 No. 12, (December, 1987); Donehower et al., "Phase I Trial of Taxol in Patients With Advanced Cancer," *Cancer Treatment Reports*, Vol. 71, No. 12, (December, 1987); Holmes et al., "Phase II Study of Taxol in Patients (PT) with Metastatic Breast Cancer (MBC)," *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, Vol. 10, (March, 1991), pp. 60. Véase también Suffness. "Development of Antitumor Natural Products at the National Cancer Institute," *Gann Monograph on Cancer Research*, 31 (1989) pp. 21-44 (que recomienda que el Taxol® se de solo como una infusión de 24 h).

15 Weiss et al., en "Hypersensitivity Reactions from Taxol," *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 8, No. 7 (July 1990) pp. 1263-1268, describen que es difícil determinar una incidencia general fiable de reacciones de hipersensibilidad (HSR) debido a las amplias variaciones en las dosis y planes de administración usados de paclitaxel, y el grado desconocido de influencia que tiene el cambio del plan de administración de infusión y el uso de medicación previa en los incidentes de HSR. Por ejemplo, de 5 pacientes que recibieron Taxol en una infusión de 3 h con más de 190 mg/m<sup>2</sup> sin medicación previa, 3 tuvieron reacciones, mientras que sólo uno de 30 pacientes, a los que se administraron dosis incluso mayores con una infusión de 6 h sin medicación previa, tuvo una reacción. Por lo tanto, esto sugiere que prolongar la infusión más allá de 6 h es suficiente para reducir los incidentes de HSR. No obstante, Weiss et al. encontraron que los pacientes que recibían 250 mg/m<sup>2</sup> de Taxol administrado con una infusión de 24 h todavía tenían HSR definidas. Por lo tanto, aunque la prolongación de la infusión del fármaco a 6 h o 24 h puede reducir el riesgo de una reacción aguda, esta conclusión no se puede confirmar, puesto que 78% de las reacciones de HSR se producían en los siguientes 10 min después de iniciar la infusión de Taxol, lo que indica que la duración de tiempo planeada para la infusión total no tiene relación. Además, la concentración de paclitaxel en la infusión puede que no sea tampoco la diferencia puesto que un número sustancial de pacientes tenía reacciones con diferentes dosificaciones pequeñas de Taxol. Finalmente no sólo el mecanismo de la HSR del Taxol es desconocido, sino que tampoco está claro si el propio paclitaxel induce las HSR, o si las HSR son debidas al excipiente (Cremaphor EL; Badische Anilin und Soda Fabrik AG (BASF), Ludwigshafen, República Federal de Alemania). A pesar de la incertidumbre de si la medicación previa tiene o no alguna influencia en reducir la gravedad o el número de HSR, se recomendaba la terapia profiláctica, puesto que no hay daño conocido debido a su uso.

25 Las recomendaciones contradictorias en la técnica anterior relacionadas con si se debe usar medicación previa para evitar las reacciones de hipersensibilidad cuando se usan duraciones prolongadas de infusión, y la falta de datos de eficacia para las infusiones hechas a lo largo de un periodo de 6 h, han conducido al uso de una infusión de 24 h de dosis alta (aproximadamente 170 mg/m<sup>2</sup>) de paclitaxel en una emulsión de cremaphor EL como un protocolo de tratamiento del cáncer aceptado.

35 Aunque parece posible minimizar los efectos secundarios de administrar paclitaxel en una emulsión mediante el uso de una duración de la infusión larga, la duración de la infusión larga no es conveniente para los pacientes y es cara debido a la necesidad de controlar a los pacientes durante toda la duración de la infusión de 6 a 24 h. Además, la duración larga de la infusión requiere que los pacientes pasen al menos una noche en un hospital o clínica de tratamiento.

40 También se han descrito en la bibliografía dosis más altas de paclitaxel. Para determinar la dosis máxima tolerada (DMT) de paclitaxel en combinación con dosis alta de ciclofosfamida y cisplatino seguido de apoyo de células progenitoras hematopoyéticas autólogas (AHPCS), Stemmer et al. ("High-dose paclitaxel, cyclophosphamide, and cisplatin with autologous hematopoietic progenitor-cell support: A phase I trial". *J. Clin. Oncol.* 14:1463-1472, 1996) han llevado a cabo un ensayo en fase I en 49 pacientes con cáncer de mama con mal pronóstico, linfoma de no Hodgkin (NHL) o cáncer de ovario con dosis en aumento de paclitaxel en infusión a lo largo de 24 h, seguido de ciclofosfamida (5.625 mg/m<sup>2</sup>), y cisplatino (165 mg/m<sup>2</sup>) seguido de AHPCS. Se encontró la toxicidad limitante de la dosis en dos pacientes con 825 mg/m<sup>2</sup> de paclitaxel; un paciente murió de fallo multiorgánico y el otro desarrolló toxicidad respiratoria, en SNC y renal de grado 3, que desaparecieron. También se observaron polineuropatía de grado 3 y toxicidad en el SNC de grado 4. Se determinó que la DMT de esta combinación era paclitaxel (775 mg/m<sup>2</sup>), ciclofosfamida (5.625 mg/m<sup>2</sup>) y cisplatino (165 mg/m<sup>2</sup>) seguido de AHPCS. La polineuropatía sensitiva y mucositis eran toxicidades prominentes, pero ambas eran reversibles y tolerables. 18 de 33 pacientes (54%) con cáncer de mama lograron una respuesta parcial. Las respuestas también se observaron en pacientes con NHL (4 de 5 pacientes) y con cáncer de ovario (2 de 2 pacientes).

55 La patente de EE.UU. 5.641.803 describe el uso de Taxol con dosis de 175 y 135 mg/m<sup>2</sup> administrados en una infusión de 3 h. Los protocolos de infusión requieren el uso de medicación previa y se describen de reacciones de hipersensibilidad en 35% de los pacientes. Se describió neurotoxicidad en 51% de los pacientes, con 66% de los pacientes experimentando neurotoxicidad en el grupo de dosis alta y 37% en el grupo de dosis bajas. Además, se observó que 48% de los pacientes experimentaban neurotoxicidad para tiempos de infusión más largos de 24 h, mientras que 54% de los pacientes experimentaban neurotoxicidad para la infusión más corta de 3 h.

Existe evidencia en la bibliografía de que dosis más altas de paclitaxel dan como resultado una tasa de respuesta más alta. La dosis y plan de administración óptimos para el paclitaxel todavía se están investigando. Para evaluar la posibilidad de que la intensidad de la dosis de paclitaxel pueda ser importante en la inducción de la respuesta a la enfermedad, Reed et al. de NCI (Reed E, Bitton R, Sarosy G, and Kohn E, "Paclitaxel dose intensity". *Journal of Infusional Chemotherapy* 6:59-63, 1996) analizaron los datos de ensayo en fase II disponibles en el tratamiento del cáncer de ovario y del cáncer de mama. Sus resultados sugieren que la relación entre la respuesta a la enfermedad objetiva y la intensidad de la dosis de paclitaxel en el cáncer de ovario recurrente es estadísticamente muy significativa con un p valor bilateral de 0,22. La relación en el cáncer de mama es incluso más fuerte, con un p valor bilateral de 0,004. Con 135 mg/m<sup>2</sup>/21 días, la tasa de respuesta objetiva era 13,2%; y con 250 mg/m<sup>2</sup>/21 días, la tasa de respuesta objetiva era 35,9%. La tasa de respuesta vista con la dosis intermedia de 175 mg/m<sup>2</sup> era lineal con los resultados de 135 mg/m<sup>2</sup> y 250 mg/m<sup>2</sup> y el análisis de regresión lineal muestra un coeficiente de correlación para estos datos de 0,946 (Reed et al., 1996).

En un estudio de Holmes et al. ("Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer". *J. Natl. Cancer Inst.* 83:1797-1805, 1991), y en MSKCC (Reichman BS et al., "Paclitaxel and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor as initial chemotherapy for metastatic breast cancer". *J. Clin. Oncol.* 11:1943-1951, 1993), se mostró que dosis más altas de paclitaxel de hasta 250 mg/m<sup>2</sup> producían respuestas mayores (60%) que la dosis de 175 mg/m<sup>2</sup> (26%) aprobada actualmente para el paclitaxel. Sin embargo, estos resultados no se han reproducido debido a la mayor toxicidad con estas dosis más altas. Sin embargo, estos estudios tienen la prueba del potencial aumento de la tasa de respuesta con dosis aumentadas de paclitaxel.

Puesto que es necesaria la medicación previa para el Taxol, que con frecuencia necesita que el paciente pase la noche en el hospital, es muy conveniente desarrollar una formulación de paclitaxel que evite la necesidad de la medicación previa.

Puesto que la medicación previa es necesaria para el Taxol, debido a las HSR asociadas con la administración del fármaco, es muy conveniente desarrollar una formulación de paclitaxel que no produzca a reacciones de hipersensibilidad. También es conveniente desarrollar una formulación de paclitaxel que no produzca neurotoxicidad.

Puesto que en las infusiones de Taxol en general van precedidas de medicación previa, y requieren el seguimiento después de la infusión y mantenimiento de registros, que a menudo necesita que el paciente permanezca durante la noche en el hospital, es muy conveniente desarrollar una formulación de paclitaxel que permita que los receptores sean tratados de forma ambulatoria.

Puesto que se ha demostrado que dosis más altas de Taxol logran respuestas clínicas mejoradas, aunque con mayor toxicidad, es conveniente desarrollar una formulación de paclitaxel que pueda lograr estas dosis sin esta toxicidad.

Puesto que se ha demostrado que la toxicidad limitante de la dosis del Taxol es toxicidad cerebral y neurotoxicidad, es conveniente desarrollar una formulación de paclitaxel que disminuya dicha toxicidad.

También es conveniente eliminar la medicación previa puesto que ésta aumenta la incomodidad del paciente y aumenta el coste y la duración del tratamiento.

También es conveniente acortar la duración de la infusión de paclitaxel, actualmente administrada en 3-24 h, para minimizar la estancia del paciente en el hospital o clínica.

Puesto que el Taxol actualmente está aprobado para la administración en concentraciones entre 0,6-1,2 mg/ml, y una dosis típica en seres humanos que es aproximadamente 250-350 mg, esto da volúmenes de infusión típicamente mayores de 300 ml. Es conveniente reducir estos volúmenes de infusión desarrollando formulaciones de paclitaxel que sean estables en concentraciones mayores para así reducir el tiempo de administración.

Puesto que la infusión de Taxol está limitada al uso de tubos y bolsas o botellas I.V. especiales debido a la lixiviación de los plastificantes por el cremaphor en la formulación de Taxol®, es conveniente desarrollar una formulación de paclitaxel que no tenga cremaphor y que no lixivie materiales potencialmente tóxicos de los tubos o bolsas de plástico usados convencionalmente para la infusión intravenosa.

#### Breve descripción de la invención

Por lo tanto, un objeto de esta invención es suministrar agentes farmacológicamente activos (p. ej., paclitaxel, taxano, taxotere y similares) en forma no modificada en una composición que no cause reacciones alérgicas debido a la presencia de emulsionantes y agentes solubilizantes añadidos, como se usan actualmente en el suministro de fármacos.

Otro objeto de la presente invención es suministrar agentes farmacológicamente activos en una composición de micropartículas o nanopartículas, opcionalmente suspendidas en un líquido biocompatible adecuado.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar métodos para la formación de partículas submicrométricas

(nanopartículas) de agentes farmacológicamente activos mediante una técnica de evaporación de disolvente de una emulsión de aceite en agua. Algunos métodos usan proteínas como agentes estabilizantes. Algunos métodos se llevan a cabo en ausencia de cualquier tensioactivo convencional, y en ausencia de cualquier material nuclear polimérico.

- 5 Estos y otros objetos de la invención serán evidentes tras la revisión de la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

Los autores de la invención han descubierto que agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua se pueden suministrar en forma de micropartículas o nanopartículas que son adecuadas para la administración parenteral en suspensión acuosa. Este modo de suministro evita la necesidad de administración de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua (p. ej., paclitaxel) en una emulsión que contiene, por ejemplo, etanol y aceite de ricino polietoxilado, diluidos en disolución salina normal (véase, por ejemplo, Norton et al., en *Abstracts of the 2nd National Cancer Institute Workshop on Taxol & Taxus*, Sep. 23-24, 1992). Una desventaja de dichas composiciones conocidas es su propensión a producir efectos secundarios alérgicos.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una formulación de paclitaxel que comprende nanopartículas que comprenden paclitaxel que tiene un recubrimiento de proteína, teniendo dichas nanopartículas un diámetro medio no mayor de aproximadamente 200 nm, en donde la concentración del paclitaxel en la formulación es al menos 2,0 mg/ml, y en donde la concentración del paclitaxel en la formulación no es 2,0 mg/ml.

Los autores de la invención describen métodos para formar nanopartículas de agentes farmacológicamente activos mediante una técnica de evaporación del disolvente de una emulsión de aceite en agua preparada en una variedad de condiciones. Por ejemplo, se pueden usar fuerzas de cizalladura altas (p. ej., tratamiento con ultrasonidos, homogeneización con alta presión o similares) en ausencia de cualquier tensioactivo convencional, y sin usar ningún material nuclear polimérico para formar la matriz de la nanopartícula. En su lugar, se usan proteínas (p. ej., albúmina de suero humano) como agente estabilizante. En un método alternativo, se pueden formar nanopartículas sin necesidad de ninguna fuerza de cizalladura alta, simplemente seleccionando materiales que forman microemulsiones de forma espontánea.

Los autores de la invención también describen un método para la formación reproducible de nanopartículas inusualmente pequeñas (menores de 200 nm de diámetro), que se pueden esterilizar por filtración a través de un filtro de 0,22 micrómetros. Esto se logra por la adición de un disolvente soluble en agua (p. ej., etanol) a la fase orgánica y seleccionando con cuidado el tipo de fase orgánica, la fracción de fase, y la concentración de fármaco en la fase orgánica. La capacidad de formar nanopartículas de un tamaño que se pueda filtrar a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  tiene una gran importancia y significancia, ya que las formulaciones que contienen una cantidad significativa de cualquier proteína (p. ej., albúmina), no se pueden esterilizar por métodos convencionales tales como en autoclave, debido a la coagulación térmica de la proteína.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, los autores de la invención han desarrollado composiciones útiles para el suministro in vivo de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua. Las composiciones de la invención comprenden agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua (en forma de sólido o líquido) contenidos dentro de una cubierta polimérica. La cubierta polimérica es un polímero biocompatible reticulado. La cubierta polimérica que contiene en la misma los agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua, después se puede suspender en un líquido acuoso biocompatible para la administración.

La invención proporciona además un sistema de suministro de fármacos en el que parte de las moléculas del agente farmacológicamente activo están unidas a la proteína (p. ej., albúmina de suero humana), y por lo tanto están inmediatamente biodisponibles tras la administración a un mamífero. La otra parte del agente farmacológicamente activo está contenido dentro de las nanopartículas recubiertas por proteína. Las nanopartículas que contienen el agente farmacológicamente activo están presentes como un componente activo puro, sin dilución por ninguna matriz polimérica.

Un gran número de agentes farmacológicamente activos convencionales circulan en la circulación sanguínea unidos a proteínas portadoras (a través de interacciones hidrófobas o iónicas) de las cuales el ejemplo más común es la albúmina del suero. Los métodos de la invención y las composiciones producidas mediante los mismos proporcionan un agente farmacológicamente activo que está "pre-unido" a una proteína (a través de interacciones hidrófobas o iónicas) antes de la administración.

La presente descripción demuestra ambos modos de biodisponibilidad para el paclitaxel descritos antes, un fármaco anticancerígeno capaz de unirse a albúmina de suero humano (véase, por ejemplo, Kumar et al., en *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 80:337 (1993)). La alta concentración de albúmina en las partículas de la invención, comparado con el Taxol® (formulación de paclitaxel de Bristol-Myers Squibb), proporciona una cantidad significativa del fármaco en forma de moléculas unidas a la albúmina, que es también el vehículo natural del fármaco en la circulación sanguínea.

Además, se aprovecha la capacidad de la albúmina de suero humano para unirse al paclitaxel, así como a otros



fármacos, lo cual potencia la capacidad del paclitaxel de absorberse en la superficie de las partículas. Puesto que la albúmina está presente en las partículas de fármaco coloidal (formadas tras eliminación del disolvente orgánico), se facilita la formación de una dispersión coloidal que es estable durante periodos prolongados, debido a una combinación de repulsión eléctrica y estabilización estérica.

5 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan también partículas submicrométricas en forma de polvo, que se pueden reconstituir fácilmente en agua o disolución salina. El polvo se obtiene después de eliminación del agua por liofilización. La albúmina de suero humano sirve como componente estructural de algunas nanopartículas de la invención, y también como un crioprotector y ayudante de reconstitución. La preparación de partículas filtrables a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  de acuerdo con el método de la invención como se describe en la presente memoria, seguido de secado o liofilización, produce una formulación sólida estéril útil para la inyección intravenosa.

10 La invención proporciona, en un aspecto particular, una composición de fármacos anticancerígenos, por ejemplo, paclitaxel, en forma de nanopartículas en una dispersión líquida o como un sólido que se puede reconstituir fácilmente para la administración. Debido a las propiedades específicas de determinados fármacos, por ejemplo, paclitaxel, dichas composiciones no se pueden obtener por métodos de evaporación del disolvente convencionales que se basan en el uso de tensioactivos. En presencia de diferentes tensioactivos, se forman cristales de fármaco muy grandes (p. ej., tamaño de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a varios cientos de micrómetros) en unos pocos minutos de almacenamiento, después del procedimiento de preparación. El tamaño de dichos cristales típicamente es mucho mayor que el tamaño permitido para la inyección intravenosa.

15 Aunque se reconoce que las partículas producidas de acuerdo con la invención pueden ser cristalinas, amorfas, o una mezcla de las mismas, en general se prefiere que el fármaco esté presente en la formulación en una forma amorfa. Esto conduciría a una mayor facilidad de disolución y absorción, produciendo una mejor biodisponibilidad.

20 El agente anticancerígeno paclitaxel tiene una actividad clínica notable en una serie de cánceres humanos que incluyen cáncer de ovario, mama, pulmón, esófago, región de cabeza y cuello, vejiga y linfomas. Actualmente está aprobado para el tratamiento de carcinoma de ovario donde se usa en combinación con cisplatino, y para el cáncer de mama metastásico en el que ha fracasado el tratamiento previo con un régimen de quimioterapia de combinación. La mayor limitación del Taxol® es su poca solubilidad y por consiguiente la formulación de BMS que contiene 50% de Cremaphor EL y 50% de etanol como vehículo solubilizante. Cada vial de esta formulación contiene 30 mg de paclitaxel disuelto en una concentración de 6 mg/ml. Antes de la administración intravenosa esta formulación debe diluirse 1:10 en disolución salina para una disolución de dosificación final que contiene 0,6 mg/ml de paclitaxel. Esta formulación se ha asociado con reacciones de hipersensibilidad graves en animales (Lorenz et al., *Agents Actions* 1987, 7, 63-67) y seres humanos (Weiss et al., *J. Clin. Oncol.*, 8, 1263-68 (1990)) y por consiguiente requiere la medicación previa de los pacientes con corticoesteroides (p. ej., dexametasona) y antihistaminas. La gran dilución da grandes volúmenes de infusión (dosis típica de 175  $\text{mg/m}^2$  o hasta 1 litro) y tiempos de infusión que están en el intervalo de 3 h a 24 h. Por lo tanto, es necesaria una formulación alternativa menos tóxica para el paclitaxel.

25 El Capxol™ es una nueva formación exenta de cremophor para el fármaco anticancerígeno paclitaxel. Los autores de la invención, basándose en estudios en animales, creen que una formulación exenta de cremophor será significativamente menos tóxica y no requerirá la medicación previa de los pacientes. La medicación previa es necesaria para reducir la hipersensibilidad y anafilaxia que se produce como resultado del cremophor en la formulación de paclitaxel actualmente aprobada y comercializada Taxol®. El Capxol™ es un polvo liofilizado para la reconstitución y administración intravenosa. Cuando se reconstituye con un medio acuoso adecuado tal como inyección de cloruro sódico al 0,9% o inyección de dextrosa al 5%, Capxol™ forma una disolución coloidal estable de paclitaxel. El tamaño de la suspensión coloidal puede estar en el intervalo de 20 nm a 8  $\mu\text{m}$ , con un intervalo preferido de aproximadamente 20-400 nm. Los dos componentes mayoritarios del Capxol™ son el paclitaxel sin modificar y la albúmina de suero humano (HSA). Puesto que la HSA es muy soluble en agua, el Capxol™ se puede reconstituir a cualquier concentración deseada de paclitaxel, limitado solo por los límites de solubilidad de la HSA. Por lo tanto, el Capxol™ se puede reconstituir en un amplio intervalo de concentraciones que van desde diluido (paclitaxel 0,1 mg/ml) a concentrado (paclitaxel 20 mg/ml). Esto puede dar como resultado volúmenes de administración bastante pequeños.

30 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan composiciones y métodos útiles para el suministro in vivo de productos biológicos, en forma de nanopartículas que son adecuadas para la administración parenteral en suspensión acuosa. Las composiciones de la invención se estabilizan mediante un polímero. El polímero es un material biocompatible, tal como proteína albúmina. El uso de las composiciones de la invención para el suministro de productos biológicos evita la necesidad de administración de productos biológicos en diluyentes o vehículos tóxicos, por ejemplo, etanol y aceite de ricino polietoxilado, diluidos en disolución salina normal (véase, por ejemplo, Norton et al., en *Abstracts of the 2nd National Cancer Institute Workshop on Taxol & Taxus*, Sep. 23-24, 1992). Una desventaja de dichas composiciones conocidas es la propensión a producir efectos secundarios alérgicos graves y otros.

35 Se sabe que el suministro de productos biológicos en forma de una suspensión de partículas permite dirigirse a órganos tales como el hígado, pulmones, bazo, circulación linfática y similares, debido a la absorción en estos

5 órganos de las partículas por el sistema reticuloendotelial (SRE) de las células. La dirección a los órganos que contienen SRE se puede controlar mediante el uso de partículas de diferentes tamaños, y mediante la administración por diferentes vías. Pero cuando se administraba a ratas, se encontró que el Capxol® de forma inesperada y sorprendente se acumulaba en tejidos distintos de los que contenían SRE tales como la próstata, páncreas, testículos, túbulos seminíferos, hueso, etc., en un nivel significativamente mayor que el Taxol® con dosis similares.

10 Por lo tanto, es muy sorprendente que la formulación de paclitaxel de la invención, Capxol®, una formulación de nanopartículas, se concentre en tejidos tales como la próstata, páncreas, testículos, túbulos seminíferos, hueso, etc., es decir, en órganos que no contienen SRE, con un nivel significativamente mayor que una formulación de paclitaxel que no es en partículas tal como Taxol®. Por lo tanto, el Capxol® se puede usar para tratar cánceres de estos tejidos con una eficacia mayor que el Taxol®. Sin embargo, la distribución a muchos otros tejidos es similar para el Capxol® y el Taxol®, por lo tanto se espera que el Capxol® mantenga una actividad anticancerígena al menos igual que la del Taxol® en otros tejidos.

15 La base para la localización en la próstata puede ser un resultado del tamaño de partículas de la formulación (20-400 nm) o de la presencia de la proteína albúmina en la formulación, que puede producir la localización dentro del tejido prostático mediante receptores de membrana específicos (gp 60, gp 18, gp 13 y similares). También es probable que otros polímeros biocompatibles, biodegradables, distintos de la albúmina, puedan mostrar especificidad para determinados tejidos tales como la próstata, dando como resultado una alta concentración local de paclitaxel en estos tejidos como resultado de las propiedades descritas antes. Dichos materiales biocompatibles están contemplados dentro del alcance de esta invención. Una realización preferida de una composición para lograr altas concentraciones locales de paclitaxel en la próstata es una formulación que contiene paclitaxel y albúmina con un tamaño de partículas en el intervalo de 20-400 nm, y exenta de cremophor. Se ha demostrado que esta realización también da como resultado niveles de concentraciones mayores del paclitaxel en el páncreas, riñón, pulmón, corazón, hueso y bazo cuando se compara con el Taxol® con dosis equivalentes. Estas propiedades proporcionan nuevas aplicaciones de esta formulación de paclitaxel incluyendo métodos de reducción de los niveles de testosterona, realización de orquiectomía médica y proporcionar altas concentraciones locales en la vasculatura coronaria para el tratamiento de la reestenosis.

20 También es muy sorprendente que el paclitaxel, cuando se administra como Capxol™, es metabolizado a sus metabolitos a una velocidad mucho más lenta que cuando se administra como Taxol®. Esto representa una mayor actividad anticancerígena durante periodos más prolongados con dosis similares de paclitaxel.

25 También es muy sorprendente que cuando el Capxol™ y el Taxol® se administran a ratas con dosis equivalentes de paclitaxel, resulta un grado mucho mayor de mielosupresión para el grupo de Taxol® comparado con el grupo de Capxol®. Esto puede dar como resultado menores incidencias de infecciones y episodios de fiebre (p. ej., neutropenia febril). También puede reducir el tiempo del ciclo entre tratamientos, que actualmente es de 21 días. Por lo tanto, el uso de Capxol™ puede proporcionar una ventaja sustancial frente al Taxol®.

30 Se encontró sorprendentemente que el vehículo del Taxol® (cremophor/etanol diluido en disolución salina) solo causaba mielosupresión fuerte y causaba reacciones de hipersensibilidad graves y muerte en varios grupos de dosis de ratones. No se observaron dichas reacciones en los grupos de Capxol™ con dosis equivalentes y mayores. Por lo tanto, Capxol™, una formulación de paclitaxel que está exenta del vehículo del Taxol®, es sustancialmente ventajosa.

35 También es muy sorprendente que cuando el Capxol™ y el Taxol® se administran a ratas con dosis equivalentes de paclitaxel, se observa una toxicidad mucho menor para el Capxol™ comparado con el Taxol®, como se pone de manifiesto por valores de DL<sub>50</sub> significativamente más altos. Esto puede permitir administrar a los pacientes dosis mayores terapéuticamente más eficaces de paclitaxel. Hay pruebas en la bibliografía que muestran tasas de respuesta mayores a dosis más altas de paclitaxel. La formulación de Capxol™ puede permitir la administración de estas dosis más altas debido a la menor toxicidad y de esta forma explotar todo el potencial de este fármaco.

40 También es sorprendente que el Capxol™, una formulación del fármaco sustancialmente insoluble en agua, paclitaxel, sea estable cuando se reconstituye en un medio acuoso con varias concentraciones diferentes en el intervalo de, pero no limitado a 0,1-20 mg/ml. Esto ofrece una ventaja sustancial frente al Taxol® durante la administración del fármaco ya que da como resultado volúmenes de infusión menores, supera los problemas de inestabilidad conocidos para el Taxol® (tales como la precipitación) y evita el uso de un filtro en línea, en la línea de infusión. Por lo tanto, el Capxol™ simplifica y mejora mucho la administración de paclitaxel a los pacientes.

45 También es sorprendente que el Capxol™ cuando se administra a ratas con dosis de paclitaxel equivalentes al Taxol®, no muestra signos de neurotoxicidad, mientras que el Taxol®, incluso en dosis bajas, muestra efectos neurotóxicos.

50 La formulación de la invención permite además la administración de paclitaxel, y otros agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua, usando un volumen mucho menor de líquido y requiriendo un tiempo de

administración muy reducido con respecto a la administración de los volúmenes y a los tiempos necesarios por los sistemas de suministro de la técnica anterior.

En combinación con una matriz de polímero biocompatibles, la formulación de la invención (Capxol™) permite el suministro sostenido local de paclitaxel con menor toxicidad y actividad prolongada.

- 5 Los sorprendentes descubrimientos anteriores para el Capxol™ ofrecen el potencial de mejorar sustancialmente la calidad de vida de los pacientes que reciben paclitaxel.

10 El Capxol™ es un polvo liofilizado que contiene sólo paclitaxel y albúmina de suero humano. Debido a la naturaleza de la disolución coloidal formada tras la reconstitución del polvo liofilizado, no son necesarios emulsionantes tóxicos tales como cremophor (en la formulación de paclitaxel de BMS) o polisorbato 80 (como en la formulación de docetaxel de Rhone Poulenc) ni disolventes tales como el etanol para solubilizar el fármaco. La eliminación de los emulsionantes tóxicos reducirá las incidencias de reacciones graves de hipersensibilidad y anafilácticas que se sabe que se producen en los productos de TAXOL.

Además, no se prevé una medicación previa con esteroides y antihistaminas antes de la administración del fármaco.

- 15 Debido a las toxicidades reducidas, como se pone de manifiesto por los estudios de DL<sub>10</sub>/DL<sub>50</sub>, se puede usar una dosis mayor para una mayor eficacia.

La reducción en la mielosupresión (comparado con la formulación de BMS) se espera que reduzca el periodo del ciclo de tratamiento (actualmente 3 semanas) y mejore los resultados terapéuticos.

- 20 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una formulación de paclitaxel que comprende nanopartículas que comprenden paclitaxel que tiene un recubrimiento de proteína, teniendo dichas nanopartículas un diámetro medio no mayor de aproximadamente 200 nm, en donde la concentración del paclitaxel en la formulación es al menos 2,0 mg/ml, y en donde la concentración del paclitaxel en la formulación no es 2,0 mg/ml.

El Capxol™ se puede administrar en concentraciones mucho mayores (hasta 20 mg/ml) comparado con la formulación de BMS (0,6 mg/ml), permitiendo infusiones de volumen mucho menor, y la administración como un bolo intravenoso.

- 25 El Taxol® tiene además la desventaja de que sólo se puede infundir con equipos de infusión de nitroglicerina y poliolefina debido a la lixiviación de los plastificantes de los tubos de infusión en la formulación. El Capxol™ no muestra lixiviación y se puede usar con cualquier tubo de infusión convencional. Además, solo se deben usar envases de vidrio o poliolefina para almacenar todas las disoluciones que contienen cremophor. La formulación de Capxol™ no tiene dichas limitaciones.

- 30 Otro problema reconocido con el Taxol® es la precipitación del paclitaxel en catéteres permanentes. Esto produce la dosificación irregular y poco controlada. Debido a la estabilidad inherente de la disolución coloidal de la nueva formulación, Capxol™, se alivia el problema de precipitación. Debido a este problema de precipitación, la administración de Taxol® requiere el uso de filtros en línea para eliminar precipitados y otra materia en partículas. El Capxol™ no tiene este requisito debido a su estabilidad inherente.

- 35 La bibliografía sugiere que las partículas en el intervalo inferior de tamaños de cientos de nanómetros se distribuyen con preferencia en los tumores a través del goteo de los vasos sanguíneos en el sitio del tumor. Por lo tanto, las partículas coloidales de paclitaxel en la formulación de Capxol™ pueden mostrar un efecto de dirección preferente, reduciendo mucho los efectos secundarios del paclitaxel administrado en la formulación de Taxol®.

- 40 Por lo tanto, un objeto principal de la presente invención es proporcionar una nueva formulación de paclitaxel que proporcione las características deseables anteriores.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una formulación nueva de paclitaxel que localice el paclitaxel en determinados tejidos, proporcionando así una mayor actividad anticancerígena en esos sitios.

Otro objeto de la invención es administrar el paclitaxel con concentraciones mayores de aproximadamente 2 mg/ml con el fin de reducir los volúmenes de infusión.

- 45 Otro objeto de la invención también es proporcionar una formulación de paclitaxel que esté exenta del vehículo del Taxol®.

Otro objeto más de la invención es proporcionar una formulación de paclitaxel que mejore la calidad de vida de los pacientes que reciben paclitaxel para el tratamiento del cáncer.

#### Breve descripción de las figuras

- 50 La figura 1 presentan los resultados de la administración intravenosa de nanopartículas de paclitaxel a ratones que llevan tumores (n=5 en cada grupo), que muestra una remisión completa del tumor en el grupo de tratamiento (■),

comparado con un grupo de control que recibe disolución salina (●). Se observa crecimiento tumoral prácticamente incontrolado en el grupo de control. La dosis para el grupo de tratamiento es 20 mg/kg de paclitaxel administrado como un bolo intravenoso durante 5 días consecutivos.

5 La figura 2 presenta los resultados de la administración intraperitoneal de nanopartículas de paclitaxel en ratas que han desarrollado artritis en las patas después de inyección intradérmica de colágeno. Se miden los volúmenes de las patas y se indica la gravedad de la enfermedad. Los volúmenes de las patas se normalizan a 100% al principio del tratamiento. El día 0 representa el inicio del tratamiento. Hay 3 grupos: grupo de control que recibe disolución salina (n=2, mostrado como una línea fina y marcado en la figura como "sin tratamiento"); un primer grupo de tratamiento que recibe nanopartículas de paclitaxel con una dosis de 1 mg/kg (n=4, mostrado como una línea gruesa y marcado en la figura como "nanopartículas de paclitaxel 1,0 mg/kg"), y un segundo grupo de tratamiento que recibe terapia de combinación de nanopartículas de paclitaxel con una dosis de 0,5 mg/kg y prednisona con una dosis de 0,2 mg/kg (n=4, mostrado como una línea gruesa y marcado en la figura como "prednisona 0,2 mg/kg + nanopartículas de paclitaxel 0,5 mg/kg"). Los dos grupos de tratamiento muestran una reducción notable del volumen de la pata con el tiempo, indicando una remisión de la artritis, mientras que el grupo de control mostraba un aumento del volumen de la pata a lo largo del mismo periodo de tiempo.

La figura 3 presenta los resultados de un estudio de mielosupresión en ratas. Se dio Capxol™ a un primer grupo de 3 ratas, y se dio Taxol® a un segundo grupo de 3 ratas, ambos con una dosis de 7 ml de formulación por kg de peso corporal, donde cada formulación contenía paclitaxel 5 mg/kg. Todas las dosis se dieron como bolo IV a través de la vena de la cola. La figura 3 muestra el % de cambio en el recuento de glóbulos blancos (WBC) como un indicador de la mielosupresión.

La figura 4 presenta un estudio piloto con Capxol™ para determinar los intervalos de dosis objetivo y la eficacia. Se implantó por vía subcutánea en los ratones (n=10) el tumor mamario MX-1 y el tratamiento se inició cuando el tumor alcanzó aproximadamente 150-300 mg de tamaño. Esto ocurría sobre el día 12 y el tratamiento se inició el día 13 después de la siembra inicial. El Capxol™ se reconstituyó en disolución salina para obtener una disolución coloidal de nanopartículas de paclitaxel. Los ratones que llevaban tumor (n=5) se trataron con Capxol™ reconstituido con una dosis de 20 mg/kg (indicado por VIV-1), dado por inyección de bolo en la vena de la cola cada día durante cinco días consecutivos. El grupo de control que llevaba tumor (n=5) recibió solo disolución salina con el mismo programa. Se controló el tamaño de los tumores en función del tiempo. El grupo de control mostró un gran aumento del peso del tumor hasta una mediana de más de 4500 mg y todos los animales en este grupo se sacrificaron entre el día 28 y el día 39. Por otra parte, el grupo de tratamiento mostró una notable eficacia y todos los animales tenían tumores no medibles el día 25. Los animales en este grupo se sacrificaron todos el día 39, momento en el que no mostraban prueba de recurrencia ni mostraban prueba de tumor.

### Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una formulación de paclitaxel que comprende nanopartículas que comprenden paclitaxel que tiene un recubrimiento de proteína, teniendo dichas nanopartículas un diámetro medio no mayor de aproximadamente 200 nm, en donde la concentración del paclitaxel en la formulación es al menos 2,0 mg/ml, y en donde la concentración del paclitaxel en la formulación no es 2,0 mg/ml.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan métodos para reducir la toxicidad del paclitaxel en un sujeto que recibe tratamiento con paclitaxel, comprendiendo dicho método la administración sistémica de dicho paclitaxel a dicho sujeto en una formulación farmacéuticamente aceptable, con una dosis de al menos 175 mg/m<sup>2</sup> a lo largo de un periodo de administración no superior a 2 horas.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona también un método para administrar paclitaxel a un sujeto que lo necesite, sin la necesidad de medicación previa antes de la administración de dicho paclitaxel, comprendiendo dicho método la administración sistémica de dicho paclitaxel a dicho sujeto en una formulación farmacéuticamente aceptable con una dosis de al menos 135 mg/m<sup>2</sup> a lo largo de un periodo de administración no superior a 2 horas.

De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona un método para administrar paclitaxel a un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método la administración sistémica de dicho paclitaxel a dicho sujeto en una formulación farmacéuticamente aceptable con una dosis de al menos 135 mg/m<sup>2</sup> a lo largo de un periodo de administración no superior a 2 horas, con un ciclo de tratamiento menor de 3 semanas.

De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona un método para administrar paclitaxel a un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método la administración sistémica de dicho paclitaxel a dicho sujeto en una formulación farmacéuticamente aceptable con una dosis de al menos 250 mg/m<sup>2</sup>.

De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona un método para administrar paclitaxel a un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método la administración sistémica de dicho paclitaxel a dicho sujeto en una formulación que se puede administrar de forma segura usando equipamiento médico hecho de materiales que contienen componentes extraíbles.

De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona un método para administrar paclitaxel

a un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método la administración sistémica de dicho paclitaxel a dicho sujeto en una formulación que se puede administrar de forma segura sin usar un filtro en línea.

5 De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona un método para administrar paclitaxel a un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método la administración sistémica de una dosis completa de dicho paclitaxel a dicho sujeto en volumen menor de 250 ml.

De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona un método para administrar paclitaxel a un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método la administración sistémica de dicho paclitaxel a dicho sujeto a una velocidad de al menos 50 mg/m<sup>2</sup>/h.

10 De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona una formulación de paclitaxel que tiene toxicidad hematológica reducida, a un sujeto que recibe tratamiento con paclitaxel, comprendiendo dicha formulación paclitaxel en una formulación farmacéuticamente aceptable adecuada para la administración sistémica en una dosis de al menos 175 mg/m<sup>2</sup> a lo largo de un periodo de administración no superior a 2 h.

15 De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona una formulación de paclitaxel adecuada para la administración de paclitaxel a un sujeto que lo necesite, sin la necesidad de medicación previa antes de la administración de dicho paclitaxel, comprendiendo dicha formulación paclitaxel en una formulación farmacéuticamente aceptable adecuada para la administración sistémica en una dosis de al menos 135 mg/m<sup>2</sup> a lo largo de un periodo de administración no superior a 2 h.

20 De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona una formulación de paclitaxel adecuada para la administración de paclitaxel a un sujeto que lo necesite con un ciclo de tratamiento menor de 3 semanas, comprendiendo dicha formulación paclitaxel en una formulación farmacéuticamente aceptable adecuada para la administración sistémica en una dosis de al menos 135 mg/m<sup>2</sup> a lo largo de un periodo de administración no superior a 2 h.

25 De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona una formulación de paclitaxel adecuada para la administración de paclitaxel a un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicha formulación paclitaxel en una formulación farmacéuticamente aceptable exenta de cremaphor.

De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona una formulación liofilizada de paclitaxel adecuada para la administración de paclitaxel a un sujeto que lo necesite tras la reconstitución.

De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona una formulación congelada de paclitaxel adecuada para la administración de paclitaxel a un sujeto que lo necesite tras la descongelación.

30 De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona una formulación líquida de paclitaxel que comprende agua y paclitaxel en una concentración de al menos 2,0 mg/ml.

De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona un sistema de suministro de fármaco que comprende partículas de un agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua, sólido o líquido, recubiertas con una proteína,

35 en donde dicho recubrimiento de proteína tiene proteína libre asociada con el mismo,

en donde una parte de dicho agente farmacológicamente activo está contenido dentro de dicho recubrimiento de proteína y una parte de dicho agente farmacológicamente activo está asociado con dicha proteína libre, y

en donde el diámetro medio de dichas partículas no es mayor que aproximadamente 1 micrómetro.

40 De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona una formulación de fármaco adecuada para la administración de fármaco a un sujeto que lo necesite por inhalación, comprendiendo dicha formulación micropartículas de proteína que tienen un tamaño de aproximadamente 1-10 μm, en donde dichas micropartículas de proteína comprenden nanopartículas de fármaco que tienen un tamaño de aproximadamente 50-1.000 nm, más opcionalmente un excipiente.

45 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan también métodos para preparar agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua para el suministro in vivo, comprendiendo dicho método:

a) combinar

i) un disolvente orgánico que tiene dicho agente activo disuelto en el mismo;

ii) agua o una disolución acuosa;

iii) un tensioactivo; y

iv) un cotensioactivo

que forman espontáneamente una emulsión; y

b) eliminar dicho disolvente orgánico para dar una suspensión de nanopartículas de dicho agente activo en dicha agua.

5 De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona un método para hacer nanopartículas que contienen un agente activo, comprendiendo dicho método combinar una fase no volátil, una fase volátil y un tensioactivo que forman espontáneamente una emulsión, en donde dicha fase volátil contiene dicho agente activo, y eliminar dicha fase volátil y de esta forma obtener una suspensión de dichas nanopartículas sólidas en dicha fase no volátil, en donde dichas nanopartículas contienen dicho agente activo y tienen un diámetro medio menor de 100 nm.

10 De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona un método para hacer nanopartículas que contienen un agente activo, comprendiendo dicho método combinar una fase no volátil y una fase volátil que forman espontáneamente una microemulsión, en donde dicha fase no volátil contiene dicho agente activo, y eliminar dicha fase no volátil y de esta forma obtener nanopartículas sólidas en dicha fase volátil, en donde dichas nanopartículas contienen dicho agente activo y tienen un diámetro medio menor de 100 nm.

15 Las composiciones producidas por los métodos descritos antes son particularmente ventajosas, ya que se ha observado que proporcionan una forma de toxicidad muy baja de una variedad de agentes farmacológicamente activos. También se describen en la presente memoria otros métodos para hacer formas de toxicidad baja de los agentes farmacológicamente activos, p. ej., paclitaxel.

20 En una realización preferida, el diámetro medio de las partículas descritas antes no es mayor de aproximadamente 200 nm. Dichas partículas son particularmente ventajosas ya que se pueden someter a filtración estéril, evitando de esta forma la necesidad de tratamiento más energético para lograr la esterilización de disoluciones que contienen el agente farmacológicamente activo deseado.

Como se usa en la presente memoria, salvo que se especifique lo contrario, el término "paclitaxel" abarca todas las formas, modificaciones y derivados de paclitaxel, p. ej., taxotere, y similares.

25 Capxol™ es la marca registrada para la formulación de paclitaxel para ser comercializada por los concesionarios de los solicitantes. Como se usa en la presente memoria, Capxol™ es simplemente una forma abreviada de referencia a nanopartículas de paclitaxel recubiertas de proteína producidas por el método del ejemplo 1. Capxol™ es una nueva formulación patentada exenta de cremaphor del fármaco anticancerígeno paclitaxel. Los autores de la invención, basándose en estudios en animales, creen que una formulación exenta de cremaphor será  
30 significativamente menos tóxica y no requerirá la medicación previa de los pacientes. La medicación previa es necesaria para reducir la hipersensibilidad y anafilaxia que se produce como resultado del cremaphor en la formulación de paclitaxel Taxol® actualmente aprobada y comercializada. Capxol™ es un polvo liofilizado para la reconstitución y administración intravenosa. Cada vial de Capxol™ contiene 30 mg de paclitaxel y aproximadamente 400 mg de albúmina de suero humano. Cuando se reconstituye con un medio acuoso adecuado, tal como inyección de cloruro sódico al 0,9% o inyección de dextrosa al 5%, el Capxol™ forma una disolución coloidal estable de paclitaxel. El tamaño de las nanopartículas coloidales típicamente es menor de 400 nm. Las nanopartículas se preparan por homogeneización a alta presión de una disolución de albúmina de suero humano USP y una disolución de paclitaxel en un disolvente orgánico. Después el disolvente se elimina para generar la suspensión coloidal o disolución de paclitaxel en la albúmina humana. Esta suspensión se esteriliza por filtración y se liofiliza para obtener Capxol™. La formulación no contiene otros excipientes o estabilizantes añadidos. La esterilidad del producto se asegura por un procedimiento de fabricación aséptico y/o por filtración estéril. Los dos componentes mayoritarios de Capxol™ son paclitaxel sin modificar y albúmina de suero humano (HSA). Puesto que la HSA es muy soluble en agua, el Capxol™ se puede reconstituir a cualquier concentración deseada de paclitaxel limitada solo por los límites de solubilidad de la HSA. Por lo tanto, el Capxol™ se puede reconstituir en un amplio intervalo de concentraciones desde diluida (paclitaxel 0,1 mg/ml) a concentrada (paclitaxel 20 mg/ml). Esto puede dar como resultado volúmenes de administración bastante pequeños.

50 Como se usa en la presente memoria, la expresión "suministro in vivo" se refiere al suministro de un agente farmacológicamente activo por vías de administración tales como oral, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, inhalación, tópica, transdérmica, supositorio (rectal), pesario (vaginal), intrauretral, intraportal, intrahepática, intraarterial, intrahumoral, y similares.

Como se usa en la presente memoria, el término "micrómetro" se refiere a una unidad de medida de una milésima de un milímetro.

Como se usa en la presente memoria, el término "biocompatible" describe una sustancia que no altera o afecta de forma apreciable, de ninguna forma adversa, el sistema biológico en el que se introduce.

55 Los agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua contemplados para usar en la práctica de la presente invención incluyen agentes farmacéuticamente activos, agentes de diagnóstico, agentes de valor

nutricional, y similares. Los ejemplos de agentes farmacéuticamente activos incluyen:

- 5 analgésicos/antipiréticos (p. ej., aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, naproxeno sódico, hidrocloreuro de buprenorfina, hidrocloreuro de propoxifeno, napsilato de propoxifeno, hidrocloreuro de meperidina, hidrocloreuro de hidromorfona, sulfato de morfina, hidrocloreuro de oxycodona, fosfato de codeína, bitartrato de dihidrocodeína, hidrocloreuro de pentazocina, bitartrato de hidrocodona, tartrato de levorfanol, diflunisal, salicilato de trolamina, hidrocloreuro de nalbufina, ácido mefenámico, tartrato de butorfanol, salicilato de colina, butalbital, citrato de feniltoloxamina, citrato de difenhidramina, metotrimoprazina, hidrocloreuro de cinamedrina, meprobamato, y similares);
- anestésicos (p. ej., ciclopropano, enflurano, halotano, isoflurano, metoxiflurano, óxido nitroso, propofol, y similares);
- 10 antiasmáticos (p. ej., azelastina, ketotifeno, traxanox, amlexanox, cromolín, ibudilast, montelukast, nedocromil, oxatomida, pranlukast, seratrodist, tosilato de suplatast, tiaramida, zafirlukast, zileuton, beclometasona, budesonida, dexametasona, flunisolida, acetónido de trimcinolona, y similares);
- antibióticos (p. ej., neomicina, estreptomina, cloranfenicol, cefalosporina, ampicilina, penicilina, tetraciclina, y similares);
- 15 antidepresivos (p. ej., nefopam, oxipertina, hidrocloreuro de doxepina, amoxapina, hidrocloreuro de trazodona, hidrocloreuro de amitriptilina, hidrocloreuro de maprotilina, sulfato de fenelzina, hidrocloreuro de desipramina, hidrocloreuro de nortriptilina, sulfato de tranilcipromina, hidrocloreuro de fluoxetina, hidrocloreuro de doxepina, hidrocloreuro de imipramina, pamoato de imipramina, nortriptilina, hidrocloreuro de amitriptilina, isocarboxazida, hidrocloreuro de desipramina, maleato de trimipramina, hidrocloreuro de protriptilina, y similares);
- 20 antidiabéticos (p. ej., biguanidas, hormonas, derivados de sulfonilurea, y similares);
- agentes antifúngicos (p. ej., griseofulvina, keloconazol, anfotericina B, nistatina, candidina, y similares);
- agentes antihipertensivos (p. ej., propanolol, propafenona, oxiprenolol, nifedipina, reserpina, camsilato de trimetafán, hidrocloreuro de fenoxibenzamina, hidrocloreuro de pargilina, deserpidina, diazóxido, monosulfato de guanetidina, minoxidil, rescinamina, nitroprusiato de sodio, rauwolfia serpentina, alseroxilon, mesilato de fentolamina, reserpina, y similares);
- 25 antiinflamatorios (p. ej., (no esteroideos) indometacina, naproxeno, ibuprofeno, ramifenazona, piroxicam, (esteroideos) cortisona, dexametasona, fluazacort, hidrocortisona, prednisona, prednisona, y similares);
- antineoplásicos (p. ej., adriamicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, duanorubicina, doxorubicina, epirubicina, mitomicina, metotrexato, fluorouracilo, carboplatino, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatino, etopósido, interferones, camptotecina y derivados de la misma, fenesterina, paclitaxel y derivados del mismo, taxotere y derivados del mismo, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, etopósido, pipsulfano, y similares);
- 30 agentes ansiolíticos (p. ej., lorazepam, hidrocloreuro de buspirona, prazepam, hidrocloreuro de clordiazepóxido, oxazepam, clorazepato dipotásico, diazepam, pamoato de hidroxizina, hidrocloreuro de hidroxizina, alprazolam, droperidol, halazepam, clormezanona, dantroleno, y similares);
- 35 agentes inmunosupresores (p. ej., ciclosporina, azatioprina, mizoribina, FK506 (tacrolimus), y similares);
- agentes antimigraña (por ejemplo, tartrato de ergotamina, hidrocloreuro de propanolol, mucato de isometepteno, dicloralfenazona y similares);
- sedantes/hipnóticos (p. ej., barbitúricos (p. ej., pentobarbital, pentobarbital sódico, secobarbital sódico), benzodiazepinas (por ejemplo, hidrocloreuro de flurazepam, triazolam, tomazepam, hidrocloreuro de midazolam, y similares);
- 40 agentes antiangina (p. ej., bloqueadores beta-adrenérgicos, bloqueadores de los canales de calcio (p. ej., nifedipina, hidrocloreuro de diltiazem, y similares), nitratos (p. ej., nitroglicerina, dinitrato de isosorbida, tetranitrato de pentaeritritol, tetranitrato de eritritilo), y similares);
- agentes antipsicóticos (p. ej., haloperidol, succinato de loxapina, hidrocloreuro de loxapina, tioridazina, hidrocloreuro de tioridazina, tiotixeno, hidrocloreuro de flufenazina, decanoato de flufenazina, enantato de flufenazina, hidrocloreuro de trifluoperazina, hidrocloreuro de clorpromazina, perfenazina, citrato de litio, proclorperazina, y similares);
- 45 agentes antimaníacos (p. ej., carbonato de litio);
- antiarrítmicos (p. ej., tosilato de bretilio, hidrocloreuro de esmolol, hidrocloreuro de verapamilo, amiodarona, hidrocloreuro de encainida, digoxina, digitoxina, hidrocloreuro de mexiletina, fosfato de disopiramida, hidrocloreuro de procainamida, sulfato de quinidina, gluconato de quinidina, poligalacturonato de quinidina, acetato de flecainida, hidrocloreuro de tocainida, hidrocloreuro de lidocaína, y similares);
- 50

- agentes antiartríticos (p. ej., fenilbutazona, sulindac, penicilamina, salsalato, piroxicam, azatioprina, indometacina, meclofenamato sódico, tiomalato de oro y sodio, ketoprofeno, auranofina, aurotioglucosa, tolmetina sódica, y similares);
- agentes antigota (p. ej., colchicina, alopurinol, y similares);
- 5 anticoagulantes (p. ej., heparina, heparina sódica, warfarina sódica, y similares);
- agentes antitrombóticos (p. ej., uroquinasa, estreptoquinasa, altoplasa, y similares);
- agentes antifibrinolíticos (p. ej., ácido aminocaproico);
- agentes hemorreológicos (p. ej., pentoxifilina);
- agentes antiplaquetas (p. ej., aspirina, empirina, ascriptina, y similares);
- 10 anticonvulsivos (p. ej., ácido valproico, divalproato sódico, fenitoína, fenitoína sódica, clonazepam, primidona, fenobarbital, fenobarbital sódico, carbamazepina, amobarbital sódico, metsuximida, metarbital, mefobarbital, mefenitoína, fensuximida, parametadiona, etotoína, fenacemida, secobarbital sódico, clorazepato dipotásico, trimetadiona y similares);
- agentes antiparkinson (p. ej., etosuximida, y similares);
- 15 antihistamínicos/antipruriginosos (p. ej., hidrocloreto de hidroxizina, hidrocloreto de difenhidramina, maleato de clorfeniramina, maleato de bromfeniramina, hidrocloreto de ciproheptadina, terfenadina, fumarato de clemastina, hidrocloreto de triprolidina, maleato de carbinoxamina, hidrocloreto de difenilpiralina, tartrato de fenindamina, maleato de azatadina, hidrocloreto de tripelenamina, maleato de dexclorfeniramina, hidrocloreto de metildlazina, tartrato de trimprazina y similares);
- 20 agentes útiles para la regulación del calcio (p. ej., calcitonina, hormona paratioridea, y similares);
- agentes antibacterianos (p. ej., sulfato de amikacina, eaztreonam, cloranfenicol, palmitato de cloranfenicol, succinato de cloranfenicol y sodio, hidrocloreto de ciprofloxacina, hidrocloreto de clindamicina, palmitato de clindamicina, fosfato de clindamicina, metronidazol, hidrocloreto de metronidazol, sulfato de gentamicina, hidrocloreto de lincomicina, sulfato de tobramicina, hidrocloreto de vancomicina, sulfato de polimixina B, colistimetato sódico, sulfato de colistina, y similares);
- 25 agentes antivíricos (p. ej., interferón gamma, zidovudina, hidrocloreto de amantadina, ribavirina, aciclovir, y similares);
- antimicrobianos (p. ej., cefalosporinas (p. ej., cefazolina sódica, cefradina, cefaclor, cefapirina sódica, ceftizoxima sódica, cefoperazona sódica, cefotetan disódico, azotil cefutóxima, cefotaxima sódica, cefadroxil monohidrato, ceftazidima, cefalexina, cefalotina sódica, hidrocloreto de cefalexina monohidrato, nafato de cefamandol, cefoxitina sódica, cefonicida de sodio, ceforanida, ceftriaxona sódica, ceftazidima, cefadroxilo, cefradina, cefuroxima sódica, y similares), penicilinas (p. ej., ampicilina, amoxicilina, penicilina G benzatina, ciclacilina, ampicilina sódica, penicilina G potásica, penicilina V potásica, piperacilina sódica, oxacilina sódica, hidrocloreto de bacampicilina, cloxacilina sódica, ticarcilina disódica, azlocilina sódica, carbenicilina de indanilo y sodio, penicilina G potásica, penicilina G procaína, metilicina sódica, nafcilina sódica, y similares), eritromicinas (p. ej., etilsuccinato de eritromicina, eritromicina, estolato de eritromicina, lactobionato de eritromicina, siearato de eritromicina, etilsuccinato de eritromicina, y similares), tetraciclinas (p. ej., hidrocloreto de tetraciclina, hclato de doxiciclina, hidrocloreto de minociclina, y similares), y similares);
- 30 antiinfecciosos (p. ej., GM-CSF);
- 40 broncodilatadores (p. ej., simpaticomiméticos (p. ej., hidrocloreto de epinefrina, sulfato de metaproterenol, sulfato de terbutalina, isoetarina, mesilato de isoetarina, hidrocloreto de isoetarina, sulfato de albuterol, albuterol, bitolterol, hidrocloreto de mesilato de isoproterenol, sulfato de terbutalina, bitartrato de epinefrina, sulfato de metaproterenol, epinefrina, bitartrato de epinefrina), agentes anticolinérgicos (p. ej., bromuro de ipratropio), xantinas (p. ej., aminofilina, difilina, sulfato de metaproterenol, aminofilina), estabilizadores de mastocitos (p. ej., cromolín sódico),
- 45 corticosteroides inhalatorios (p. ej., dipropionato de flurisolidebeclometasona, dipropionato de beclometasona monohidrato), salbutamol, dipropionato de beclometasona (BDP), bromuro de ipratropio, budesonida, ketotifeno, salmeterol, xinafoato, sulfato de terbutalina, triamcinolona, teofilina, nedocromil sódico, sulfato de metaproterenol, albuterol, flunisolida y similares);
- 50 hormonas (p. ej., andrógenos (p. ej., danazol, cipionato de testosterona, fluoximesterona, etiltestosterona, enaninato de testosterona, metiltestosterona, fluoximesterona, cipionato de testosterona), estrógenos (p. ej., estradiol, estropipato, estrógenos conjugados), progestinas (p. ej., acetato de metoxiprogesterona, acetato de noretindrona), corticosteroides (p. ej., triamcinolona, betametasona, fosfato de betametasona sódica, dexametasona, fosfato de dexametasona y sodio, acetato de dexametasona, prednisona, suspensión de acetato de metilprednisolona,



- acetónido de triamcinolona, metilprednisolona, fosfato de prednisolona y sodio, succinato de metilprednisolona y sodio, succinato de hidrocortisona y sodio, succinato de metilprednisolona y sodio, hexacatónido de triamcinolona, hidrocortisona, cipionato de hidrocortisona, prednisolona, acetato de fluorocortisona, acetato de parametasona, tebulato de prednisolona, acetato de prednisolona, fosfato de prednisolona y sodio, succinato de hidrocortisona y sodio y similares), hormonas tiroideas (p. ej., levotiroxina sodio) y similares), y similares;
- 5 agentes hipoglicémicos (p. ej., insulina humana, insulina bovina purificada, insulina porcina purificada, gliburida, clorpropamida, glipizida, tolbutamida, tolazamida y similares);
- agentes hipolipémicos (p. ej., clofibrato, dextrotiroxina sódica, probucol, lovastatina, niacina y similares);
- proteínas (p. ej., ADNasa, alginasa, superóxido dismutasa, lipasa y similares);
- 10 ácidos nucleicos (p. ej., ácidos nucleicos del mismo sentido o antisentido que codifican cualquier proteína terapéuticamente útil, incluyendo cualquiera de las proteínas descritas en la presente memoria, y similares);
- agentes útiles para la estimulación de la eritropoyesis (p. ej., eritropoyetina);
- agentes antiulcerosos/antirreflujo (p. ej., famotidina, cimetidina, hidrocloruro de ranitidina y similares);
- 15 antináuseas/antieméticos (p. ej., hidrocloruro de meclizina, nabilona, proclorperazina, dimenhidrinato, hidrocloruro de prometazina, tietilperazina, escopolamina y similares);
- vitaminas liposolubles (p. ej., vitaminas A, D, E, K y similares); y
- otros fármacos tales como mitotano, visadina, halonitrosoureas, antroclinas, elipticina y similares.

Los ejemplos de agentes diagnósticos contemplados para usar en la práctica de la presente invención, incluyen agentes de contraste para ultrasonidos, agentes de radiocontraste (p. ej., yodoocanos, halogenocarbonos, renografina y similares), agentes de contraste magnético (p. ej., fluorocarbonos, compuestos paramagnéticos solubles en lípidos y similares), así como otros agentes diagnósticos que no pueden ser fácilmente administrados sin alguna modificación física y/o química para adaptar su naturaleza substancialmente insoluble en agua.

Los ejemplos de agentes de valor nutricional contemplados para usar en la práctica de la presente invención, incluyen aminoácidos, azúcares, proteínas, carbohidratos, vitaminas liposolubles (p. ej., vitaminas A, D, E, K y similares), grasas, o combinaciones de cualesquiera dos o más de ellos.

#### 25 A. Formación de nanopartículas usando homogeneización con alta cizalladura

Las diferencias clave entre los agentes farmacológicamente activos contenidos en una cubierta polimérica según la invención y las microesferas de proteína de la técnica anterior están en la naturaleza de la formación y el estado final de la proteína después de formación de la partícula, y en su capacidad para llevar agentes poco solubles en agua o sustancialmente insolubles en agua. De acuerdo con la presente invención, el polímero (p. ej., una proteína) puede estar reticulado como resultado de la exposición a condiciones de alta cizalladura en un homogeneizador de alta presión. La alta cizalladura se usa para dispersar un agente dispersante que contiene el agente farmacológicamente activo disuelto o suspendido en una disolución acuosa de un polímero biocompatible, que opcionalmente lleva grupos sulfhidrilo o disulfuro (p. ej., albúmina) de modo que se forma una cubierta de polímero reticulado alrededor de las gotitas finas del medio no acuoso. Las condiciones de alta cizalladura producen cavitación en el líquido que produce un gran calentamiento local y da como resultado la formación de iones superóxido que son capaces de reticular el polímero, por ejemplo, por oxidación de los restos sulfhidrilo (y/o alterando los enlaces disulfuro existentes) para formar nuevos enlaces disulfuro de reticulación.

A diferencia con el procedimiento de la invención, el método de la técnica anterior de reticulación de glutaraldehído no es específico y es esencialmente reactivo con cualquier grupo nucleófilo presente en la estructura de la proteína (p. ej., aminas e hidroxilos). La desnaturalización térmica como enseña la técnica anterior altera de forma significativa e irreversible la estructura de la proteína. En cambio, la formación de disulfuro contemplada por la presente invención no desnaturaliza sustancialmente la proteína. Además, las partículas de los agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua contenidos en la cubierta difieren de las microesferas de proteína reticulada o desnaturalizada con calor de la técnica anterior porque la cubierta polimérica producida por el procedimiento de la invención es relativamente fina comparada con el diámetro de la partícula recubierta. Se ha determinado (por microscopía electrónica de transmisión) que el "espesor de la cubierta" del recubrimiento polimérico es aproximadamente 25 nm para una partícula recubierta que tiene un diámetro de 1  $\mu\text{m}$  (1000 nm). En cambio, las microesferas de la técnica anterior no tienen cubiertas de proteína, sino más bien tienen proteína dispersada por todo el volumen de la microesfera.

Por lo tanto, según la presente invención, se disuelve un agente farmacológicamente activo en un disolvente adecuado (p. ej., cloroformo, cloruro de metileno, acetato de etilo, etanol, tetrahidrofurano, dioxano, butanol, acetato de butilo, acetonitrilo, acetona, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, metilpirrolidinona, o similares, así como mezclas de cualesquiera dos o más de los mismos). Los disolventes adicionales contemplados para usar en la práctica de la

presente invención incluyen aceite de soja, aceite de coco, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de naranja, aceite de limoneno, alcoholes C1-C20, ésteres C2-C20, cetonas C3-C20, polietilenglicoles, hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos halogenados y combinaciones de los mismos.

- 5 A diferencia de los métodos convencionales para la formación de nanopartículas, no se disuelve un polímero (p. ej., poli(ácido láctico)) en el disolvente. La fase de aceite usada en la preparación de las composiciones de la invención típicamente contiene solo el agente farmacológicamente activo disuelto en el disolvente.

A continuación, se añade una proteína (p. ej., albúmina de suero humano) (en la fase acuosa) para que actúe como un agente estabilizante para la formación de nanogotas estables. La proteína se añade en una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,05 a 25% (p/v), más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,5% - 5% (p/v). A diferencia de los métodos convencionales para la formación de nanopartículas, no se añaden a la mezcla tensioactivos (p. ej., laurilsulfato sódico, lecitina, Tween 80, Pluronic F-68, o similares).

15 A continuación, se forma una emulsión por homogeneización a alta presión y fuerzas de cizalladura altas. Dicha homogeneización se lleva a cabo de forma conveniente en un homogeneizador de alta presión, que típicamente funciona a presiones en el intervalo de aproximadamente 210 hasta 4200 kg/cm<sup>2</sup>. Preferiblemente, dichos procedimientos se llevan a cabo a presiones en el intervalo de aproximadamente 420-2800 kg/cm<sup>2</sup>. La emulsión resultante comprende nanogotas muy pequeñas del disolvente no acuoso (que contienen el agente farmacológicamente activo disuelto) y nanogotas muy pequeñas del agente estabilizantes de proteína. Los métodos de homogeneización aceptables incluyen procedimientos que imparten alta cizalladura y cavitación tales como

20 homogenización a alta presión, mezcladores de alta cizalladura, ultrasonidos, impulsores de alta cizalladura, y similares.

Finalmente, el disolvente se evapora a presión reducida para dar un sistema coloidal compuesto de nanopartículas recubiertas de proteína del agente farmacológicamente activo y proteína. Los métodos de evaporación aceptables incluyen el uso de rotavapores, evaporadores de capa delgada, secadores por atomización, liofilizadores, y

25 similares. También se puede usar la ultrafiltración para la eliminación del disolvente.

Después de la evaporación del disolvente, la suspensión líquida se puede secar para obtener un polvo que contiene el agente farmacológicamente activo y proteína. El polvo resultante se puede volver a dispersar en cualquier momento conveniente en un medio acuoso adecuado tal como disolución salina, disolución salina tamponada, agua, medio acuoso tamponado, disoluciones de aminoácidos, disoluciones de vitaminas, disoluciones de hidratos de carbono, o similares, así como combinaciones de cualesquiera dos o más de los mismos, para obtener una suspensión que se puede administrar a mamíferos. Los métodos contemplados para obtener este polvo incluyen la liofilización, secado por atomización, y similares.

30

De acuerdo con otra realización de la presente invención, se proporciona un método alternativo para la formación de partículas submicrométricas inusualmente pequeñas (nanopartículas), es decir, partículas que tienen menos de 200 nm de diámetro. Dichas partículas son capaces de ser esterilizadas por filtración antes de usar en forma de una suspensión líquida. La capacidad para esterilizar por filtración el producto final del procedimiento de formulación de la invención (es decir, las partículas de fármaco) tiene una gran importancia puesto que no se pueden esterilizar dispersiones que contienen concentraciones altas de proteína (p. ej., albúmina de suero) por medios convencionales tales como en autoclave.

35

Con el fin de obtener partículas esterilizables por filtración (es decir, partículas <200 nm), el agente farmacológicamente activo se disuelve inicialmente en un disolvente orgánico sustancialmente inmiscible con el agua (p. ej., un disolvente que tiene una solubilidad en agua menor de aproximadamente 5%, tal como, por ejemplo, cloroformo) en una alta concentración, formando así una fase de aceite que contiene el agente farmacológicamente activo. Los disolventes adecuados se han expuesto antes. A diferencia de los métodos convencionales para la

40 formación de nanopartículas, no se disuelve un polímero (p. ej., poli(ácido láctico)) en el disolvente. La fase de aceite usada en el procedimiento de la presente invención contiene solo el agente farmacológicamente activo disuelto en el disolvente.

45

A continuación, se añade un disolvente orgánico miscibles con el agua (p. ej., un disolvente que tiene una solubilidad en agua mayor que aproximadamente 10%) a la fase de aceite en una concentración final en el intervalo de aproximadamente 1%-99% v/v, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 5%-25% v/v, de la fase orgánica total. El disolvente orgánico miscible con el agua se puede seleccionar de disolventes tales como acetato de etilo, etanol, tetrahidrofurano, dioxano, acetonitrilo, butanol, acetona, propilenglicol, glicerol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, metilpirrolidinona, y similares. Alternativamente, se prepara primero la mezcla del disolvente inmiscible con el agua con el disolvente miscible con el agua, seguido de disolución del agente farmacéuticamente activo en la mezcla.

50

55

A continuación, se disuelve en el medio acuoso albúmina de suero humano o cualquier otro agente estabilizante adecuado como se ha descrito antes. Este componente actúa como un agente estabilizante para la formación de nanogotas estables. Opcionalmente, se disuelve una cantidad suficiente del primer disolvente orgánico (p. ej.,

cloroformo) en la fase acuosa para llevarla hasta cerca de la concentración de saturación. Se añade una cantidad medida separada de la fase orgánica (que ahora contiene el agente farmacológicamente activo, el primer disolvente orgánico y el segundo disolvente orgánico) a la fase acuosa saturada, de modo que la fracción de fases de la fase orgánica es entre aproximadamente 0,5%-15% v/v, y más preferiblemente entre 1% y 8% v/v.

- 5 A continuación, se forma una mezcla compuesta de micro y nanogotas por homogeneización con fuerzas de cizalladura bajas. Esto se puede llevar a cabo en una variedad de formas, como pueden identificar fácilmente los expertos en la materia, usando, por ejemplo, un homogeneizador de laboratorio convencional que funciona en el intervalo de aproximadamente 2.000 hasta aproximadamente 15.000 rpm. A esto le sigue la homogeneización con alta presión (es decir, en el intervalo de aproximadamente 210 hasta 4200 kg/cm<sup>2</sup>). La mezcla resultante comprende una disolución acuosa de proteína (p. ej., albúmina de suero humano), el agente farmacológicamente activo insoluble en agua, el primer disolvente y el segundo disolvente. Finalmente, el disolvente se evapora rápidamente a vacío para dar un sistema de dispersión coloidal (agente farmacológicamente activo y proteína) en forma de nanopartículas extremadamente pequeñas (es decir, partículas en el intervalo de aproximadamente 10 nm-200 nm de diámetro) que se pueden esterilizar por filtración. El intervalo de tamaños de las partículas preferido es entre aproximadamente 50 nm -170 nm, dependiendo de la formulación y los parámetros de trabajo.

Los sistemas coloidales preparados de acuerdo con la presente invención se pueden convertir después en una forma de polvo por eliminación del agua de los mismos, por ejemplo, por liofilización o secado por atomización con un perfil de temperatura-tiempo adecuado. La proteína (p. ej., albúmina de suero humano) actúa ella misma como un crioprotector o lioprotector, y el polvo se reconstituye fácilmente por adición de agua, disolución salina o tampón, sin necesidad de usar crioprotectores convencionales tales como manitol, sacarosa, glicina y similares. Aunque no son necesarios, se entiende, por supuesto, que si se desea se pueden añadir crioprotectores convencionales a las formulaciones de la invención.

El sistema coloidal del agente farmacológicamente activo permite el suministro de dosis altas del agente farmacológicamente activo en volúmenes relativamente pequeños. Esto minimiza la incomodidad del paciente de recibir volúmenes grandes de fluido y minimiza la estancia en el hospital. Además, las paredes de la cubierta o recubrimiento polimérico en general son completamente degradables in vivo por enzimas proteolíticas (p. ej., cuando el polímero es una proteína), dando como resultado que sustancialmente no hay efectos secundarios del sistema de suministro, lo cual es una gran diferencia con los efectos secundarios significativos producidos por formulaciones anteriores.

Se puede usar una serie de polímeros biocompatibles en la práctica de la presente invención para la formación de la cubierta polimérica que rodea los agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua. Esencialmente, se puede usar cualquier polímero, natural o sintético, que lleve opcionalmente grupos sulfhidrilo o enlaces disulfuro en su estructura, para preparar una cubierta reticulada por disulfuro sobre partículas de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua. Los grupos sulfhidrilo o enlaces disulfuro pueden existir previamente en la estructura del polímero o se pueden introducir mediante una modificación química adecuada. Por ejemplo, los polímeros naturales tales como proteínas, péptidos, poli(ácidos nucleicos), polisacáridos (p. ej., almidón, celulosa, dextranos, alginatos, chitosán, pectina, ácido hialurónico, y similares), proteoglicanos, lipoproteínas, y similares, son candidatos para dicha modificación.

Las proteínas contempladas para usar como agentes estabilizantes de acuerdo con la presente invención incluyen albúminas (que contienen 35 restos de cisteína), inmunoglobulinas, caseínas, insulinas (que contienen 6 restos de cisteína por unidad  $\alpha_2\beta_2$ ), lisozimas (que contienen 8 restos de cisteína), inmunoglobulinas, alfa-2-macroglobulina, fibronectinas, vitronectinas, fibrinógenos, lipasas, y similares. Las proteínas, péptidos, enzimas, anticuerpos y combinaciones de los mismos, son clases generales de estabilizantes contemplados para usar en la presente invención.

Una proteína actualmente preferida para usar como un agente estabilizante es la albúmina. Opcionalmente, se podrían usar proteínas tales como la alfa-2-macroglobulina, una opsonina conocida, para potenciar la absorción de las partículas encerradas en la cubierta de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua por células de tipo macrófagos, o para potenciar la absorción de las partículas encerradas en la cubierta en el hígado y bazo. También se pueden usar anticuerpos específicos para dirigir las nanopartículas a sitios específicos. Otras proteínas funcionales, tales como anticuerpos o enzimas, que podrían facilitar un producto biológico dirigido a un sitio deseado, también se pueden usar como componentes de la proteína estabilizante.

Igualmente, los polímeros sintéticos también son buenos candidatos para la formación de partículas que tienen una cubierta polimérica. Además, los polialquilenglicoles (p. ej., de cadena lineal o ramificada), poli(alcohol vinílico), poli(acrilatos), poli(metacrilato de hidroxietilo), poli(ácido acrílico), polietiloxolina, poli(acrilamidas), poliisopropilacrilamidas, polivinilpirrolidina, polilactida/glicólido, y similares, y combinaciones de los mismos, son buenos candidatos para el polímero biocompatible en la formulación de la invención.

Igualmente, los polipéptidos sintéticos también son buenos candidatos para agentes de estabilización para los agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua. Además, están contemplados para usar en la práctica de la presente invención materiales tales como poliaminoácidos sintéticos que contienen restos de

cisteína y/o grupos disulfuro; poli(alcohol vinílico) modificado para contener grupos sulfhidrilo libres y/o grupos disulfuro; poli(metacrilato de hidroxietilo) modificado para contener grupos sulfhidrilo libres y/o grupos disulfuro; poli(ácido acrílico) modificado para contener grupos sulfhidrilo libres y/o grupos disulfuro; polietiloxazolina modificada para contener grupos sulfhidrilo libres y/o grupos disulfuro; poliacrilamida modificada para contener grupos sulfhidrilo libres y/o grupos disulfuro, polivinilpirrolidina modificada para contener grupos sulfhidrilo libres y/o grupos disulfuro; polialquilenglicoles modificados para contener grupos sulfhidrilo libres y/o grupos disulfuro; polilactidas, poliglicólidos, policaprolactonas, o copolímeros de los mismos, modificados para contener grupos sulfhidrilo libres y/o grupos disulfuro; así como mezclas de cualesquiera dos o más de los mismos.

En la preparación de las composiciones de la invención, se puede usar una gran variedad de medios orgánicos para suspender o disolver el agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua. Los medios orgánicos contemplados para usar en la práctica de la presente invención incluyen cualquier líquido no acuoso que sea capaz de suspender o disolver el agente farmacológicamente activo, que no reaccione químicamente ni con el polímero usado para producir la cubierta ni con el propio agente farmacológicamente activo. Los ejemplos incluyen aceites vegetales (p. ej., aceite de soja, aceite de oliva, y similares), aceite de coco, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de naranja, aceite de limoneno, hidrocarburos alifáticos, cicloalifáticos o aromáticos, que tienen 4-30 átomos de carbono (p. ej., n-dodecano, n-decano, n-hexano, ciclohexano, tolueno, benceno, y similares), alcoholes alifáticos o aromáticos que tienen 2-30 átomos de carbono (p. ej., octanol, y similares), ésteres alifáticos o aromáticos que tienen 2-30 átomos de carbono (p. ej., caprilato (octanoato) de etilo, y similares), éteres de alquilo, arilo o cíclicos que tienen 2-30 átomos de carbono (p. ej., éter dietílico, tetrahidrofurano, y similares), haluros de alquilo o arilo que tienen 1-30 átomos de carbono (y opcionalmente más de un sustituyente halógeno, p. ej.,  $\text{CH}_3\text{Cl}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}-\text{CH}_2\text{Cl}$ , y similares), cetonas que tienen 3-30 átomos de carbono (p. ej., acetona, metiletilcetona, y similares), polialquilenglicoles (p. ej., polietilenglicol, y similares), o combinaciones de cualesquiera dos o más de los mismos.

Las combinaciones especialmente preferidas de medios orgánicos contemplados para usar en la práctica de la presente invención, típicamente tienen un punto de ebullición no superior a aproximadamente 200°C, e incluyen líquidos volátiles tales como diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, benceno, etanol, butanol, acetato de butilo, y similares (es decir, disolventes que tienen un grado de solubilidad alto para el agente farmacológicamente activo, y son solubles en el otro medio orgánico usado), junto con un medio orgánico de peso molecular más alto (menos volátil). Cuando se añaden al otro medio orgánico, estos aditivos volátiles ayudan a la solubilidad del agente farmacológicamente activo en el medio orgánico. Esto es conveniente puesto que esta etapa normalmente requiere tiempo. Después de la disolución, el componente volátil se puede separar por evaporación (opcionalmente a vacío).

Las partículas del agente farmacológicamente activo asociadas con una cubierta polimérica, preparadas como se ha descrito antes, se suministran en forma de una suspensión en un líquido acuoso biocompatible. Este líquido se puede seleccionar de agua, disolución salina, una disolución que contiene tampones adecuados, una disolución que contiene agentes nutricionales tales como aminoácidos, azúcares, proteínas, hidratos de carbono, vitaminas o grasa, y similares.

Estos materiales biocompatibles también se pueden usar en varias formas físicas tales como geles (reticulados o no reticulados) para proporcionar matrices de las cuales se puede liberar el principio farmacológicamente activo, por ejemplo paclitaxel, por difusión y/o degradación de la matriz. También se pueden usar materiales sensibles a la temperatura como la matriz dispersante para la formulación de la invención. Así por ejemplo, se puede inyectar Capxol™ en una formulación líquida del material sensible a la temperatura (p. ej., copolímeros de poliacrilamidas o copolímeros de polialquilenglicoles y polilactida/glicólidos) que gelifica en el sitio del tumor y proporciona la liberación lenta de Capxol™. La formulación de Capxol™ se puede dispersar en una matriz de los polímeros biocompatibles mencionados antes, para proporcionar una formulación de paclitaxel de liberación controlada, que a través de las propiedades de la formulación de Capxol™ (albúmina asociada con paclitaxel) produce una toxicidad menor en el tejido cerebral así como una toxicidad sistémica menor, como se discute más adelante. Esta combinación de Capxol™ u otros agentes quimioterapéuticos formulados de manera similar al Capxol™, junto con una matriz de polímero biocompatible, puede ser útil para el suministro local controlado de agentes quimioterapéuticos para tratar tumores sólidos en el cerebro y peritoneo (cáncer de ovario), y en aplicaciones locales a otros tumores sólidos. Estas formulaciones de combinación no están limitadas al uso de paclitaxel y se pueden usar con una amplia variedad de principios farmacológicamente activos incluyendo antiinfecciosos, inmunosupresores otros agentes quimioterapéuticos, y similares.

Las partículas coloidales contenidas sustancialmente de forma completa dentro de una capa estabilizante polimérica, o asociadas con la misma, preparadas como se describe en la presente memoria, se suministran solas u opcionalmente como una suspensión en un medio biocompatible. Este medio se puede seleccionar de agua, medio acuoso tamponado, disolución salina, disolución salina tamponada, disoluciones opcionalmente tamponadas de aminoácidos, disoluciones opcionalmente tamponadas de proteínas, disoluciones opcionalmente tamponadas de azúcares, disoluciones opcionalmente tamponadas de hidratos de carbono, disoluciones opcionalmente tamponadas de vitaminas, disoluciones opcionalmente tamponadas de polímeros sintéticos, emulsiones que contienen lípidos, y similares.

Además, las partículas coloidales se pueden modificar opcionalmente mediante un agente adecuado, en donde el

agente está asociado con la capa polimérica mediante un enlace covalente opcional. Los enlaces covalentes contemplados para dichas uniones incluyen éster, éter, uretano, diéster, amida, amina secundaria o terciaria, éster fosfato, éster sulfato y similares. Los agentes adecuados contemplados para esta modificación opcional de la cubierta polimérica incluyen polímeros sintéticos (polialquilenglicoles (p. ej., polietilenglicol de cadena lineal o ramificada), poli(alcohol vinílico), poli(metacrilato de hidroxietilo), poli(ácido acrílico), polietiloxazolona, poli(acrilamida, polivinilpirrolidona, y similares), fosfolípidos (tales como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), esfingomielina, y similares), proteínas (tales como enzimas, anticuerpos, y similares), polisacáridos (tales como almidón, celulosa, dextranos, alginatos, chiotsán, pectina, ácido hialurónico, y similares), agentes de modificación química (tales como piridoxal-5'-fosfato, derivados de piridoxal, dialdehídos, ésteres de diaspirina, y similares), o combinaciones de cualesquiera dos o más de los mismos.

Son posibles variaciones sobre el tema general de partículas coloidales estabilizadas. Se podría usar una suspensión de partículas finas del agente farmacológico en un agente de dispersión biocompatible (en lugar de un agente de dispersión biocompatible que contiene un compuesto biológico disuelto) para producir una cubierta polimérica que contiene partículas del compuesto biológico suspendidas en el agente de dispersión. En otras palabras, la cubierta polimérica podría contener una disolución saturada del compuesto biológico en agente de dispersión. Otra variación es una cubierta polimérica que contiene un núcleo sólido de compuesto biológico producido disolviendo inicialmente el compuesto biológico en un disolvente orgánico volátil (p. ej., benceno), formando la cubierta polimérica y evaporando el disolvente volátil a vacío, p. ej., en un evaporador, secador por atomización, o liofilizando toda la suspensión. Esto da como resultado una estructura que tiene un núcleo sólido de compuesto biológico rodeado de un recubrimiento de polímero. Este último método es particularmente ventajoso para suministrar dosis altas de compuesto biológico en un volumen relativamente pequeño. En algunos casos, el material biocompatible que forma la cubierta alrededor del núcleo puede ser él mismo un agente terapéutico o de diagnóstico, por ejemplo, en el caso de la insulina, que se puede suministrar como parte de una cubierta polimérica formada en el procedimiento descrito anteriormente. En otros casos, el polímero que forma la cubierta podría participar en el suministro de un compuesto biológico, por ejemplo, en el caso de anticuerpos usados para dirigir, o en el caso de hemoglobina, que se puede suministrar como parte de una cubierta polimérica formada en el procedimiento de irradiación ultrasónica descrito antes, proporcionando de esta forma un sustituto de la sangre que tiene una alta capacidad de unión al oxígeno.

Los expertos en la técnica reconocerán que son posibles diferentes variaciones dentro del alcance y el espíritu de este aspecto de la invención. El medio orgánico dentro de la cubierta polimérica puede variar, se puede usar una gran variedad de agentes farmacológicamente activos, y se puede usar una gran variedad de proteínas así como otros polímeros naturales y sintéticos en la formación de las paredes de la cubierta polimérica. Las aplicaciones también tienen una variedad bastante amplia. En otras aplicaciones distintas de las biomédicas tales como el suministro de fármacos, agentes de diagnóstico (en aplicaciones de generación de imagen), sangre artificial y agentes de nutrición parenteral, las estructuras de cubierta polimérica de la invención se pueden incorporar en aplicaciones cosméticas tales como cremas para la piel o productos para el cuidado del cabello, en aplicaciones de perfumería, en tintas sensibles a la presión, y similares.

Este aspecto de la invención ahora se describirá con mayor detalle por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

#### 40 Ejemplo 1

##### Preparación de nanopartículas por homogeneización de alta presión

Se disuelven 30 mg de paclitaxel en 3,0 ml de cloruro de metileno. La disolución se añadió a 27,0 ml de disolución de albúmina de suero humano (1% p/v). La mezcla se homogeneizó durante 5 min a bajas rpm (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I.Q.) con el fin de formar una emulsión bruta y después se transfirió a un homogeneizador de alta presión (Avestin). La emulsión se llevó a cabo a 630-2800 kg/cm<sup>2</sup> mientras se recirculaba la emulsión durante al menos 5 ciclos. El sistema resultante se transfirió a un rotavapor, y el cloruro de metileno se separó rápidamente a 40°C, a presión reducida (30 mm de Hg), durante 20-30 min. La dispersión resultante era traslúcida y el diámetro típico de las partículas de paclitaxel resultantes era 160-220 nm (media Z, Malvern Zetasizer).

Después la dispersión se liofilizó durante 48 h sin añadir crioprotector. La torta resultante se podía reconstituir fácilmente a la dispersión original por adición de agua estéril o disolución salina. El tamaño de partículas después de la reconstitución era el mismo que antes de la liofilización.

#### Ejemplo 2

El uso de tensioactivos convencionales y proteínas da como resultado la formación de cristales grandes

El siguiente ejemplo demuestra el efecto de añadir tensioactivos que se usan en el método de evaporación de disolvente convencional. Se llevaron a cabo una serie de experimentos usando un procedimiento similar al descrito en el ejemplo 1, pero se añade un tensioactivo tal como Tween 80 (de 1% a 10%) al disolvente orgánico. Se encontró que después de la separación del cloruro de metileno, se obtiene un gran número de cristales de paclitaxel que tienen un tamaño medio de 1-2 µm, vistos por microscopía óptica y con luz polarizada. Los cristales crecen en

unas horas para formar cristales de tipo aguja muy grandes, con un tamaño en el intervalo de aproximadamente 5-15  $\mu\text{m}$ . Se observa un fenómeno similar con otros tensioactivos usados habitualmente, tales como Pluronic F-68, Pluronic F-127, Cremophor EL y Brij 58.

- 5 A partir de estos resultados se puede concluir que el método convencional de evaporación de disolvente que usa tensioactivos convencionales en combinación con una proteína tal como albúmina no es adecuado para la formación de partículas de fármaco (p. ej., paclitaxel) submicrométricas sin un núcleo polimérico, aunque se use un disolvente polar (p. ej., cloruro de metileno).

#### Ejemplo 3

El uso de tensioactivos convencionales solos da como resultado la formación de cristales grandes

- 10 Este ejemplo demuestra que no se pueden formar nanopartículas aunque se usen tensioactivos convencionales, sin un material nuclear polimérico, con agentes farmacológicamente activos que son solubles en disolventes polares inmiscibles con el agua (p. ej., cloroformo).

- 15 Se disuelven 30 mg de paclitaxel en 0,55 ml de cloroformo y 0,05 ml de etanol. La disolución se añade a 29,4 ml de disolución de Tween 80 (1% p/v) que está presaturada con cloroformo al 1%. La mezcla se homogeneiza durante 5 min a bajas rpm (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I.Q.) con el fin de formar una emulsión bruta y después se transfiere a un homogeneizador de alta presión (Avestin). La emulsión se lleva a cabo a 630-2800  $\text{kg}/\text{cm}^2$  mientras se recircula la emulsión durante al menos 6 ciclos. El sistema resultante se transfirió a un rotavapor, y el cloroformo se separó rápidamente a 40°C, a presión reducida (30 mm de Hg), durante 15-30 min. La dispersión resultante era opaca, y contenía cristales grandes de tipo aguja del fármaco. El tamaño inicial de los cristales (observados también con luz polarizada), era 0,7-5 micrómetros. El almacenamiento de la dispersión durante varias horas a temperatura ambiente condujo a un mayor aumento del tamaño de los cristales, y finalmente a la precipitación.
- 20

#### Ejemplo 4

Preparación de nanopartículas de menos de 200 nm esterilizables por filtración

- 25 Este ejemplo describe un procedimiento por el cual se pueden obtener partículas de fármaco esterilizables por filtración. Por lo tanto, se disuelven 30 mg de paclitaxel en 0,55 ml de cloroformo y 0,05 ml de etanol. La disolución se añade a 29,4 ml de disolución de albúmina de suero humano (1% p/v) que está presaturada con cloroformo al 1%. La mezcla se homogeneiza durante 5 min a bajas rpm (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I.Q.) con el fin de formar una emulsión bruta y después se transfiere a un homogeneizador de alta presión (Avestin). La emulsión se lleva a cabo a 630-2800  $\text{kg}/\text{cm}^2$  mientras se recircula la emulsión durante al menos 6 ciclos. El sistema resultante se transfiere a un rotavapor, y el cloroformo se separa rápidamente a 40°C, a presión reducida (30 mm de Hg), durante 15-30 min. La dispersión resultante es traslúcida, y el diámetro típico de las partículas resultantes es 140-160 nm (media Z, Malvern Zetasizer). La dispersión se filtra a través de un filtro de 0,22 micrómetros (Millipore), sin ningún cambio significativo en la turbidez o el tamaño de partículas. El análisis por HPLC del contenido de paclitaxel puso de manifiesto que después de la filtración se había recuperado más de 97% del paclitaxel, proporcionando así una dispersión de paclitaxel estéril.
- 30
- 35

Después la dispersión se liofilizó durante 48 h sin añadir crioprotector. La torta resultante se podía reconstituir fácilmente a la dispersión original por adición de agua estéril o disolución salina. El tamaño de partículas después de la reconstitución era el mismo que antes de la liofilización.

- 40 Ejemplo 5

Preparación de nanopartículas de menos de 200 nm esterilizables por filtración

- Este ejemplo describe un procedimiento por el cual se pueden obtener partículas de fármaco esterilizables por filtración. Por lo tanto, se disuelven 225 mg de paclitaxel en 2,7 ml de cloroformo y 0,3 ml de etanol. La disolución se añade a 97 ml de disolución de albúmina de suero humano (3% p/v). La mezcla se homogeneiza durante 5 min a bajas rpm (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I.Q.) con el fin de formar una emulsión bruta y después se transfiere a un homogeneizador de alta presión (Avestin). La emulsión se lleva a cabo a 630-2800  $\text{kg}/\text{cm}^2$  mientras se recircula la emulsión durante al menos 6 ciclos. El sistema resultante se transfiere a un rotavapor, y el cloroformo se separa rápidamente a 40°C, a presión reducida (30 mm de Hg), durante 15-30 min. La dispersión resultante es traslúcida, y el diámetro típico de las partículas resultantes es 140-160 nm (media Z, Malvern Zeta Sizer). La dispersión se filtra a través de un filtro de 0,22 micrómetros (Sartorius, sartobran 300), sin ningún cambio significativo en la turbidez o el tamaño de partículas. El análisis por HPLC del contenido de paclitaxel puso de manifiesto típicamente que después de la filtración se podía haber recuperado 70-100% del paclitaxel, dependiendo de las condiciones usadas. Por lo tanto, se obtuvo una dispersión de paclitaxel estéril.
- 45
- 50

- 55 La dispersión estéril se envasó de forma aséptica en viales de vidrio estériles y se liofilizó sin adición de ningún crioprotector. La torta resultante se podía reconstituir fácilmente a la dispersión original por adición de agua estéril o

disolución salina. El tamaño de partículas después de la reconstitución era el mismo que antes de la liofilización.

#### Ejemplo 6

Efecto de la fracción de fases del disolvente orgánico en el tamaño de partículas

5 El siguiente ejemplo demuestra la importancia de tener una fracción de fases inusualmente baja del disolvente orgánico en el sistema.

10 Por lo tanto, se llevaron a cabo una serie de experimentos siguiendo un procedimiento similar al descrito en el ejemplo 4, excepto que se alteró la fracción de fases del disolvente orgánico y el contenido de etanol se mantuvo al 10% v/v en la fase orgánica. Se encontró que el aumento de la fracción de fases conducía a un aumento significativo del tamaño de partículas: con la fracción de fases de 4% v/v (por encima de la concentración de saturación, o concentración de cloroformo total de 5% v/v) las partículas resultantes tienen un diámetro de 250 nm; con la fracción de fases de 3% v/v, las partículas tienen un diámetro de 200 nm, y con la fracción de fases de 2% v/v, las partículas tienen un diámetro de 150 nm.

Claramente, solamente las partículas preparadas con la fracción de fases muy baja se podían esterilizar por filtración.

#### 15 Ejemplo 7

Efecto de la concentración de fármaco en el tamaño de partículas

20 La función de la concentración de fármaco en la fase orgánica se demuestra en el siguiente ejemplo. Se llevaron a cabo dos experimentos en los que la concentración de paclitaxel en la fase orgánica era 50 mg/ml o 75 mg/ml, mientras que todos los demás parámetros eran los mismos descritos en el ejemplo 2. Se encontró que la concentración de fármaco baja da partículas que tienen un diámetro de aproximadamente 150 nm, mientras que las preparadas con la carga de fármaco más alta eran más pequeñas, es decir, 130-138 nm. Cuando se llevó a cabo un experimento similar pero con una concentración de etanol en la fase orgánica de aproximadamente 50%, se observó una tendencia similar, es decir, las partículas tenían 210 nm y 156 nm de diámetro, para una concentración de fármaco de 25 mg/ml y 50 mg/ml, respectivamente.

25 Estos descubrimientos contradicen directamente los descritos por Sjoström y col., véase antes, para la formación de nanopartículas en presencia de tensioactivos.

#### Ejemplo 8

Formación de nanopartículas de un fármaco modelo

30 Se disuelven 30 mg de isoreserpina (un fármaco modelo) en 3,0 ml de cloruro de metileno. La disolución se añade a 27,0 ml de disolución de albúmina de suero humano (1% p/v). La mezcla se homogeneiza durante 5 min a bajas rpm (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I.Q.) con el fin de formar una emulsión bruta y después se transfiere a un homogeneizador de alta presión (Avestin). La emulsión se lleva a cabo a 630-1260 kg/cm<sup>2</sup> mientras se recircula la emulsión durante al menos 5 ciclos. El sistema resultante se transfiere a un rotavapor, y el cloruro de metileno se separa rápidamente a 40°C, a presión reducida (30 mm de Hg), durante 20-30 min. La dispersión resultante es traslúcida, y el diámetro típico de las partículas resultantes era 120-140 nm (media Z, Malvern Zetasizer). La dispersión se filtró a través de un filtro de 0,22 micrómetros (Millipore).

Después la dispersión estéril se liofilizó durante 48 h sin añadir crioprotector. La torta resultante se podía reconstituir fácilmente a la dispersión original por adición de agua estéril o disolución salina. El tamaño de partículas después de la reconstitución era el mismo que antes de la liofilización.

#### 40 Ejemplo 9

Formación de partículas extremadamente pequeñas con un fármaco modelo

45 Se demuestra el efecto de la adición de etanol en la reducción del tamaño de partículas para la isoreserpina. Por lo tanto, se disuelven 30 mg de isoreserpina en 2,7 ml de cloruro de metileno y 0,3 ml de etanol. La disolución se añade a 27,0 ml de disolución de albúmina de suero humano (1% p/v). La mezcla se homogeneiza durante 5 min a bajas rpm (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I.Q.) con el fin de formar una emulsión bruta y después se transfiere a un homogeneizador de alta presión (Avestin). La emulsión se llevó a cabo a 630-2800 kg/cm<sup>2</sup> mientras se recirculaba la emulsión durante al menos 5 ciclos. El sistema resultante se transfirió a un rotavapor, y el cloruro de metileno se separó rápidamente a 40°C, a presión reducida (30 mm de Hg), durante 20-30 min. La dispersión resultante era traslúcida, y el diámetro típico de las partículas resultantes era 90-110 nm (media Z, Malvern Zetasizer). La dispersión se filtró a través de un filtro de 0,22 micrómetros (Millipore).

50 Después la dispersión estéril se liofilizó durante 48 h sin añadir crioprotector. La torta resultante se podía reconstituir fácilmente a la dispersión original por adición de agua estéril o disolución salina. El tamaño de partículas después de

la reconstitución era el mismo que antes de la liofilización.

Ejemplo 10

Uso de solo un disolvente miscible con el agua, supersaturado con fármaco - No adecuado para el procedimiento de la invención

5 Se dispersan 30 mg de paclitaxel en 0,6 ml de etanol. Con esta concentración (50 mg/ml), el paclitaxel no es completamente soluble y forma una dispersión supersaturada. La dispersión se añade a 29,4 ml de disolución de albúmina de suero humano (1% p/v). La mezcla se homogeneiza durante 5 min a bajas rpm (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I.Q.) con el fin de formar una dispersión bruta y después se transfiere a un homogeneizador de alta presión (Avestin). La emulsión se lleva a cabo a 630-2800 kg/cm<sup>2</sup> mientras se recircula la emulsión durante al menos 6 ciclos. El sistema resultante se transfiere a un rotavapor, y el etanol se separa rápidamente a 40°C, a presión reducida (30 mm de Hg), durante 15-30 min. El tamaño de partículas de la dispersión resultante es extremadamente amplio, en el intervalo de aproximadamente 250 nm a varios micrómetros.

15 La observación con el microscopio puso de manifiesto la presencia de partículas grandes y típicos cristales en forma de aguja de paclitaxel. Estas partículas eran demasiado grandes para la inyección intravenosa. Este experimento demuestra que el uso de disolventes tales como el etanol que son completamente miscibles con el agua, en el procedimiento de la invención da como resultado la formación de partículas grandes con una distribución muy amplia del tamaño de partículas y por lo tanto, no se pueden usar solos para el procedimiento de la invención. Por lo tanto, el procedimiento de la invención excluye específicamente el uso de disolventes miscibles con el agua cuando se usan solos para la disolución o dispersión del componente fármaco. El procedimiento de la invención requiere que dichos disolventes, cuando se usan, deban ser mezclados con disolventes esencialmente inmiscibles con el agua para permitir la producción de nanopartículas de la invención.

Ejemplo 11

Uso de solo un disolvente miscible con el agua que contiene fármaco disuelto - No adecuado para el procedimiento de la invención

25 Se dispersan 30 mg de paclitaxel en 1,3 ml de etanol. A esta concentración (aproximadamente 24,5 mg/ml), el paclitaxel es completamente soluble en etanol. La disolución se añade a 28,7 ml de disolución de albúmina de suero humano (1% p/v). La mezcla se homogeneiza durante 5 min a bajas rpm (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I.Q.) con el fin de formar una dispersión bruta y después se transfiere a un homogeneizador de alta presión (Avestin). La emulsión se lleva a cabo a 630-1260 kg/cm<sup>2</sup> mientras se recircula la emulsión durante al menos 6 ciclos. El sistema resultante se transfiere a un rotavapor, y el etanol se separa rápidamente a 40°C, a presión reducida (30 mm de Hg), durante 15-30 min. El tamaño de partículas de la dispersión resultante era extremadamente amplio, en un intervalo de aproximadamente 250 nm a varios micrómetros. La observación con el microscopio puso de manifiesto la presencia de partículas grandes y típicos cristales en forma de aguja de paclitaxel. Estas partículas eran demasiado grandes para la inyección intravenosa.

35 Este ejemplo, además del ejemplo 10 anterior, demuestra que en el procedimiento de la invención el uso de disolventes tales como el etanol que son completamente miscibles con el agua, da como resultado la formación de partículas grandes con una distribución muy amplia del tamaño de partículas y por lo tanto, no se pueden usar solos para el procedimiento de la invención. Por lo tanto, el procedimiento de la invención excluye específicamente el uso de disolventes miscibles con el agua cuando se usan solos para la disolución o dispersión del componente fármaco. El procedimiento de la invención requiere que dichos disolventes, cuando se usan, sean mezclados con disolventes esencialmente inmiscibles con el agua para permitir la formación de la invención.

Ejemplo 12

Determinación del estado físico del paclitaxel en forma de nanopartículas por difracción de rayos X de polvo

45 La materia prima del paclitaxel normalmente está presente en forma de cristales en forma de aguja de diferentes tamaños, típicamente entre 5-500 μm. La presencia de cristales en una formulación de fármaco para la inyección intravenosa es obviamente perjudicial si los cristales están presentes con tamaños por encima de algunos micrómetros, debido al potencial bloqueo de los capilares. Además, la solubilidad de los cristales de fármaco en general será menor que para el fármaco amorfo, disminuyendo así la biodisponibilidad del fármaco después de administración intravenosa. También se sabe que cuando la carga del fármaco en una formulación aumenta, también aumenta la tendencia a la cristalización. Por lo tanto, es ventajoso que la formulación contenga el fármaco esencialmente en forma amorfa.

55 Se usó la difracción de rayos X de polvo para determinar la naturaleza cristalina o no cristalina del paclitaxel en la formulación liofilizada de polvo. Se analizaron las siguientes muestras: Muestra 1 - paclitaxel en polvo; Muestra 2 - albúmina de suero liofilizada; Muestra 3 - una mezcla física de paclitaxel y albúmina; y Muestra 4 - paclitaxel formulado. Se realizó la difracción de rayos X de cada muestra de ángulos 2-zeta 2° a 70° usando radiación de CuKa, un voltaje de aceleración de 40 keV/30 mA, un tamaño de paso de 2-zeta de 0,05°, y un tiempo de



adquisición de datos de 2,0 s por paso. La muestra 1 mostraba picos fuertes típicos de una muestra cristalina. El pico de paclitaxel más intenso se encontraba a 2-zeta 5,1°. La muestra 2 mostraba jorobas anchas típicas de material amorfo. La muestra 3 mostraba en gran medida las jorobas amplias del ejemplo 2, pero además, era visible el pico en 2-zeta 5,1° del paclitaxel. La muestra 4, el paclitaxel formulado, no mostraba pruebas de la cristalinidad característica del paclitaxel, y aparecía idéntica a la muestra 2, indicando la presencia de agente farmacológicamente activo sustancialmente amorfo en la muestra formulada.

La naturaleza amorfa de las nanopartículas producidas de acuerdo con la invención contrasta directamente con los productos producidos por otros métodos descritos en la técnica para la producción de nanopartículas. Por ejemplo, el uso de técnicas de molienda, como se describe en el patente de EE.UU. 5.145.684 (Liversidge et al.), y como describen Liversidge-Merisko et al., *Pharmaceutical Research*, 13(2):272-278 (1996), produce un producto sustancialmente cristalino.

#### Ejemplo 13

Preparación de nanopartículas de ciclosporina (Capsorine I.V.) por homogeneización a alta presión

Se disuelven 30 mg de ciclosporina en 3,0 ml de cloruro de metileno. Después, la disolución se añade a 27,0 ml de disolución de albúmina de suero humano (1% p/v). La mezcla se homogeneiza durante 5 min a bajas rpm (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I.Q.) con el fin de formar una emulsión bruta y después se transfiere a un homogeneizador de alta presión (Avestin). La emulsión se llevó a cabo a 630-2800 kg/cm<sup>2</sup> mientras se recircula la emulsión durante al menos 5 ciclos. El sistema resultante se transfirió a un rotavapor, y el cloruro de metileno se separó rápidamente a 40°C, a presión reducida (30 mm de Hg), durante 20-30 min. La dispersión resultante era traslúcida, y el diámetro típico de las partículas resultantes era 160-220 nm (media Z, Malvern Zetasizer).

Después la dispersión se liofilizó durante 48 h sin añadir crioprotector. La torta resultante se podía reconstituir fácilmente a la dispersión original por adición de agua estéril o disolución salina. El tamaño de partículas después de la reconstitución era el mismo que antes de la liofilización.

#### Ejemplo 14

Preparación de nanogotas de ciclosporina (Casporine oral) por homogeneización a alta presión

Se disuelven 30 mg de ciclosporina en 3,0 ml de un aceite adecuado (aceite de sésamo que contiene aceite de naranja al 10%). Después, la disolución se añade a 27,0 ml de disolución de albúmina de suero humano (1% p/v). La mezcla se homogeneiza durante 5 min a bajas rpm (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I.Q.) con el fin de formar una emulsión bruta y después se transfiere a un homogeneizador de alta presión (Avestin). La emulsión se lleva a cabo a 630-2800 kg/cm<sup>2</sup> mientras se recircula la emulsión durante al menos 5 ciclos. La dispersión resultante tenía un diámetro típico de 160-220 nm (media Z, Malvern Zetasizer).

La dispersión se podía usar directamente o liofilizar durante 48 h, añadiendo opcionalmente un crioprotector adecuado. La torta resultante se podía reconstituir fácilmente a la dispersión original por adición de agua estéril o disolución salina.

#### Ejemplo 15

Formulación para inhalación de fármaco antiasmático

Se han preparado productos farmacéuticos antiasmáticos usando técnicas de micropartículas para dar formulaciones eficaces para los inhaladores de polvo seco (DPI). Partiendo de un fármaco esteroideo (p. ej., beclometasona, dipropionato de beclometasona, budesonida, dexametasona, flunisolida, triamcinolona acetónido, y similares), se prepara una formulación seca del tamaño de partículas y características de liberación adecuadas para asegurar el suministro eficaz en el sistema respiratorio.

La formulación se prepara usando técnicas de ultrasonidos, u homogeneización en la que el fármaco activo, disuelto en un disolvente, se dispersa en una disolución acuosa de proteína para formar una emulsión de nanopartículas. Después, esta emulsión se evapora para separar los disolventes, dejando el fármaco activo recubierto con proteína en la disolución. Esta muestra líquida que contiene las partículas de fármaco coloidal se mide mediante un Malvern Zetasizer y da un tamaño medio Z de 260 nm. En una realización preferida, el intervalo de tamaños de estas partículas coloidales es de aproximadamente 50-1.000 nm, y más preferiblemente de aproximadamente 70-400 nm.

En esta forma líquida, se pueden disolver otros excipientes. Dichos excipientes incluyen (pero no se limitan a) manitol al 0,5-15%, lactosa al 0,1-5% y maltodextrina. En esta etapa, la disolución resultante del fármaco activo, proteína y excipiente se puede secar por pulverización o liofilizar y moler para dar un polvo seco. Después del secado por atomización, se determina el tamaño de las partículas secas mediante el aparato Malvern Mastersizer, como D (v 0,5) de aproximadamente 1-10 µm. El intervalo de tamaños preferido para estas partículas es 0,5-15 µm, con un intervalo más preferido de 0,7-8 µm.

Este polvo secado por atomización después se mezcla con un excipiente vehículo en polvo. Otra vez, son posibles varios vehículos, incluyendo lactosa, trehalosa, Pharmatose 325M, sacarosa, manitol, y similares. El tamaño del vehículo en polvo es significativamente mayor que el de las partículas de fármaco formuladas (~63-90  $\mu\text{m}$  para la lactosa, 40-100  $\mu\text{m}$  para Pharmatose).

- 5 La eficacia de la formulación en polvo seca se demuestra por ensayo con un impactador de cascada Andersen de 8 etapas. Los resultados de los ensayos del impactador muestran una fracción de partículas finas (FPF) de ~60%. Esto indica una liberación de partículas muy eficaz, de tamaño adecuado para la deposición respiratoria. Esta FPF es sorprendentemente alta y es un resultado de la composición de la formulación que contiene nanopartículas coloidales del fármaco dentro de partículas de formulación más grandes.
- 10 Esta formulación muestra la aplicabilidad de las micropartículas y técnicas de secado por atomización en el procesamiento y composición de formulaciones de polvo seco para el suministro de aerosol por DPI. Los resultados de FPF alta mostrados indican una eficacia y procedimiento prometedor para las formulaciones de DPI.

#### Ejemplo 16

Resumen del procedimiento de fabricación actualmente preferido: partiendo de 1 g de paclitaxel como BDS

- 15 Preparar una disolución de HSA al 3%. A 51,7 ml de Albutein al 25% añadir 379,3 ml de agua para inyección. Mezclar bien y filtrar la disolución a través de un filtro estéril Filterware desechable de Nalgene de 0,22  $\mu\text{m}$ . Conservar a 4°C hasta su uso.

- 20 Pesar 1,0 g de paclitaxel en una botella de vidrio. Combinar  $\text{CHCl}_3$  y alcohol etílico en proporciones adecuadas en un vial. Mezclar bien. Añadir al paclitaxel 13,33 ml de la mezcla de cloroformo/alcohol etílico. Agitar para asegurar que se disuelve todo el paclitaxel en la disolución. Filtrar la disolución a través de un filtro de Teflon estéril de 0,22  $\mu\text{m}$  y recoger en una botella de vidrio estéril.

- 25 A la disolución de paclitaxel disuelto en la botella de vidrio añadir la disolución de HSA. Usar el mezclador Sentry Microprocessor para mezclar la disolución de paclitaxel/HSA. Cuando la disolución está mezclada, verter el contenido en la cámara del homogeneizador. Circular la mezcla por el homogeneizador a presión hasta que se obtenga el tamaño de partículas deseado. Recoger la muestra homogeneizada en un matraz de fondo redondo estéril Kontes.

Colocar el matraz con la muestra final en el rotavapor. Encender el vacío y la rotación al máximo en el rotavapor, y evaporar el disolvente orgánico. Esto da como resultado la disolución coloidal de paclitaxel en albúmina humana. Guardar ~3 ml de esta muestra evaporada en el rotavapor para el análisis del tamaño de partículas.

- 30 Filtrar la disolución coloidal en una campana estéril usando un filtro estéril de 0,45/0,2  $\mu\text{m}$  y recoger en un recipiente colector estéril. Guardar ~3 ml de la muestra filtrada para el análisis por HPLC de la concentración de paclitaxel.

- 35 Determinar el volumen de carga para obtener 30 mg (u otra cantidad derivada) de paclitaxel por vial. Cargar la muestra esterilizada por filtración en viales de 30 ml Wheaton tratados en autoclave con aproximadamente 17 ml (basado en ensayo). Cerrar los viales con tapones de vial de suero Wheaton tratados en autoclave. Cada vial debe contener aproximadamente 30 mg de paclitaxel.

Liofilizar las muestras en el liofilizador de bandeja con sistema de taponado FTS usando un ciclo de liofilización predeterminado. Después de liofilizar las muestras, tapar los viales y sellar los viales engastándolos con tapas de aluminio desprendibles Wheaton de 20 mm. Etiquetar las muestras de forma adecuada. El procedimiento entero se lleva a cabo en un entorno de sala limpia en condiciones asépticas.

- 40 Las muestras liofilizadas contienen disolvente residual en niveles <1000 ppm, y más preferiblemente <500 ppm, o incluso <100 ppm.

- 45 Filtración estéril del producto final: después de separación del disolvente por evaporación, la disolución coloidal de paclitaxel en el matraz se esteriliza por filtración a través de una combinación de filtro esterilizante de 0,45/0,2  $\mu\text{m}$ . La disolución filtrada se recoge en un vaso de precipitados estéril y se envasa de forma estéril en viales de 30 ml. Los viales después se ponen en el liofilizador. Después de completarse el ciclo de liofilización, los viales se cubren con un manto de nitrógeno gaseoso estéril seco y se tapan bajo el manto de nitrógeno.

Hay que indicar que los procedimientos de homogeneización a alta presión se usan para romper y matar células bacterianas y otras células para extraer su contenido.

#### Ejemplo 17

- 50 Formación de nanopartículas usando ultrasonidos. Preparación de la cubierta de proteína que contiene aceite

Al igual que el uso de la homogeneización de alta cizalladura, se cree que el uso de ultrasonidos para formar

nanopartículas de agentes farmacológicamente activos insolubles en agua recubiertas de proteína, funciona por reticulación de proteínas mediante la formación de enlaces disulfuro de intermoleculares. Muchas de las ventajas de la técnica anterior que tienen las técnicas de homogeneización de alta cizalladura descritas antes se aplican igualmente a los métodos de ultrasonidos descritos a continuación.

- 5 Con respecto a los disolventes orgánicos, proteínas y polímeros no proteicos que se pueden usar en el método de ultrasonidos, se hace referencia a los componentes descritos antes con respecto al método de homogeneización de alta cizalladura. Se espera que todos los mismos componentes funcionen igualmente bien en ambos métodos.

Este aspecto de la invención se describirá ahora con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

- 10 Se pusieron 3 ml de una disolución de albúmina de suero humano al 5% USP (Farmacopea de Estados Unidos) (Alpha Therapeutic Corporation) en un recipiente cilíndrico que se podía unir a una sonda de ultrasonidos (Heat Systems, Modelo XL2020). La disolución de albúmina se cubrió con una capa de 6,5 ml de aceite de soja de calidad USP (aceite de soja). Se llevó el extremo de la sonda de ultrasonidos a la interfase entre las dos disoluciones y el conjunto se mantuvo en un baño de enfriamiento a 20°C. Se dejó que el sistema se equilibrara y el dispositivo de ultrasonidos se puso en marcha durante 30 s. Se produjo una mezcla vigorosa y se obtuvo una suspensión lechosa blanca. La suspensión se diluyó 1:5 con disolución salina normal. Se usó un contador de partículas (Particle Data Systems, Elzone, Model 280 PC) para determinar la distribución de tamaños y la concentración de las cubiertas de proteína que contienen aceite. Se determinó que las cubiertas de proteína resultantes tenían una dimensión máxima de la sección transversal de aproximadamente  $1,35 \pm 0,73 \mu\text{m}$ , y se determinó que la concentración total era  $\sim 10^9$  cubiertas/ml en la suspensión original.

Como control, los componentes anteriores, sin la proteína, no formaron una microemulsión estable cuando se sometieron a la irradiación de ultrasonidos. Este resultado sugiere que la proteína es esencial para la formación de microesferas. Esto se confirma por los estudios de micrografía electrónica de barrido y micrografía electrónica de transmisión como se describe a continuación.

#### 25 Ejemplo 18

Preparación de las cubiertas poliméricas que contienen paclitaxel disuelto

- Se disolvió paclitaxel en aceite de soja de calidad USP con una concentración de 2 mg/ml. Se pusieron 3 ml de disolución de albúmina de suero humano al 5% USP en un recipiente cilíndrico que se podía unir a una sonda de ultrasonidos. La disolución de albúmina se cubrió con una capa de 6,5 ml de aceite de soja/disolución de paclitaxel. Se llevó el extremo de la sonda de ultrasonidos a la interfase entre las dos disoluciones y el conjunto se mantuvo en equilibrio 30 s. Se produjo una mezcla vigorosa y se obtuvo una suspensión lechosa blanca estable que contenía cubiertas poliméricas de paredes de proteína que encerraban la disolución de aceite/paclitaxel.

- Con el fin de obtener una carga más alta de fármaco en la cubierta de proteína reticulada, se puede mezclar con el aceite un disolvente mutuo para el aceite y el fármaco (en el que el fármaco tiene una solubilidad considerablemente mayor). Con la condición de que este disolvente sea relativamente no tóxico (p. ej., acetato de etilo), se puede inyectar junto con el vehículo original. En otros casos, se puede separar por evaporación del líquido a vacío después de la preparación de las cubiertas poliméricas.

- Se reconoce que se pueden usar varios métodos diferentes para lograr las características físicas de la formulación de la invención. Las propiedades biológicas asociadas con esta formulación de concentraciones locales más altas en sitios de órganos específicos (próstata, pulmón, páncreas, hueso, riñón, corazón) así como las menores toxicidades ( $DL_{50}$  mayor, menor mielosupresión, menor toxicidad cerebral) asociadas con mayores eficacias, son independientes del método de fabricación.

#### Ejemplo 19

Preparación de nanopartículas por ultrasonidos

- 45 Se disuelven 20 mg de paclitaxel en 1,0 ml de cloruro de metileno. La disolución se añade a 4,0 ml de disolución de albúmina de suero humano (5% p/v). La mezcla se homogeneiza durante 5 min a bajas rpm (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I.Q.) con el fin de formar una emulsión bruta y después se transfiere a una celda del dispositivo de ultrasonidos a 40 kHz. El tratamiento con ultrasonidos se lleva a cabo a 60-90% de potencia a 0° durante 1 min (550 Sonic Dismembrator). La mezcla se transfiere a un rotavapor, y el cloruro de metileno se separa rápidamente a 50 40°C, a presión reducida (30 mm de Hg), durante 20-30 min. El diámetro típico de las partículas resultantes era 350-420 nm (media Z, Malvern Zetasizer).

Después la dispersión se liofilizó durante 48 h sin añadir crioprotector. La torta resultante se podía reconstituir fácilmente a la dispersión original por adición de agua estéril o disolución salina. El tamaño de partículas después de la reconstitución era el mismo que antes de la liofilización.

## Ejemplo 20

Biodistribución in vivo de cubiertas de proteína reticulada que contienen un fluoróforo

Para determinar la absorción y biodistribución de líquido atrapado dentro de las cubiertas poliméricas de proteína después de inyección intravenosa, se atrapó un colorante fluorescente (rubreno, disponible en Aldrich) dentro de una cubierta polimérica de proteína de albúmina de suero humano (HSA) y se usó como un marcador. Por lo tanto, se disolvió rubreno en tolueno, y se prepararon las cubiertas de albúmina que contienen tolueno/rubreno como se ha descrito antes por irradiación de ultrasonidos. La suspensión lechosa resultante se diluyó 5 veces en disolución salina normal. Después se inyectaron 2 ml de la suspensión diluida en la vena de la cola de una rata a lo largo de 10 min. Se sacrificó un animal 1 h después de la inyección, y otro 24 h después de la inyección.

Se examinó en secciones congeladas de 100  $\mu\text{m}$  de pulmón, hígado, riñón, bazo y médula ósea con un microscopio de fluorescencia, la presencia de colorante fluorescente atrapado en la cubierta polimérica o colorante liberado. Después de 1 h, la mayoría de las cubiertas poliméricas parecían estar intactas (es decir, aparecían como partículas fluorescentes brillantes de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro), y localizadas en los pulmones y el hígado. Después de 24 h, el colorante se observaba en el hígado, pulmones, bazo y médula ósea. También se observó una tinción general del tejido indicando que la pared de la cubierta de las cubiertas poliméricas había sido digerida, y liberado el colorante de su interior. Este resultado estaba de acuerdo con lo que se esperaba y demuestra el potencial uso de las composiciones de la invención para la liberación retardada o controlada de un agente farmacéutico atrapado tal como el paclitaxel.

## Ejemplo 21

20 Toxicidad de las cubiertas poliméricas que contienen aceite de soja (SBO)

Se prepararon cubiertas poliméricas que contienen aceite de soja como se describe en el ejemplo 15. La suspensión resultante se diluyó en disolución salina normal para producir dos disoluciones diferentes, una que contenía SBO al 20% y la otra que contenía SBO al 30%.

25 Intralipid, un agente de NPT disponible en el comercio, contiene SBO al 20%. La  $DL_{50}$  para Intralipid en ratones es 120 mg/kg, o aproximadamente 4 ml para un ratón de 30 g, cuando se inyecta a 1 cc/min.

Se trataron 2 grupos de ratones (3 ratones en cada grupo; cada ratón pesaba aproximadamente 30 g) con la composición de la invención que contenía SBO como sigue. Se inyectaron a cada ratón 4 ml de la suspensión preparada de cubiertas poliméricas que contienen SBO. Todos los miembros de un grupo recibieron la suspensión que contenía SBO al 20%, mientras que todos los miembros del otro grupo recibieron la suspensión que contenía SBO al 30%.

35 Los tres ratones en el grupo que recibieron la suspensión que contenía SBO al 20% sobrevivieron a dicho tratamiento, y no mostraron una toxicidad grave en ningún tejido u órgano cuando se observaron una semana después del tratamiento con SBO. Solo uno de los tres ratones en el grupo que recibió suspensión que contenía SBO al 30% murió después de la inyección. Estos resultados demuestran claramente que el aceite contenido en las cubiertas poliméricas de acuerdo con la presente invención no es tóxico en su dosis  $DL_{50}$ , comparado con una formulación de SBO disponible en el comercio (Intralipid). Este efecto se puede atribuir a la liberación lenta (es decir, velocidad controlada de hacerse biocompatible) del aceite de dentro de la cubierta polimérica. Dicha liberación lenta evita alcanzar una dosis letal del aceite, a diferencia con las dosificaciones altas de aceite alcanzadas con las emulsiones disponibles en el comercio.

40 Ejemplo 22

Biodisponibilidad in vivo de aceite de soja liberado de cubiertas poliméricas

Se llevó a cabo un ensayo para determinar la liberación lenta o sostenida del material encerrado en la cubierta polimérica después de inyección de una suspensión de cubiertas poliméricas en la circulación sanguínea de ratas. Se prepararon cubiertas poliméricas de paredes de proteína reticulada (albúmina) que contenían aceite de soja (SBO) por ultrasonidos como se ha descrito antes. La suspensión resultante de las cubiertas poliméricas que contienen aceite se diluyó en disolución salina hasta una suspensión final que contenía 20% de aceite. Se inyectaron 5 ml de esta suspensión en la vena yugular externa canulada de ratas a lo largo de un periodo de 10 min. Se recogió sangre de estas ratas en varios tiempos de medición después de la inyección y se determinó el nivel de triglicéridos (el aceite de soja es predominantemente triglicérido) en la sangre por análisis rutinario.

50 Se usó como control 5 ml de una emulsión de grasa disponible en el comercio (Intralipid, un agente de nutrición parenteral acuoso, que contiene aceite de soja al 20%, fosfolípidos de yema de huevo al 1,2% y glicerina al 2,25%). El control usa fosfátido de huevo como emulsionante para estabilizar la emulsión. Una comparación de los niveles en el suero de los triglicéridos en los dos casos daría una comparación directa de la biodisponibilidad del aceite en función del tiempo. Además de la suspensión de cubiertas poliméricas que contienen 20% de aceite, también se inyectaron 5 ml de una muestra de cubiertas poliméricas que contienen aceite en disolución salina con una

concentración final de aceite al 30%. Se usaron 2 ratas en cada uno de los 3 grupos. Los niveles de triglicéridos en la sangre en cada caso están tabulados en la tabla 1, dados en unidades de mg/dl.

Tabla 1

Grupo	Triglicéridos en el suero (mg/dl)					
	Pre	1 h	4 h	24 h	48 h	72 h
Intralipid Control (SBO 20%)	11,4	941,9	382,9	15,0	8,8	23,8
Cubiertas poliméricas (SBO al 20%)	24,8	46,7	43,8	29,3	24,2	43,4
Cubiertas poliméricas (SBO al 30%)	33,4	56,1	134,5	83,2	34,3	33,9

5 Los niveles en la sangre antes de inyección se muestran en la columna marcada "Pre". Claramente, para el control Intralipid, se observan niveles de triglicéridos muy altos después de inyección. Después se observa que los niveles de triglicéridos tardan aproximadamente 24 h en bajar a los niveles previos a la inyección. Por lo tanto, se observa que el aceite está inmediatamente disponible para el metabolismo después de inyección.

10 La suspensión de cubiertas poliméricas que contienen aceite que contiene la misma cantidad de aceite total que Intralipid (20%) muestra una biodisponibilidad claramente diferente de los triglicéridos detectables en el suero. Los niveles aumentan a aproximadamente el doble de su valor normal y se mantienen en este nivel durante muchas horas, indicando una liberación lenta o sostenida de triglicéridos en la sangre en niveles muy cercanos a los normales. El grupo que recibe cubiertas poliméricas que contienen aceite que tienen 30% de aceite, muestra un nivel más alto de triglicéridos (simultáneo con la dosis más alta administrada) que vuelve al nivel normal en las siguientes 48 h. De nuevo, los niveles de triglicéridos en la sangre no aumentan enormemente en este grupo, comparado con el grupo de control que recibe Intralipid. Esto, de nuevo, indica la biodisponibilidad lenta y sostenida del aceite de la composición de la invención, que tiene la ventaja de evitar los niveles peligrosamente altos del aceite contenido en las cubiertas poliméricas y la biodisponibilidad a lo largo de un periodo de tiempo prolongado en niveles aceptables. Claramente, los fármacos suministrados dentro de las cubiertas poliméricas de la presente invención lograrían las mismas ventajas.

20 Dichos sistemas de cubiertas poliméricas que contienen aceite de soja se podrían suspender en una disolución acuosa de aminoácidos, electrolitos esenciales, vitaminas y azúcares para formar un agente de nutrición parenteral total (NPT). Dicha NPT no se puede formular a partir de las emulsiones de grasa actualmente disponibles (p. ej., Intralipid) debido a la inestabilidad de la emulsión en presencia de electrolitos.

#### Ejemplo 23

25 Preparación de cubiertas poliméricas de pared de proteína que contienen un núcleo sólido de agente farmacéuticamente activo

30 Otro método de suministro de un fármaco poco soluble en agua tal como paclitaxel dentro de una cubierta polimérica, es preparar una cubierta de material polimérico alrededor de un núcleo de fármaco sólido. Dicha partícula de fármaco "recubierta de proteína" se puede obtener como sigue. Se repite el procedimiento descrito en el ejemplo 16 usando un disolvente orgánico para disolver el paclitaxel en una concentración relativamente alta. Los disolventes usados en general son orgánicos tales como benceno, tolueno, hexano, éter etílico, cloroformo, alcohol y similares. Las cubiertas poliméricas se producen como se describe en el ejemplo 15. Se diluyen 5 ml de la suspensión lechosa de cubiertas poliméricas que contienen paclitaxel disuelto, hasta 10 ml en disolución salina normal. Esta suspensión se pone en un rotavapor y se separan los componentes orgánicos volátiles a vacío. La suspensión resultante se examina con microscopio para poner de manifiesto núcleos opacos, que indican la separación de sustancialmente todo el disolvente orgánico, y la presencia de paclitaxel sólido. La suspensión se puede congelar y almacenar indefinidamente y usar directamente o liofilizar posteriormente.

40 Alternativamente, las cubiertas poliméricas con núcleos de fármaco disuelto que contienen disolvente orgánico se liofilizan and para obtener un polvo desmenuzable seco que se puede volver a suspender en disolución salina (u otro líquido adecuado) en el momento de usar. Aunque la proteína actualmente preferida para usar en la formación de la cubierta polimérica es albúmina, se podrían usar otras proteínas tales como  $\alpha$ -2-macroglobulina, una opsonina conocida, para potenciar la absorción de las cubiertas poliméricas por las células de tipo macrófagos. Alternativamente, se podrían incorporar moléculas de tipo PEG en las partículas para producir una cubierta polimérica con un mayor tiempo de circulación in vivo.

#### 45 Ejemplo 24

Formación de nanopartículas por microemulsión espontánea

También se pueden formar nanopartículas sin usar ultrasonidos, homogeneización de alta cizalladura o cualquier

otra técnica de alta energía. Por lo tanto, si se desea, se puede formar una suspensión (o polvo seco) de fármaco esencialmente puro.

5 Una microemulsión es un sistema de emulsión termodinámicamente estable que se forma espontáneamente cuando todos sus componentes se ponen en contacto, en ausencia de uso de equipamiento de alta cizalladura u otra agitación sustancial. Las microemulsiones son sustancialmente no opacas, es decir, son transparentes o traslúcidas.

10 Las microemulsiones comprenden una fase dispersa, en la que el tamaño de gotita típico es inferior a 1000 Angstrom (Å), de ahí su transparencia óptica. Las gotitas en la microemulsión típicamente son esféricas, aunque son posibles otras estructuras tales como cilindros alargados. (Para una discusión adicional véase, p. ej., Rosof, *Progress in Surface and Membrane Science*, 12,405, Academic Press (1975), Friberg, *Dispersion Science and Technology*, 6, 317 (1985)).

Como se mostrará a continuación, la presente invención usa las características únicas de las microemulsiones como primera etapa hacia la obtención de nanopartículas extremadamente pequeñas, después de separación de la fase de aceite.

15 Como se ha descrito antes, las micropartículas y nanopartículas se pueden formar mediante diferentes procedimientos, entre ellos, el método de evaporación del disolvente. Este método se basa, en principio, en la formación de una emulsión de aceite en agua sencilla, en presencia de agente tensioactivo, mientras se aplican fuerzas de cizalladura altas mediante diferentes equipamientos tales como mezcladoras de rotor y estator, ultrasonidos, homogeneizadoras de alta presión, molinos coloidales, etc. Después de formar dicha emulsión, que contiene un polímero y un fármaco disueltos en las gotitas de aceite dispersas, se separa la fase de aceite por evaporación, típicamente a presión reducida y temperatura elevada, y se forman micropartículas o nanopartículas del fármaco y polímero disueltos. Obviamente, el tamaño de las partículas depende del tamaño de las gotitas de la emulsión; cuanto más pequeñas son las gotitas, más pequeñas son las partículas resultantes. Las gotitas de emulsión pequeñas se pueden lograr solamente aplicando energía muy alta, e incluso entonces, usando los homogeneizadores de alta presión más avanzados tales como el Microfluidizer, no es práctico lograr gotitas de emulsión inferiores a 75 nm. Puesto que las emulsiones son sistemas inherentemente inestables, y sufren procesos tales como agregación y coalescencia de gotitas, los procedimientos de evaporación de disolvente para dichas emulsiones pueden dar como resultado partículas más grandes.

El nuevo método, que supera los problemas asociados con la aplicación del método de evaporación del disolvente en las emulsiones convencionales, consiste en las siguientes etapas:

30 a. Disolver el fármaco insoluble en agua en un disolvente que tiene baja solubilidad en agua, y tiene una presión de vapor mayor que la del agua. El fármaco se disuelve sin ningún aglutinante polimérico adicional, aunque en principio dicho aglutinante puede estar presente.

b. Mezclar el disolvente con un tensioactivo(s) adecuado(s) y un cotensioactivo(s) soluble en agua.

35 c. Añadir una cantidad adecuada de agua o disolución acuosa a esta mezcla, formando así espontáneamente una microemulsión de aceite en agua, sin usar ningún equipamiento de alta cizalladura. La disolución acuosa puede contener electrolitos, aminoácidos, o cualquier otro aditivo que pueda afectar a la formación de la microemulsión durante la primera etapa de preparación.

d. Opcionalmente añadir una disolución de proteína a la microemulsión.

40 e. Separar el disolvente por evaporación a presión reducida, produciendo así la precipitación del fármaco en forma de nanopartículas amorfas extremadamente pequeñas, que tienen un tamaño típico inferior a 1000 Angstroms. En esta etapa las partículas están dispersas y estabilizadas en un medio acuoso que contiene tensioactivo, cotensioactivo y opcionalmente agentes protectores tales como proteínas, azúcares, etc. Los métodos de evaporación aceptables incluyen el uso de rotavapores, evaporadores de capa delgada, secadores por atomización, liofilizadores, y otros equipamientos de evaporación convencionales usados típicamente en la industria.

45 f. Opcionalmente, se puede separar el tensioactivo y cotensioactivo por diálisis, ultrafiltración, adsorción, etc., obteniendo así nanopartículas que están estabilizadas por la proteína (si se usa).

50 g. Después de evaporar el disolvente, la dispersión líquida de nanopartículas se puede secar para obtener un polvo que contiene el agente farmacológico y opcionalmente la proteína, que se puede volver a dispersar en un medio acuoso estable tal como disolución salina, tampón, agua, y similares, para obtener una suspensión que se puede administrar a un animal, que tiene un tamaño de partículas inferior a 1000 Angstroms. Los métodos aceptables para obtener este polvo son la liofilización, secado por pulverización, y similares. Si la conversión en una forma sólida se realiza por liofilización, se pueden añadir diferentes crioprotectores, tales como manitol, lactosa, albúmina, carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, maltodextrinas y/o polietilenglicol.

55 Estas nanopartículas después se pueden mezclar con excipientes adicionales o materiales formadores de matriz, con el fin de obtener un sistema de suministro de fármaco, con una alta biodisponibilidad, características de

liberación controlada y protección en los jugos gástricos. El producto final se puede introducir en el sujeto en forma de un comprimido, cápsula, líquido reconstituido, o similar.

La formulación de la presente invención tiene ventajas significativas frente a los métodos usados previamente para preparar nanopartículas y micropartículas, y el uso de microemulsiones o "concentrado de premicroemulsión".

5 Se obtienen muchas ventajas usando el procedimiento de la invención. La microemulsión se forma espontáneamente, si se seleccionan los componentes adecuados, y no son necesarios equipamientos de alto coste y consumo energético. El tamaño de las gotitas es más pequeño en aproximadamente un orden de magnitud que las gotitas más pequeñas de emulsión obtenidas por un equipamiento de alta cizalladura, y por lo tanto se pueden obtener nanopartículas extremadamente pequeñas. La microemulsión es termodinámicamente estable, y por lo tanto se evitarán los problemas habituales asociados con la inestabilidad del emulsión (y por lo tanto una dependencia del tiempo del tamaño de las partículas resultantes). El procedimiento entero es mucho más sencillo que el método convencional de evaporación del disolvente de emulsiones, y menos sensible a diferentes parámetros. Puesto que solamente está implicada la mezcla simple en el procedimiento, el cambio de escala a volúmenes de producción grandes es muy sencillo, comparado con la emulsión con un equipamiento tal como un homogeneizador de alta cizalladura. Puesto que el tamaño de partículas obtenido por el nuevo procedimiento es tan pequeño, un orden de magnitud menor que el tamaño de poros de las membranas usadas para la esterilización por filtración, el procedimiento de esterilización es muy eficaz, sin problemas asociados con el bloqueo de membranas, tal como una mayor presión de filtración, y pérdida alta de fármaco durante el procedimiento de filtración. Puesto que no hay fuerzas altas de cizalladura en el procedimiento de emulsión, no hay aumento de la temperatura durante la emulsión, y por lo tanto mediante el nuevo método de la invención se pueden procesar incluso fármacos sensibles a la temperatura. El fármaco en la formulación líquida de la presente invención tiene una mayor estabilidad química porque contiene nanopartículas dispersas comparado con las microemulsiones convencionales que contienen nanogotas dispersas, es decir, se producen más reacciones químicas en el estado líquido (microgota) frente al estado sólido (nanopartícula). La presente invención tiene una mayor estabilidad química como formulación seca comparada con las microemulsiones convencionales que son líquidas como fase de microemulsión continua. La formulación sólida permite la inclusión del fármaco en diferentes formas farmacéuticas sólidas, tales como comprimidos, gránulos y cápsulas, comparado con las microemulsiones convencionales o los "concentrados de premicroemulsión", que están presentes en una forma líquida. La distribución de tamaños muy estrecha combinada con un tamaño medio de partículas muy bajo, asegura una mayor adsorción del fármaco, de una forma más uniforme que las micropartículas y nanopartículas preparadas por métodos convencionales, y por lo tanto, se espera una mayor biodisponibilidad.

Aunque los ejemplos presentados en la siguiente sección se refieren a moléculas insolubles en agua, los agentes farmacológicos contemplados como útiles en la preparación de nanopartículas incluyen, pero no se limitan a, fármacos, agentes de diagnóstico, agentes de valor terapéutico, agentes nutricionales, y similares, que son solubles o insolubles en agua. Una lista no limitante de categorías de fármacos y compuestos incluye, pero no se limita a, todos los compuestos listados antes para usar en el aspecto que homogeneización de alta cizalladura de la invención.

Los disolventes descritos en los siguientes ejemplos son tolueno y acetato de etilo, sin embargo, cualquier disolvente o mezcla de disolventes que sea capaz de disolver el fármaco requerido, será adecuado para usar en el procedimiento de la invención, con la condición de que se pueda formar una microemulsión adecuada antes de la separación del disolvente. Dichos disolventes pueden ser cloroformo, cloruro de metileno, acetato de etilo, acetato de butilo, acetato de isobutilo, acetato de propilo, éter de terc-butilo y metilo, butanol, propilenglicol, heptano, anisol, cumeno, formiato de etilo, etanol, propanol, tetrahidrofurano, dioxano, acetonitrilo, acetona, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, metilpirrolidinona; aceite de soja, aceite de coco, aceite de ricino, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, alcoholes C1-C20, ésteres C2-C20, cetonas C3-C20, polietilenglicoles, hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos halogenados, d-limoneno y combinaciones de los mismos, y similares.

La proteína (o una mezcla de varias proteínas) usada en este procedimiento debe ser tal que no precipite durante la mezcla inicial o durante la etapa de evaporación. Hay muchas proteínas de este tipo, incluyendo albúminas (p. ej., BSA, HSA, huevo), gelatina, colágeno, IgG, diferentes enzimas, lactoglobulina, caseína, proteínas de soja, y similares.

Los tensioactivos usados en esta invención deberían ser capaces de formar espontáneamente microemulsiones de aceite en agua, en presencia de un cotensioactivo y disolvente adecuados, son producir la precipitación del fármaco o de la proteína (si está presente). Los tensioactivos pueden ser no iónicos (Tween, Span, Triton, Pluronic, poli(ésteres de glicerol), y similares), aniónicos (SDS, colatos y desoxicolatos, jabones de ácidos grasos, y similares), catiónicos (cloruro de cetiltrimetilamonio, y similares) o de ion híbrido (lecitina, aminoácidos y similares).

El cotensioactivo debería ser capaz de formar microemulsiones espontáneamente con los tensioactivos seleccionados, sin producir la precipitación de las moléculas de fármaco disueltas (o proteína, si está presente), y sin inducir la formación de material cristalino grande. Los cotensioactivos pueden ser solubles en agua o solubles en aceite, tales como butanol, propilenglicol, alcohol bencílico, propanol, y similares.

La conversión de la dispersión líquida de nanopartículas por liofilización puede requerir la adición de agentes crioprotectores, tales como manitol, lactosa, aminoácidos, proteínas, polisacáridos, y similares.

Está claro que los principios descritos en esta invención se pueden aplicar con diversas variaciones del procedimiento, por ejemplo:

- 5 1. La formación de las partículas de fármaco se puede inducir por dilución de la microemulsión en un disolvente adecuado, en el que el disolvente es miscible. Por ejemplo, si el disolvente tiene una solubilidad baja en agua, se podría diluir la microemulsión en un grado tal que el disolvente esté por debajo de su límite de solubilidad en agua.
2. El disolvente y opcionalmente el tensioactivo y cotensioactivo se pueden separar usando un agente de extracción selectivo que no disuelva el fármaco.
- 10 3. El tensioactivo y cotensioactivo se pueden separar por ultrafiltración, usando filtros que tengan un corte de exclusión inferior al PM de la proteína. La diálisis sencilla también es una opción.
4. La formulación puede contener sólo componentes que son aceptables para el uso previsto de la formulación final (sea oral, IV, tópica, etc.), de forma que no es necesario su separación.
- 15 5. Igualmente, se pueden usar cotensioactivos que pueden permanecer en el producto final, tales como glicerol, alcohol bencílico, etc.
6. Es posible la adición de diferentes moléculas solubles en agua que pueden afectar al diagrama de fases de la microemulsión (electrolitos, etanol, etc.), controlando así la relación entre los diferentes componentes para dar la carga de fármaco óptima.
- 20 7. La etapa de emulsión espontánea se puede realizar a una temperatura distinta de la temperatura ambiente, con el fin de afectar al diagrama de fases (y las proporciones de los componentes que conducen a la formación de una microemulsión). En particular, se puede usar el efecto de la temperatura (en tensioactivos etoxilados) para cambiar el sistema de una microemulsión de aceite en agua a una de agua en aceite.
8. Se pueden añadir otros componentes a la fase del disolvente, con el fin de afectar a la biodisponibilidad del fármaco. En particular, se prefiere la adición de un aceite tal como aceite de soja, para potenciar la absorción oral, y
- 25 9. Igualmente, se puede añadir un polímero formador de matriz (tal como PVP) al disolvente, junto con el fármaco.
10. La estabilización y las propiedades de la forma sólida se pueden alterar mediante la adición de un polímero soluble en agua distinto de la proteína (carboximetilcelulosa, gomas, y similares) a la fase acuosa externa de la microemulsión.
- 30 11. Las propiedades de fluidez del polvo en forma sólida resultante se pueden alterar por adición de partículas coloidales (p. ej., sílice) como una carga, o la adición de adyuvantes de la reconstitución/antiaglomeración.
12. Se pueden aplicar los mismos principios descritos en esta intención a la formación de partículas solubles en agua, pero realizando la etapa de emulsión en el intervalo de composición en el que se forme la microemulsión de agua en aceite. El procedimiento se puede usar, por ejemplo, para formar nanopartículas de proteína
- 35 extremadamente pequeñas.

#### Ejemplo 25

##### Preparación de nanopartículas de ciclosporina A

Se disuelven 115 mg de ciclosporina A en 1 ml de acetato de butilo, y se mezclan con 2 g de una disolución de Triton X-100:n-butanol 4:1. Se obtiene un sistema transparente. Se añaden gota a gota 10 g de agua, mientras se agita ligeramente. Se obtiene una microemulsión de aceite en agua transparente. Se añaden 10 g de disolución de caseína al 1%, mientras se agita ligeramente. El sistema se vuelve ligeramente turbio. Se separa el acetato de butilo en un Rotovap, a 40°C, 80 mm de Hg. El sistema se vuelve completamente transparente.

El tamaño de partículas se midió por espectroscopía de correlación fotónica. Se encontró que el tamaño medio Z es 25-33 nm, mientras que el tamaño por la distribución en número o volumen es solo 9 nm. No se observaron partículas con el microscopio óptico, ni con luz polarizada. Este resultado indica la ausencia de partículas cristalinas.

La dispersión líquida de estas nanopartículas se liofilizó, después de añadir lactosa (al 2% p/p).

Se obtuvo un material sólido blanco, que después de reconstituir en agua, dio un sistema transparente, similar al previo a la liofilización. El tamaño de partículas en esta muestra reconstituida era muy similar al de la formulación original, con tamaño medio Z de aproximadamente 40 nm y diámetro por distribución en volumen y número entre 10-12 nm.



## Ejemplo 26

## Preparación de nanopartículas de ciclosporina A

Se disuelven 119 mg de ciclosporina A en acetato de butilo, y se mezclan con 2 g de una disolución de Triton X-100:propilenglicol 4:1. Se obtiene un sistema transparente. Se añaden gota a gota 7 g de agua, mientras se agita ligeramente. Se obtiene una microemulsión de aceite en agua transparente. Se añaden 7 g de disolución de caseína al 1%, mientras se agita ligeramente. El sistema se vuelve ligeramente turbio. La muestra se diluye 1:1 con agua, antes de la evaporación del disolvente. Se separa el acetato de butilo en un Rotovap, a 40°C, 80 mm de Hg. El sistema se vuelve completamente transparente. Este procedimiento también dio nanopartículas extremadamente pequeñas: tamaño medio Z 45 nm, y por distribución en volumen y número 11 nm.

10 La dispersión líquida de estas nanopartículas se liofilizó, después de añadir lactosa (al 2% p/p).

Se obtuvo un material sólido blanco, que después de reconstituir en agua, dio un sistema transparente, similar al previo a la liofilización. El tamaño de partículas en esta muestra reconstituida era muy cercano al de la formulación original, con tamaño medio Z de aproximadamente 25 nm y diámetro por distribución en volumen y número entre 9-11 nm.

## 15 Ejemplo 27

## Nanopartículas de ciclosporina

Se hicieron microemulsiones con las siguientes composiciones: 50 mg de ciclosporina, 0,5 g de acetato de butilo, 3,04 g de Tween 80:propilenglicol (1:1) y 6,8 g de agua. La microemulsión se evaporó para dar un líquido transparente que contenía 5 mg/ml de ciclosporina. En un experimento de control, realizado con los componentes anteriores mediante mezcla simple, pero sin acetato de etilo, incluso después de 17 h, la ciclosporina no se había disuelto.

Hay varias posibilidades para los tensioactivos, incluyendo posirobatos (Tween), ésteres de sorbitán (Span), ésteres de sacarosa, lecitina, monodiglicéridos, copolímeros de bloques de polietileno-polipropileno (pluronic), jabones (estearato sódico, etc.), sales biliares glicolato sódico, aceite de ricino etoxilado, estearoil-lactilato sódico, ácidos grasos etoxilados (myrj), alcoholes grasos etoxilados (Brij), dodecilsulfato sódico (SDS) y similares. Además, en general, se pueden usar biopolímeros tales como almidón, gelatina, derivados de celulosa, etc. Además, para aplicaciones orales, se pueden usar todos los tensioactivos de calidad alimentaria aceptables así como tensioactivos presentados en el *McCutcheon Handbook of Surfactants* o índice CTFA. Los codisolventes o cotensioactivos posibles para la microemulsión incluyen propilenglicol, etanol, glicerol, butanol, ácido oleico, y similares.

## 30 Ejemplo 28

## Preparación de nanopartículas de BHT

Se disuelven 110 mg de hidroxitolueno butilado (BHT) en 1 ml de tolueno, y se mezclan con 2 ml de una disolución de Triton X-100:propilenglicol 4:1. Se añadieron 32 g de disolución de caseína al 1%, y se formó espontáneamente una microemulsión. La microemulsión se evaporó a presión reducida, 80 mm de Hg, a 40°C, hasta hacerse transparente. El tamaño de las partículas resultantes es: tamaño medio Z 30 nm, el diámetro por distribución en volumen y número es 16 y 15 nm, respectivamente.

## Ejemplo 29

## Preparación de nanopartículas de BHT

Se llevó a cabo un procedimiento similar al descrito en el ejemplo 27, pero usando agua en lugar de disolución de caseína. Después de evaporación a 40°C, 80 mm de Hg, el sistema se volvió transparente, con un tamaño medio Z de ~10 nm.

## Ejemplo 30

## Preparación de nanopartículas de paclitaxel

Se disolvieron 30 mg de paclitaxel en 2 ml de acetato de butilo, y se añadieron 4 g de Triton X-100:propilenglicol 4:1. Se añadieron 40 ml de agua y el sistema era ligeramente turbio. Después de evaporación, el sistema se volvió completamente transparente. El tamaño medio Z era 6 nm, el tamaño por distribución en volumen y número era 7-9 nm. Se midió el mismo tamaño después de un día a 4°C.

## Ejemplo 31

## Identificación de diagramas de fases de microemulsiones

50 Se identificaron las composiciones que daban microemulsiones, y que se podían usar para obtener nanopartículas

por el método de evaporación del disolvente. Estas composiciones deben contener un disolvente miscible con el agua capaz de disolver moléculas hidrófobas, una disolución acuosa como medio continuo, tensioactivos y posiblemente cotensioactivos.

5 Las microemulsiones de acetato de butilo en agua se pueden formar con diferentes composiciones que se describen mediante diagramas de fases (el acetato de butilo se clasifica como disolvente con una concentración residual aceptable alta en el producto final). Además, tanto el tensioactivo como el cotensioactivo se usan en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas: Tween 80 (monooleato de sorbitán etoxilado) y propilenglicol. Se llevaron a cabo experimentos preliminares usando BHT como una molécula hidrófoba modelo, dando dispersiones de partículas en el intervalo de tamaños de 20-50 nm. Después de filtración a través de filtros de 0,2  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 100% del BHT pasaba la membrana.

10 Se obtuvieron diagramas de fases de diferentes combinaciones de tensioactivo/cotensioactivo mediante mezcla vortical del disolvente con una mezcla de tensioactivo/cotensioactivo (preparada antes de la mezcla con el disolvente, en diferentes proporciones), seguido de la adición de agua gota a gota. Se observó la turbidez de las diferentes composiciones junto con la "línea de agua", y las composiciones que daban sistemas translúcidos se analizaron además por difracción de luz. Usando diferentes proporciones de disolvente/tensioactivo/cotensioactivo, se identificaron las áreas en los diagramas de fases que daban microemulsiones (solamente un número pequeño de los componentes seleccionados daban microemulsiones). Se usó el mismo procedimiento para sistemas en los que se había disuelto BHT en acetato de butilo antes de realizar los experimentos de diagramas de fases.

15 La "filtrabilidad" de las microemulsiones y las nanopartículas que contienen el BHT se evaluó comparando los espectros de absorción de UV antes y después de filtración por 0,2  $\mu\text{m}$ . Las nanopartículas se obtuvieron por evaporación a vacío del acetato de butilo (60 mm de Hg, 40°C). Se debe entre remarcar que no se usó equipamiento de alta cizalladura durante todo el procedimiento.

20 Se identificaron los sistemas de microemulsiones que podían ser útiles para el suministro oral. Se eligió el acetato de n-butilo como disolvente. Se evaluaron los siguientes tensioactivos y cotensioactivos en diferentes proporciones:

Tween 80:Glicerol	5:1
Tween 80:Glicerol	4:1
Tween 80:Glicerol	3:1
Tween 80:Glicerol	2:1
Tween 80:Glicerol	1:1
Span 80:Glicerol	4:1
Span 80:Glicerol	3:1
Tween 80:Propilenglicol	4:1
Tween 80:Propilenglicol	3:1
Tween 80:Propilenglicol	2,5:1
Tween 80:Propilenglicol	1,5:1
Tween 80:Propilenglicol	1:1
Tween 80:Propilenglicol	1:2
((Tween 80 + Span 80) 7:1):Propilenglicol	3.5:1
((Tween 80 + Span 80) 7:1):Propilenglicol	1:1
((Tween 80 + Span 80) 8:1):Propilenglicol	4:1
((Tween 80 + Span 80) 5:1):Propilenglicol	1:1
Tween 80:((Propilenglicol + Glicerol) 1:1,2)	2:1

25 Se encontró que una composición adecuada era la siguiente: Tween 80 como tensioactivo y propilenglicol como cotensioactivo en una proporción 1:1. Se evaluó el diagrama de fases completo para el sistema de acetato de n-

butilo, Tween 80:propilenglicol 1:1, agua. Se ensayaron dos disolventes adicionales: acetato de sec-butilo y acetato de terc-butilo. Los diagramas de fases de estos sistemas eran los mismos que los que tenían acetato de n-butilo. Se evaluó adicionalmente el sistema de acetato de n-butilo, Tween 80:propilenglicol 1:1, agua.

5 Se llevó a cabo la medición del tamaño de partículas para la muestra de 7% de acetato de butilo, 30% de tensioactivo/PG, 63% de agua. Se encontró un tamaño medio Z de aproximadamente 20 nm. Se llevó a cabo el procedimiento de formación de nanopartículas para un colorante insoluble en agua, Sudan III, en una concentración de aproximadamente 10 mg en 1 g de acetato de butilo (5% de acetato de butilo, 23% de tensioactivo/PG, 72% de agua). Se encontró un tamaño de partículas de aproximadamente 17 nm. El procedimiento de formación de nanopartículas también se llevó a cabo para el BHT en una concentración de 100 mg en 1 g de acetato de butilo. Se determinó el diagrama de fases para este sistema. Se encontró un tamaño de partículas de aproximadamente 20-50 nm dependiendo de la composición.

15 Se llevaron a cabo experimentos de control con Sudan III y BHT. Se añadieron 14,4 g de agua a 10 mg de Sudan III y se añadieron 4,6 g de tensioactivo/PG a la mezcla. La muestra se agitó durante 24 h con un agitador magnético. Se observó la disolución de Sudan III. Sin embargo, cuando se llevó a cabo el mismo experimento con BHT (100 mg de BHT en 9 g de agua y 4,3 g de tensioactivo/PG) no se observó disolución del BHT. En esta etapa se llevó a cabo la evaporación (temperatura de 40°C, presión de aproximadamente 60 mm de Hg). La medición del tamaño de partículas para las muestras se realizó antes y después de la evaporación. Se encontró un tamaño medio Z de 20-50 nm y 30 nm para las muestras antes de evaporación y después de evaporación, respectivamente.

20 Las muestras después de evaporación se filtraron a través de filtros de 0,2 µm, y se midió la concentración de BHT antes y después de filtración por absorción UV. Se encontró que no había diferencias entre las dos muestras. Este resultado es, evidentemente, una indicación del tamaño muy pequeño de las nanopartículas de BHT.

25 Se prepararon dos muestras (composición de estas muestras: muestra nº 1; 4% de acetato de butilo; 14% de tensioactivo/PG, 80% de agua; muestra nº 2: BHT 123 mg/g en acetato de butilo; 5% de acetato de butilo, 18% de tensioactivo/PG; 77% de agua).

Ejemplo 32

Alternativas en la elección del equipamiento del procedimiento

El equipamiento del procedimiento usado para producir los lotes actuales se aumentará de escala para la fabricación clínica. Hay varias alternativas disponibles en la elección del equipamiento para mayor escala para la producción de Capxol™. Algunas de estas alternativas se listan a continuación.

Categoría del equipamiento	Opciones de equipamiento
Premezcladora	Mezcladora de palas, Mezcladora de rotor/estator
Equipamiento de alta presión	Homogeneizadores de alta presión (Avestin, Microfluidics, Stansted), aparatos de ultrasonidos (Heat Systems)
Equipamiento de separación de disolvente	Rotavapores, evaporadores de flujo continuo, evaporadores de capa delgada, evaporadores instantáneos, concentradores de recirculación, ultrafiltración
Equipamiento de deshidratación	Liofilizadores, secadores por atomización

30 Ejemplo 33

Sistemas de suministro intravenoso formulados a partir de una variedad de materiales

35 Los materiales usados para la preparación de sistemas de suministro intravenoso pueden ser poliméricos (p. ej., tubos de polietileno, polivinilo, polipropileno, y similares) o de vidrio. Se sabe que los tubos estándar de calidad médica contienen restos hidrófobos en sus superficies interiores. Por lo tanto, estos restos están disponibles para ponerse en contacto con la disolución para inyección. Realmente, dichos tubos se adaptan específicamente, tal como los catéteres, para presentar restos hidrófobos en contacto con la disolución de tratamiento para así reducir la absorción de material acuoso en el tubo. Sin embargo, cualquier resto hidrófobo en la disolución de tratamiento probablemente se unirá tanto al tubo del catéter como a otros componentes del sistema de suministro. Como resultado, una parte sustancial de un agente farmacológicamente activo hidrófobo puede quedar secuestrado en las paredes interiores del tubo del catéter y el recipiente de suministro. Por consiguiente, la dosificación de los agentes farmacológicamente activos hidrófobos puede ser irregular, puesto que una parte sustancial del agente activo puede quedar absorbida en las paredes de los tubos. En tratamientos terapéuticos críticos, cuando se usa el agente farmacológicamente activo hidrófobo para tratar una enfermedad, una reducción significativa de la dosis efectiva del agente activo puede conducir a un fracaso terapéutico. El fracaso es particularmente notable cuando se usan restos terapéuticos que requieren que el agente activo esté presente por encima de un determinado nivel, pero la ventana terapéutica es estrecha.

Ahora se ha desarrollado un nuevo método para la introducción intravenosa de un agente farmacológicamente activo hidrófobo. Mediante protección de los restos hidrófobos del agente activo, por asociación con los restos hidrófobos de un recubrimiento biocompatible (p. ej., albúmina), se reduce espectacularmente la tendencia del agente activo a quedar unido a los tubos. Por lo tanto, la presente invención permite usar fármacos muy hidrófobos, en combinación con polímeros estándar de calidad médica y vidrios hidrófobos, en los que el fármaco está protegido y por lo tanto no se absorbe sobre la superficie. El método de la invención comprende poner un recubrimiento protector de un polímero biocompatible (p. ej., albúmina) alrededor del fármaco hidrófobo y poner la composición resultante en un sistema de suministro polimérico hidrófobo. Por lo tanto, los métodos de la invención son capaces de mejorar el suministro de una variedad de agentes terapéuticos hidrófobos.

5

## 10 Ejemplo 34

Análisis por HPLC del paclitaxel

Sistema cromatográfico:

HPLC:	Sistema de suministro de disolvente Shimadzu LC-10AS Autoinyector Shimadzu SIL-10A Controlador de sistema Shimadzu SCL-10A Detector de matriz de diodos Shimadzu SPD-M10AV Horno de la columna Shimadzu CTO-10A
Columna:	Curosil-PFP, 5 µm, 4,6 mm × 25 cm, Phenomenex; o C-18
Fase móvil:	agua/acetonitrilo 65:45
Caudal:	isocrático, 1,0 ml/min
Detección:	228 nm

Identidad del principio activo (PI) paclitaxel

15

El PI paclitaxel y paclitaxel de referencia (99,9%, Hauser Chemical Research, Inc., Lote 1782-105-5) se disolvieron cuantitativamente en acetonitrilo y se inyectaron en el HPLC por separado. Se inyectaron 10 µl del PI paclitaxel 1,00 mg/ml y 10 µl de paclitaxel de referencia 2,07 mg/ml. El tiempo de retención del pico dominante del PI de paclitaxel se corresponde con el tiempo de retención del paclitaxel de referencia de Hauser.

Potencia del PI paclitaxel

20

El PI paclitaxel y paclitaxel de referencia se inyectaron en el HPLC como se ha descrito antes. La potencia del paclitaxel se obtuvo basándose en la relación de áreas de los picos del PI paclitaxel frente al paclitaxel de referencia y la potencia conocida del paclitaxel de referencia.

Perfil de impurezas del PI paclitaxel

25

El sistema cromatográfico descrito antes es capaz de proporcionar una alta resolución de taxanos. Se inyectó en el HPLC 10-20 µl de PI paclitaxel 1,0 mg/ml en acetonitrilo que está dentro del intervalo de respuesta lineal del sistema de HPLC de los autores de la invención. El perfil de impurezas se determinó por las áreas relativas de los picos.

Ensayo de potencia del paclitaxel en Capxol™

30

Se prepararon disoluciones de referencia (60, 100, 120, 140 and 160 µg/ml) por disolución cuantitativa del PI paclitaxel en HSA al 3%. Las muestras de Capxol™ se diluyeron en disolución salina hasta una concentración de paclitaxel de ~100 µg/ml. Se añadió a las disoluciones de referencia y de muestras de Capxol™ cefalomanina como referencia interna seguido de extracción en fase sólida o extracción en fase líquida (véase a continuación). Se inyectaron por separado volúmenes iguales (20-30 µl) de las preparaciones de referencia y las preparaciones de muestras de Capxol™ en el HPLC para medir la relación de los picos de respuesta entre el paclitaxel y la cefalomanina de referencia interna. Se generó una curva de calibración por la regresión por mínimos cuadrados habitual de los resultados de las inyecciones de referencia. La potencia del paclitaxel en el Capxol™ se determina comparando la relación de los picos de respuesta de las inyecciones de muestra con las inyecciones de referencia.

35

Perfil de impurezas del paclitaxel en el Capxol™

El Capxol™ se sometió a extracción en fase sólida o extracción en fase líquida (véase a continuación) antes de inyección en el HPLC. Se inyectaron 30 µl de paclitaxel ~1 mg/ml extraído de Capxol™ para investigar el perfil de impurezas como antes.

## Extracción en fase sólida

Se reconstituye una muestra de Capxol™ hasta aproximadamente 100 µg/ml en disolución salina. Se acondiciona una columna de extracción en fase sólida, Bond-Elut (C-18), con agua. La columna se carga con la muestra que se saca de la columna usando vacío. Después, la columna se lava con agua seguido de elución del paclitaxel con acetoneitrilo. El eluato que contiene el paclitaxel extraído en acetoneitrilo se inyecta en el HPLC.

## Extracción en fase líquida

Se reconstituye una muestra de Capxol™ hasta aproximadamente 100 µg/ml en disolución salina. A aproximadamente 200 µl de esta muestra se añaden 800 µl de acetoneitrilo. La mezcla se mezcla con vórtice durante 30 s y después se centrifuga a 3.000 g durante 5 min. Se separa el líquido sobrenadante y se recoge. El sedimento se vuelve a suspender en 200 µl de disolución salina y se repite la etapa de extracción. Se mezcla el segundo líquido sobrenadante con el primero. La mezcla extraída se concentra por evaporación seguido de inyección en el HPLC.

## Ejemplo 35

## Distribución del tamaño de partículas por espectroscopía de correlación fotónica (PCS)

La distribución del tamaño de partículas del Capxol™ reconstituido se analizó por espectroscopía de correlación fotónica (PCS) en un aparato Malvern Zetasizer, Malvern Instruments Ltd. El Zetasizer se calibró mediante referencias de tamaño Nanosphere™ rastreadas NIST, Duke Scientific Corporation. El procedimiento para medir el tamaño de partículas del Capxol™ en el aparato Malvern Zetasizer incluía el ajuste de los siguientes parámetros:

Temperatura: 20,70°C

Ángulo de difracción: 90°

Índice de refracción del dispersante: 1,33

Longitud de onda 633 nm

Visc. (auto): 0,99

Índice de refracción real: 1,59

Índice de refracción imaginario: 0

Después de preparar el Zetasizer, a continuación determinar la dilución de la muestra necesaria para una buena medición del tamaño a partir de las lecturas de kcts/s (para empezar, poner una parte alícuota de 200 µl de muestra en la cubeta y después diluir con aproximadamente 2 ml de agua destilada filtrada a través de un filtro de 0,22 µm). Poner la cubeta en el soporte de cubeta dentro del Zetasizer y empezar la medición. Una vez empezada la medición, aparecerá la pantalla de "Correlator Control". Del menú, elegir que presente el medidor de velocidad. La velocidad debe estar en el intervalo medio de 100-250 kcts/s. Si la velocidad es o bien demasiado alta o demasiado baja, preparar otra muestra con mayor o menor dilución respectivamente. Se analizó el tamaño del Capxol™ reconstituido, se hizo la media y se registró por análisis multimodal después de tres autoexperimentos. El tamaño medio de partículas era 155 nm ± 23 nm para 25 lotes de Capxol™.

## Ejemplo 36

## Cubiertas poliméricas como vehículos para construcciones de polinucleótidos, enzimas y vacunas

A medida que la terapia génica está más ampliamente aceptada como una opción terapéutica viable (en este momento, alrededor de 40 propuestas de transferencia de genes humanos han sido aprobadas por las comisiones de revisión de la NIH y/o FDA), una de las barreras que hay que superar en la implementación de este procedimiento terapéutico es la reticencia a usar vectores víricos para la incorporación de material genético en el genoma de una célula humana. Los virus son inherentemente tóxicos. Por lo tanto, los riesgos implicados en el uso de vectores de víricos en la terapia génica, en especial para el tratamiento de enfermedades no genéticas, no letales, son inaceptables. Desgraciadamente, los plásmidos transferidos sin el uso de un vector vírico normalmente no se incorporan en el genoma de la célula diana. Además, como los fármacos convencionales, estos plásmidos tienen una semivida finita en el cuerpo. Por lo tanto, una limitación general a la implementación de la terapia génica (así como la terapia antisentido, que es una forma inversa de la terapia génica, en la que se introduce un ácido nucleico u oligonucleótido para inhibir la expresión génica) ha sido la incapacidad de suministrar de forma eficaz ácidos nucleicos u oligonucleótidos que son demasiado grandes para penetrar las membranas celulares.

La encapsulación de ADN, ARN, plásmidos, oligonucleótidos, enzimas y similares, en cubiertas de microcápsulas de proteínas, como se describe en la presente memoria, puede facilitar su suministro dirigido al hígado, pulmón, bazo, linfa y médula ósea. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, dichos productos biológicos se pueden

5 suministrar en sitios intracelulares sin el riesgo relacionado asociado con el uso de vectores víricos. Este tipo de formulación facilita la absorción no específica o endocitosis de las cubiertas poliméricas directamente desde la circulación sanguínea a las células del SRE, a células musculares por inyección intramuscular, o por inyección directa en los tumores. Además, se pueden usar anticuerpos monoclonales contra de receptores nucleares para dirigir el producto encapsulado al núcleo de determinados tipos de células.

10 Las enfermedades en las que se pueden dirigir dichas construcciones incluyen diabetes, hepatitis, hemofilia, fibrosis quística, esclerosis múltiple, cánceres en general, gripe, SIDA, y similares. Por ejemplo, el gen para el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) se puede encapsular en cubiertas de proteína para el suministro para el tratamiento de la neuropatía periférica diabética y la caquexia. Los genes que codifican el factor IX y el factor VIII (útiles para el tratamiento de la hemofilia) se pueden dirigir al hígado por encapsulación en cubiertas de microcápsulas de proteína de la presente invención. Igualmente, el gen para el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL) se puede dirigir al hígado para el tratamiento de la aterosclerosis por encapsulación en cubiertas de microcápsulas de proteína de la presente invención.

15 Otros genes útiles en la práctica de la presente invención, son genes que reestiman la respuesta inmunitaria del cuerpo contra células de cáncer. Por ejemplo, se pueden incorporar antígenos tales como HLA-B7, codificados por ADN contenido en un plásmido, en una cubierta de proteína de la presente invención para la inyección directamente en un tumor (tal como un cáncer de piel). Una vez en e tumor, el antígeno reclutará las células específicas del tumor que elevan el nivel de citoquinas (p. ej., IL-2) que convierten al tumor en una diana para el ataque del sistema inmunitario.

20 Como otro ejemplo, los plásmidos que contienen partes del genoma del virus adenoasociados están contemplados para la encapsulación en cubiertas de microcápsulas de proteína de la presente invención. Además, las cubiertas de microcápsulas de proteína de la presente invención se pueden usar para suministrar genes terapéuticos a linfocitos T CD8+, para la inmunoterapia adoptiva frente a una variedad de tumores y enfermedades infecciosas.

25 Las cubiertas de proteína de la presente invención también se pueden usar como un sistema de suministro para combatir enfermedades infecciosas mediante el suministro dirigido de un nucleótido antisentido, por ejemplo, contra el virus de la hepatitis B. Un ejemplo de dicho oligonucleótido antisentido es un fosforotioato 21-mero contra la señal de poliadenilación del virus de la hepatitis B.

30 Las cubiertas de proteína de la presente invención también se pueden usar para suministrar el gen regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). Los seres humanos que carecen de este gen desarrollan fibrosis quística, que se puede tratar por nebulización de cubiertas de microcápsulas de proteína de la presente invención que contienen el gen CFTR, e inhalándolo directamente en los pulmones.

35 También se pueden suministrar enzimas usando las cubiertas de proteína de la presente invención. Por ejemplo, la enzima, DNAsa, se puede encapsular y suministrar al pulmón. Igualmente, se pueden encapsular ribozimas y dirigirlos a proteínas de la envuelta del virus o células infectadas por virus uniendo anticuerpos adecuados al exterior de la cubierta polimérica. También se pueden encapsular vacunas en microcápsulas poliméricas de la presente invención y usar para el suministro subcutáneo, intramuscular o intravenoso.

Ejemplo 37

Tratamiento localizado de tumores cerebrales y tumores dentro del peritoneo

40 El suministro local de agentes quimioterapéuticos en un tumor es un método eficaz para la exposición a largo plazo al fármaco mientras que se minimizan los efectos secundarios limitantes de la dosis. Los materiales biocompatibles discutidos antes también se pueden usar en varias formas físicas tales como geles (reticulados o no reticulados) para proporcionar matrices a partir de las cuales se puede liberar el principio farmacológicamente activo, por ejemplo paclitaxel, por difusión y/o degradación de la matriz. El Capxol™ se puede dispersar dentro de una matriz del material biocompatible para proporcionar una formulación de liberación sostenida de paclitaxel para el tratamiento de tumores cerebrales y tumores dentro de la cavidad peritoneal (cáncer de ovario y enfermedades metastásicas). También se pueden usar materiales sensibles a la temperatura como la matriz dispersante para la formulación de la invención.

45 Así por ejemplo, el Capxol™ se puede inyectar en una formulación líquida de los materiales sensibles a la temperatura (p. ej., copolímeros de poli(acrilamidas o copolímeros de polialquilenglicoles y polilactida/glicólidos, y similares), la cual gelifica en el sitio del tumor y proporciona la liberación lenta de Capxol™. La formulación de Capxol™ se puede dispersar en una matriz de los polímeros biocompatibles mencionados antes para proporcionar una formulación de liberación controlada de paclitaxel, que por las propiedades de la formulación de Capxol™ (albúmina asociada con paclitaxel) da como resultado una menor toxicidad en el tejido cerebral así como una menor toxicidad sistémica como se ha discutido antes. Esta combinación de Capxol, u otros agentes quimioterapéuticos formulados similares al Capxol™, junto con una matriz de polímero biocompatible, puede ser útil para el suministro local controlado de agentes quimioterapéuticos para tratar tumores sólidos en el cerebro y peritoneo (cáncer de ovario) y en aplicaciones locales distintas de los tumores sólidos. Estas formulaciones de combinación no están limitadas al uso de paclitaxel y se pueden usar con una amplia variedad de principios farmacológicamente activos

incluyendo antiinfecciosos, inmunosupresores y otros agentes quimioterapéuticos, y similares.

#### Ejemplo 38

Estabilidad de Capxol™ después de reconstitución

5 El Capxol™ liofilizado en viales de vidrio se reconstituyó con disolución salina normal estéril a concentraciones de 1, 5, 10 y 15 mg/ml y se almacenó a temperatura ambiente y condiciones refrigeradas. Se encontró que las suspensiones eran homogéneas durante al menos 3 días en estas condiciones. Las mediciones del tamaño de partículas realizadas en diferentes tiempos de medición indicaban que no había cambio en la distribución de tamaños. No se observó precipitación en estas condiciones. Esta estabilidad es inesperada y supera los problemas asociados con el taxol®, que precipita en las siguientes aproximadamente 24 h después de la reconstitución en las concentraciones recomendadas de 0,6-1,2 mg/ml.

10 Además, el Capxol™ reconstituido era estable en presencia de diferentes materiales de tubos poliméricos tales como teflón, Silastic, polietileno, Tygon, y otros materiales de tubos de infusión convencionales. Esto es una ventaja importante frente al Taxol® que está limitado a conjuntos de infusión de polietileno y botellas de infusión de vidrio.

#### Ejemplo 39

15 Formas farmacéuticas unitarias para el Capxol™

20 Capxol™ se prepara como un polvo liofilizado en viales de tamaño adecuado. Por lo tanto se puede cargar una dosificación deseada en un recipiente adecuado y liofilizarla para obtener un polvo que contiene esencialmente albúmina y paclitaxel en la cantidad deseada. Dichos recipientes después se reconstituyen con disolución salina normal estéril u otro diluyente acuoso hasta el volumen adecuado en el momento de uso para obtener una suspensión homogénea de paclitaxel en el diluyente. Esta disolución reconstituida se puede administrar directamente a un paciente por inyección o infusión con conjuntos de infusión i.v. convencionales.

Además, el Capxol™ se puede preparar como una disolución lista para usar congelada en botellas o bolsas que se descongelarán en el momento de usar y simplemente se administrarán al paciente. Esto evita la etapa de liofilización en el procedimiento de fabricación.

25 Es muy sorprendente que cuando se administra Capxol™ y Taxol® a ratas con dosis equivalentes de paclitaxel, resulta un grado de mielosupresión mucho mayor para el grupo de Taxol® comparado con el grupo de Capxol™. Esto puede dar como resultado menores incidencias de infecciones y episodios de fiebre (por ejemplo, neutropenia febril). También puede reducir el tiempo del ciclo entre tratamientos que actualmente es de 21 días. Con el uso de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, este tiempo de ciclo se puede reducir a 2

30 semanas o menos, permitiendo un tratamiento más eficaz para el cáncer. Por lo tanto, el uso de composiciones farmacéuticas preparadas de acuerdo con la presente invención puede proporcionar una ventaja sustancial frente al Taxol®.

#### Ejemplo 40

Suministro oral de fármacos

35 El taxol® es muy poco absorbido por la vía oral. Las formulaciones en partículas tales como Capxol™ pueden potenciar mucho la absorción de fármacos tales como el paclitaxel. Además, las formulaciones de paclitaxel de la invención preparadas por el procedimiento de microemulsión/evaporación son útiles para la absorción oral de fármacos. El uso de tensioactivos en combinación con estas formulaciones potencia sorprendentemente la biodisponibilidad oral de estos fármacos. Se encontró sorprendentemente que el uso de lípidos, tensioactivos,

40 inhibidores enzimáticos, potenciadores de la penetración, agentes de emparejamiento iónico, inhibidores del metabolismo y similares, aumentaba la absorción oral de las formulaciones de paclitaxel de la invención. Los ejemplos de agentes de emparejamiento iónico incluyen, pero sin limitar, tioracetato, tricloroacetato salicilato, ácido naftalenosulfónico, glicina, carbonato de bis-N,N-dibutilaminoetileno, n-alkilsulfonatos y sulfatos de n-alkilo. Los ejemplos de potenciadores de penetración de la membrana incluyen, pero no se limitan a, caprato sódico,

45 acilglicéridos, éter de alkilo y polioxietileno, sacil-carnitinas, colato sódico, taurocolato sódico, taurodihidrofusidato sódico, EDTA, salicilato sódico y metoxisalicilato sódico. En la presente memoria se ha descrito una lista no limitante de tensioactivos y lípidos que se pueden usar para las formulaciones de la invención.

#### Ejemplo 41

Modo de administración de Capxol™ y la formulación de la invención de otros fármacos

50 Las formulaciones de la invención se pueden administrar por infusión intravenosa, bolo intravenoso, inyección intraperitoneal, inyección intraarterial, inyección intraportal, embolización hepática, inyección o implante intratumoral, inyección o iontoforesis intrauretral, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intratecal, inhalación de polvo seco o líquido nebulizado, y similares.

## Ejemplo 42

Uso de Capxol™ dirigido a la vasculatura angiogénica

La angiogénesis se ha implicado como factor causante y/o exacerbante en el avance de enfermedades tales como el cáncer, artritis reumatoide y retinopatía. Los autores de la invención han encontrado sorprendentemente que el Capxol™ invierte o reduce la gravedad de la artritis reumatoide y también cura tumores en modelos animales. Por lo tanto es posible que el Capxol™ tenga actividad antiangiogénica. Para hacer el Capxol™ incluso más eficaz, se puede dirigir a la vasculatura angiogénica uniendo péptidos adecuados al Capxol™. Un ejemplo de dicho péptido es RGD (arginina-glicina-ácido aspártico). Se pueden unir otros muchos péptidos con actividad similar al Capxol™, u otros fármacos preparados por el procedimiento de la invención, para la terapia dirigida. El péptido/Capxol™ se puede administrar por medios convencionales a pacientes que lo necesiten.

## Ejemplo 43

Uso de Capxol™ para el tratamiento de la enfermedad hepática

El carcinoma hepatocelular en fase terminal y otros cánceres del hígado se pueden tratar por administración de Capxol™ por vía intraportal. La embolización directa en el hígado potencia mucho que la dosis alcance el hígado. Además, se pueden usar dosis mucho mayores que las del Taxol® convencional para tratar la enfermedad de forma más eficaz. Además, se pueden combinar agentes directores adecuados tales como proteínas o péptidos que localizan el tejido hepático, con el Capxol™ para una mayor eficacia terapéutica.

## Ejemplo 44

Estudio de toxicidad/mielosupresión de paclitaxel - comparación de Taxol® y Capxol™ para el estudio de la administración de dosis única en ratas

A continuación se presenta un resumen de un estudio preclínico:

Esquema:	1X, infusión de dosis intravenosa única (día 1)
Animales:	ratas Sprague Dawley, 40 machos, 40 hembras, 5 ratas/sexo por grupo
Peso:	300 ± 5 g
Duración del estudio:	15 días
Grupos de tratamiento:	Taxol® (1 vehículo + 3 grupos tratados) Capxol™ (1 vehículo + 3 grupos tratados)
Dosis:	Taxol® (0, 3, 6, y 9 mg/kg) Capxol™ (0, 6, 9, y 12 mg/kg)
Concentración de la dosis:	0,6 mg/ml (todas las ratas)
Volumen de la dosis:	Taxol® (15, 5, 10, 15 ml/kg) Capxol™ (20, 10, 15, y 20 ml/kg)
Velocidad de infusión:	aproximadamente 0,75 ml/h (todas las ratas)
Ruta de la dosis:	infusión I.V., vena de la cola
Observación clínica:	1X/día
Patología clínica:	Días 0 (antes de tratamiento), 1, 3, 7, 15. Hacer lista estándar para la rama toxicológica de NCI
Pesos corporales:	días -1, 1, 3, 8 y 15

(\*el vehículo se prepara por un procedimiento idéntico descrito en la sección de fabricación, con la excepción de que se omite la adición de paclitaxel).

## Ejemplo 45

Estudio piloto de mielosupresión (toxicidad hematológica)

Antes de iniciar el estudio formal, se llevó a cabo un estudio piloto con 3 ratas en el grupo de Capxol™ y 3 ratas en el grupo de Taxol® para determinar los resultados. La dosis usada era 5 mg/kg con un volumen de dosificación de 7 ml/kg. La dosis se dio como un bolo intravenoso a través de la vena de la cola. Los resultados de este estudio se resumen en la gráfica (véase la figura 3) que muestra el porcentaje de cambio en los recuentos de WBC (un indicador de mielosupresión) para cada formulación en función del tiempo.

Conclusiones del estudio piloto de mielosupresión



Los datos muestran recuentos de WBC significativamente menores (media + DT) en el grupo de Taxol® comparado con el grupo de Capxol™, que indica un mayor grado de mielosupresión para el Taxol® (supresión máxima de WBC >70% para el Taxol®; supresión máxima de WBC >30% para Capxol™). El análisis de los datos muestra una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre los dos grupos para todos los tiempos de medición excepto para el día 0, 13 y 14. Además, se recuperan niveles normales de WBC en 6 días en el grupo que recibe Capxol™, mientras que son necesarios 14 días para recuperar los niveles normales de WBC en el grupo de Taxol®. Esto indica una toxicidad hematológica significativamente reducida para el Capxol™. Si se observan resultados similares en ensayos clínicos humanos, estos datos pueden sugerir que el tiempo del ciclo (actualmente 3 semanas para el Taxol®) entre ciclos posteriores de tratamiento se podría reducir significativamente (posiblemente a 2 semanas, o incluso 1 semana o menos, cuando se use Capxol™).

#### Ejemplo 46

##### Estudio piloto de la eficacia antitumoral

Antes de iniciar el estudio anterior, se llevó a cabo un estudio piloto con Capxol™ para determinar los intervalos de dosis y eficacia objetivos. Se implanto en los ratones ( $n=10$ ) por vía subcutánea el tumor mamario MX-1 y el tratamiento se inició cuando el tumor alcanzó aproximadamente 150-300 mg de tamaño. Esto ocurría sobre el día 12 y el tratamiento se inició el día 13 después de la siembra inicial. El Capxol™ se reconstituyó en disolución salina para obtener una disolución coloidal de nanopartículas de paclitaxel. Los ratones que llevaban tumores ( $n=5$ ) se trataron con Capxol™ reconstituido con una dosis de 20 mg/kg (indicado por VIV-1), dado por inyección de bolo en la vena de la cola cada día durante 5 días consecutivos. El grupo de control que llevaba tumor ( $n=5$ ) recibió solo disolución salina con el mismo esquema. Se controló el tamaño de los tumores en función del tiempo. El grupo de control mostró un aumento enorme del peso tumoral hasta una mediana de más de 4500 mg y todos los animales en este grupo se sacrificaron entre el día 28 y el día 39. Por otra parte, el grupo de tratamiento mostró una eficacia notable y todos los animales tenían tumores no medibles sobre el día 25. Los animales en este grupo se sacrificaron todos el día 39, momento en el que no mostraron pruebas de recaída ni pruebas de tumor. Los resultados se muestran en la figura 4.

#### Conclusión:

Este estudio mostraba una actividad antitumoral notable del Capxol™. Por lo tanto, la actividad antitumoral del paclitaxel se conserva en la formulación de Capxol™. Este estudio indica que la administración intravenosa de nanopartículas de paclitaxel puede ser tan eficaz como la administración del fármaco en forma soluble. Por lo tanto, el Capxol™ muestra eficacia y una potente actividad antitumoral sin los efectos tóxicos observados en la formulación de Taxol® que contiene cremaphor aprobada y comercializada.

Nota: basándose en los datos de la bibliografía y en la experiencia de los científicos del SRI (Southern Research Institute), se ha establecido que la dosis máxima tolerada (DMT) del paclitaxel disuelto en el diluyente 12 (cremaphor/etanol, que es el mismo diluyente usado en el Taxol®) es 22,5 mg/kg para esta raza particular de ratones atómicos. Este resultado se obtiene disolviendo el paclitaxel a una concentración mucho mayor en el diluyente 12 comparado con el Taxol® (6 mg/ml en cremaphor/etanol). Esto se hace para minimizar la cantidad de cremaphor/etanol administrada a los ratones para evitar la toxicidad del vehículo. Con una dosis de 22,5 mg/kg, el paclitaxel en el diluyente 12 tiene una eficacia similar a la del Capxol™ anterior.

#### Ejemplo 47

##### Tratamiento de la artritis reumatoide en un modelo animal con nanopartículas de paclitaxel

El modelo de artritis inducida por colágeno en la rata de Louvian se usó para ensayar el efecto terapéutico de las nanopartículas de paclitaxel en la artritis. Se controló el tamaño de las patas de los animales experimentales para evaluar la gravedad de la artritis.

Después de desarrollarse completamente la artritis (normalmente ~9-10 días después de la inyección de colágeno), los animales experimentales se dividieron en grupos diferentes para recibir nanopartículas de paclitaxel 1 mg/kg una vez al día o nanopartículas de paclitaxel 0,5 mg/kg + prednisona 0,2 mg/kg dos veces al día (tratamiento de combinación) por vía intraperitoneal, durante 6 dosis, y después una dosis por semana durante 3 semanas. Los tamaños de las patas se midieron al principio del tratamiento (día 0) y cada vez que se inyectó el fármaco. Un grupo recibió solo disolución salina normal como control. Al final del experimento, el grupo que recibió nanopartículas de paclitaxel logró una reducción de 42% del tamaño de la pata, el grupo del tratamiento de combinación mostró una reducción de 33% del tamaño de la pata, mientras que el grupo de control tenía un aumento de aproximadamente 20% del tamaño de la pata. El tamaño de la pata original antes de inducir la artritis era 50%. Los resultados se muestran en la figura 2.

En conclusión, las nanopartículas que contenían paclitaxel demostraron efecto terapéutico en la artritis. Para evitar los efectos secundarios del uso a largo plazo tanto de paclitaxel como del esteroide, probablemente es mejor elegir un tratamiento de combinación para lograr un efecto similar pero con sólo la mitad de la dosificación de cada

fármaco.

#### Ejemplo 48

##### Efecto del Capxol™ en la reestenosis arterial

5 La proliferación de músculo liso vascular anormal (VSMP) está asociada con trastornos cardiovasculares tales como la aterosclerosis, hipertensión y la mayoría de los procedimientos endovasculares. La VSMP anormal es una complicación común de la angioplastia coronaria transluminal percutánea (PCTA). Se ha descrito que la incidencia de la reestenosis crónica que resulta de la VSMP después de PTCA es tan alta como 40-50% en los siguientes 3-6 meses.

10 La alta incidencia de la reoclusión vascular asociada con la PTCA ha conducido al desarrollo del modelo animal y vivo de reestenosis y a la búsqueda de agentes para prevenirla. El siguiente estudio describe el uso de Capxol™ en la inhibición de la reestenosis después de traumatismo de la íntima de la arteria.

15 Se anestesian ratas Sprague-Dawley macho (Charles River) que pesan 350-400 g con ketamina y Rompun y la arteria carótida común derecha se expone para una distancia de 3,0 cm. El tejido adherente se limpia para permitir poner dos micropinzas Bulldog de Dietrich separadas aproximadamente 2 cm alrededor de la carótida sin causar lesión por aplastamiento del nervio vago o ganglio cervical superior asociado y cadena simpática. No hay ramificaciones presentes a lo largo de este segmento del vaso. Se inserta primero una aguja de calibre 30 unida a una llave de 3 vías y después se tira del extremo inferior del segmento aislado para hacer un agujero en la pared del vaso, y después se inserta en el extremo superior para la inyección. Se inyectan 2-3 ml de disolución salina tamponada con fosfato para lavar toda la sangre dentro del segmento aislado y después la llave de 3 vías se gira a otra conexión a una fuente regulada de aire comprimido. Se pasa una corriente de aire suave (25 ml por minuto) a lo largo del lumen del vaso durante 3 min para producir lesión por secado del endotelio. Después el segmento se vuelve a llenar con disolución salina antes de retirar la aguja del vaso. Antes de retirar las pinzas, los agujeros de la aguja en la pared del vaso se cauterizan con cuidado para prevenir el sangrado. También se puede usar un algodón humedecido con disolución salina para presionar en los agujeros de la aguja para parar la hemorragia. La piel se cierra con grapas metálicas de 7,5 mm y se lava con Betadine.

25 Todos los animales recibieron la cirugía descrita antes y se sacrificaron el día 14 después de la cirugía. Se recogió la arteria carótida de cada lado para el examen patológico. El lado no operado servirá como control. Los grupos experimentales recibieron tratamiento diferente como sigue:

Grupo 1: Tratamiento con dosis alta de Capxol™: paclitaxel 5 mg (p/100 mg de albúmina humana)/kg/semana, IV.

30 Grupo 2: Tratamiento con dosis baja de Capxol™: paclitaxel 1 mg (p/20 mg de albúmina humana)/kg/semana, IV.

Grupo 3: Control de vehículo del fármaco: 100 mg de albúmina humana/kg/semana, IV.

Las muestras de las biopsias de las arterias carótidas se conservan en formalina y después se cortan secciones transversales (8 µm) de los bloques de parafina y se tiñen con hematoxilina y eosina. Se cuantifican las áreas de las secciones transversales de las capas de vasos sanguíneos (íntima, media y adventicia).

35 Las arterias carótidas lesionadas en el grupo de control mostraron una acumulación notable de células de músculo liso de la íntima e invasión de VSCM de la membrana basal. El grosor total de la pared de la arteria carótida se ha duplicado. Los grupos de tratamiento mostraron una disminución estadísticamente significativa en el grosor de la pared de la íntima comparado con el control.

#### Ejemplo 49

##### 40 Nanopartículas dirigidas in vivo

Por incorporación de determinados restos directores tales como proteínas, anticuerpos, enzimas, péptidos, oligonucleótidos, azúcares, polisacáridos, y similares, en el recubrimiento de proteína de las nanopartículas, se puede dirigir a sitios específicos en el cuerpo. Esta capacidad de dirección se puede usar para propósitos terapéuticos o de diagnóstico.

##### 45 Ejemplo 50

##### Anticuerpo dirigido de cubiertas poliméricas

50 La naturaleza de las cubiertas poliméricas de determinados aspectos de la invención permite la unión de anticuerpos monoclonales o policlonales a la cubierta polimérica, o una incorporación de anticuerpos dentro de la cubierta polimérica. Los anticuerpos se pueden incorporar en la cubierta polimérica cuando se forma una cubierta polimérica de microcápsulas, o los anticuerpos se pueden unir a la cubierta polimérica después de la preparación de la misma. Se pueden usar técnicas convencionales de inmovilización de proteínas para este propósito. Por ejemplo, con microcápsulas de proteína preparadas a partir de una proteína tal como la albúmina, hay un gran número de grupos

amino en los restos de lisina de la albúmina disponibles para la unión de anticuerpos modificados de forma adecuada. Como ejemplo, se pueden suministrar agentes antitumorales a un tumor por incorporación de anticuerpos contra el tumor dentro de la cubierta polimérica cuando ésta se forma, o se pueden unir anticuerpos contra el tumor a la cubierta polimérica después de preparación de la misma. Como otro ejemplo, se pueden suministrar productos génicos a células específicas (p. ej., hepatocitos o determinados mastocitos en la médula ósea) por incorporación de anticuerpos contra receptores en las células diana, dentro de la cubierta polimérica cuando ésta se forma, o se pueden unir anticuerpos contra receptores en las células diana a la cubierta polimérica después de preparación de la misma. Además, se pueden usar anticuerpos monoclonales contra receptores nucleares para dirigir el producto encapsulado al núcleo de determinados tipos de células.

#### 10 Ejemplo 51

Agentes inmunosupresores dirigidos a órganos trasplantados usando suministro intravenoso de cubiertas poliméricas que contienen dichos agentes

Los agentes inmunosupresores se usan ampliamente después del trasplante de órgano para prevenir episodios de rechazo. En particular, la ciclosporina, un potente agente inmunosupresor, prolonga la supervivencia de trasplantes alogénicos que implican piel, corazón, riñón, páncreas, médula ósea, intestino delgado, y pulmón en animales. Se ha demostrado que la ciclosporina suprime algo de inmunidad humoral y en gran medida, reacciones mediadas por células tales como rechazo de aloinjerto, hipersensibilidad retardada, encefalomiелitis alérgica experimental, artritis inducida por adyuvante de Freund, enfermedad de injerto contra huésped en muchas especies animales para una variedad de órganos. Se han realizado trasplantes alogénicos de riñón, hígado y corazón con éxito en seres humanos usando ciclosporina.

La ciclosporina habitualmente es suministrada en forma oral como cápsulas que contienen una disolución de ciclosporina en alcohol, y aceites tales como aceite de maíz, glicéridos polioxietilados y similares, o como una disolución en aceite de oliva, glicéridos polioxietilados y similares. También se administra por inyección intravenosa, en cuyo caso se disuelve en una disolución de etanol (aproximadamente al 30%) y cremaphor (aceite de ricino polioxietilado) que se debe diluir de 1:20 a 1:100 en disolución salina normal o dextrosa al 5% antes de inyección. Comparado con una infusión intravenosa (i.v.) la biodisponibilidad absoluta de la disolución oral es aproximadamente 30% (Sandoz Pharmaceutical Corporation, Publication SDI-Z10 (A4), 1990). En general, el suministro i.v. de ciclosporina tienen problemas similares a los que se encuentran actualmente en el suministro i.v. de Taxol®, es decir, reacciones anafilácticas y alérgicas que se cree que son debidas al cremaphor, el vehículo de suministro usado para la formulación i.v. Además, el suministro intravenoso del fármaco (p. ej., ciclosporina) encapsulado como se describe aquí, evita los peligrosos niveles en sangre máximos inmediatamente después de la administración del fármaco. Por ejemplo, una comparación de las formulaciones actualmente disponibles para la ciclosporina con la forma encapsulada descrita antes de ciclosporina, mostró una disminución de 5 veces de los niveles en sangre máximos de ciclosporina inmediatamente después de inyección.

Con el fin de evitar problemas asociados con el cremaphor, la ciclosporina contenida en cubiertas poliméricas como se han descrito antes, se puede suministrar por inyección i.v. Se puede disolver en un aceite biocompatible o una serie de otros disolventes, después de lo cual se puede dispersar en las cubiertas poliméricas por ultrasonidos como se ha descrito antes. Además, una ventaja importante de suministrar la ciclosporina (u otro agente inmunosupresor) en cubiertas poliméricas es que se dirigen localmente debido a la absorción del material inyectado por el sistema SRE en el hígado. Esto, en cierta medida, puede evitar la toxicidad sistémica y reducir las dosificaciones efectivas debido a la dirección local.

#### Ejemplo 52

Uso de Capxol™ para anticuerpos dirigidos

Se pueden unir anticuerpos monoclonales contra diferentes tumores o tejidos al Capxol™ para permitir dirigir el Capxol™ u otros fármacos preparados por el procedimiento de la invención a los sitios de la enfermedad. Por ejemplo, los anticuerpos contra el cáncer de ovario unidos al Capxol™ y administrados por vía intraperitoneal tendrían un gran beneficio para los pacientes de cáncer de ovario.

#### Ejemplo 53

Administración intravenosa de agentes terapéuticos

La administración intravenosa de agentes terapéuticos, por ejemplo, fármacos, agentes de generación de imágenes, y similares, predispone al agente terapéutico a al menos un paso a través del hígado. Puesto que el agente terapéutico es filtrado a través del hígado, una parte significativa de este agente terapéutico es absorbida y secuestrada por el hígado, y por lo tanto, no está disponible para la distribución sistémica. Además, una vez absorbido por el hígado, es probable que sea metabolizado, y los subproductos metabólicos resultantes a menudo tienen toxicidades sistémicas generales. Mediante la encapsulación del fármaco u otro agente terapéutico en un recubrimiento de acuerdo con la invención (p. ej., usando una proteína tal como albúmina), se alivia el secuestro por el hígado tras la administración intravenosa. Se sabe que la albúmina, por ejemplo, pasa a través del hígado y se

distribuye en general por todo el paciente. Por lo tanto, no se produce el secuestro de la albúmina por el hígado en la misma medida que los compuestos tóxicos o fármacos que tienen receptores hepáticos (u otros mecanismos) que inician procesos que dan como resultado su eliminación de la circulación sanguínea. Mediante la protección del agente terapéutico con un recubrimiento de un polímero biocompatible (p. ej., un recubrimiento de albúmina humana), el fármaco evita el hígado y en general se distribuye por todos los sistemas de órganos. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método nuevo para evitar el hígado, que comprende encapsular un fármaco en una albúmina de hígado humano (esencialmente un componente fisiológico). De esta forma, la mayor parte del fármaco está disponible para la terapia sistémica. Además de la mayor disponibilidad del fármaco, hay una disminución en la producción de subproductos metabólicos de la degradación hepatocelular del fármaco. Tanto el aumento de evitar el hígado como la disminución de los subproductos del metabolismo del fármaco proporcionan una mejora sinérgica en la eficacia general del fármaco. Esta eficacia mejorada se extiende a todos los fármacos y materiales que son encapsulados en albúmina humana.

#### Ejemplo 54

Reducción de los efectos de mielosupresión (toxicidad hematológica) y toxicidad general de fármacos

Varios fármacos quimioterapéuticos tienen toxicidad limitante de la dosis debido a efectos mielosupresores. El Taxol® (paclitaxel) es un ejemplo clásico de dicho fármaco. Cuando se administra en su formulación actualmente aprobada de cremaphor/etanol, el Taxol® produce efectos de mielosupresión que limitan la administración repetida del fármaco e impiden la repetición del tratamiento de un paciente durante al menos 3 semanas, con el fin de dejar que los recuentos sanguíneos del paciente vuelvan a la normalidad. Se ha postulado que debido a la naturaleza biocompatible no tóxica del vehículo del fármaco de determinados aspectos de la presente invención, en concreto la albúmina humana, se pueden reducir muchos los efectos secundarios tóxicos de la mielosupresión.

Se dio paclitaxel a ratas Sprague Dawley en formulación comercial (Taxol®) o preparado por un método de la invención como nanopartículas con albúmina. Ambas formulaciones se administraron por inyección en la vena de la cola. Se administró un nivel de dosis única de 5 mg/kg para el Taxol®, mientras que se administraron dos niveles de dosis de 5 mg/kg y 12 mg/kg para la formulación de la invención. Se controlaron los recuentos de glóbulos blancos de las ratas diariamente después de administración como índice de la mielosupresión.

Para el Taxol® (5 mg/kg) se encontró que los recuentos de WBC disminuían en 47,6% y 63,5% el día 1 y el día 2 después de administración, respectivamente, mientras que para la formulación de la invención de 5 mg/kg, los recuentos de WBC aumentaron en 14,7% y 2,4% el día 1 y día 2, respectivamente. Par la formulación de la invención de dosis mayor de 12 mg/kg, los recuentos de WBC aumentaron en 6,5% y 3,6% el día 1 y día 2, respectivamente.

Estos resultados indican que la mielosupresión a corto plazo se reduce mucho administrando el fármaco en la formulación de la presente invención.

Otro indicador de la toxicidad general es el peso corporal del animal. También se controlaron los pesos corporales de las ratas después de administración de paclitaxel. Con una dosis de 5 mg/kg, el Taxol® produjo una reducción del peso corporal de 10,4% en 3 días después de la administración, mientras que la misma dosis de paclitaxel administrada en la formulación de la invención produjo una disminución de solo 3,9% del peso corporal, indicando la toxicidad muy reducida de la formulación de la invención.

Es muy sorprendente que cuando la formulación de la invención y el Taxol® se administran a ratas con dosis equivalentes de paclitaxel, se produce un grado de mielosupresión mucho mayor para el grupo de Taxol® comparado con el grupo de la formulación de la invención. Esto puede dar como resultado menores incidencias de infecciones y episodios de fiebre (p. ej., neutropenia febril). También puede reducir el tiempo del ciclo entre los tratamientos que actualmente es de 21 días para el Taxol®. Con el uso de las composiciones farmacéuticas preparadas de acuerdo con la presente invención, este tiempo de ciclo se puede reducir a 2 semanas, 1 semana o menos, permitiendo un tratamiento más eficaz del cáncer. Por lo tanto, el uso de las composiciones farmacéuticas preparadas de acuerdo con la presente invención, puede proporcionar ventajas sustanciales frente al Taxol®.

#### Ejemplo 55

Administración de dosis de bolo de la formulación de nanopartículas

El fármaco anticancerígeno, paclitaxel, en su formulación comercial de BMS con cremaphor/etanol, no se puede administrar como un bolo intravenoso. Esto se debe a la amplia toxicidad del vehículo que produce graves reacciones anafilácticas y requiere que los pacientes que reciben el fármaco sean medicados previamente con esteroides, antihistaminas y similares. La formulación de Taxol® se administra como una infusión intravenosa que dura, en cualquier parte, de 1 h a 24 h. En cambio, las formulaciones de acuerdo con la presente invención, debido al uso de un vehículo no tóxico, se pueden administrar a un paciente fácilmente como un bolo intravenosa (es decir, en un periodo inferior a 1 h) sin los problemas de toxicidad observados en el Taxol® que se usa actualmente en clínica.

La dosis eficaz de paclitaxel para un paciente típicamente está entre 200-500 mg, dependiendo del peso corporal del paciente o de la superficie corporal. El Taxol® debe administrarse con una concentración final de la dosificación de 0,6 mg/ml, que requiere volúmenes de infusión grandes (típicamente en el intervalo de aproximadamente 300-1000 ml). En cambio, las formulaciones de la invención no tienen estas limitaciones y se pueden administrar con la concentración deseada. Esto permite a los médicos tratar a los pacientes mediante un bolo intravenoso rápido que se puede administrar en tan poco como unos minutos. Por ejemplo, si la formulación de la invención se reconstituye a una concentración de dosificación de 20 mg/ml, el volumen de infusión para una dosis total de 200-500 mg es solo 10-15 ml, respectivamente. Esto es una gran ventaja en la práctica clínica.

Ejemplo 56

10 Reducción de la toxicidad del paclitaxel en la formulación de nanopartículas comparada con el Taxol®

Es bien sabido que el fármaco anticancerígeno paclitaxel, en su formulación comercial (es decir, Taxol®), tiene una extensa toxicidad que produce graves reacciones anafilácticas y requiere que los pacientes que reciben el fármaco sean medicados previamente con esteroides, antihistaminas y similares. La toxicidad del Taxol® se comparó con la formulación de nanopartículas de la presente invención.

15 Por lo tanto, la formulación se inyectó por vía intravenosa a través de la vena de la cola a ratones C57BL con diferentes niveles de dosis y se controlaron los efectos tóxicos por observación general de los ratones después de inyección.

20 Para el Taxol® una dosis de 30 mg/kg era uniformemente letal en los siguientes 5 min de la administración intravenosa. Para la misma dosis, la formulación de nanopartículas de acuerdo con la invención no mostró efectos tóxicos aparentes. La formulación de nanopartículas con una dosis de 103 mg/kg mostró algo de reducción del peso corporal de los ratones, pero incluso esta dosis alta no era letal. Las dosis de aproximadamente 1000 mg/kg, 800 mg/kg y 550 mg/kg eran todas letales pero difería el tiempo hasta la letalidad, que estaba en el intervalo entre unas horas y 24 h. Por lo tanto, la dosis letal de la formulación intravenosa es mayor de 103 mg/kg pero menor de 550 mg/kg.

25 Por lo tanto está claro que la dosis letal de la formulación de la invención de paclitaxel es sustancialmente mayor que la de Taxol®. Esto tiene una gran importancia en la práctica clínica donde se pueden administrar dosis más altas de fármacos quimioterapéuticos para una actividad oncolítica más eficaz con una toxicidad muy reducida.

Ejemplo 57

30 Determinación de la DL<sub>50</sub> en ratones para el Taxol® producido por los métodos de la invención y el Taxol después de una administración intravenosa única

35 Se comparó la DL<sub>50</sub> del Capxol™, Taxol® y sus vehículos, después de una administración intravenosa única. Se usaron un total de 48 ratones CD1. Se ensayaron dosis de paclitaxel de 30, 103, 367, 548, y 822 mg/kg para el Capxol™, y dosis de paclitaxel de 4, 6, 9, 13,4, y 20,1 mg/kg para Taxol®. La dosis para la albúmina humana, el vehículo para Capxol™, solo se ensayó con 4,94 g/kg (corresponde a una dosis de 548 mg/ml de Capxol™) porque la albúmina humana no se considera tóxica para seres humanos. Las dosis ensayadas para el vehículo de Taxol® (Cremophor EL®) eran 1,5, 1,9, 2,8 y 3,4 ml/kg que corresponden a dosis de paclitaxel de 9, 11,3, 16,6 y 20,1 mg/kg, respectivamente. Se administró cada concentración de 3 a 4 ratones. Los resultados indicaban que el paclitaxel administrado en el Capxol™ es menos tóxico que el Taxol® o el vehículo de Taxol® administrado solo. La DL<sub>50</sub> y la DL<sub>10</sub> para el Capxol™ eran 447,4 y 371,5 mg/kg de paclitaxel, 7,53 y 5,13 mg/kg de paclitaxel en el Taxol®, y 1325 y 794 mg/kg de vehículo de Taxol® (corresponde a una dosis de 15,06 y 9,06 mg/kg de paclitaxel). En este estudio, la DL<sub>50</sub> para el Capxol™ era 59 veces mayor que para el Taxol® y 29 veces mayor que para el vehículo del Taxol® solo. La DL<sub>10</sub> para el paclitaxel en el Capxol™ era 72 veces mayor que para el paclitaxel en el Taxol®. La revisión de todos los datos en este estudio sugiere que el vehículo del Taxol® es responsable de buena parte de la toxicidad del Taxol®. Se observó que los ratones que recibían Taxol® y vehículo de Taxol® mostraban signos clásicos de hipersensibilidad grave indicada por coloración de la piel rosa brillante poco después de la administración. No se observaron dichas reacciones para los grupos de Capxol™ y vehículo del Capxol™. Los resultados se presentan en la tabla 2.

Tabla 2

Administración intravenosa única						
Grupo	Dosis (mg/kg)	nº de animales (n)	nº de muertes	% de supervivencia	DL <sub>50</sub> (mg/kg)	DMT o DL <sub>10</sub> (mg/kg)
Capxol™	822	3	3	0	447,4	371,5
	548	4	4	0		
	367	3	0	100		
	103	3	0	100		
	30	3	0	100		
Taxol®	20,1	4	4	0	7,53	5,13
	13,4	4	4	0		
	9	3	2	33		
	6	4	1	75		
	4	3	0	100		

Estas dosis altas de Capxol™ se administraron como inyecciones de bolo y representan el equivalente de aproximadamente 80-2000 mg/m<sup>2</sup> de dosis en seres humanos. La DL<sub>10</sub> o dosis máxima tolerada de Capxol™ en este estudio es equivalente a aproximadamente 1000 mg/m<sup>2</sup> en seres humanos. Esto es significativamente mayor que la dosis humana aprobada de 175 mg/m<sup>2</sup> para el Taxol®.

Para sorpresa de los autores de la invención, se encontró que el vehículo solo, Cremophor/etanol, producía reacciones de hipersensibilidad grave y muerte en varios grupos de dosis de ratones. Los datos de DL<sub>50</sub> para el vehículo del Taxol® solo muestran que es considerablemente más tóxico que el Capxol™, y contribuye significativamente a la toxicidad del Taxol®. No estaba claro en la bibliografía la causa de la hipersensibilidad, sin embargo, basándose en estos datos, los autores de la invención creen que la HSR se puede atribuir al vehículo del Taxol®.

#### Ejemplo 58

Determinación de la DL<sub>50</sub> de Capxol™ y Taxol® en ratones después de administración intravenosa múltiple

Se compararon la DL<sub>50</sub> del Capxol™ y Taxol® y sus vehículos después de múltiples administraciones intravenosas. Se usó un total de 32 ratones CD1. Se administró Capxol™ con dosis de paclitaxel de 30, 69 y 103 mg/kg diariamente durante 5 días consecutivos. Se administró Taxol® con dosis de paclitaxel de 4, 6, 9, 13,4 y 20,1 mg/kg diariamente durante 5 días consecutivos. Se administró cada concentración a 4 ratones. Los resultados se presentan en la tabla 3.

Tabla 3

#### Administraciones intravenosas múltiples

Grupo	Dosis (mg/kg)	nº de animales	nº de muertes	% de supervivientes	DL <sub>50</sub> (mg/kg)	DMT o DL <sub>10</sub>
Capxol™	103	4	4	0	76	64
	69	4	1	75		
	30	4	0	100		
Taxol®	20,1	4	4	0	8,0	4,3
	13,4	4	4	0		
	9	4	2	50		
	6	4	1	75		
	4	4	0	100		

Los resultados indicaban que el Capxol™ es menos tóxico que el Taxol®. La DL<sub>50</sub> y DL<sub>10</sub> del Capxol™ eran 76,2 y

64,5 mg/kg de paclitaxel, respectivamente, comparado con 8,07 y 4,3 mg/kg de paclitaxel en el Taxol®, respectivamente. En este estudio, la DL<sub>50</sub> para el Capxol™ era 9,4 veces mayor que para el Taxol®. La DL<sub>10</sub> para el Capxol™ era 15 veces mayor que para el Taxol®. Los resultados de este estudio sugieren que el Capxol™ es menos tóxico que el Taxol® cuando se administran múltiples dosis en intervalos diarios.

5 Ejemplo 59

Toxicidad y eficacia de dos formulaciones de Capxol™ y Taxol®

Se llevó a cabo un estudio para determinar la eficacia del Capxol™, Taxol® y el vehículo del Capxol™ en ratones NCr-nu atímicos a los que se ha implantado fragmentos de tumor mamario humano MX-1.

10 Se administraron a grupos de 5 ratones inyecciones intravenosas de formulaciones de Capxol™ VR-3 o VR-4 en dosis de 13,4, 20, 30, 45 mg/kg/día durante 5 días. También se administraron a grupos de 5 ratones inyecciones intravenosas de Taxol® en dosis de 13,4, 20 y 30 mg/kg/día durante 5 días. Un grupo de control de 10 ratones se trató con una inyección intravenosa de control con vehículo de Capxol™ (albúmina humana, 600 mg/kg/día) durante 5 días. Los parámetros de evaluación eran el número de regresiones tumorales completas, la duración media de la regresión completa, los supervivientes sin tumor, y las recaídas tumorales.

15 El tratamiento con la formulación de Capxol™ VR-3 produjo las regresiones tumorales completas con todos los niveles de dosis. Las dos dosis más altas dieron como resultado 100% de supervivencia después de 103 días. La formulación de Capxol™ VR-4 produjo la regresión tumoral completa en los tres grupos de dosis más alta, y 60% de regresiones con 13,4 mg/kg/día. Las tasas de supervivencia después de 103 días eran algo menores que con la formulación VR-4. El tratamiento con Taxol® con 30, 20 y 13,4 mg/kg/día dio tasas de supervivencia a los 103 días de 40%, 20% y 20%, respectivamente. El tratamiento con el vehículo de control no tenía efecto en el crecimiento tumoral y los animales se sacrificaron después de 33 a 47 días. Los resultados se presentan en la tabla 4.

Tabla 4

Dosificación (mg/kg/día)	CR/Total			TSF/TR			DCR (días)			Muertes no específicas/Total		
	VR-	VR-	TAX	VR-3	VR-4	TAX	VR-3	VR-4	TAX	VR-	VR-4	TAX
45	5/5	5/5	NA	5/0	3 /2	NA	>88	>73	NA	0/5	0/5	NA
30	5/5	5/5	4/4	5/0	5/0	2/2	>88	>88	>56	0/5	0/5	1/5
20	5/5	5/5	4/4	1/4	2/3	1/3	>S1	>47	>57	0/5	0/5	1/5
13	4/5	3/5	4/5	0/5	0/5	1/4	10	8	>29	0/5	0/5	0/5

CR = regresión tumoral completa;

TFS = supervivientes sin tumor;

25 TR = recaída tumoral;

DCR = días de regresión completa

Estos resultados inesperados y sorprendentes muestran una mayor eficacia para las dos formulaciones de Capxol™ comparadas con el Taxol®. Además, se consiguen dosis mayores de paclitaxel en los grupos de Capxol™ debido a la menor toxicidad de la formulación. Estas dosis altas se administraron en forma de inyecciones de bolo.

30 Ejemplo 60

Cinéticas sanguíneas y distribución tisular de <sup>3</sup>H-Taxol® y Capxol™ después de una dosis intravenosa única en la rata

35 Se llevaron a cabo dos estudios para comparar la farmacocinética y la distribución tisular del <sup>3</sup>H-paclitaxel formulado en Capxol™ y el concentrado de inyección Taxol®. Se inyectó a 14 ratas macho por vía intravenosa 10 mg/kg y a 10 ratas 4,9 mg/kg de <sup>3</sup>H-Taxol®. Se inyectó a 10 ratas macho por vía intravenosa 5,1 mg/kg de <sup>3</sup>H-Capxol™ en el estudio anterior.

40 Los niveles tanto de radiactividad total como de paclitaxel disminuyen de forma bifásica en la sangre de las ratas después de dosis de bolo IV de 5 mg/kg de <sup>3</sup>H-Taxol® o de <sup>3</sup>H-Capxol™. Sin embargo, los niveles tanto de radiactividad total como de paclitaxel son significativamente menores después de la administración de <sup>3</sup>H-Capxol™ tras una dosis similar al <sup>3</sup>H-Taxol®. Este nivel inferior se distribuye rápidamente fuera de la sangre.

El perfil sanguíneo por HPLC muestra un patrón similar de metabolismo a metabolito(s) muy polar(es) tanto para el

5  $^3\text{H-Capxol}^{\text{TM}}$  como para el  $^3\text{H-Taxol}^{\text{®}}$ . Sin embargo, la velocidad del metabolismo aparece significativamente más lenta para el  $^3\text{H-Capxol}^{\text{TM}}$  ya que permanece 44,2% de radiactividad en la sangre como paclitaxel 24 h después de la dosis, frente a 27,7% para el  $^3\text{H-Taxol}^{\text{®}}$ . La excreción de la radiactividad se produce solo de forma mínima en la orina y de forma predominante en las heces para el  $^3\text{H-Capxol}^{\text{TM}}$  lo cual es similar a los patrones de excreción publicados para el  $^3\text{H-Taxol}^{\text{®}}$ . Las cinéticas sanguíneas para la radiactividad total y el paclitaxel después de administración IV de  $^3\text{H-Capxol}^{\text{TM}}$  o  $^3\text{H-Taxol}^{\text{®}}$  con 5 mg/kg se presentan en la tabla 5.

Tabla 5

Tratamiento	AUC <sub>0-24</sub> (mg eq.h/ml)	C <sub>0</sub> extrapolada (mg eq/ml)	C <sub>máx</sub> observada (mg eq/ml)	T <sub>máx</sub> observado (h)	t <sub>1/2</sub> β (h)
Radioactividad total					
$^3\text{H-Capxol}^{\text{TM}}$	6,1	7,6	4,2	0,03	19,0
$^3\text{H-Taxol}^{\text{®}}$	10,2	19,7	13,5	0,03	19,7
paclitaxel					
$^3\text{H-Capxol}^{\text{TM}}$	3,7	7,0	4,0	0,03	11,4
$^3\text{H-Taxol}^{\text{®}}$	5,4	17,1	11,8	0,03	7,2

10 Los niveles de radiactividad tisular son mayores después de administración de Capxol<sup>TM</sup> que de administración de Taxol<sup>®</sup> para 12 de 14 tejidos. Las relaciones tejido/sangre en ppm son mayores en todos los tejidos para los animales a los que se administró  $^3\text{H-Capxol}^{\text{TM}}$  y los niveles sanguíneos son menores. Esto apoya la distribución rápida del  $^3\text{H-Capxol}^{\text{TM}}$  desde la sangre a los tejidos sugerida por los datos de la cinética sanguínea.

15 El  $^3\text{H-paclitaxel}$  formulado en el Capxol<sup>TM</sup> muestra un perfil farmacocinético similar al  $^3\text{H-paclitaxel}$  formulado en el Taxol<sup>®</sup> para el concentrado para inyección, pero las relaciones de tejido/sangre en ppm y las velocidades de metabolismo difieren significativamente. Un nivel significativamente menor de radiactividad total para los animales tratados con Capxol<sup>TM</sup> que los animales tratados con Taxol<sup>®</sup> en la muestra de sangre de 2 min después de administración, indica que el  $^3\text{H-Capxol}^{\text{TM}}$  se distribuye más rápidamente fuera de la sangre. Sin embargo, la velocidad del metabolismo aparece significativamente más lenta para el  $^3\text{H-Capxol}^{\text{TM}}$  ya que permanece 44% de radiactividad en la sangre como paclitaxel 24 h después de administración, frente a 28% para el Taxol<sup>®</sup>.

20 Este descubrimiento para el Capxol<sup>TM</sup> es sorprendente y proporciona una formulación nueva para lograr una actividad sostenida del paclitaxel comparada con el Taxol<sup>®</sup>. Considerado junto con las concentraciones locales altas, esta actividad potenciada debería dar una mayor eficacia del tratamiento de tumores primarios o metástasis en órganos con concentraciones locales altas. Las distribuciones tisulares se presentan en la siguiente tabla 6. Los datos representan la media y las desviaciones típicas de 10 ratas en cada grupo (Capxol<sup>TM</sup> y Taxol<sup>®</sup>)

Tabla 6

25 Residuos de radiactividad en tejidos de ratas macho, expresados en ppm, después de una dosis intravenosa única de  $^3\text{H-Capxol}^{\text{TM}}$  y  $^3\text{H-Taxol}^{\text{®}}$  de 5 mg/kg

Muestra	Capxol <sup>TM</sup>		Taxol <sup>®</sup>	
	Valores medios	± DT	Valores medios	± DT
Cerebro	0,106	0,008	0,145	0,020
Corazón	0,368	0,063	0,262	0,037
Pulmón	1,006	0,140	0,694	0,057
Hígado	1,192	0,128	1,37	0,204
Riñón	0,670	0,110	0,473	0,068
Músculo	0,422	0,120	0,386	0,035
Tracto GI	0,802	0,274	0,898	0,243
Testículos	0,265	0,023	0,326	0,047
Páncreas	0,963	0,357	0,468	0,070



Muestra	Capxol™		Taxol®	
	Valores medios	± DT	Valores medios	± DT
Cuerpo	0,596	0,070	0,441	0,065
Hueso	0,531	0,108	0,297	0,051
Bazo	0,912	0,131	0,493	0,070
Próstata	1,728	0,356	1,10	0,161
Vesículas seminales	1,142	0,253	1,20	0,237
Sangre	0,131	0,010	0,181	0,020
Plasma	0,131	0,012	0,196	0,026

Los datos muestran niveles significativamente más altos de acumulación de Capxol™ en varios órganos cuando se compara con el Taxol®. Estos órganos incluyen próstata, páncreas, riñón, pulmón, corazón, hueso y bazo. Por lo tanto, el Capxol™ puede ser más eficaz que el Taxol® en el tratamiento de cánceres de estos órganos con niveles equivalentes de paclitaxel.

- 5 Los niveles en el tejido prostático tienen un interés particular en el tratamiento del cáncer prostático. Este resultado sorprendente e inesperado tiene implicaciones para el tratamiento del cáncer de próstata. La tabla 7 muestra los datos para ratas individuales (10 en cada grupo) que muestran mayor acumulación de paclitaxel en la próstata para el Capxol™ comparado con el Taxol®. La base para la localización dentro de la próstata podría ser un resultado del tamaño de partículas de la formulación (20-400 nm), o la presencia de la proteína albúmina en la formulación que puede producir la localización en el tejido prostático a través de receptores de membrana específicos (gp 60, gp 18, gp 13, y similares). También es probable que otros polímeros biodegradables biocompatibles distintos de la albúmina puedan mostrar especificidad por algunos tejidos tales como la próstata dando como resultado la alta concentración local de paclitaxel en estos tejidos como resultado de las propiedades descritas antes. Se contempla que dichos materiales biocompatibles están dentro del alcance de esta invención. Una realización preferida de una composición para conseguir concentraciones locales altas de paclitaxel en la próstata es una formulación que contiene paclitaxel y albúmina con un tamaño de partículas en el intervalo de 20-400 nm, y exenta de cremophor. Esta realización también ha demostrado dar concentraciones en niveles más altos de paclitaxel en el páncreas, riñón, pulmón, corazón, hueso y bazo, cuando se compara con el Taxol® con dosis equivalentes.

Tabla 7

20 Datos para 10 ratas en cada grupo. Dosis de paclitaxel de 5 mg/kg

	Capxol™		Taxol®
	1,228		1,13
	2,463		1,04
	1,904		0,952
	1,850		1,42
	1,660		1,31
	1,246		1,08
	1,895		1,03
	1,563		0,95
	1,798		0,94
	1,676		1,18
Media	1,728	Media	1,103
DT	0,36	DT	0,16

Estos datos muestran que la localización del Capxol™ en la próstata es aproximadamente 150% comparado con el Taxol®.

Esta localización inesperada del paclitaxel en la próstata en la formulación de Capxol™ se puede explotar para el

5 suministro de otros agentes farmacológicamente activos en la próstata para el tratamiento de otros estados patológicos que afectan a este órgano, p. ej., antibióticos en una formulación similar para el tratamiento de la prostatitis (inflamación e infección de la próstata), agentes terapéuticos eficaces para el tratamiento de la hipertrofia prostática benigna se pueden formular de una forma similar para conseguir el suministro local alto. Igualmente, el descubrimiento sorprendente de que el Capxol™ proporciona concentraciones locales altas en el corazón se puede explotar para el tratamiento de la reestenosis, así como de la enfermedad aterosclerótica en vasos coronarios. El paclitaxel ha demostrado tener un efecto terapéutico en la prevención de la reestenosis y la aterosclerosis, y por lo tanto el Capxol™ es una forma ideal del paclitaxel para estas afecciones. Además, se ha demostrado que la albúmina polimerizada preferiblemente se une a vasos endoteliales inflamados posiblemente a través de los receptores gp60, gp18 y gp13.

## Ejemplo 61

Cinéticas sanguíneas y distribución tisular del paclitaxel después de múltiples dosis intravenosas. Niveles de Capxol™ en la rata

15 El estudio usando <sup>3</sup>H-Capxol™ se complementó por el tratamiento de 4 grupos adicionales de ratas con una dosis de bolo única de 9,1 mg/kg, 26,4 mg/kg, 116,7 mg/kg y 148,1 mg/kg de paclitaxel en Capxol™. Se recogió sangre de la vena de la cola y se calculó el AUC<sub>0-24</sub>. A las 24 h, se recogieron muestras de sangre, se extrajeron y el extracto se inyectó en el HPLC para determinar los niveles del compuesto original en la sangre.

Las cinéticas sanguíneas para la radiactividad total y el paclitaxel después de administración IV de <sup>3</sup>H-Capxol™ se presentan en la tabla 8.

20 Tabla 8

Grupo/Dosis (mg/kg)	AUC <sub>0-24</sub> (µg eq.h/ml)	C <sub>0</sub> extrapolada (µg eq/ml)	C <sub>máx</sub> observada (µg eq/ml)	T <sub>máx</sub> observado (h)	t <sub>1/2</sub> β (h)
A/9,1	11,5	10,2	7,19	0,03	22,3
B/26,4	43,5	44,8	29,5	0,03	16,0
C/116,7	248,9	644,6	283,3	0,03	8,48
D/148,1	355,3	1009,8	414,2	0,03	9,34

Al aumentar la dosis de paclitaxel, aumentaba de forma proporcional el área bajo la curva. El nivel de compuesto original después de 24 h aumentó en un factor de 8,5 (0,04 ppm - 0,34 ppm), que iba de la dosis de 9 mg/kg a la dosis de 148 mg/kg.

## Ejemplo 62

25 Determinación de la toxicidad de Capxol™ y Taxol® en ratas después de una administración intravenosa única

30 El objetivo del estudio era determinar la toxicidad del Capxol™ después de una administración IV única en ratas macho y hembra. Se administró Capxol™ a 6 ratas machos y 6 hembras con dosis de 5, 9, 30, 90 y 120 mg/kg. Se sacrificó la mitad de los animales de cada grupo de dosis y se hizo la necropsia el día 8. Se hizo la necropsia del resto de los animales el día 31. Los resultados de los animales tratados con Capxol™ se compararon con los resultados de los grupos de disolución salina normal y de control con vehículo así como con los resultados de los animales tratados con 5, 9 y 30 mg/kg de Taxol®.

Los animales se examinaron inmediatamente después de administrar la dosis, 1 h y 4 h después de la administración, y después 1 vez al día. Se recogió sangre de cada animal para la determinación hematológica y sérica antes de la eutanasia.

35 Se produjeron 13 muertes durante el periodo de observación de 30 días. Los 12 animales tratados con Taxol® con una dosis de paclitaxel de 30 mg/kg habían muerto el día 4. Solo murió un animal tratad con Capxol™. El animal tratado con Capxol™ recibió 90 mg/kg de paclitaxel y se encontró muerto el día 15. No murieron otros animales tratados con Capxol™ con la dosis de 90 mg/kg o 120 mg/kg, por lo tanto no se cree que la muerte esté relacionada con el tratamiento.

40 Durante el primer periodo de observación de 4 h, se observaron piloerección y marcha vacilante en la mayoría de los animales tratados con Taxol®, posiblemente debido al contenido de alcohol del fármaco. La piloerección se observó en algunos pocos animales tratados con Capxol™. En los animales tratados con Taxol® con una dosis de 30 mg/kg de paclitaxel se observó piloerección y letargo y se encontraron muertos el día 4. No se observaron signos evidentes de toxicidad en los animales tratados con Capxol™, excepto por algunos incidentes de piloerección con los niveles de dosis de 90 mg/ml y 120 mg/ml.

45

No se describieron anomalías en los animales tratados con Capxol™. Los resultados de la necropsia ordinaria el día 8 y el día 31 eran normales. Se observaron cambios significativos relacionados con la dosis en los órganos reproductores de machos en animales tratados con Capxol™. Se observó una degeneración y vacuolización de las células epiteliales ductales epididimarias, a menudo acompañado de infiltrado linfocitario intersticial multifocal. Había una atrofia grave creciente de los túbulos seminíferos observado en los testículos con la dosis de Capxol™ aumentada. En opinión del patólogo se observaban lesiones significativas en los órganos reproductores masculinos en los animales tratados con 9, 30, 90, y 120 mg/kg Capxol™. Estos cambios implicaban la degeneración difusa y necrosis de los testículos. Estos cambios eran los más prevalentes en los animales que recibieron la dosis más alta de Capxol™. No se observaron cambios en los animales de control no tratados, animales de control con vehículo o los tratados con Taxol®.

Este descubrimiento es inesperado y tiene implicaciones terapéuticas significativas para el tratamiento de los cánceres dependientes de hormonas tales como el cáncer de próstata. La extirpación de los testículos (orquiectomía) es un procedimiento terapéutico para el tratamiento del cáncer de próstata. El Capxol™ representa una nueva formulación para el tratamiento de esta enfermedad al lograr una concentración local alta de paclitaxel en el sitio, por la actividad sostenida del principio activo, por reducción de la función testicular y sin el vehículo tóxico cremophor. Por lo tanto, el tratamiento con Capxol™ permite la reducción de los niveles de testosterona y otras hormonas andrógenas.

Se observó necrosis de la corteza cerebral con el nivel de dosis medio de los animales tratados con Taxol®. Esto puede explicar las muertes de los animales tratados con dosis incluso mayores de Taxol®. No se observaron lesiones cerebrales en los animales tratados con Capxol™.

Esta falta de toxicidad cerebral o neurológica es sorprendente y tiene implicaciones significativas tanto en el tratamiento de los tumores cerebrales como en la capacidad para conseguir dosis sistémicas altas en el intervalo de 5-120 mg/kg en ratas (equivalente a dosis de 30-700 mg/m<sup>2</sup> en seres humanos).

Para resumir, el Capxol™ era considerablemente menos tóxico que el Taxol®. Los animales tratados con Taxol® no sobrevivieron a dosis mayores de 9 mg/kg. Con la excepción de una muerte incidental con 90 mg/kg de Capxol™, todos los animales que recibieron Capxol™ sobrevivieron con dosis de hasta e incluyendo 120 mg/kg. Había un efecto relacionado con la dosis alta del Capxol™ en los órganos reproductores masculinos y una supresión en el peso corporal. Las ratas hembra no demostraron ningún efecto tóxico por la administración de Capxol™ con dosis de hasta e incluyendo 120 mg/kg. Estas dosis altas se administraron como inyecciones de bolo y representan el equivalente a la dosis de 30-700 mg/m<sup>2</sup> en seres humanos.

#### Ejemplo 63

Datos farmacocinéticos (PK) para nanopartículas de ciclosporina (Capsorine I.V.) después de administración intravenosa (comparación con Sandimmune I.V., formulación actualmente comercializada por Sandoz)

Se reconstituyeron nanopartículas de ciclosporina (Capsorine I.V.) preparadas como se ha descrito antes (ejemplos 13 y 14) en disolución salina y se administraron a un primero grupo de 3 ratas Sprague Dawley por bolo intravenoso. Se administró a un segundo grupo de 3 ratas Sandimmune I.V., que contiene cremaphor/etanol, después de dilución en disolución salina. Cada grupo recibió la misma dosis de 2,5 mg/kg de ciclosporina. Se tomaron muestras de sangre en los tiempos 0, 5, 15, 30 (minutos), y 1, 2, 4, 8, 24, 36 y 48 (horas). Los niveles de ciclosporina en la sangre se ensayaron por HPLC y se determinaron los parámetros PK típicos. Las curvas PK mostraron una caída a lo largo del tiempo como sigue:

#### Caída a lo largo del tiempo

	AUC, mg.h/ml	Cm <sub>max</sub> , ng/ml
Capsorine I.V.	12.228	2.853
Sandimmune I.V.	7.791	2.606

Además, debido a la toxicidad de la formulación de Sandimmune I.V., 2 de las 3 ratas en este grupo murieron en las siguientes 4 h después de la dosificación. Por lo tanto, la formulación de nanopartículas (Capsorine I.V.) de acuerdo con la presente invención muestra una mayor AUC y no muestra toxicidad comparado con la formulación disponible en el comercio (Sandimmune I.V.).

#### Ejemplo 64

Datos farmacocinéticos (PK) para nanogotas de ciclosporina (Capsorine Oral) después de administración oral. Comparación con Neoral (formulación actualmente comercializada por Sandoz)

Se administraron nanogotas de ciclosporina preparadas antes en zumo de naranja, a un primer grupo de 3 ratas Sprague Dawley por alimentación oral por sonda. Se administró a un segundo grupo de 3 ratas Neoral, una

5 formulación en microemulsión disponible en el comercio que contiene emulsionantes, después de dilución en zumo de naranja, también por alimentación oral por sonda. Cada grupo recibió la misma dosis de 12 mg/kg de ciclosporina en un volumen idéntico de zumo de naranja. Se tomaron muestras de sangre en los tiempos 0, 5, 15, 30 (minutos), y 1, 2, 4, 8, 24, 36 y 48 (horas). Los niveles de ciclosporina en la sangre se ensayaron por HPLC y se determinaron los parámetros PK típicos. Las curvas PK mostraron una caída típica a lo largo del tiempo como sigue:

Caída a lo largo del tiempo		
	AUC, mg.h/ml	Cmáx, ng/ml
Capsorine Oral	3.195	887
Neoral	3.213	690

Por lo tanto, la formulación de nanogotas (Capsorine Oral) de la presente invención presenta un comportamiento PK similar a la formulación disponible en el comercio (Neoral).

#### Ejemplo 65

##### Investigación clínica con Capxol™: Objetivos y ventajas

10 El fundamento para seleccionar la dosis inicial para los ensayos de fase I/II se basará en los datos de toxicidad preclínicos espectacularmente menores para la formulación de Capxol™ comparada con la de Taxol®. Los datos preclínicos anteriores indican que los niveles de dosificación iniciales de Capxol™ para los estudios de fase I/II usarán la DMT (dosis máxima tolerada) establecida para el paclitaxel en el Taxol®. Basándose en los datos preclínicos actuales, se prevé en este momento que los objetivos clínicos para la aprobación de comercialización  
15 serán eliminar la necesidad de medicación previa antes de la administración del paclitaxel; determinar la dosis equivalente de Capxol™ respecto al Taxol®, es decir, determinar la dosis a la que se obtiene la respuesta antitumoral equivalente; y eliminar la necesidad de infusión i.v. continua (de 3 a 24 h) para la administración de paclitaxel y sustituirla por la administración a lo largo de periodos mucho más cortos (<1 h o bolo).

20 Hay muchas ventajas potenciales de la formulación de Capxol™ para el paclitaxel. El Capxol™ es un polvo liofilizado que contiene solo paclitaxel y albúmina de suero humano. Debido a la naturaleza de la disolución coloidal formada tras la reconstitución del polvo liofilizado, no se requieren emulsionantes tóxicos tales como cremaphor (en la formulación de BMS de paclitaxel) o polisorbato 80 (en la formulación de docetaxel de Rhone Poulenc), ni disolventes tales como etanol para solubilizar el fármaco. La eliminación de los emulsionantes tóxicos reducirá la incidencia de hipersensibilidad grave y reacciones anafilácticas, que se sabe que se producen con productos tales  
25 como el Taxol®.

Además, no se prevé medicación previa con esteroides ni antihistaminas antes de la administración del fármaco.

Debido a las toxicidades reducidas, como se pone de manifiesto por los estudios de DL<sub>10</sub>/DL<sub>50</sub>, se pueden usar dosis más altas que darán como resultado mayor eficacia.

30 Se espera que la reducción de la mielosupresión (comparada con el Taxol®) reduzca el periodo del ciclo de tratamiento (actualmente de 3 semanas) y mejore los resultados terapéuticos.

Se puede administrar Capxol™ con concentraciones mucho mayores (de hasta 20 mg/ml) comparado con el Taxol® (0,6 mg/ml), permitiendo infusiones de volúmenes mucho menores, y posiblemente la administración como un bolo intravenoso.

35 Un problema reconocido con el Taxol® es la precipitación del paclitaxel en catéteres permanentes. Esto produce la dosificación irregular y poco controlada. Debido a la estabilidad inherente de la disolución coloidal de la nueva formulación, Capxol™, se alivia el problema de la precipitación.

40 La bibliografía sugiere que las partículas de tamaño en el intervalo inferior de cientos de nanómetros se reparten con preferencia en los tumores a través del goteo de los vasos sanguíneos al sitio del tumor. Por lo tanto, se espera que las partículas coloidales de paclitaxel en la formulación de Capxol™ muestren un efecto dirigido preferente, reduciendo mucho los efectos secundarios del paclitaxel administrado en la formulación de BMS.

#### Ejemplo 66

##### Esquema de diseño de ensayo clínico de Capxol™

Indicación: Cáncer metastático de mama

45 Plan de dosificación: El fundamento para seleccionar la dosis inicial para los ensayos de fase I/II se basará en los datos de toxicidad preclínicos significativamente menores (Datos de DL<sub>10</sub> de dosis única en ratones) para la formulación de Capxol™ comparada con la de Taxol®. Se determinó que la DL<sub>10</sub> de dosis única en ratones era

398,1 mg/kg. La conversión de esta dosis a una base de superficie específica (3 veces el valor de mg/kg) da un cálculo de 1194,3 o aproximadamente 1200 mg/m<sup>2</sup>. Una dosis conservadora inicial de 1/10 de este valor para seres humanos da una dosis de 120 mg/m<sup>2</sup>. Sin embargo, ya está bien establecido que el paclitaxel es seguro con una dosis de 175 mg/m<sup>2</sup> y basándose en el estudio piloto con Capxol<sup>TM</sup> que muestra una menor mielosupresión en ratas, una dosis de 175 mg/m<sup>2</sup> debería ser segura para la formulación de Capxol<sup>TM</sup>. La disolución de Capxol<sup>TM</sup> se suministrará en aproximadamente 15-30 minutos o menos, si es posible.

Ejemplo 67

Esquema del programa de desarrollo clínico de Capxol<sup>TM</sup>: Estudio para encontrar la dosis de la fase I/II de combinación/ ensayo de eficacia limitado

10 Pacientes/Propósito: Pacientes que tienen enfermedad metastásica de mama avanzada refractaria a las terapias convencionales. El objetivo de este ensayo será establecer la tasa de respuesta del Capxol<sup>TM</sup> como agente único en pacientes con cáncer de mama metastásico.

15 Dosificación - Componente de la fase I: La dosis inicial para usar en el componente de fase I del ensayo será la dosis máxima tolerada (DMT) conocida para el paclitaxel (135 mg/m<sup>2</sup>). Las dosis posteriores se aumentarán en etapas de 25% hasta alcanzar la DMT. Habrá 3 pacientes con cada uno de los niveles de dosis inicial de Capxol<sup>TM</sup>, ampliando a 6 pacientes en la DMT. La capacidad para moverse al siguiente nivel de dosis se basará en el patrón de efectos adversos. Es decir, el estudio se interrumpirá siempre que 2 o más pacientes de los 6 con un nivel de dosis particular presente toxicidad sin mielosupresión de grado 3 o toxicidad con mielosupresión de grado 4 (en la escala de toxicidad de la OMS). La dosis para el Capxol<sup>TM</sup> se designará como la dosis inmediatamente precedente a la dosis a la que se interrumpió el ensayo. Si es necesario también se pueden explorar esquemas alternativos de administración de fármaco, tales como diario x 5 o infusión de 24 h, basándose en los resultados del esquema de dosis de bolo única inicial.

25 Farmacocinética: Para pacientes seleccionados, se llevará a cabo un estudio farmacocinético completo usando suero extraído en los tiempos de medición designados de forma adecuada. Se determinarán parámetros tales como t<sup>1/2</sup> (fase α y β), AUC, C<sub>máx</sub>, eliminación y volumen de distribución.

30 Pacientes - Componente de la fase II: Habiendo establecido la DMT, se seleccionarán pacientes de cáncer de mama similares a los usados en los ensayos de paclitaxel originales para el componente de la fase II. El número se basará en el deseo de establecer una tasa de respuesta tumoral con precisión aceptable con un nivel de confianza de 95%. Como tal, el estudio tendrá solo el objetivo de establecer la equivalencia con el paclitaxel convencional mostrando que el intervalo de confianza contiene las tasas de respuesta esperadas para el Capxol<sup>TM</sup>. El tamaño de la muestra de los pacientes usada será de 30 pacientes, que es común para el componente de la fase II de un estudio de fase I/II.

35 Medición: El resultado principal será la tasa de respuesta tumoral (CR/PR) para los pacientes reclutados. Además, se controlarán el tiempo de respuesta, la duración de la respuesta y el tiempo de supervivencia. La seguridad del tratamiento también se evaluará a partir de las tasas de sucesos adversos y cambios en parámetros de laboratorio convencionales.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Una formulación de paclitaxel que comprende nanopartículas que comprenden un paclitaxel que tiene un recubrimiento de proteína, teniendo dichas nanopartículas un diámetro medio no superior a aproximadamente 200 nm, en donde la concentración de paclitaxel en la formulación es al menos 2,0 mg/ml, y en donde la concentración de paclitaxel en la formulación no es 20 mg/ml.
- 2.- La formulación de la reivindicación 1, en donde la concentración de paclitaxel en la formulación es 2-20 mg/ml.
- 3.- La formulación de la reivindicación 2, en donde la concentración de paclitaxel en la formulación es 5 mg/ml.
- 10 4.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la formulación es estable durante al menos 3 días en al menos una de las condiciones de temperatura ambiente o refrigerada.
- 5.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho paclitaxel se administra por vía oral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intraarterial, intrauretral, intratecal o por inhalación.
- 15 6.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la proteína es albúmina.
- 7.- La formulación de la reivindicación 6, en donde la albúmina es albúmina de suero humano.
- 8.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las nanopartículas se pueden filtrar a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m.
- 20 9.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las nanopartículas tienen un intervalo de tamaños de 10-200 nm.
- 10.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las nanopartículas tienen un intervalo de tamaños de 50 a 170 nm.
- 11.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las nanopartículas se esterilizan por filtración.
- 25 12.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el paclitaxel en la nanopartícula es amorfo.
- 13.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las nanopartículas se suspenden en un líquido acuoso biocompatible.
- 14.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las nanopartículas en la composición tienen un núcleo que carece sustancialmente de una matriz polimérica.
- 30 15.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para usar para tratar el cáncer.
- 16.- La formulación de la reivindicación 15, en donde el cáncer es cáncer de próstata, orquiectomía, cáncer pancreático o tumor cerebral.
- 17.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para usar en el tratamiento de la reestenosis.

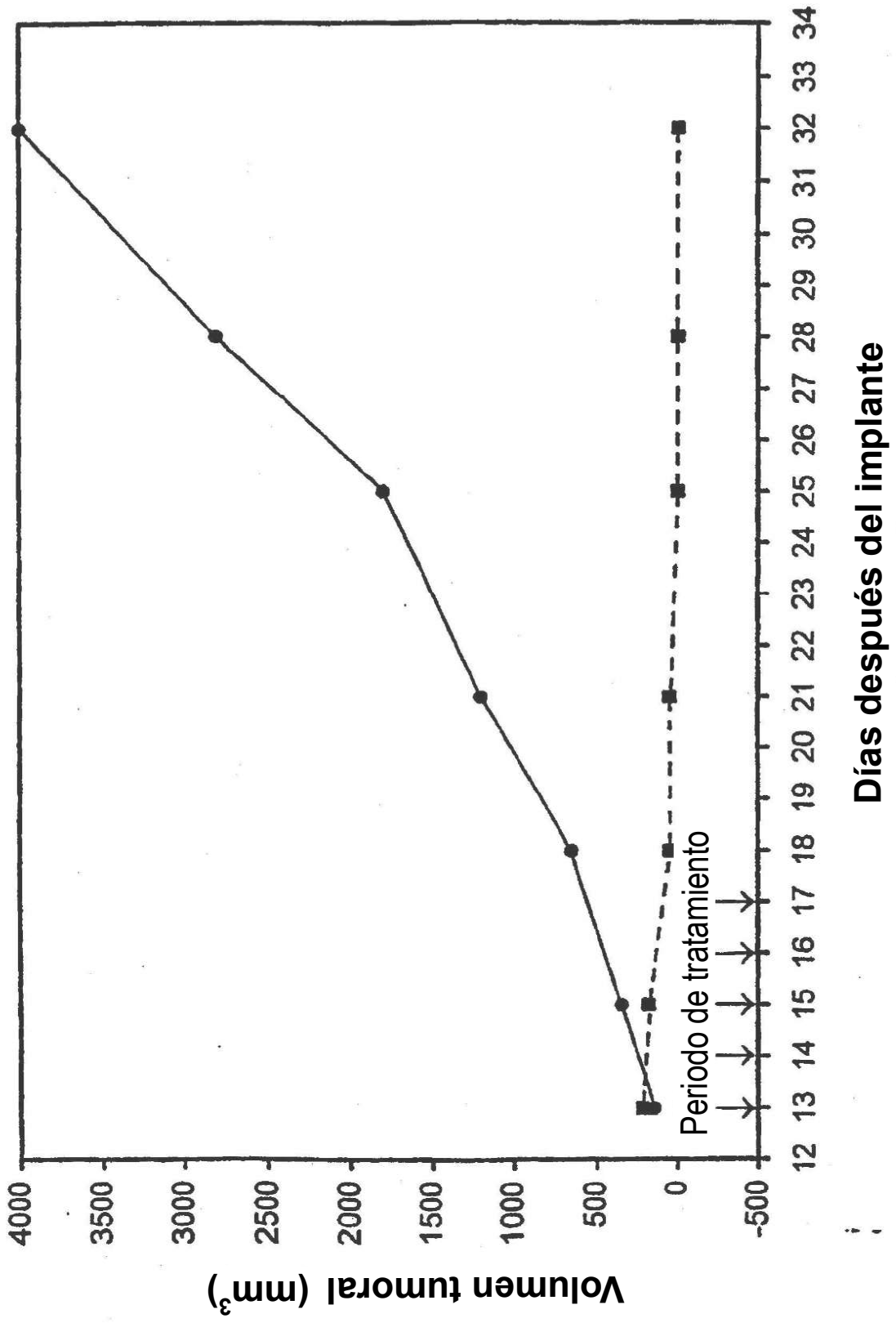
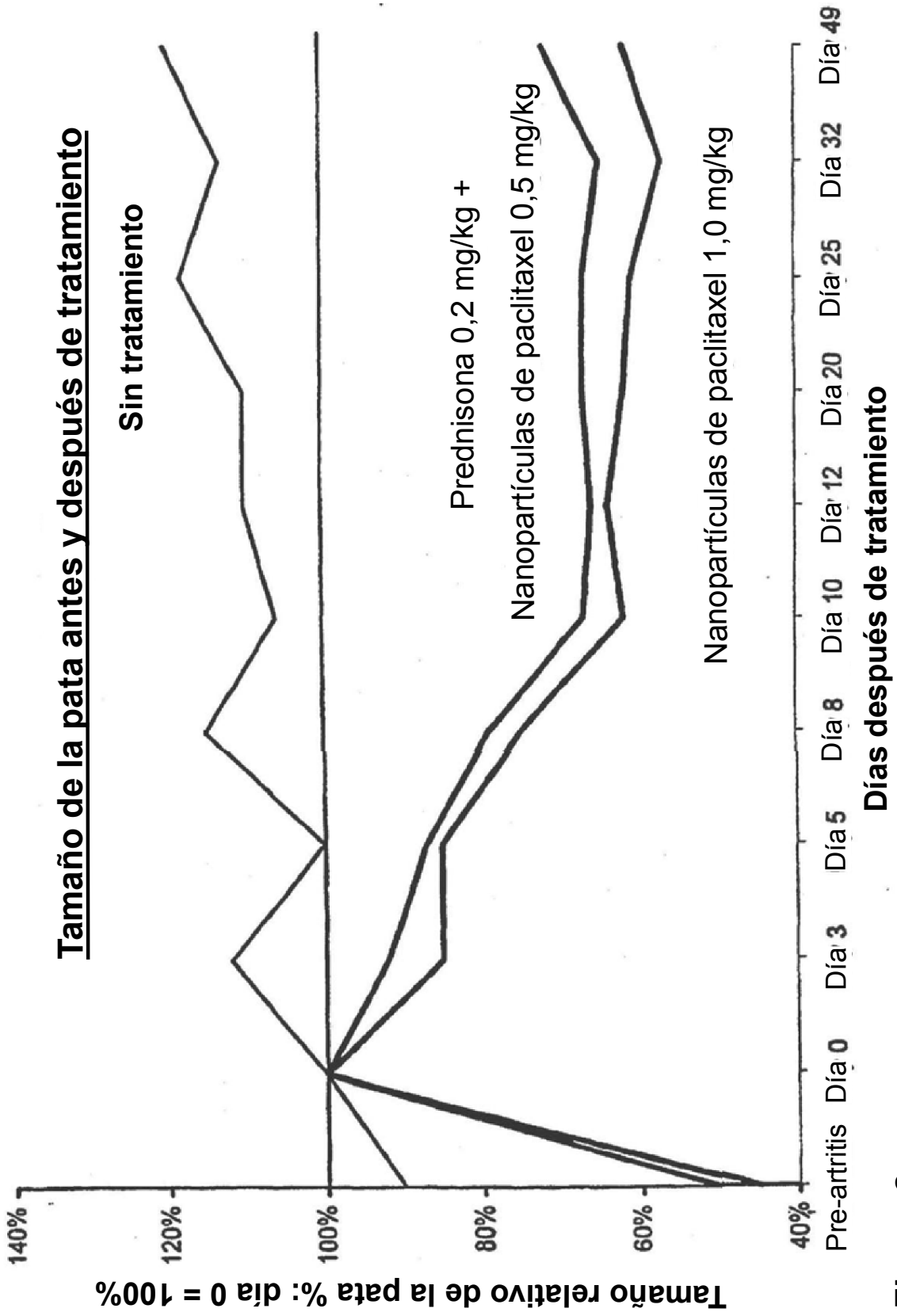


Figura 1



**Figura 2**



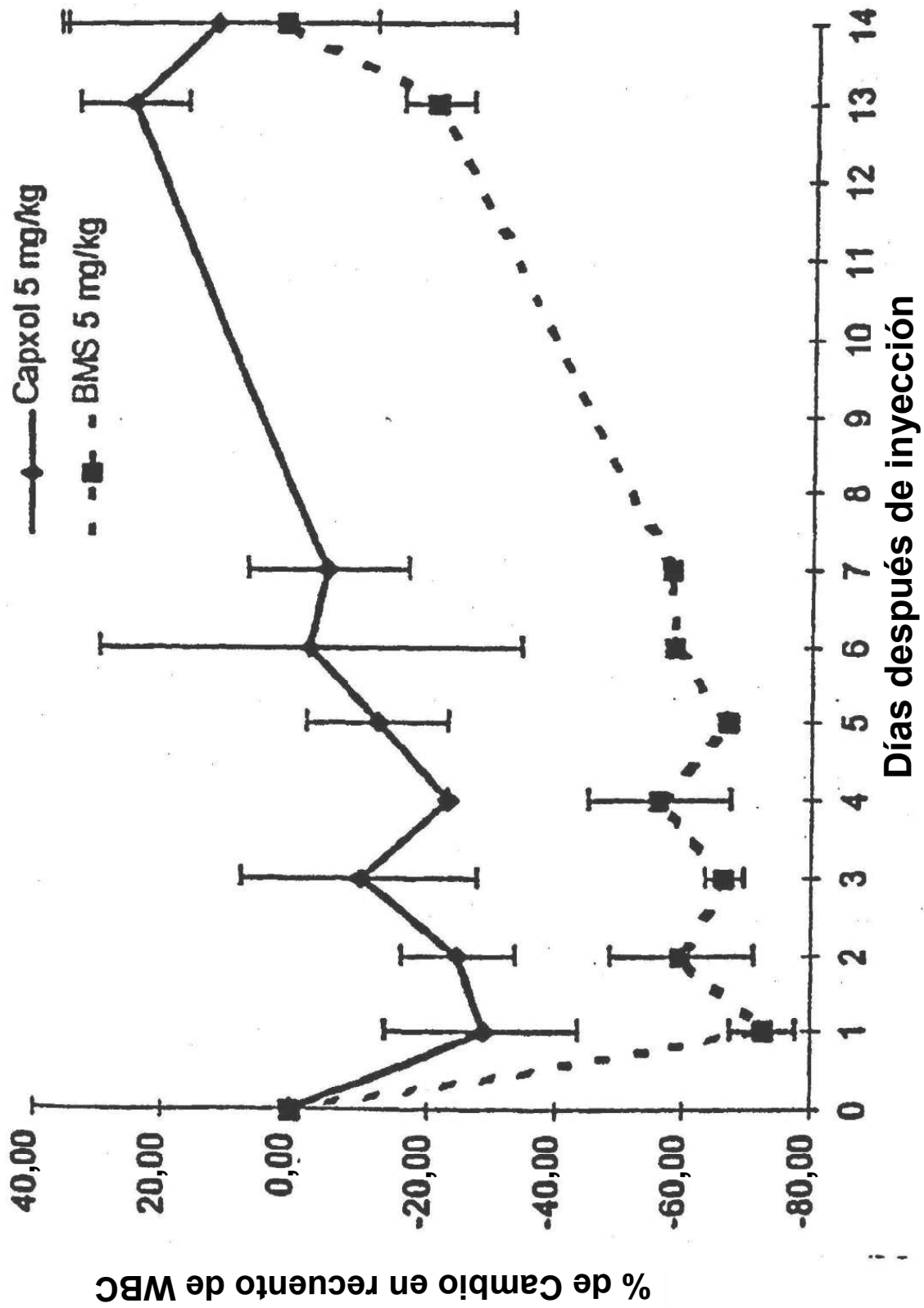
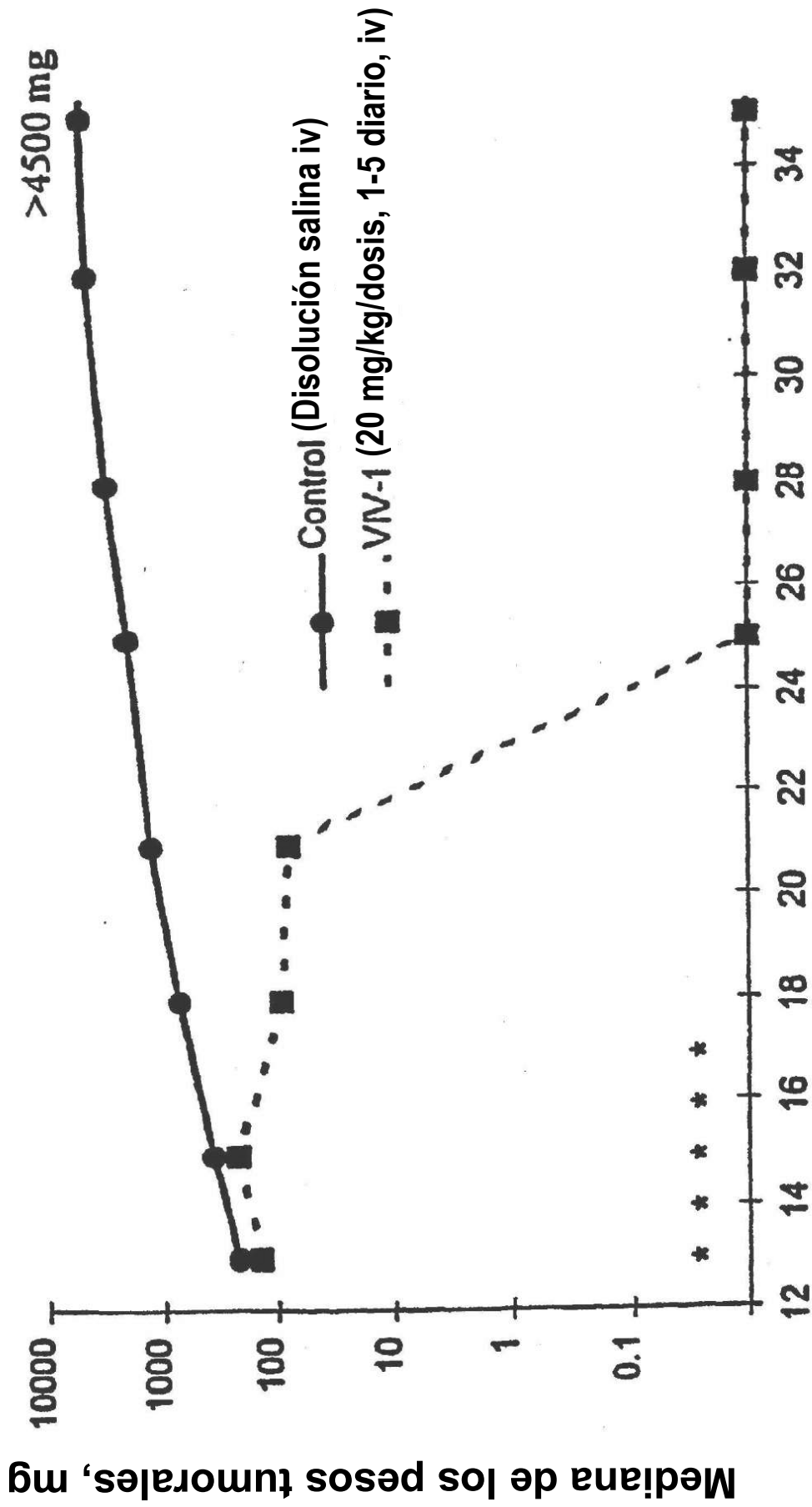


Figura 3



Días después del implante

Figura 4