

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 339**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 9/20** (2006.01)

**A61K 38/28** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 9/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2011 E 11726032 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2579844**

54 Título: **Sistemas de administración de película de nanopartículas**

30 Prioridad:

**10.06.2010 US 353366 P**

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

**10.05.2016**

73 Titular/es:

**MIDATECH LTD. (50.0%)  
65 Innovation Drive, Milton Park  
Abingdon, Oxfordshire OX14 4RQ, GB y  
MONOSOL RX, LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RADEMACHER, THOMAS;  
MOUS, JAN;  
BARRY, JUSTIN;  
WILLIAMS, PHILLIP;  
GARCÍA BARRIENTOS, ÁFRICA;  
SCHOBEL, ALEXANDER M.;  
MYERS, GARRY L. y  
KENDALL, KEITH, J**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 569 339 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**

Sistemas de administración de película de nanopartículas

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a sistemas de administración de película que comprenden nanopartículas, particularmente para su uso en medicina, e incluye métodos y sistemas para el tratamiento de trastornos de la regulación de la glucosa en sangre.

10

**Antecedentes a la invención**

La presente invención se refiere a composiciones, sistemas de administración, productos y métodos de preparación y administración de tales composiciones, sistemas de administración y productos hechos a partir de las mismas, para el tratamiento de mamíferos y particularmente seres humanos.

15

La administración de ciertos productos farmacéuticos, agentes biológicamente activos, cosmeceúticos, nutracéuticos y otros principios activos usando película se describe en las patentes de EE.UU. 7.357.891, 7.425.292 y 7.666.337, entre otras. Sin embargo, las películas que están previstas para ingestión no son particularmente adecuadas para principios activos que se destruyen, inactivan en el tracto GI, o simplemente no son bien absorbidos mediante tal administración. Muchos agentes biológicos, tales como la insulina, son particularmente susceptibles a la destrucción cuando se ingieren y así normalmente se administran mediante inyección.

20

Existe la necesidad de un sistema de administración de película que venza las dificultades asociadas a la administración oral del principio activo al aparato circulatorio sin exposición al tubo gastrointestinal. Más particularmente, hay necesidad de vencer las dificultades asociadas a la administración oral eficaz de biológicos, tales como ciertos péptidos, mediante, por ejemplo, administración por vía oral.

25

**Breve descripción de la invención**

30

La presente invención vence las dificultades anteriormente mencionadas proporcionando un sistema de administración de película que facilita el transporte vectorial del componente que lleva el principio activo, mediante, por ejemplo, administración por vía oral, permitiendo así que el componente que lleva el principio activo sea administrado al aparato circulatorio sin exposición al tubo gastrointestinal del paciente. La presente invención también trata el problema de proporcionar un componente que lleva el principio activo adecuado para la administración de principios activos tales como péptidos, es decir, un componente que esté ligado a, unido a, asociado a o acoplado de otro modo a un principio activo.

35

La presente invención proporciona un sistema de administración de película particularmente útil para, aunque no se limita a, administración oral. En particular, este sistema de administración de película de la presente invención, aunque no se limita a un uso particular, es especialmente muy apto para tejido bucal, sublingual, y otro tejido mucoso, además de uso en tejido de órgano. Los productos de película hechos a partir del sistema de administración incorporan polímeros solubles en agua y/o hinchables en agua que forman al menos una matriz, deseablemente junto con un disolvente adecuado, y adicionalmente incorporan nanopartículas que, como se describe en el presente documento, incluyen un núcleo de metal, una corona de ligandos y un principio activo unido a uno o más ligandos. Este sistema de administración es especialmente útil para la administración de principios activos que no son muy adecuados para la administración a través del tracto GI.

40

45

En un aspecto de la invención se proporciona un sistema de administración de película terapéutico o bioeficaz que incluye:

50

(a) una o más matrices de película que incluyen al menos un polímero;

(b) una pluralidad de nanopartículas incorporadas en al menos una de dichas matrices de película, incluyendo dichas nanopartículas:

55

(i) un núcleo que incluye un metal; y

(ii) una corona que incluye una pluralidad de ligandos ligados covalentemente al núcleo, en la que al menos uno de dichos ligandos incluye un resto de hidrato de carbono; y

60

(iii) en el que al menos un péptido está unido a la corona.

En otro aspecto de la invención se proporciona un sistema de administración de película que contiene insulina que incluye:

65

(a) una o más matrices de película que incluyen al menos un polímero;

(b) una pluralidad de nanopartículas incorporadas en al menos una de dichas matrices de película, incluyendo

dichas nanopartículas:

- (i) un núcleo que incluye un oro;
- (ii) una pluralidad de ligandos covalentemente unidos al núcleo y que forman una corona alrededor del núcleo, en el que los ligandos comprenden 2'-tioetil- $\alpha$ -D-galactopiranosido y 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol cada uno unido al núcleo mediante sus átomos de azufre respectivos, y en el que las nanopartículas tienen un promedio de al menos cinco monómeros de insulina unidos por núcleo de nanopartícula.

10 En otro aspecto más de la invención se proporciona un proceso de preparación de una película que tiene una distribución sustancialmente uniforme de componentes, que incluye las etapas de:

(a) formar una matriz de polímero capaz de fluir que incluye un polímero soluble en agua o hinchable en agua, un disolvente y un componente que lleva el principio activo, incluyendo dicho componente que lleva el principio activo una pluralidad de nanopartículas que incluyen:

- (i) un núcleo que incluye un metal;
- (ii) una corona que incluye una pluralidad de ligandos ligados covalentemente al núcleo, en la que al menos uno de dichos ligandos comprende un resto de hidrato de carbono; y
- (iii) un péptido unido a la corona;

teniendo dicha matriz una distribución uniforme de dicho componente que lleva el activo;

(b) colar dicha matriz de polímero capaz de fluir;

(c) evaporar al menos una porción de dicho disolvente de dicha matriz de polímero capaz de fluir para formar una película viscoelástica en el plazo de aproximadamente 10 minutos o menos para mantener dicha distribución uniforme de dicho componente que lleva el principio activo encerrando o previniendo sustancialmente la migración de dicho componente que lleva el principio activo dentro de dicha película viscoelástica; y

(d) formar una película resultante de dicha película viscoelástica, en el que dicha película resultante tiene un contenido de agua del 10 % o menos y dicha distribución uniforme de componente que lleva el principio activo se mantiene por dicho cierre o previniendo sustancialmente la migración de dicho componente que lleva el principio activo. Puede añadirse otra etapa para formar capas de película adicionales dispuestas sobre la capa inicial.

En otro aspecto adicional de la invención se proporciona un proceso de preparación de una película que tiene una distribución sustancialmente uniforme de componentes, que incluye las etapas de:

(a) formar una premezcla de mezcla madre que incluye un disolvente y un polímero seleccionado del grupo de polímeros solubles en agua, polímeros hinchables en agua y combinaciones de los mismos;

(b) añadir un componente que lleva el principio activo a una cantidad predeterminada de dicha premezcla de mezcla madre para formar una matriz de polímero capaz de fluir, incluyendo dicho componente que lleva el principio activo una pluralidad de nanopartículas que incluyen:

- (i) un núcleo que incluye un metal;
- (ii) una corona que incluye una pluralidad de ligandos ligados covalentemente al núcleo, en la que al menos uno de dichos ligandos incluye un resto de hidrato de carbono; y
- (iii) un péptido unido a la corona; teniendo dicha matriz una distribución uniforme de dicho componente que lleva el activo;

(c) colar dicha matriz de polímero capaz de fluir;

(d) evaporar al menos una porción de dicho disolvente de dicha matriz de polímero capaz de fluir para formar una película viscoelástica en el plazo de aproximadamente 10 minutos o menos para mantener dicha distribución uniforme de dicho componente que lleva el principio activo encerrando o previniendo sustancialmente la migración de dicho componente que lleva el principio activo dentro de dicha película viscoelástica; y

(e) formar una película resultante de dicha película viscoelástica, en el que dicha película resultante tiene un contenido de agua del 10 % o menos y dicha distribución uniforme de componente que lleva el principio activo se mantiene por dicho cierre o previniendo sustancialmente la migración de dicho componente que lleva el principio activo.

En otro aspecto más de la invención se proporciona un artículo de fabricación que incluye al menos una película que incluye:

(a) una o más matrices de película que incluyen al menos un polímero;

(b) una pluralidad de nanopartículas incorporadas en al menos una de dichas matrices de película, incluyendo dichas nanopartículas:

- (i) un núcleo que incluye un metal;

- (ii) una corona que incluye una pluralidad de ligandos ligados covalentemente al núcleo, en la que al menos uno de dichos ligandos incluye un resto de hidrato de carbono; y
- (iii) un péptido unido a la corona; y

5 dicha al menos una película tiene un contenido de agua de aproximadamente el 10 % o menos en peso de la al menos una película y una varianza por unidad de volumen de la pluralidad de nanopartículas o contenido de péptido por unidad de volumen de no superior a aproximadamente el 10 % o menos en peso de la al menos una película.

Adicionalmente se proporciona un artículo de fabricación que incluye:

10 al menos un sistema de administración de película como se define en una cualquiera de las realizaciones inventivas en el presente documento;  
un recipiente para alojar el al menos un sistema de administración de película de película; y  
15 opcionalmente, un prospecto y/o una etiqueta.

La presente invención incluye la combinación de los aspectos y características preferidas descritas, excepto cuando una combinación tal sea claramente no permisible o se establezca que se evite explícitamente. Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se describen en más detalle más adelante y con referencia a los ejemplos y figuras adjuntos.

### 20 Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 9:1 de GlcC2:GlcNAc "*NP-GlcC2 (9) GlcNAc(1)*";

25 la **Figura 2** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 4:1 de GlcC2:GlcNAc "*NP-GlcC2 (4) GlcNAc(1)*";

30 la **Figura 3** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcC2:GlcNAc "*NP-GlcC2 (1) GlcNAc(1)*";

la **Figura 4** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:9 de GlcC2:GlcNAc "*NP-GlcC2 (1) GlcNAc(9)*";

35 la **Figura 5** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcC2:alfa-Gal "*NP-GlcC2 (1) alfa-Gal (1)*";

la **Figura 6** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de betaGlcC2:EG6NH2 "*NP-betaGlcC2 (1) EG6NH2 (1)*";

40 la **Figura 7** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcNHAc:EG6NH2 "*NP-GlcNHAc(1)EG6NH2(1)*";

45 la **Figura 8** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de alfa-Glc:EG6NH2 "*NP-alfa-Glc(1)EG6NH2(1)*";

la **Figura 9** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos de alfa-Glc "*NP-alfa-Glc*";

50 la **Figura 10** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcC2:GlcNH<sub>2</sub> "*NP-GlcC2(1)GlcNH<sub>2</sub>(1)*";

55 la **Figura 11** muestra una representación esquemática de nanopartículas que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de alfa-Gal:EG6NH2 "*NP-alfa-Gal(1)EG6NH2(1)*". En ciertos ejemplos, las nanopartículas NP-alfa-Gal(1)EG6NH2(1) se denominan en el presente documento el lote NP10;

la **Figura 12** muestra curvas de unión de insulina de insulina humana unida (en nmoles) por cantidad de oro (en nmoles) para 11 composiciones coronales de nanopartícula diferentes;

60 la **Figura 13** muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas NP-alfa-Gal(1)EG6NH2(1) {lote n.º NP10};

la **Figura 14** muestra gráficos de la distribución de tamaño determinados por dispersión de luz dinámica (DLS) para MI-NP-10 amina-gal (es decir, nanopartículas de NP-alfa-Gal(1)EG6NH2(1)) por, **A**) número y **B**) volumen;

65 la **Figura 15** muestra gráficos de la distribución de tamaño determinados por dispersión de luz dinámica (DLS)

para MI-NP-10 amina-gal unidas a insulina (es decir, nanopartículas de NP-alfa-Gal(1)EG6NH2(1)) por **A**) número y **B**) volumen;

5 la **Figura 16** muestra datos del análisis termogravimétrico (TGA) experimental para nanopartículas de  $\alpha$ -galactosa-EG-amina-Au con picos de temperatura indicados {lote n.º NP10};

10 la **Figura 17** muestra una gráfica de insulina unida a nanopartículas de oro, en la que los diamantes indican nanopartículas en ausencia de cinc, los triángulos indican nanopartículas sintetizadas en presencia de 1,33 equivalentes de cinc y los círculos indican nanopartículas sintetizadas en ausencia de cinc a las que se han añadido 1,33 equivalentes de cinc post-síntesis;

la **Figura 18** muestra la unión de GLP-1 a nanopartículas de oro a cantidades variables de nanopartículas de oro;

15 la **Figura 19** muestra un trazo de MALDI que muestra GLP-1 e insulina de una preparación de nanopartículas que comprende tanto GLP-1 como insulina;

la **Figura 20** muestra un trazo de HPLC que muestra GLP-1 e insulina de una preparación de nanopartículas que comprende tanto GLP-1 como insulina;

20 la **Figura 21** muestra gráficos de cantidad de insulina humana en  $\mu\text{g}$  recuperada de tiras de polímero a las temperaturas de fabricación 60 °C, 80 °C y 100 °C en comparación con un blanco (se indican barras de error);

25 la **Figura 22** muestra gráficos de niveles de glucosa en sangre en ratones diabéticos post-inyección para las muestras inyectadas y controles indicados;

la **Figura 23** muestra **A**) gráficos de niveles de péptido C con el tiempo para el minicerdo 1 de control tras la administración de agua (círculos) y de tira de blanco (cuadrados), **B**) gráficos de niveles de péptido C con el tiempo para el minicerdo 2 tras la administración subcutánea (círculos) y transbucal (cuadrados) de muestra;

30 la **Figura 24** muestra representaciones de glucosa en sangre con el tiempo tras la administración subcutánea (izquierda) y transbucal (derecha) para **A**) minicerdo 1 frente a 2. **B**) Minicerdo 1 frente a 3 y **C**) minicerdo 1 frente a 4, en las que los gráficos se promediaron para dos experimentos;

35 la **Figura 25** muestra gráficos de insulina medida **A**) muestra niveles de insulina  $\mu\text{U/ml}$  para el minicerdo 1 de control durante el experimento de insulina subcutánea y el experimento de insulina transbucal usando agua y control de tira de blanco; **B**) muestra los datos de niveles de insulina del día 0,  $\mu\text{U/ml}$ , presentes en los minicerdos 2, 3 y 4 después de la inyección de 2,5 UI de insulina humana corregidos para cambios en los niveles de referencia mostrados en A) (minicerdo 1 sc) se representaron desde el momento de 5 min en adelante; **C**) muestra los datos de niveles de insulina del día 7,  $\mu\text{U/ml}$ , presentes en los minicerdos 2, 3 y 4 después de la administración transbucal de 5 UI de tiras de insulina humana corregidos para cambios en los niveles de referencia de la insulina mostrada en A) (minicerdo 1 tb);

#### Descripción detallada de la invención

45 En la descripción de la presente invención se emplearán los siguientes términos, y pretenden definirse como se indica a continuación.

50 Como se usa en el presente documento, "nanopartícula" se refiere a una partícula que tiene una escala nanométrica, y no pretende expresar ninguna limitación de forma específica. En particular, "nanopartícula" engloba nanoesferas, nanotubos, nanocajas, nanoagrupaciones, nanovarillas y similares. En ciertas realizaciones, las nanopartículas y/o núcleos de nanopartícula contemplados en el presente documento tienen una geometría generalmente poliédrica o esférica.

55 Las nanopartículas que comprenden una pluralidad de ligandos que contienen hidrato de carbono se han descrito en, por ejemplo, los documentos WO 2002/032404, WO 2004/108165, WO 2005/116226, WO 2006/037979, WO 2007/015105, WO 2007/122388, WO 2005/091704 (cuyos contenidos enteros de cada uno se incorporan explícitamente en el presente documento por referencia) y tales nanopartículas pueden encontrar uso según la presente invención. Además, las nanopartículas recubiertas de oro que comprenden un núcleo magnético de ferritas de óxido de hierro (que tienen la fórmula  $X\text{Fe}_2\text{O}_4$ , en la que X = Fe, Mn o Co) funcionalizadas con compuestos orgánicos (por ejemplo, mediante un enlace tiol-oro) se describen en la solicitud de patente europea sin publicar N.º EP09382185.8 presentada el 25 de septiembre de 2009 (cuyo contenido entero se incorpora explícitamente en el presente documento por referencia) y se contemplan específicamente para su uso como nanopartículas/núcleos de nanopartícula según la presente invención.

65 Como se usa en el presente documento, "corona" se refiere a una capa o recubrimiento, que puede cubrir parcialmente o completamente la superficie expuesta del núcleo de nanopartícula. La corona incluye una pluralidad

de ligandos que incluyen al menos un resto de hidrato de carbono. Así, la corona puede considerarse que es una fase orgánica que rodea o rodea parcialmente el núcleo metálico. En ciertas realizaciones, la corona proporciona y/o participa en pasivar el núcleo de la nanopartícula. Así, en ciertos casos, la corona puede incluir una capa de recubrimiento suficientemente completa para estabilizar sustancialmente el núcleo que contiene metal. Sin embargo, se contempla específicamente en el presente documento que ciertas nanopartículas que tienen núcleos, por ejemplo, que incluyen un núcleo interno que contiene óxido metálico recubierto con un metal noble, puedan incluir una corona que solo recubre parcialmente la superficie del núcleo.

Como se usa en el presente documento, "péptido" pretende englobar cualquier secuencia de aminoácidos y específicamente incluye péptidos, polipéptidos, proteínas (incluyendo proteínas que tienen estructura secundaria, terciaria y/o cuaternaria) y fragmentos de los mismos. La expresión "péptido unido a" pretende englobar específicamente una parte de (pero puede incluir toda) la secuencia de aminoácidos del péptido que forma una interacción de unión con una o más partes (tales como un grupo químico o resto) de uno o más de la pluralidad de ligandos de la nanopartícula. En ciertas realizaciones, el péptido puede tener un peso molecular de < 500 kDa, < 100 kDa, < 50 kDa, tal como hasta 20 kDa.

Como se usa en el presente documento, los términos "componente que lleva el activo" o "componente que contiene el activo" se usan indistintamente y pretenden englobar un componente que está ligado a, acoplado a, unido a o de otro modo íntimamente asociado a, tanto físicamente y/o químicamente, un principio activo, y particularmente un agente farmacéutico o biológico, con el fin de administrar el principio activo al paciente.

El término "película" incluye sistemas de administración de cualquier espesor, que incluye películas, hojas, discos, obleas y similares, en cualquier forma, que incluye forma rectangular, cuadrada, u otra deseada. La película puede estar en forma de un rollo continuo de película o puede dimensionarse a una longitud y anchura deseadas. Las películas descritas en el presente documento pueden tener cualquier espesor y tamaño deseados adecuados para el uso previsto. Por ejemplo, una película de la presente invención puede dimensionarse de forma que pueda colocarse en la cavidad bucal del usuario o adherirse al tejido mucoso o de órgano. Por ejemplo, algunas películas pueden tener un espesor relativamente delgado de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 milésimas de pulgada, mientras que otras pueden tener un espesor algo más grueso de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 milésimas de pulgada. Para algunas películas, el espesor puede ser incluso mayor, es decir, superior a aproximadamente 30 milésimas de pulgada. Se entenderá, por supuesto, que el espesor de la película puede limitarse debido a la formulación usada, y películas más gruesas pueden requerir tiempos de secado más largos o técnicas de fabricación diferentes.

Además, películas más gruesas pueden formarse deseablemente mediante laminación de películas más delgadas. Además, el término "película" incluye composiciones de una sola capa, además de composiciones multi-capa, tales como películas laminadas, recubrimientos sobre películas y similares. Por ejemplo, dos o más películas pueden formarse por separado y luego laminarse juntas usando, por ejemplo, calor y/o disolvente para formar una película más gruesa. Adicionalmente, puede prepararse múltiples capas de película recubriendo una primera película con capas de película adicionales, sin necesariamente la necesidad de etapas de laminación. Pueden añadirse múltiples capas de película para formar estructuras de diversos espesores y también para permitir diferentes funciones y propiedades de las diferentes capas. La composición, independientemente del espesor, mantiene una distribución uniforme de componentes a través de la aplicación de secado controlado de la película para proporcionar una película final que en su forma seca tiene uniformidad del componente que lleva el principio activo a lo largo de toda la película, como se describe en el presente documento. Las películas de la presente invención no variarán en el contenido de componente que lleva el principio activo más del 10 % en peso en cualquier volumen de película dado. Por ejemplo, dosis unitarias de tamaños iguales o aleatorios contendrán sustancialmente la misma cantidad en peso de componente que lleva el principio activo, con no más de una variación del 10 % en peso entre las dosis. Las estructuras de película de la presente invención también pueden incluir una bolsa o región de fármaco entre dos películas.

Las nanopartículas descritas en el presente documento pueden dispersarse a través de toda la película, o pueden depositarse sobre una o más superficies de la película. En cualquier caso, la cantidad de nanopartículas por unidad de área es deseablemente sustancialmente uniforme a través de toda la película. Se desea que las películas de la presente invención incluyan una uniformidad de distribución de componente a través de todo el volumen de una película dada. Tal uniformidad incluye una cantidad sustancialmente uniforme de nanopartículas por unidad de volumen de la película y/o una cantidad sustancialmente uniforme de principio activo farmacéutico o biológico (por ejemplo, un péptido) asociado a las nanopartículas por unidad de volumen de la película, si las nanopartículas están dentro de la matriz de la película o recubiertas, laminadas, depositadas o estabilizadas sobre una o más superficies de la misma. Cuando tales películas se cortan en unidades individuales, la cantidad de nanopartículas en la unidad puede conocerse con una gran exactitud.

La uniformidad de los componentes a través de toda la película, es decir, la uniformidad del contenido, es beneficiosa en administrar una dosis exacta y eficaz a un usuario. Pueden usarse diversos métodos de formación de películas uniformes, además de diversos aditivos y cargas, que incluyen aquellos métodos y materiales descritos en las patentes de EE.UU. N.º 7.425.292, 7.357.891 y 7.666.337, que se incorporan en el presente documento por

referencia en sus totalidades. En algunas realizaciones particularmente deseables, la cantidad de componente que lleva el principio activo, o la cantidad de principio activo de por sí, por unidad de volumen, no varía más de aproximadamente el 10 %, como se trata anteriormente. Así, puede prepararse una gran hoja de película y cortar a partir de la misma unidades de dosificación de igual tamaño y la cantidad de componente que lleva el principio activo o principio activo de por sí en cada unidad de dosificación no variará más del 10 % en peso entre unidades.

Por consiguiente, en un aspecto la presente invención proporciona un sistema de administración de película terapéutico o bioeficaz que incluye:

- 10 (a) una o más matrices de película que incluyen al menos un polímero;
- (b) una pluralidad de nanopartículas incorporadas en al menos una de dichas matrices de película, incluyendo dichas nanopartículas:
- 15 (i) un núcleo que incluye un metal;
- (ii) una corona que incluye una pluralidad de ligandos ligados covalentemente al núcleo, en la que al menos uno de dichos ligandos incluye un resto de hidrato de carbono; y
- (iii) al menos un péptido unido a la corona.

20 El término "unido" pretende incluir una asociación física y/o química entre dos componentes. Este término incluye cualquier forma de enlace químico, por ejemplo, enlace covalente, iónico, de hidrógeno o fuerzas intermoleculares, tales como fuerzas de van der Waals o fuerzas electrostáticas. El término incluye acoplamiento o enlace físico. Esta asociación física y o química puede ser prevista para ser reversible, es decir, el componente puede separarse o disociarse, el uno del otro, por ejemplo, para liberar el componente activo del componente de soporte.

25 El término "membrana mucosa" o "tejido mucoso" se indica para incluir, sin limitación, el revestimiento de membrana que tienen todos los conductos del cuerpo que comunican con el exterior, tales como las vías respiratorias, tracto genitourinario y tubo digestivo, y que tienen células y glándulas asociadas que secretan moco. El término "tejido de órgano" pretende incluir cualquier agrupación de tejidos que forman una estructura y función distinta en un animal o cuerpo humano, excluyendo la capa de epidermis más externa de la piel. Por ejemplo, el corazón, riñón e hígado son ejemplos de tejido de órgano.

Uno o más péptidos pueden estar reversiblemente unidos a la corona.

35 En particular se contempla específicamente que el péptido pueda unirse a una parte de la nanopartícula no covalentemente. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, actualmente se cree que un péptido puede participar en una o más interacciones de unión reversibles con uno o más ligandos que proporcionan la corona de la nanopartícula. En particular, una porción de la secuencia de aminoácidos puede participar en enlace de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y/o interacciones electrostáticas con uno o más ligandos (por ejemplo, interactuar con uno o más grupos funcionales de un ligando expuesto). La unión del péptido puede implicar adsorción, absorción u otra interacción directa o indirecta con uno o más ligandos de la nanopartícula.

40 Como se describe en el presente documento con referencia a ciertas realizaciones de la presente invención, uno o más péptidos pueden unirse de forma que al menos una fracción o porción del péptido unido se libere de la nanopartícula tras poner en contacto la nanopartícula con una solución fisiológica. Como se describe en el presente documento, el péptido puede unirse a la nanopartícula de un modo tal que el péptido se estabilice (por ejemplo, termoestabilice) mientras esté unido, pero pueda liberarse y esté disponible en una forma que sea biológicamente activa (por ejemplo, puede liberarse de forma que el péptido sea detectable por ELISA y/o capaz de ejercer al menos una acción biológica en un sistema *in vitro* o *in vivo* que es característico del péptido libre). En particular, cuando el péptido incluye insulina (humana), el péptido puede unirse a la nanopartícula de forma que una suspensión de las nanopartículas unidas a insulina dé un resultado en un ELISA para insulina (humana) y/o ejerza un efecto sobre niveles de glucosa en sangre en un sujeto mamífero tras la administración al mismo.

55 Se contemplan varias cinéticas de liberación para la disociación de molécula(s) de péptido unidas de la nanopartícula, que incluyen liberación bi- o multi-fásica (tal como una liberación rápida inicial seguida de una fase de liberación posterior más lenta). Por ejemplo, la liberación puede incluir disociación de moléculas de péptido unidas de la nanopartícula rápidamente en el plazo de segundos o minutos, seguido de liberación sostenida adicional durante un periodo de al menos 2, 4, 6, 8 o más horas. Tal cinética de liberación puede ser ventajosa en ciertas circunstancias, por ejemplo, si se desea acción sostenida, en comparación con, por ejemplo, una inyección de péptido libre.

60 El péptido (incluyendo sin limitación polipéptido, proteína, o fragmento de los mismos) puede seleccionarse del grupo que consiste en: insulina, GLP-1, IGF1, IGF2, relaxina, INSL5, INSL6, INSL7, polipéptido pancreático (PP), péptido tirosina tirosina (PTT), neuropéptido Y, oxitocina, vasopresina, GnRH, TRH, CRH, GHRH/somatostatina, FSH, LH, TSH, CGA, prolactina, CIIP, ACTH, MSH, endorfinas, lipotropina, GH, calcitonina, PTH, inhibina, relaxina, hCG, HPL, glucagones, somatostatina, melatonina, timosina, timulina, gastrina, grelina, timopoyetina, CCK, secretina de GIP, motina VIP, enteroglucagón, leptina, adiponectina, resistina, osteocalcina, renina, EPO, calcitrol, ANP, BNP,

quimiocinas, citocinas, adipocinas y análogos biológicamente activos de los mismos. En ciertas realizaciones, el péptido es capaz de estimular una reducción en los niveles de glucosa en sangre en un sujeto mamífero. Así, en algunos casos según la presente invención, el péptido puede incluir insulina humana monómera y/o dímera. Además, el al menos un péptido puede comprender una combinación de dos o más péptidos especificados anteriormente, por ejemplo, insulina y GLP-1.

En ciertos casos según la presente invención puede haber al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10 o más moléculas de péptido unidas por núcleo en promedio. Puede ser un tipo individual de péptido o dos o más péptidos diferentes. Si una combinación de dos péptidos diferentes está unida a una nanopartícula, los péptidos diferentes pueden estar presentes en algunos casos en una relación de 1:10 a 10:1, tal como 1:2 a 2:1. Así, se contemplan específicamente combinaciones complementarias de péptidos que se administran ventajosamente.

Como se usa en el presente documento, el término "hidrato de carbono" pretende incluir compuestos de la fórmula general  $C_n(H_2O)_m$  en la que  $n = m$  y  $n$  es mayor que 3. Por tanto, incluidos dentro de la definición de hidrato de carbono están análogos / miméticos de hidrato de carbono que no están incluidos en la fórmula general  $C_n(H_2O)_m$ . Los análogos / miméticos de hidrato de carbono incluyen, pero no se limitan a, pseudo-azúcares (carba-azúcares), amino-azúcares, imino-azúcares e inositoles. Los amino-azúcares incluyen piperidinas polihidroxiladas, pirrolidinas, pirrolizidinas e indolizidinas.

Como se describe en el presente documento, la nanopartícula según la presente invención incluye una pluralidad de ligandos ligados covalentemente a un núcleo que contiene metal. Los ligandos pueden ser iguales o diferentes. En realizaciones particulares, la pluralidad de ligandos puede incluir una primera clase de ligandos que incluyen al menos un resto de hidrato de carbono y una segunda clase de ligandos no de hidrato de carbono. Como se usa en el presente documento, el al menos un ligando que incluye resto de hidrato de carbono generalmente incluirá uno o más grupos azúcar, tales como un monosacárido, un disacárido y/o un polisacárido, y/o uno o más grupos pseudo-azúcar (tales como pseudo-azúcar seleccionado de: un carba-azúcar, un amino-azúcar, un imino-azúcar, un inositol, una piperidina polihidroxilada, una pirrolidina, una pirrolizidina y una indolizidina). Los ligandos están ligados covalentemente al núcleo de la nanopartícula. Por tanto, debe entenderse que el término "resto de hidrato de carbono" incluye derivados químicos de hidratos de carbono tales como glucósidos en los que el ligando incluye un grupo azúcar o grupo pseudo-azúcar (tal como pseudo-azúcar seleccionado de: un carba-azúcar, un amino-azúcar, imino-azúcar, un inositol, una piperidina polihidroxilada, una pirrolidina, una pirrolizidina y una indolizidina) unido a un átomo o molécula no de azúcar. En casos particulares, el ligando que incluye un resto de hidrato de carbono según la presente invención puede incluir un glucósido de galactosa, glucosa, glucosamina, N-acetilglucosamina, manosa, fucosa y/o lactosa, por ejemplo, el resto de hidrato de carbono puede incluir un galactopiranosido y/o un glucopiranosido. El ligando que contiene hidrato de carbono puede estar ligado covalentemente al núcleo mediante un conector seleccionado de conectores que contienen azufre, conectores que contienen amino y conectores que contienen fosfato. También pueden usarse combinaciones de conectores del núcleo. El conector puede incluir en algunos casos una cadena de alquilo de al menos dos carbonos.

El ligando ligado al núcleo incluye uno o más grupos hidrato de carbono (sacárido), por ejemplo, que incluyen un polisacárido, un oligosacárido o un grupo sacárido individual. El ligando también puede ser un conjugado de glicano tal como un glicolípido o una glicoproteína. Además del grupo hidrato de carbono, el ligando puede incluir adicionalmente uno o más de un grupo péptido, un dominio de proteína, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un segmento de ADN/ARN) y/o una sonda fluorescente.

En ciertos casos, las partículas pueden tener más de una especie de ligando inmovilizada sobre ellas, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 10, 20 o 100 ligandos diferentes. Alternativamente o adicionalmente pueden emplearse juntos una pluralidad de tipos diferentes de partículas.

En ciertos casos, el número medio de ligandos ligado a un núcleo metálico individual de la partícula es al menos 5, al menos 10 o al menos 20 ligandos. El número puede estar en el intervalo 10 a 10.000 tal como 10 a 1.000, más particularmente 20 a 500 o 44 a 106 ligandos por núcleo.

Preferentemente, sustancialmente todos los ligandos están unidos covalentemente al núcleo de las partículas. Se conocen en la técnica protocolos para llevar a cabo esto (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2002/032404, WO 2004/108165, WO 2005/116226, WO 2006/037979, WO 2007/015105, WO 2007/122388, WO 2005/091704). Esto puede llevarse a cabo haciendo reaccionar ligandos con grupos terminales reductores con un metal noble tal como oro bajo condiciones reductoras. Un método a modo de ejemplo de producción de las partículas emplea restos de hidrato de carbono derivatizados con tiol para acoplar los ligandos a partículas. Así, el ligando se derivatiza como un disulfuro protegido. Convenientemente, el ligando protegido por disulfuro en metanol puede añadirse a una solución acuosa de ácido tetracloroáurico. Un agente reductor preferido es el borohidruro de sodio. En ciertas realizaciones, las nanopartículas son solubles en disolventes orgánicos y en agua y soluciones fisiológicas. Los presentes inventores han encontrado que las nanopartículas como se describen en el presente documento son adecuadas para aplicaciones terapéuticas, y pueden ser no tóxicas, solubles y/o eliminarse en la orina.

En ciertos casos según la presente invención, el al menos un ligando que comprende un resto de hidrato de carbono está seleccionado del grupo de: 2'-tioetil- $\alpha$ -D-galactopiranosido, 2'-tioetil- $\beta$ -D-glucopiranosido, 2'-tioetil-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido, 5'-tiopentanol-2-desoxi-2-imidazolacetamido- $\alpha,\alpha$ -D-glucopiranosido y 2'-tioetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, y en el que dicho al menos un ligando que comprende un resto de hidrato de carbono está ligado covalentemente al núcleo mediante el azufre del tiol.

Adicionalmente o alternativamente, la pluralidad de ligandos puede incluir un grupo amina. Así, un ligando que comprende un grupo hidrato de carbono puede incluir un grupo amina (por ejemplo, como parte del hidrato de carbono, tal como una glucosamina, y/o como un grupo constituyente de una parte no de hidrato de carbono del ligando. Además, si la pluralidad de ligandos incluye al menos un ligando no de hidrato de carbono, el grupo no de hidrato de carbono puede incluir un grupo amina. El al menos un ligando no de hidrato de carbono puede incluir 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol ligado covalentemente al núcleo mediante el azufre del tiol.

Según ciertas realizaciones de la presente invención, la pluralidad de ligandos puede incluir dicho al menos un ligando que incluye un resto de hidrato de carbono y dicho al menos un ligando no de hidrato de carbono en el que dichos ligandos son diferentes y están presentes sobre la nanopartícula en una relación de 1:40 a 40:1, tal como una relación de 1:10 a 10:1, más particularmente una relación de 1:2 a 2:1.

El "núcleo" de nanopartícula incluye un metal. Núcleos adecuados se describen en, por ejemplo, los documentos WO 2002/032404, WO 2004/108165, WO 2005/116226, WO 2006/037979, WO 2007/015105, WO 2007/122388, WO 2005/091704 (los contenidos enteros de cada uno se incorporan explícitamente en el presente documento por referencia) y tales núcleos de nanopartícula pueden encontrar uso según la presente invención. Además, las nanopartículas recubiertas de oro que incluyen un núcleo magnético de ferritas de óxido de hierro (que tienen la fórmula  $XFe_2O_4$ , en la que X = Fe, Mn o Co) se describen en la solicitud de patente europea sin publicar N.º EP09382185.8 presentada el 25 de septiembre de 2009 (cuyo contenido entero se incorpora explícitamente en el presente documento por referencia) y pueden encontrar uso según la presente invención.

En algunos casos según la presente invención, el núcleo de nanopartícula incluye un metal seleccionado del grupo de: Au, Ag, Cu, Pt, Pd, Fe, Co, Gd, Zn o cualquier combinación de los mismos. El núcleo puede incluir un metal pasivo seleccionado del grupo de: Au, Ag, Pt, Pd y Cu, o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones puede emplearse una combinación específica de metales, tal como una combinación de metales seleccionados del grupo de: Au/Fe, Au/Ag, Au/Cu, Au/Ag/Cu, Au/Pt, Au/Pd, Au/Ag/Cu/Pd, Au/Gd, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd, Au/Fe/Cu/Gd.

En algunos casos según la presente invención, el núcleo de nanopartícula puede ser magnético. El núcleo puede incluir un átomo activo para RMN, tal como un metal seleccionado del grupo de:  $Mn^{2+}$ ,  $Gd^{3+}$ ,  $Eu^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $V^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  y lantánidos<sup>3+</sup>.

En algunos casos según la presente invención, el núcleo de nanopartícula puede incluir un semiconductor, tal como aquellos seleccionados del grupo de: seleniuro de cadmio, sulfuro de cadmio, telurio de cadmio y sulfuro de cinc.

En algunos casos según la presente invención, el núcleo de nanopartícula puede incluir un óxido metálico recubierto con un metal seleccionado del grupo de: Au, Ag, Cu, Pt, Pd y Zn, o cualquier combinación de los mismos. El óxido metálico puede ser ventajosamente de fórmula  $XFe_2O_4$ , en la que X es un metal seleccionado del grupo de: Fe, Mn y Co.

En algunos casos según la presente invención, el núcleo de nanopartícula puede tener un diámetro promedio en el intervalo de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 50 nm, tal como aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10 nm, más específicamente aproximadamente 1,5 nm a aproximadamente 2 nm.

Según la presente invención, dicho al menos un péptido puede comprender al menos dos, tres, cuatro, cinco o más especies diferentes de péptido. En particular, la nanopartícula puede comprender insulina y GLP-1 unidos a la corona de la misma nanopartícula. La presencia de más de una especie de péptido unido a la nanopartícula puede preferirse en ciertos ámbitos (por ejemplo, cierta práctica clínica) en comparación con la unión de una única especie de péptido. En particular, combinaciones de péptidos pueden ser transportadas sobre una nanopartícula de forma que los péptidos realicen funciones mutuamente beneficiosas y/o actúen de acuerdo, tal como en un modo sinérgico. La presencia de más de una especie puede usarse con el fin de tratar una o más afecciones y para una o más indicaciones terapéuticas.

La nanopartícula de la invención puede comprender un componente que tiene un estado divalente, tal como un metal o compuesto que tiene un estado divalente, o un óxido o sal del mismo. Por ejemplo, metales o complejos metálicos que tienen la capacidad de existir en un estado divalente son particularmente útiles. Un componente tal puede estar en el estado divalente como se añade o puede transformarse en un estado divalente después de la adición. Óxidos y sales del componente divalente también son útiles y pueden añadirse directamente o formarse *in situ* posterior a la adición. Entre las sales útiles del componente divalente se incluyen sales de haluro, tales como cloruro, yoduro, bromuro y fluoruro. Tales componentes divalentes pueden incluir, por ejemplo, metales divalentes

tales como cinc, magnesio, cobre, níquel, cobalto, cadmio o calcio, y sus óxidos y sales de los mismos. El componente está deseablemente presente en una cantidad suficiente para producir un efecto estabilizante, y está deseablemente presente en una cantidad de aproximadamente 0,5 a 2,0 equivalentes con respecto al metal del núcleo (es decir, oro), u opcionalmente aproximadamente 0,75 a 1,5 equivalentes con respecto al metal del núcleo (es decir, oro).

El componente divalente puede estar presente en algunos casos en la corona de la nanopartícula. Se contempla específicamente en el presente documento que el componente divalente pueda incluirse en la nanopartícula, que incluye en la corona de la nanopartícula como resultado de la inclusión de cinc en el proceso de síntesis de la nanopartícula. Adicionalmente o alternativamente, el componente divalente puede añadirse después de la síntesis de la nanopartícula.

En algunos casos según la presente invención, el componente divalente, tal como el cinc, puede seleccionarse de:  $Zn^{2+}$  y  $ZnO$ . Por ejemplo, el cinc puede estar en forma de  $ZnCl_2$ .

### 15 **Preparación de un sistema de administración de película**

El sistema de administración de la presente invención puede ser una película como se define en el presente documento. Como se trata en el presente documento, se prepara una matriz que forma película capaz de fluir para ser uniforme en contenido según las enseñanzas de la presente invención. La uniformidad del contenido se mantiene deseablemente, ya que a la matriz capaz de fluir se le da forma de una película y se seca. El proceso de secado de la presente invención puede usar varios factores para producir uniformidad dentro de la película, mientras que se mantenga el componente activo a una temperatura segura, es decir, a temperaturas y/o condiciones en las que el principio activo no se degradará sustancialmente, o será menos potente o sustancialmente inactivo. Primero, las películas de la presente invención tienen una historia térmica extremadamente corta, normalmente solo en el orden de minutos, de manera que la exposición a temperatura total se minimiza en la medida de lo posible. Las películas se secan de forma controlada para prevenir la agregación y migración de componentes, además de prevenir la formación de calor en su interior. Las películas pueden secarse desde arriba o una combinación de secado superior e inferior. Deseablemente, la superficie superior de la película húmeda no se seca de un modo que produzca pelado antes del secado del espesor de la película al contenido final deseado de nivel de agua, que como se describirá después en el presente documento, es aproximadamente el 10 % en peso o menos de la composición de película total.

En cualquier método de secado, sin embargo, se desea formar rápidamente una masa viscoelástica inmovilizante del principio activo de la película en el plazo de los diez (10) primeros minutos a quince (15) minutos de secado, más deseablemente en el plazo de los cuatro (4) primeros a seis (6) minutos de secado y lo más deseablemente en el plazo de los cuatro (4) primeros minutos de secado para crear una distribución uniforme de dicho principio activo encerrando o previniendo sustancialmente la migración de dicho principio activo. Por ejemplo, el principio activo puede ser un componente de la pluralidad de nanopartículas citadas en el presente documento. Debido a la corta exposición al calor y el enfriamiento evaporativo, los componentes de película tales como fármaco, principios activos biológicos o volátiles sensibles permanecen inafectados por las altas temperaturas durante el proceso de secado, y partículas a pequeña escala de principio activo se mantienen en un modo no agregado. A diferencia, el pelado sobre la superficie superior atrapa moléculas de vehículo líquido de elevada energía dentro de la película, haciendo así que la temperatura dentro de la película aumente y exponiendo los componentes activos a altas temperaturas posiblemente perjudiciales.

Segundo, la mezcla térmica se produce dentro de la película debido al secado controlado y la ausencia de pelado superficial. La mezcla térmica se produce mediante corrientes de convección en la película. Como el calor se aplica a la parte inferior de la película, el líquido cerca de la parte inferior aumenta de temperatura, se expande y se vuelve menos denso. Como tal, este líquido más caliente sube y el líquido más frío toma su lugar. Mientras que sube, el líquido más caliente se mezcla con el líquido más frío y comparte energía térmica con él, es decir, transfiere calor. A medida que se repite el ciclo, la energía térmica se difunde a través de toda la película.

La robusta mezcla térmica lograda por el proceso de secado controlado de la presente invención produce difusión térmica uniforme a través de toda la película. En ausencia de tal mezcla térmica pueden desarrollarse "puntos calientes". Bolsas de calor en la película producen la formación de agregados de partículas o áreas de peligro dentro de la película y posterior no uniformidad. La formación de tales agregados o aglomeraciones es no deseable debido a que conduce a películas no uniformes en las que el principio activo puede distribuirse aleatoriamente. Tal distribución irregular puede conducir a grandes diferencias en la cantidad de principio activo por unidad de película, dosificación o volumen, que es problemático desde una perspectiva de potencia, seguridad y eficacia.

Además, la mezcla térmica ayuda a mantener una temperatura general más baja dentro de la película. Aunque las superficies de la película pueden exponerse a una temperatura por encima de la cual el principio activo se degrada, el interior de la película puede no alcanzar esa temperatura. Debido a este diferencial de temperatura, el principio activo no se degrada.

Por ejemplo, las películas de la presente invención se secan deseablemente durante diez (10) minutos o menos. El

secado de las películas a 80 °C durante diez (10) minutos produce un diferencial de temperatura entre la atmósfera y la matriz de película de aproximadamente 5 °C. Esto significa que después de diez (10) minutos de secado, la temperatura del interior de la película es 5 °C inferior a la temperatura de exposición del exterior. En muchos casos, sin embargo, tiempos de secado inferiores a diez (10) minutos son suficientes, tales como cuatro (4) a seis (6) minutos. El secado durante cuatro (4) minutos puede realizarse por un diferencial de temperatura de aproximadamente 30 °C, y el secado durante seis (6) minutos puede ir acompañado por un diferencial de aproximadamente 25 °C. Debido a tales grandes diferenciales de temperatura, las películas pueden secarse a altas temperaturas del aire eficaces sin causar que los principios activos sensibles al calor se degraden, y sin causar que la matriz alcance una temperatura a la que el principio activo se vuelve sustancialmente inestable, se degrada sustancialmente o se vuelve menos activo.

Después de la mezcla mecánica, la película puede colocarse sobre una cinta transportadora para la mezcla térmica continuada durante el proceso de secado. Al comienzo del proceso de secado, la película se calienta preferentemente desde abajo a medida que se desplaza por la cinta transportadora. El calor puede suministrarse a la película por un mecanismo de calentamiento, tal como, pero no se limita a, una secadora. A medida que se calienta la película, el vehículo líquido, o volátil, empieza a evaporarse. La mezcla térmica también se inicia a medida que el líquido más caliente sube y el líquido más frío toma su lugar. Debido a que no se forma piel sobre la superficie superior de la película, el líquido volátil continúa evaporándose y mezcla térmica continúa distribuyendo la energía térmica a través de toda la película. Una vez se ha evaporado una cantidad suficiente del líquido volátil, la mezcla térmica ha producido difusión térmica uniforme a través de toda la película. Los componentes se encierran deseablemente en una distribución uniforme a través de toda la película. Puede desearse formar un sólido viscoelástico rápidamente, por ejemplo, en el plazo de los diez (10) primeros minutos o menos, deseablemente en el plazo de los seis (6) primeros minutos o menos, y lo más deseablemente en el plazo de los 0,5 primeros minutos a cuatro (4) minutos. Aunque pueden quedar cantidades menores de vehículo líquido, es decir, agua, posterior a la formación de la película viscoelástica, la película puede secarse adicionalmente sin afectar la heterogeneidad deseada de la película, si se desea. El secado adicional forma la película final, eliminando deseablemente el disolvente del sólido viscoelástico de forma que quede menos del diez por ciento (10 %) del disolvente, y más deseablemente quede menos del ocho por ciento (8 %) de disolvente, y lo más deseablemente quede menos del seis por ciento (6 %) del disolvente en la película final.

Aunque las temperaturas del aire para el secado pueden ser aproximadamente 50 °C a aproximadamente 160 °C, las temperaturas de la matriz de película son generalmente inferiores a la temperatura de ebullición del agua en la matriz, deseablemente aproximadamente 90 °C o menos, y lo más deseablemente aproximadamente 80 °C o menos. En otras palabras, las temperaturas del aire usadas para el secado pueden ser opcionalmente superiores a las temperaturas reales que la matriz experimenta.

Además, las partículas o material particulado que contiene principio activo, por ejemplo, las nanopartículas citadas en el presente documento, pueden añadirse a la composición que forma película o material después de que la composición o material se cuele en una película. Por ejemplo, tales partículas pueden añadirse a la película antes del secado de la película. Las partículas que contienen principio activo pueden dosificarse de forma controlada a la película y disponerse sobre la película mediante una técnica adecuada, tal como mediante el uso de una racleta, que es un dispositivo que toca marginalmente o suavemente la superficie de la película y dispone de forma controlada las partículas sobre la superficie de la película. Otras técnicas adecuadas, pero no limitantes, incluyen el uso de un rodillo adicional para colocar las partículas que contienen principio activo sobre la superficie de la película, pulverizar o depositar las partículas sobre la superficie de la película, añadir las partículas que contienen principio activo por tanto extrusión por boquilla de ranura simple (aplicada para secar la película de apoyo) como doble (película de apoyo y partículas formadas simultáneamente) y similares. Las partículas que contienen principio activo pueden colocarse sobre cualquiera o ambas de las superficies de la película, es decir, las superficies de la película superior y/o inferior por técnicas de deposición. Las técnicas de deposición incluirían la capacidad para dosificar con exactitud la cantidad de partículas que contienen principio activo sobre la superficie de la película. En algunas realizaciones, las partículas que contienen principio activo pueden dispersarse en un medio fluido y la dispersión depositarse sobre la película, tal como en una capa de recubrimiento. Deseablemente, las partículas se disponen de forma segura sobre la película, tal como estando incorporadas en la película. Además, tales partículas están deseablemente no completamente encerradas o completamente incorporadas en la película, pero siguen estando expuestas a la superficie de la película, tal como en el caso en el que las partículas están parcialmente incorporadas o parcialmente encerradas.

La monitorización y control del espesor de la película también contribuye a la producción de una película uniforme proporcionando una película de espesor uniforme. El espesor de la película puede monitorizarse con calibradores tales como Gamma o Beta. Un calibrador puede acoplarse a otro calibrador al final del aparato de secado, es decir, horno o túnel de secado, para comunicar mediante bucles de retroalimentación para controlar y ajustar la abertura en el aparato de recubrimiento, produciendo el control del espesor de película uniforme. Alternativamente, el espesor de la película también puede controlarse por medición manual durante el proceso de producción para lograr el espesor deseado de la película.

Los productos de película se forman generalmente combinando un polímero apropiadamente seleccionado y

disolvente polar, además de cualquier agente o carga según se desee. Deseablemente, el contenido de disolvente de la combinación es al menos aproximadamente el 30 % en peso de la combinación total. El material formado por esta combinación se forma en una película, deseablemente por recubrimiento con rodillo, y luego se seca, deseablemente por un proceso de secado rápido y controlado para mantener la uniformidad de la película, más específicamente, una heterogeneidad uniforme no auto-agregante. La película resultante contendrá deseablemente aproximadamente el diez por ciento (10 %) en peso o menos de disolvente, más deseablemente aproximadamente el ocho por ciento (8 %) en peso o menos de disolvente, incluso más deseablemente aproximadamente el seis por ciento (6 %) en peso o menos de disolvente, y lo más deseablemente aproximadamente el dos por ciento (2 %) o menos de disolvente. El disolvente puede ser agua, un disolvente orgánico polar que incluye, pero no se limita a, etanol, isopropanol, acetona, cloruro de metileno, o cualquier combinación de los mismos.

La consideración de los parámetros anteriormente tratados, tales como, pero no se limitan a, las propiedades de reología, viscosidad, método de mezcla, método de colada y método de secado, también afecta la selección del material para los diferentes componentes de la presente invención. Además, tal consideración con selección de material apropiado proporciona las composiciones de la presente invención, que incluyen una forma de dosificación farmacéutica, biológica, bioeficaz y/o cosmética o producto de película que tiene no más de un diez por ciento (10 %) en peso de varianza de un principio activo, por ejemplo, un principio activo farmacéutico, biológico, bioeficaz y/o cosmético por unidad de volumen, o no más de un diez por ciento (10 %) de varianza en peso de un componente que lleva el principio activo (por ejemplo, nanopartículas) por unidad de volumen del producto de película. En otras palabras, la uniformidad de la presente invención se determina por la presencia de no más de un diez por ciento (10 %) en peso del componente que contiene principio activo farmacéutico, biológico, bioeficaz y/o varianza cosmética a través de toda la matriz. Deseablemente, la varianza es inferior al cinco por ciento (5 %) en peso, inferior al dos por ciento (2 %) en peso, inferior al uno por ciento (1 %) en peso, o inferior al 0,5 % en peso. En algunas realizaciones, la película o sistema de administración de película puede dividirse en películas individuales de tamaño aproximadamente igual, y la cantidad de nanopartículas (en peso) no varía más de aproximadamente el diez por ciento entre películas individuales. Deseablemente, la varianza entre las películas individuales divididas de la misma película de partida es inferior al cinco por ciento (5 %) en peso, inferior al dos por ciento (2 %) en peso, inferior al uno por ciento (1 %) en peso, o inferior al 0,5 % en peso.

### 30 **Polímeros que forman película para el sistema de administración de película**

Las unidades o dosificaciones de película de la presente invención incluyen al menos un polímero soluble en agua. Las películas también pueden incluir polímeros hinchables en agua o insolubles en agua, si se desea.

35 En algunas realizaciones, la película auto-portante incluye un polímero basado en sacárido, que es soluble en agua. Por ejemplo, el polímero basado en sacárido puede ser celulosa o un derivado de celulosa. Ejemplos específicos de polímeros solubles en agua basados en sacárido útiles incluyen, pero no se limitan a, povidex, pululano, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxietilcelulosa (HPC), hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, alginato de sodio, goma xantana, goma tragacanto, goma guar, goma de acacia, goma arábiga, almidón, gelatina, y combinaciones de los mismos.

45 En algunas realizaciones preferidas, el polímero basado en sacárido puede ser al menos un polímero celulósico, povidex, o combinaciones de los mismos. La película también puede incluir polímeros solubles en agua o insolubles en agua no basados en sacárido. Ejemplos de polímeros solubles en agua no basados en sacárido incluyen poli(óxido de etileno), polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), polietilenglicol, ácido poliacrílico, copolímero de metacrilato de metilo, copolímeros de carboxivinilo, y combinaciones de los mismos. Ejemplos específicos de polímeros insolubles en agua útiles incluyen, pero no se limitan a, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, acetato-ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y combinaciones de los mismos.

50 En algunas realizaciones preferidas adicionales, el polímero puede ser una combinación de hidroxipropilmetilcelulosa y poli(óxido de etileno). En algunas otras realizaciones preferidas, el polímero es una combinación de povidex y poli(óxido de etileno). En todavía realizaciones preferidas adicionales, el polímero es una combinación de povidex, hidroxipropilmetilcelulosa y poli(óxido de etileno).

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "polímero soluble en agua" y variantes de la misma se refieren a un polímero que es al menos parcialmente soluble en agua, y deseablemente completamente o predominantemente soluble en agua, o absorbe agua. En algunas realizaciones, la unidad de película de la presente invención es al menos parcialmente soluble cuando se expone a un agente humectante. En algunas otras realizaciones, la unidad de película inventiva es sustancialmente soluble cuando se expone a un agente humectante.

60 Los polímeros que absorben agua se denominan frecuentemente polímeros hinchables en agua. Los materiales útiles con la presente invención pueden ser solubles en agua o hinchables en agua a temperatura ambiente y otras temperaturas, tales como temperaturas que superan la temperatura ambiente. Además, los materiales pueden ser solubles en agua o hinchables en agua a presiones inferiores a la presión atmosférica. Deseablemente, los polímeros solubles en agua son solubles en agua o hinchables en agua teniendo al menos el 20 por ciento en peso de captación de agua. También son útiles polímeros hinchables en agua que tienen un veinticinco (25) por ciento o

porcentaje mayor en peso de captación de agua. Las películas o formas de dosificación de la presente invención formadas a partir de tales polímeros solubles en agua son deseablemente suficientemente solubles en agua para ser solubles tras el contacto con fluidos corporales.

5 Otros polímeros útiles para la incorporación en las películas de la presente invención incluyen polímeros biodegradables, copolímeros, polímeros de bloque y combinaciones de los mismos. Entre los polímeros útiles conocidos o clases de polímero que cumplen los criterios anteriores están: poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), polidioxanos, polioxalatos, poli( $\alpha$ -ésteres), polianhídridos, poliacetatos, policaprolactonas, poli(ortoésteres), poliaminoácidos, poliaminocarbonatos, poliuretanos, policarbonatos, poliamidas, poli(cianoacrilatos de alquilo), y mezclas y copolímeros de los mismos. Polímeros útiles adicionales incluyen estereopolímeros de ácido L- y D-láctico, copolímeros de bis(p-carboxifenoxi)propano y ácido sebácico, copolímeros de ácido sebácico, copolímeros de caprolactona, copolímeros de poli(ácido láctico)/poli(ácido glicólico)/polietilenglicol, copolímeros de poliuretano y poli(ácido láctico), copolímeros de poliuretano y poli(ácido láctico), copolímeros de  $\alpha$ -aminoácidos, copolímeros de  $\alpha$ -aminoácidos y ácido caproico, copolímeros de glutamato de  $\alpha$ -bencilo y polietilenglicol, copolímeros de succinato y poli(glicoles), polifosfaceno, polihidroxi-alcanoatos, y mezclas de los mismos. Se contemplan sistemas binarios y ternarios.

20 Otros polímeros específicos útiles incluyen aquellos comercializados bajo las marcas registradas Medisorb y Bidel. Los materiales de Medisorb se comercializan por the Dupont Company de Wilmington, Delaware, y se identifican genéricamente como un "copolímero de lactida/glicolida" que contiene "ácido propanoico, polímero de 2-hidroxi con polímero de hidroxil con ácido hidroxiacético". Cuatro de tales polímeros incluyen lactida/glicolida 100L, que se cree que es 100 % de lactida que tiene un punto de fusión dentro del intervalo de 338 °-347 °F (170 °-175 °C); lactida/glicolida 100L, que se cree que es 100 % de glicolida que tiene un punto de fusión dentro del intervalo de 437 °-455 °F (225 °-235 °C); lactida/glicolida 85/15, que se cree que es 85 % de lactida y 15 % de glicolida con un punto de fusión dentro del intervalo de 338 °-347 °F (170 °-175 °C); y lactida/glicolida 50/50, que se cree que es un copolímero de 50 % de lactida y 50 % de glicolida con un punto de fusión dentro del intervalo de 338 °-347 °F (170 °-175 °C).

30 Los materiales de Bidel representan una familia de diversos polianhídridos que se diferencian químicamente.

Aunque puede usarse varios polímeros diferentes, se desea seleccionar polímeros que proporcionen una viscosidad deseada de la mezcla antes de secarse. Por ejemplo, si el agente u otros componentes no son solubles en el disolvente seleccionado, se desea un polímero que proporcione una mayor viscosidad para ayudar en el mantenimiento de la uniformidad. Por otra parte, si los componentes son solubles en el disolvente, puede preferirse un polímero que proporcione una menor viscosidad.

40 El polímero desempeña una función importante en afectar la viscosidad de la película. La viscosidad es una propiedad de un líquido que controla la estabilidad del agente en una emulsión, un coloide o una suspensión. Generalmente, la viscosidad de la matriz variará de aproximadamente 400 cps a aproximadamente 100.000 cps, preferentemente de aproximadamente 800 cps a aproximadamente 60.000 cps, y lo más preferentemente de aproximadamente 1.000 cps a aproximadamente 40.000 cps. Deseablemente, la viscosidad de la matriz que forma película aumentará rápidamente tras iniciarse el proceso de secado.

45 La viscosidad puede ajustarse basándose en el componente de agente seleccionado y/o componente que contiene principio activo, dependiendo de los otros componentes dentro de la matriz. Por ejemplo, si el componente no es soluble dentro del disolvente seleccionado, puede seleccionarse una viscosidad apropiada para prevenir que el componente se deposite, que afectaría adversamente la uniformidad de la película resultante. La viscosidad puede ajustarse en diferentes formas. Para aumentar la viscosidad de la matriz de película, el polímero puede elegirse de un mayor peso molecular o pueden añadirse reticulantes, tales como sales de calcio, sodio y potasio. La viscosidad también puede ajustarse ajustando la temperatura o añadiendo un componente que aumenta la viscosidad. Los componentes que aumentarán la viscosidad o estabilizarán la emulsión/suspensión incluyen polímeros de mayor peso molecular y polisacáridos y gomas, que incluyen, sin limitación, alginato, carragenina, hidroxipropilmetilcelulosa, goma garrofin, goma guar, goma xantana, dextrano, goma arábica, goma gellan, y combinaciones de los mismos.

55 También se ha observado que ciertos polímeros, que cuando se usan solos generalmente requerirían un plastificante para lograr una película flexible, pueden combinarse sin un plastificante y todavía lograr películas flexibles. Por ejemplo, HPMC y HPC, cuando se usan en combinación, proporcionan una película flexible fuerte con la plasticidad y elasticidad apropiadas para fabricación y almacenamiento. No se necesita plastificante o polialcohol adicional para la flexibilidad.

65 Adicionalmente, el poli(óxido de etileno) (PEO), cuando se usa solo o en combinación con un polímero celulósico hidrófilo y/o polidextrosa, logra películas fuertes flexibles. No se necesitan plastificantes o polialcoholes adicionales para la flexibilidad. Ejemplos no limitantes de polímeros celulósicos adecuados para la combinación con PEO incluyen HPC y HPMC. PEO y HPC no tienen esencialmente temperatura de gelación, mientras que HPMC tiene una temperatura de gelación de 58-64 °C (Methocel EF disponible de Dow Chemical Co.). Además, estas películas

son suficientemente flexibles incluso cuando están sustancialmente libres de disolventes orgánicos, que pueden eliminarse sin comprometer las propiedades de la película. Los disolventes orgánicos pueden tender a plastificar la película, por lo que excluir disolventes orgánicos puede ser útil cuando este efecto sea menos deseable o vaya a controlarse por otros aditivos. Las películas basadas en PEO también presentan buena resistencia al desgarro, poco o ningún ondulado, y velocidades de disolución rápidas cuando el componente de polímero contiene niveles apropiados de PEO.

Para lograr las propiedades de película deseadas, puede variarse el nivel y/o peso molecular de PEO en el componente de polímero. El modificar el contenido de PEO afecta propiedades tales como la resistencia al desgarro, velocidad de disolución y las tendencias de adhesión. Así, un método de control de las propiedades de película es modificar el contenido de PEO. Por ejemplo, en algunas realizaciones son deseables películas de rápida disolución. Modificando el contenido del componente de polímero pueden lograrse las características de disolución deseadas.

Según la presente invención, el PEO oscila deseablemente de aproximadamente el 20 % al 100 % en peso en el componente de polímero. En algunas realizaciones, la cantidad de PEO oscila deseablemente de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 200 mg. El polímero celulósico hidrófilo y/o la povidona oscilan de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 80 % en peso, o en una relación de hasta aproximadamente 4:1 con el PEO, y deseablemente en una relación de aproximadamente 1:1.

En algunas realizaciones puede desearse variar los niveles de PEO para promover ciertas propiedades de película. Para obtener películas con alta resistencia al desgarro y velocidad de disolución rápidas, son deseables niveles de aproximadamente el 50 % o mayores de PEO en el componente de polímero. Para lograr la prevención de la adhesión, es decir, prevenir que la película se adhiera al cielo de la boca, son deseables niveles de PEO de aproximadamente el 20 % al 75 %. En algunas realizaciones, sin embargo, puede desearse la adhesión al cielo de la boca, tal como para administración a animales o niños. En tales casos pueden emplearse mayores niveles de PEO. Más específicamente, la integridad estructural y la disolución de la película pueden controlarse de forma que la película pueda adherirse a la mucosa y eliminarse fácilmente, o adherirse más firmemente y ser difícil de eliminar, dependiendo del uso previsto.

El peso molecular del PEO también puede variarse. Puede desearse PEO de alto peso molecular, tal como aproximadamente 4 millones, para aumentar la mucoadhesión de la película. Más deseablemente, el peso molecular puede oscilar de aproximadamente 100.000 a 900.000, más deseablemente de aproximadamente 100.000 a 600.000, y lo más deseablemente de aproximadamente 100.000 a 300.000. En algunas realizaciones, puede desearse combinar PEO de alto peso molecular (600.000 a 900.000) con de bajo peso molecular (100.000 a 300.000) en el componente de polímero.

Por ejemplo, pueden obtenerse ciertas propiedades de película, tales como velocidades de disolución rápidas y alta resistencia al desgarro, combinando pequeñas cantidades de PEO de alto peso molecular con mayores cantidades de PEO de menor peso molecular. Deseablemente, tales composiciones contienen aproximadamente el 60 % o niveles mayores de PEO de menor peso molecular en el componente de polímero de mezcla de PEO.

Para equilibrar las propiedades de prevención de la adhesión, velocidad de disolución rápida y buena resistencia al desgarro, composiciones de película deseables pueden incluir de aproximadamente el 50 % al 75 % de PEO de bajo peso molecular, opcionalmente combinadas con una pequeña cantidad de un PEO de mayor peso molecular, conteniendo el resto del componente de polímero un polímero celulósico hidrófilo (HPC o HPMC) y/o povidona.

En algunas realizaciones la película puede incluir poli(alcohol vinílico) (PVA), solo o en combinación con al menos un polímero adicional. Ejemplos de un polímero adicional incluyen un polímero celulósico, almidón, polivinilpirrolidona (PVP), poli(óxido de etileno) (PEO), un alginato, una pectina, o combinaciones de los mismos. El PVA puede usarse en las películas para mejorar la resistencia de la película y/o para variar y ralentizar los tiempos de disolución. Las películas son especialmente útiles para la administración de productos cosméticos, nutracéuticos, biológicos, farmacéuticos y agentes bioeficaces. En una realización preferida, la película incluye PVA sin ningún plastificante añadido. Por ejemplo, la película puede incluir tanto PVA, que proporciona resistencia a la película, como PEO, que proporciona flexibilidad a la película y puede obviar la necesidad de un plastificante.

El PVA puede usarse en cantidades variables dependiendo de la aplicación del producto y características deseadas. Por ejemplo, en general, una mayor cantidad de PVA aumentará la resistencia de la película y aumentará el tiempo de disolución. Para películas que requieren alta dosificación de principio activo, el PVA puede usarse eficazmente a la cantidad mínima del 0,5, preferentemente del 1 %, más preferentemente del 5 %, en peso de la película, para mejorar la resistencia de la película. El PVA puede usarse eficazmente a una cantidad máxima, por ejemplo, del 80 %, preferentemente del 50 %, más preferentemente del 25 % en peso de la película. Para ralentizar el tiempo de disolución, el PVA puede usarse a niveles de hasta el 80 %. Una película que contiene un principio activo puede recubrirse sobre una o ambas superficies con una capa que contiene PVA para modificar la disolución de la película y la liberación de un principio activo de la película.

La alta carga de principios activos puede disminuir la resistencia y flexibilidad de la película. El incluir PVA en la

película tanto solo como en combinación con al menos otro polímero puede aumentar la resistencia a la tracción de la película. Por tanto, partículas de fármaco o partículas de fármaco de sabor enmascarado o recubiertas o de liberación modificada pueden tener un mayor tamaño de partícula, que puede dificultar la carga de estas partículas en la película. El PVA puede aumentar la viscosidad de la solución de película para permitir la carga de fármaco mejorada.

### **Partículas de liberación controlada**

El término "liberación controlada" pretende significar la liberación de los componentes a una tasa pre-seleccionada o deseada. Por ejemplo, en realizaciones en las que la película incluye nanopartículas dentro del cuerpo de la película, puede desearse controlar su liberación de la película. Esta velocidad variará dependiendo de la aplicación. Velocidades deseables incluyen perfiles de liberación rápida o inmediata, además de liberación retardada, sostenida o secuencial. Se contemplan combinaciones de patrones de liberación, tales como liberación máxima inicial, seguida de menores niveles de liberación sostenida de principio activo. También se contemplan liberaciones pulsadas del agente.

Las películas solubles generalmente se clasifican en tres clases principales: disolución rápida, disolución moderada y disolución lenta. Las películas de la presente invención son solubles en presencia de líquido, tal como en la cavidad bucal del usuario o cuando se mezclan con un líquido, tal como agua. Las películas de disolución rápida generalmente se disuelven en aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 30 segundos. Las películas de disolución moderada generalmente se disuelven en aproximadamente 1 a aproximadamente 30 minutos, y las películas de disolución lenta generalmente se disuelven en más de 30 minutos, por ejemplo, hasta aproximadamente 60 minutos o más. Las películas de disolución rápida pueden consistir en polímeros hidrófilos de bajo peso molecular (es decir, polímeros que tienen un peso molecular entre aproximadamente 1.000 y 200.000). A diferencia, las películas de disolución lenta generalmente tienen polímeros de alto peso molecular (es decir, que tienen un peso molecular en los millones).

Las películas de disolución moderada tienden a encontrarse entre las películas de disolución rápida y lenta. Las películas de disolución moderada se disuelven más bien rápidamente, y también pueden tener un buen nivel de mucoadhesión. Las películas moderadas también son flexibles, rápidamente humectables, y normalmente no son irritantes para el usuario. Para las películas de disolución oral se prefieren las películas de disolución moderada, ya que tales películas proporcionan una tasa de disolución suficientemente rápida (entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 30 minutos), mientras que proporcionan un nivel de mucoadhesión aceptable de forma que la película no se elimine fácilmente una vez se coloca en la cavidad bucal del usuario.

Los polímeros que se eligen para las películas de la presente invención también pueden elegirse para permitir la disgregación controlada de los componentes. Esto puede lograrse proporcionando una película sustancialmente insoluble en agua que incorpora nanopartículas que se liberarán de la película con el tiempo. Esto puede llevarse a cabo incorporando varios polímeros diferentes, solubles o insolubles, y también pueden incluirse polímeros biodegradables en combinación. Alternativamente, las partículas de agente de liberación controlada recubiertas pueden incorporarse en una matriz de película fácilmente soluble para lograr la propiedad de liberación controlada de las nanopartículas. Los polímeros usados para preparar la matriz de película pueden ser solubles en agua, parcialmente solubles en agua, hinchables en agua, o una combinación de polímeros que pueden ser solubles, parcialmente solubles y/o hinchables.

En algunas realizaciones, una combinación de una capa de película de liberación sostenida (o disolución lenta) puede combinarse con una película de capa de disolución rápida. El principio activo o el componente que contiene principio activo, tal como las nanopartículas de insulina y/o GLP-1 descritas en el presente documento, pueden estar en cualquier capa o ambas. En una realización, el principio activo o el componente que contiene principio activo están en una capa de película de disolución rápida (o de liberación rápida) y pueden laminarse una capa de liberación sostenida más lenta o unirse de otro modo a la misma. La capa de liberación rápida puede estar prevista para estar contra una superficie mucosa o de tejido de órgano (como se define en el presente documento) y la capa de liberación sostenida lenta puede ser una capa exclusiva que cubre y protege la capa de disolución rápida, además de adherir la unidad de película total al sitio mucoso o de tejido de órgano (como se define en el presente documento), por ejemplo, como en una aplicación bucal.

La conveniencia de administrar una dosis única de una medicación que libera componentes en una forma controlada durante un periodo de tiempo prolongado, a diferencia de la administración de varias dosis únicas a intervalos regulares, se ha reconocido hace tiempo en las técnicas farmacéuticas. Asimismo, se reconoce la ventaja para el paciente y el profesional clínico de tener niveles coherentes y uniformes de medicación administrados al cuerpo durante un periodo de tiempo prolongado.

### **Componentes opcionales**

También pueden añadirse otros varios componentes y cargas a las películas de la presente invención. Éstos pueden incluir, sin limitación, tensioactivos; plastificantes que ayudan en compatibilizar los componentes dentro de la

mezcla; polialcoholes; antiespumantes, tales como compuestos que contienen silicona, que promueven una superficie más lisa de la película liberando oxígeno de la película; y geles termoestables tales como pectina, carragenina y gelatina, que ayudan a mantener la dispersión de componentes.

- 5 La variedad de aditivos que pueden incorporarse en las composiciones inventivas puede proporcionar varias funciones diferentes. Ejemplos de clases de aditivos incluyen excipientes, lubricantes, agentes de tamponamiento, estabilizadores, agentes de expansión, pigmentos, colorantes, cargas, agentes de carga, fragancias, modificadores de la liberación, adyuvantes, plastificantes, aceleradores del flujo, agentes de desmoldeo, polioles, agentes de granulación, diluyentes, aglutinantes, tampones, absorbentes, deslizantes, adhesivos, antiadherentes, acidulantes, suavizantes, resinas, emolientes, disolventes, tensioactivos, emulsionantes, elastómeros y mezclas de los mismos. Estos aditivos pueden añadirse con el (los) principio(s) activo(s).

15 Aditivos útiles incluyen, por ejemplo, gelatina, proteínas vegetales tales como proteína de girasol, proteínas de soja, proteínas de semilla de algodón, proteínas de cacahuete, proteínas de semillas de uva, proteínas del suero de la leche, aislados de proteína del suero de la leche, proteínas de la sangre, proteínas de huevo, proteínas acrilatadas, polisacáridos solubles en agua tales como alginatos, carrageninas, goma guar, agar-agar, goma xantana, goma gellan, goma arábica y gomas relacionadas (goma ghatti, goma karaya, goma tragacanto), pectina, derivados de celulosa solubles en agua: alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas y hidroxialquilalquilcelulosas, tales como metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, ésteres de celulosa y ésteres de hidroxialquilcelulosa tales como acetato-ftalato de celulosa (CAP), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC); carboxialquilcelulosas, carboxialquilalquilcelulosas, ésteres de carboxialquilcelulosa tales como carboximetilcelulosa y sus sales de metales alcalinos; polímeros sintéticos solubles en agua tales como ácidos poliacrílicos y ésteres de ácido poliacrílico, ácidos polimetacrílicos y ésteres de ácido polimetacrílico, poli(acetato de vinilo), poli(alcoholes vinílicos), poli(acetato-ftalatos de vinilo) (PVAP), polivinilpirrolidona (PVP), copolímero de PVY/acetato de vinilo, y ácidos policrotónicos; también son adecuados gelatina ftalada, succinato de gelatina, gelatina reticulada, Shellac, derivados químicos solubles en agua de almidón, acrilatos y metacrilatos catiónicamente modificados que poseen, por ejemplo, un grupo amino terciario o cuaternario, tales como el grupo dietilaminoetilo, que puede estar cuaternizado, si se desea; y otros polímeros similares.

20 Tales sustancias de relleno pueden añadirse opcionalmente en cualquier cantidad deseada deseablemente dentro del intervalo de hasta aproximadamente el 80 %, deseablemente aproximadamente del 3 % al 50 % y más deseablemente dentro del intervalo del 3 % al 20 % basado en el peso de todos los componentes.

35 Aditivos adicionales pueden ser deslizantes y opacificantes, tales como los óxidos de magnesio, aluminio, silicio, titanio, etc., deseablemente en un intervalo de concentración de aproximadamente el 0,02 % a aproximadamente el 3 % en peso y deseablemente de aproximadamente el 0,02 % a aproximadamente el 1 % basado en el peso de todos los componentes.

40 Otros ejemplos de aditivos son plastificantes que incluyen poli(óxidos de alquileo), tales como polietilenglicoles, polipropilenglicoles, polietilen-propilenglicoles, plastificantes orgánicos con bajos pesos moleculares, tales como glicerol, monoacetato, diacetato o triacetato de glicerol, triacetina, polisorbato, alcohol cetílico, propilenglicol, sorbitol, dietilsulfosuccinato de sodio, citrato de trietilo, citrato de tributilo, y similares, añadidos en concentraciones que oscilan de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 30 %, y deseablemente que oscilan de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 20 % basado en el peso del polímero.

50 Pueden añadirse adicionalmente compuestos para mejorar la textura de la composición de película tal como grasas animales o vegetales, deseablemente en su forma hidrogenada, especialmente aquellas que son sólidas a temperatura ambiente. Estas grasas tienen deseablemente un punto de fusión de 50 °C o superior. Se prefieren triglicéridos con ácidos grasos C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> y C<sub>22</sub>. Estas grasas pueden añadirse solas sin añadir sustancias de relleno o plastificantes y pueden añadirse ventajosamente solas o junto con mono- y/o di-glicéridos o fosfatidas, especialmente lecitina.

55 Los mono- y di-glicéridos se derivan deseablemente de los tipos de grasas descritos anteriormente, es decir, con ácidos grasos C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> y C<sub>22</sub>.

Las cantidades totales usadas de las grasas, mono-, di-glicéridos y/o lecitinas son hasta aproximadamente el cinco por ciento (5 %) y preferentemente dentro del intervalo de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el dos por ciento (2 %) en peso de la composición total.

60 Es adicionalmente útil añadir dióxido de silicio, silicato de calcio o dióxido de titanio en una concentración de aproximadamente el 0,02 % a aproximadamente el 1 % en peso de la composición total. Estos compuestos actúan de opacificantes y agentes de flujo.

65 Estos aditivos van a usarse en cantidades suficientes para lograr su fin previsto. Generalmente, la combinación de ciertos de estos aditivos alterará el perfil de liberación global del principio activo y puede usarse para modificar, es decir, impedir o acelerar la liberación.

La lecitina es un agente tensioactivo para su uso en la presente invención. La lecitina puede incluirse en la materia prima en una cantidad de aproximadamente el 0,25 % a aproximadamente el 2,00 % en peso. Otros agentes tensioactivos, es decir, surfactantes, incluyen, pero no se limitan a, alcohol cetílico, laurilsulfato de sodio, los Spans™ y Tweens™ que están comercialmente disponibles de ICI Americas, Inc. También son útiles aceites etoxilados, que incluyen aceites de ricino etoxilados, tales como Cremophor® EL que está comercialmente disponible de BASF. Carbowax™ es otro modificador más que es muy útil en la presente invención. Pueden usarse Tweens™ o combinaciones de agentes tensioactivos para lograr el equilibrio hidrófilo-lipófilo ("HLB") deseado. La presente invención, sin embargo, no requiere el uso de un tensioactivo y las películas o composiciones que forman película de la presente invención pueden estar esencialmente libres de un tensioactivo, mientras que todavía proporcionen las características de uniformidad deseables de la presente invención.

Como modificadores adicionales que potencian el procedimiento y producto de la presente invención se identifican, Los solicitantes pretenden incluir todos aquellos modificadores adicionales dentro del alcance de la invención reivindicados en el presente documento.

Otros componentes incluyen aglutinantes que contribuyen a la facilidad de formación y calidad general de las películas. Ejemplos no limitantes de aglutinantes incluyen almidones, almidones pregelatinizados, gelatina, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa, poliacrilamidas, poliviniloxazolidona y poli(alcoholes vinílicos).

Las películas de la presente invención, particularmente las películas útiles para ingestión oral por un usuario, pueden incluir además uno o más agentes potenciadores del sabor, tales como aromas y/o edulcorantes. Aromas y edulcorantes adecuados incluyen aquellos expuestos en la patente de EE.UU. N.º 7.425.292, cuyos contenidos enteros se incorporan por referencia en el presente documento.

Otros posibles aditivos incluyen agentes potenciadores de la solubilidad, tales como sustancias que forman compuestos de inclusión con principios activos. Tales agentes pueden ser útiles en mejorar las propiedades de principios activos muy insolubles y/o inestables. En general, estas sustancias son moléculas con forma de donut con cavidades internas hidrófobas y exteriores hidrófilas. Principios activos insolubles y/o inestables pueden ajustarse dentro de la cavidad hidrófoba, produciendo así un complejo de inclusión, que es soluble en agua. Por consiguiente, la formación del complejo de inclusión permite que principios activos muy insolubles y/o inestables se disuelvan en agua. Un ejemplo particularmente deseable de tales agentes son las ciclodextrinas, que son hidratos de carbono cíclicos derivados del almidón. Otras sustancias similares, sin embargo, se consideran perfectamente dentro del alcance de la presente invención.

Las diversas realizaciones de la invención pueden incluir potenciadores de la penetración y de la permeación. Entre tales potenciadores útiles están incluidos derivados de ácido graso de mono- y diacilglicerol de cadena media, tales como laurato de glicerol, y mezclas de los mismos; tensioactivos sintéticos y naturales y mezclas de los mismos; ácidos grasos de cadena media y sales y ésteres de los mismos, que incluyen mono-, di- y triglicéridos tales como caprilato de sodio y caprato de sodio, y mezclas de los mismos; sales biliares; agentes quelantes, tales como EDTA; detergentes; ciclodextrinas, derivados de enamina, fosfolípidos, lecitinas, cetomacrogel, salicilato de sodio, ácido 5-metoxisalicílico de sodio; ésteres de glicerol y polietilenglicol tales como aquellos comercializados bajo el nombre Labrasol; toxina de la zónula ocluyente; y glucósidos de alquilo. Adicionalmente, también son útiles combinaciones de potenciadores de la penetración y de la permeación de diferentes clases.

Potenciadores de la permeación adicionales incluyen polisorbato 80, fosfatidilcolina, n-metilpiperazina, salicilato de sodio, melitina y cloruro de palmitoilcarnitina (pcc). 23-lauril éter, aprotinina, Azone, cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridinio, bromuro de cetiltrimetilamonio, ciclodextrina, sulfato de dextrano, ácido láurico, ácido láurico/propilenglicol, lisofosfatidilcolina, mentol, metoxisalicilato, oleato de metilo, ácido oleico, fosfatidilcolina, polioxietileno, EDTA de sodio, glicocolato de sodio, taurocolato de sodio, laurilsulfato de sodio, salicilato de sodio, glicodesoxicolato de sodio, taurodesoxicolato de sodio, sulfóxidos, y combinaciones de los mismos.

Potenciadores de la permeación y/o de la penetración adicionales incluyen sulfóxido de dimetilo, sulfóxido de decilmetilo, sulfóxidos de alquilo: alcanoles, tales como etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, octanol, nonanol, decanol, 2-butanol, 2-pentanol, alcohol bencílico; ácidos de alcohol graso y sus alcoholes correspondientes, tales como alcohol caprílico, decílico, laurílico, 2-laurílico, mirístico, cetílico, estearílico, oleílico, linoléico, linolenílico; ácidos carboxílicos lineales tales como: valérico, heptanoico, pelargónico, caproico, cáprico, láurico, mirístico, esteárico, oleico, caprílico; ácidos carboxílicos ramificados: tales como isovalérico, neopentanoico, neoheptanoico, neononanoico, trimetilhexanoico, neodecanoico, isoesteárico; ésteres de ácidos grasos, tales como n-butilato de isopropilo alifático, n-hexanoato de isopropilo, n-decanoato de isopropilo, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, miristato de octildodecilo; ésteres de alquilo tales como acetato de etilo, acetato de butilo, acetato de metilo, valerato de metilo, propionato de metilo, sebacato de dietilo, oleato de etilo; propilenglicol, polietilenglicol, etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, dipropilenglicol, glicerol, propanodiol, butanodiol, pentanodiol, hexanotriol, urea, dimetilacetamida,

dietiltoluamida, dimetilformamida, dimetiloctamida, dimetildecamida; urea cíclica biodegradable, tal como 1-alquil-4-imidazolin-2-ona; derivados de pirrolidona, tales como 1-metil-2-pirrolidona, 2-pirrolidona, 1-lauril-2-pirrolidona, 1-metil-4-carboxi-2-pirrolidona, 1-hexil-4-carboxi-2-pirrolidona, 1-lauril-4-carboxi-2-pirrolidona, 1-metil-4-metoxicarbonil-2-pirrolidona, 1-hexil-4-metoxicarbonil-2-pirrolidona, 1-lauril-4-metoxicarbonil-2-pirrolidona, N-ciclohexilpirrolidona, N-dimetilaminopropilpirrolidona, N-cocoalquilpirrolidona, N-seboalquilpirrolidona; derivados de pirrolidona biodegradables tales como los ésteres de ácidos grasos de N-(2-hidroxietil)-2-pirrolidona; amidas cíclicas tales como 1-dodecilazacicloheptan-2-ona (Azone), 1-geranilazacicloheptan-2-ona, 1-farnesilazacicloheptan-2-ona, 1-teranilgeranilazacicloheptan-2-ona, 1-(3,7-dimetiloctil)azacicloheptan-2-ona, 1-(3,7,11-trimetildodecil)azacicloheptan-2-ona, 1-geranilazaciclohexano-2-ona, 1-geranilazaciclopentan-2,5-diona, 1-farnesilazaciclopentan-2-ona; hexametenlauramida y sus derivados; dietanolamina, trietanolamina; tensioactivos aniónicos tales como laurato de sodio, laurilsulfato de sodio; tensioactivos catiónicos tales como bromuro de cetiltrimetilamonio, bromuro de tetradeciltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, cloruro de octadeciltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de dodeciltrimetilamonio, cloruro de hexadeciltrimetilamonio; tensioactivos no iónicos que incluyen copolímeros de bloque de polioxietileno/polioxipropileno/polioxietileno (tales como aquellos comercializados bajo los nombres comerciales Ploxamer 231, 182, y 184), polioxietileno dodecil éteres (comercializados bajo el nombre comercial Brij 30), polioxietileno monooleil éteres (comercializados bajo los nombres comerciales Brij 93, 96 y 99), ésteres de sorbitano de ácidos grasos tales como aquellos comercializados bajo los nombres comerciales Span (20, 40, 60, 80, 85), monoesteratos de sorbitano tales como aquellos comercializados bajo los nombres comerciales Tween (20, 40, 60, 80), monoesteratos de polietilenglicol tales como aquellos comercializados bajo los nombres comerciales Myrj (45, 51, 52) y dicaprilato/dicaprato de propilenglicol comercializados bajo los nombres comerciales Miglyol 840 y otros; sales biliares tales como colato de sodio, sales de sodio de ácidos taurocólico, glicólico y desoxicólico; lecitina; hidrocarburos tales como D-limoneno,  $\alpha$ -pineno, B-careno; alcoholes tales como  $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, carvol; cetonas tales como carvona, pulegona, piperitona, mentona; óxidos tales como óxido de ciclohexeno, óxido de limoneno, óxido de  $\alpha$ -pineno, óxido de ciclopenteno, 1,8-cineol; aceites tales como ylang ylang, anís, Chenopodium, eucalipto; N-heptano, N-octano, N-nonano, N-decano, N-undecano, N-dodecano, N-tridecano, N-tetradecano, N-hexadecano; ácido salicílico y salicilatos (incluyendo sus derivados de metil, etil y propilglicol); ácido cítrico y succínico.

Como se ha expuesto previamente, también son útiles combinaciones de potenciadores de la penetración y de la permeación de diferentes clases. Son útiles combinaciones de alcoholes y otros potenciadores de la permeación. Por ejemplo, pueden usarse etanol e isopropanol como una combinación. Estos alcoholes pueden usarse adicionalmente en combinación con otros potenciadores de la permeación y/o de la penetración descritos en el presente documento como mezclas o soluciones. Por ejemplo, combinaciones útiles no limitantes incluyen etanol en combinación con uno o más componentes seleccionados de monoterpenos cíclicos, dicaprilato/dicaprato de propilenglicol (comercializados bajo el nombre comercial Miglyol 840), acetato de etilo, ácido oleico, 1-mentol, urea, glicéridos, triésteres de glicerina y ácidos alifáticos tales como tricaprilina (comercializada bajo el nombre comercial Panasate 800), propilenglicol, urea, agua: e isopropanol en combinación con componentes tales como polioxietileno-monooleato de sorbitano (comercializados bajo el nombre comercial Tween 80), miristato de isopropilo, miristato de isopropilo, ácido láurico, alcohol láurico y laurilsulfato de Na.

Los potenciadores de la permeación promueven y/o potencian la absorción del principio activo. También pueden emplearse inhibidores enzimáticos para proteger principios activos biológicos sensibles de ser destruidos antes de la absorción. Los potenciadores de la permeación pueden usarse en diversas cantidades eficaces en la película dependiendo de la formulación específica y del principio activo. Generalmente, los potenciadores de la permeación pueden estar presentes en cantidades de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 25 %, usarse más deseablemente en cantidades del 0,01 % a aproximadamente el 15 %, en peso de la composición de película total.

### **Formación de la película**

Las películas de la presente invención pueden formarse en una tira de película o una hoja antes del secado. Después de combinar los componentes deseados para formar una matriz multi-componente, que incluye el polímero, agua y nanopartículas, además de cualquier otro componente según se desee, la combinación se forma en una hoja o película, por cualquier método conocido en la técnica tal como recubrimiento, extensión, colada o estiramiento de la matriz multi-componente. Si se desea una película multi-capa, esto puede llevarse a cabo co-extruyendo más de una combinación de componentes que pueden ser la misma composición o diferente. También puede lograrse una película multi-capa recubriendo, extendiendo o colando una combinación sobre una capa de película ya formada.

Pueden emplearse varias técnicas en la etapa de mezcla para prevenir las inclusiones de burbujas en la película final. Para proporcionar una mezcla de composición con sustancialmente ninguna formación de burbujas de aire en el producto final, se emplean agentes antiespumantes o reductores de la tensión superficial. Adicionalmente, la velocidad de la mezcla se controla deseablemente para prevenir la cavitación de la mezcla de un modo que arrastre aire en la mezcla. Finalmente, la reducción de las burbujas de aire puede lograrse adicionalmente permitiendo que la mezcla repose durante un tiempo suficiente para que las burbujas escapen antes de secar la película. Deseablemente, el proceso inventivo forma primero una mezcla madre de componentes que forman película sin principios activos o materiales volátiles. En una realización, el (los) activo(s) se combinan con mezclas más pequeñas de la mezcla madre justo antes de la colada. Así, la premezcla de mezcla madre puede dejarse reposar

durante un tiempo más largo sin preocuparse por la inestabilidad del principio activo u otros componentes.

Aunque puede usarse varias técnicas que forman películas diferentes, se desea seleccionar un método que proporcione una película flexible, tal como un recubrimiento con rodillo inverso. La flexibilidad de la película permite que las hojas de película se enrollen y transporten para almacenamiento o antes de ser cortadas en formas de dosificación individuales. Deseablemente, las películas también serán auto-portantes o, en otras palabras, pueden mantener su integridad y estructura en ausencia de un soporte separado. Además, las películas de la presente invención pueden seleccionarse de materiales que son comestibles o ingeribles.

#### 10 Colada o deposición de la composición de película

La invención usa procesos de preparación de películas auto-portantes que tienen una distribución sustancialmente uniforme de componentes.

La película auto-portante es particularmente útil para la administración de principios activos como se trata en el presente documento. Los procesos de preparación de la película se diseñan para mantener la uniformidad composicional de los componentes distribuidos a través de toda la película, que es particularmente necesario cuando los principios activos, tales como los principios activos farmacéuticos, se incorporan en la película. En el contexto farmacéutico es esencial que la película sea desde el punto de vista de la composición uniforme de manera que pueda dividirse en unidades de dosificación de película individuales, teniendo cada unidad de dosificación la cantidad apropiada de principio activo cuando se administra, de forma que pueda asegurarse la autorización reglamentaria.

El proceso puede incluir además las etapas preliminares de formar una premezcla de mezcla madre de un polímero soluble en agua comestible y agua; opcionalmente, desairear la premezcla (tal como mezclando); alimentar una cantidad predeterminada de la premezcla a al menos una mezcladora; añadir las nanopartículas a la mezcladora; y mezclar los componentes para lograr una distribución uniforme de los mismos. A partir de aquí se forma la película húmeda y se seca.

Los métodos de recubrimiento o colada son particularmente útiles con el fin de formar las películas de la presente invención. Ejemplos específicos incluyen recubrimiento con rodillo inverso, recubrimiento por huecograbado, recubrimiento por inmersión, recubrimiento por varilla dosificadora o barra Mayer, recubrimiento por boquilla ranurada o por extrusión, recubrimiento de hueco o de cuchilla sobre rodillo, recubrimiento con cuchilla de aire, recubrimiento con cortina, o combinaciones de los mismos, especialmente cuando se desea una película multi-capas.

El recubrimiento con rodillo, o más específicamente el recubrimiento con rodillo inverso, se desea particularmente cuando se forman películas según la presente invención. Este procedimiento proporciona un excelente control y uniformidad de las películas resultantes, que se desea en la presente invención. En este procedimiento, el material de recubrimiento se mide sobre el rodillo aplicador por el parámetro de precisión del hueco entre el rodillo dosificador superior y el rodillo de aplicación debajo de él. El recubrimiento se transfiere del rodillo de aplicación al sustrato a medida que pasa alrededor del rodillo de soporte adyacente al rodillo de aplicación. Son comunes tanto procesos de tres rodillos como de cuadro rodillos.

El proceso de recubrimiento por huecograbado se basa en un rodillo grabado que opera en un baño de recubrimiento, que llena los puntos grabados o líneas del rodillo con el material de recubrimiento. El exceso de recubrimiento sobre el rodillo se limpia con una raqueta y el recubrimiento se deposita entonces sobre el sustrato a medida que pasa entre el rodillo grabado y un rodillo de presión.

Es común el huecograbado de desplazamiento, en el que el recubrimiento se deposita sobre un rodillo intermedio antes de la transferencia al sustrato.

En el proceso simple de recubrimiento por inmersión, el sustrato se sumerge en un baño de recubrimiento, que normalmente es de una viscosidad baja para permitir que el recubrimiento vuelva de nuevo al baño a medida que aparece el sustrato.

En el proceso de recubrimiento con varilla dosificadora, un exceso del recubrimiento se deposita sobre el sustrato a medida que pasa por encima del rodillo del baño. La varilla dosificadora enrollada con alambre, algunas veces conocida como una barra Mayer, permite que la cantidad deseada del recubrimiento permanezca sobre el sustrato. La cantidad se determina por el diámetro del alambre usado sobre la varilla.

En el proceso de boquilla ranurada, el recubrimiento se exprime por gravedad o bajo presión a través de una ranura y sobre el sustrato. Si el recubrimiento es 100 % de sólidos, el proceso se llama "extrusión" y en este caso la velocidad de la línea es frecuentemente mucho más rápida que la velocidad de la extrusión. Esto permite recubrimientos que son considerablemente más delgados que la anchura de la ranura.

El proceso de hueco o de cuchilla sobre rodillo se basa en un recubrimiento que se aplica al sustrato que entonces pasa a través de un "hueco" entre una "cuchilla" y un rodillo de soporte. A medida que el recubrimiento y el sustrato

pasan a través, se raspa el exceso.

El recubrimiento con cuchilla de aire es donde el recubrimiento se aplica al sustrato y el exceso se "deja escapar" por un poderoso chorro de la cuchilla de aire. Este procedimiento es útil para recubrimientos acuosos.

5 En el proceso de recubrimiento con cortina, un baño con una ranura en la base permite que una cortina continua del recubrimiento caiga en el hueco entre dos cintas transportadoras. El objeto que va a recubrirse se pasa a lo largo de la cinta transportadora a una velocidad controlada y así recibe el recubrimiento sobre su cara superior. En algunas realizaciones, las partículas que contienen principio activo pueden depositarse por una técnica de deposición de micro-gotas sobre una dosis unitaria discreta de la película. En algunas realizaciones, el componente que contiene el principio activo o partículas puede imprimirse sobre la superficie de una película ya formada, para formar encima una capa impresa discreta del principio activo.

#### 15 Secado de la película

La etapa de secado también es un factor contribuyente con respecto a mantener la uniformidad de la composición de película. Un proceso de secado controlado es particularmente importante cuando, en ausencia de una composición que aumenta la viscosidad o una composición en la que la viscosidad está controlada, por ejemplo, por la selección del polímero, los componentes dentro de la película pueden tener una elevada tendencia a agregarse o conglomerarse.

20 Un método alternativo de formación de una película con una dosificación precisa, que no necesitaría el proceso de secado controlado, sería colar las películas sobre un pocillo predeterminado. Con este método, aunque los componentes pueden agregarse, esto no producirá la migración del principio activo a una forma de dosificación adyacente, ya que cada pocillo puede definir la unidad de dosificación de por sí.

30 Un proceso usado para hacer las películas se describe en la patente de EE.UU. Número 7.425.292, que se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia. En este proceso, las películas se preparan formando rápidamente una película viscoelástica aplicando corriente de aire caliente a la película para prevenir que la migración del flujo y las fuerzas intermoleculares creen agregados o conglomerados, manteniéndose así la distribución uniforme composicional de componentes en la película; y adicionalmente secando la película viscoelástica para formar una película auto-portante.

35 La matriz que forma la película húmeda puede primero alimentarse sobre la cara superior de una superficie antes de la aplicación de corrientes de aire caliente.

40 La película húmeda se forma deseablemente a partir de una matriz desaireada dentro de un periodo de tiempo antes de que se degrade el principio activo contenido en su interior. El proceso puede incluir además una etapa de dividir la película secada en unidades de dosificación individuales de dimensiones y constitución composicional iguales. Pueden aplicarse corrientes de aire caliente a la superficie superior, si se desea. En tales realizaciones, puede desearse que las corrientes de aire caliente se apliquen a la superficie inferior de la película a una mayor velocidad que a la superficie superior de la película durante el secado. Las corrientes de aire caliente aplicadas para secar la parte superior de las películas son preferentemente menores que las que producirían ondulado o pelado de la superficie. La velocidad de la corriente de aire está controlada de forma que no suministre una tensión de cizallamiento suficiente para vencer la viscosidad inherente de la matriz que forma película y, por tanto, no interrumpa la superficie superior de la película. Esto permite que la película aumente suficientemente en viscosidad para fijar la uniformidad volumétrica mientras que permite la evaporación de agua a través de la superficie no pelada.

50 Cuando se usa un proceso de secado controlado o rápido, los vehículos líquidos se eliminan de la película de un modo tal que se mantenga la uniformidad, o más específicamente, la heterogeneidad uniforme no auto-agregante, que se obtiene en la película húmeda.

55 Deseablemente, la película se seca rápidamente, de forma que una estructura viscoelástica sólida se forma inicialmente y el contenido de la película se "reúne". Esto puede tener lugar en el plazo de los primeros minutos, por ejemplo aproximadamente los 0,5 primeros a aproximadamente 4,0 minutos del proceso de secado. Puede desearse limitar la cantidad de flujo de aire superior durante esta etapa de secado inicial. El controlar el secado de este modo previene la destrucción y reforma de la superficie superior de la película, que resulta de métodos de secado convencionales. Esto se lleva a cabo formando la película y colocándola sobre la cara superior de una superficie que tiene caras superior e inferior. Entonces, inicialmente se aplica calor a la cara inferior de la película para proporcionar que la energía necesaria se evapore o se elimine de otro modo el vehículo líquido. Las películas secadas de este modo se secan más rápidamente y uniformemente en comparación con las películas secadas al aire, o aquellas secadas por medios de secado convencionales. A diferencia de una película secada al aire que se seca primero en la parte de arriba y los bordes, las películas secadas aplicando calor a la parte inferior se secan simultáneamente en el centro, además de en los bordes. Esto también previene la deposición de componentes que se producen con películas secadas mediante medios convencionales.

La temperatura de la matriz que forma película durante el secado es deseablemente aproximadamente 100 °C o menos, deseablemente aproximadamente 90 °C o menos, y lo más deseablemente aproximadamente 80 °C o menos. La temperatura del aire puede ser sustancialmente superior a la temperatura de la matriz de película a condición de que no se confieran efectos perjudiciales sustanciales sobre la matriz de película o el principio activo o el componente que contiene principio activo o partículas. Puede desearse secar la película de forma que la temperatura dentro de la película sea inferior al punto de ebullición de cualquier disolvente o disolventes que están dentro de la matriz que forma película. Además, se desea que la temperatura dentro de la matriz que forma película se mantenga por debajo de la temperatura de degradación de cualquier principio activo contenido dentro de la película. Se observa, sin embargo, que la temperatura fuera de la película puede ser mayor de la temperatura dentro de la película, y en algunos casos puede ser sustancialmente mayor que la temperatura dentro de la película.

Otro método de control del proceso de secado, que puede usarse solo o en combinación con otros métodos controlados como se desvela anteriormente, incluye controlar y modificar la humedad dentro del aparato de secado en el que la película está siendo secada. De este modo puede evitarse el secado prematuro de la superficie superior de la película.

Otro método de secado sigue aquél previamente expuesto por Magoon, que se basa en una interesante propiedad del agua. Aunque el agua transmite energía por conducción y convección tanto dentro de como a sus alrededores, el agua solo irradia energía dentro de y al agua. Por tanto, el aparato de Magoon incluye una superficie sobre la que se coloca pulpa de fruta que es transparente a la radiación infrarroja. La parte inferior de la superficie está en contacto con un baño de agua de temperatura controlada. La temperatura del baño de agua se controla deseablemente a una temperatura ligeramente por debajo de la temperatura de ebullición de agua. Cuando la pulpa de fruta húmeda se coloca sobre la superficie del aparato, este crea una "ventana de refractancia". Esto significa que se permite que la energía infrarroja radie a través de la superficie solo al área sobre la superficie ocupada por la pulpa de fruta, y solo hasta que la pulpa de fruta esté seca. El aparato de Magoon proporciona las películas de la presente invención con un tiempo de secado eficaz que reduce el caso de agregación de los componentes de la película.

El objetivo de los procesos de secado descritos en el presente documento es proporcionar un método de secado de las películas que evite complicaciones, tales como el efecto indicado de "ondulado", que está asociado a los métodos de secado convencionales y que inicialmente secan la superficie superior de la película, atrapando la humedad dentro. En métodos de secado en hornos convencionales, como la humedad atrapada dentro se evapora posteriormente, la superficie superior se altera rasgándose y entonces se modifica.

Estas complicaciones se evitan por los presentes métodos de secado, y se proporciona una película uniforme secando la superficie inferior de la película primero o previniendo de otro modo la formación de la formación de película de polímero (piel) sobre la superficie superior de la película antes de secar la profundidad de la película. Esto puede lograrse aplicando calor como se ha descrito anteriormente, o alternativamente por la introducción de radiación (tal como microondas controlada) para evaporar el agua u otro disolvente polar dentro de la película.

En algunas realizaciones, la película se seca rápidamente de manera que se forma una estructura viscoelástica en el plazo de los quince (15) primeros minutos de secado, deseablemente en el plazo de los diez (10) primeros minutos de secado, y más particularmente en el plazo de los cuatro (4) primeros minutos de secado. Deseablemente, la película se seca a una velocidad tan rápida que ningún componente, que incluye las nanopartículas, se mueve no deseablemente o agrega. Secando rápidamente la matriz húmeda, un número sustancial de las nanopartículas no tiene tiempo de aglomerarse.

Pero alternativamente, el secado puede lograrse usando flujo de fluidos equilibrado, tal como flujo de aire equilibrado, en el que los flujos de aire inferior y superior se controlan para proporcionar una película uniforme. En un caso tal, el flujo de aire dirigido a la parte superior de la película no debe crear una condición que produzca el movimiento de las partículas presentes en la película húmeda, debido a fuerzas generadas por las corrientes de aire, es decir, cualquier flujo de aire superior que esté presente durante esta etapa de secado debe ser insuficiente para vencer la viscosidad inherente de la superficie de la película. Adicionalmente, cualquier corriente de aire dirigida a la parte inferior de la película debe controlarse deseablemente de forma que la película no se eleve debido a las fuerzas del aire. Las corrientes de aire incontroladas, tanto por encima como por debajo de la película, pueden crear falta de uniformidad en los productos de película final. El nivel de humedad del área que rodea la superficie superior también puede ajustarse apropiadamente para prevenir el cierre o pelado prematuro de la superficie del polímero.

La presente invención da productos de película excepcionalmente uniformes cuando se presta atención a reducir el movimiento y/o agregación de los componentes composicionales. Evitando la introducción y eliminando el excesivo aire en el proceso de mezcla, seleccionando polímeros y disolventes para proporcionar una viscosidad controlable y secando de forma controlada la película en una forma rápida para mantener la uniformidad encerrando los componentes que contienen el principio activo, resultan tales películas. Diversos métodos de secado incluyen aquellos expuestos en las patentes de EE.UU. N.º 7.425.292 y 7.357.891, que se incorporan en el presente documento por referencia en sus totalidades.

Las películas pueden inicialmente tener un espesor de aproximadamente 500 µm a aproximadamente 1.500 µm, o

aproximadamente 20 milésimas de pulgada a aproximadamente 60 milésimas de pulgada, y cuando se secan tienen un espesor de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ , o aproximadamente 0,1 milésimas de pulgada a aproximadamente 10 milésimas de pulgada. En algunas realizaciones, el producto de película tiene un espesor superior a 0,1 milésimas de pulgada. En algunas otras realizaciones, el producto de película tiene un espesor de aproximadamente 10 milésimas de pulgada o menos. En algunas realizaciones adicionales, el producto de película tiene un espesor de aproximadamente 0,5 milésimas de pulgada a aproximadamente 5 milésimas de pulgada. Deseablemente, las películas secadas tendrán un espesor de aproximadamente 2 milésimas de pulgada a aproximadamente 8 milésimas de pulgada, y más deseablemente de aproximadamente 3 milésimas de pulgada a aproximadamente 6 milésimas de pulgada.

#### Extrusión de la composición de película

En realizaciones alternativas, los productos de película de la presente invención pueden formarse por extrusión en vez de métodos de colada o de deposición. La extrusión es particularmente útil para composiciones de película que contienen componentes de polímero basados en poli(óxido de etileno), como se trata más adelante. Por ejemplo, puede emplearse un proceso de extrusión de un solo husillo según la presente invención. Según un proceso de extrusión tal, se forma presión en el fundido de polímero de manera que pueda extruirse a través de una boquilla o inyectarse en un molde.

Puede ser particularmente deseable emplear métodos de extrusión para formar composiciones de película que contienen componentes de polímero PEO. Estas composiciones contienen PEO o mezclas de PEO en el componente de polímero, y pueden estar esencialmente libres de plastificantes añadidos, y/o tensioactivos, y polialcoholes.

Las composiciones pueden extruirse como una hoja a temperaturas de procesamiento inferiores a aproximadamente 90 °C. La extrusión puede continuar estrujando la composición de película a través de rodillos o una boquilla para obtener una matriz uniforme. La composición de película extruida se enfría entonces por cualquier mecanismo conocido para aquellos expertos habituales en la materia. Por ejemplo, pueden emplearse rodillos enfriados, lechos de refrigeración por aire o lechos de refrigeración por agua. La etapa de refrigeración es particularmente deseable para composiciones de película que contienen componentes de polímero PEO debido a que el PEO tiende a mantener el calor. Las hojas así formadas pueden formarse en diversas formas, según se desee.

#### Usos de las películas

Las películas de la presente invención son muy aptas para muchos usos. El alto grado de uniformidad de los componentes de la película las hace particularmente muy adecuadas para incorporar productos farmacéuticos. Además, los polímeros usados en la construcción de las películas pueden elegirse para permitir un intervalo de tiempos de disgregación para las películas. Una variación o extensión en el tiempo durante el que una película se disgregará puede lograr el control con respecto a la tasa a la que se libera el principio activo, que puede permitir un sistema de administración de liberación sostenida. Además, las películas pueden usarse para la administración de nanopartículas a la piel y otras superficies del cuerpo, que incluyen aquellas con membranas mucosas y tejido de órgano (como se define en el presente documento).

Las películas pueden usarse para administrar nanopartículas mediante administración oral, o cualquier otra administración deseada. La administración puede llevarse a cabo preparando la película como se ha descrito anteriormente, introduciendo la película a una superficie mucosa o de tejido de un mamífero, y humectando la película si fuera necesario, por ejemplo. Si se desea, esta película puede prepararse y adherirse a una segunda capa o de soporte que se elimina antes de uso, es decir, aplicación a la piel. Puede usarse un adhesivo para unir la película al material de soporte o de apoyo, que puede ser cualquiera de aquellos conocidos en la técnica, y es preferentemente no soluble en agua. Si se usa un adhesivo, deseablemente será un adhesivo que no altere las propiedades del principio activo. También son útiles composiciones mucoadhesivas. Las composiciones de película sirven en muchos casos ellas mismas de mucoadhesivos.

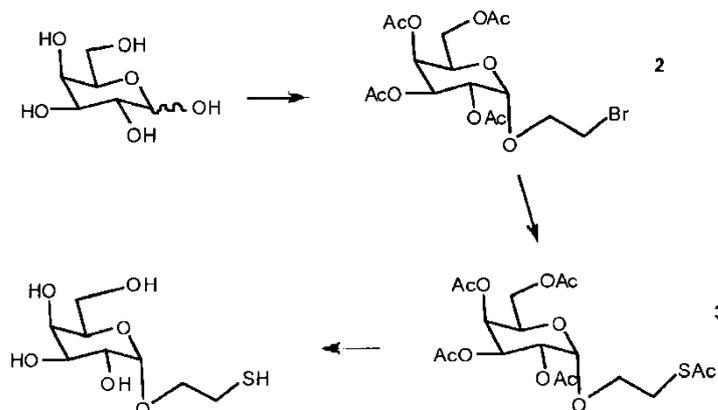
Las películas de la presente invención se aprovechan de la tendencia de las películas para disolverse rápidamente cuando se humectan, es decir, mediante contacto con un agente humectante tal como agua o saliva. Las nanopartículas pueden introducirse a un líquido preparando una película según la presente invención, introduciéndola en un líquido, y dejando que la película se disuelva. Ésta puede usarse para preparar una forma de dosificación líquida de las nanopartículas, que pueden entonces administrarse al usuario.

Lo siguiente se presenta a modo de ejemplo y no debe interpretarse como una limitación al alcance de las reivindicaciones.

#### **Ejemplos**

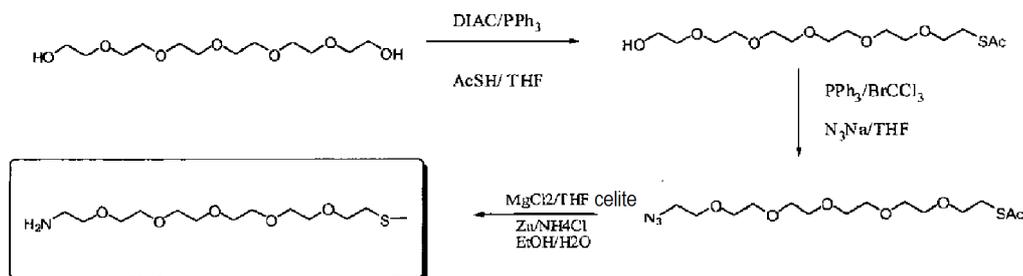
##### ***Ejemplo 1 - Preparación de ligandos***

**Preparación de 2-tio-etil- $\alpha$ -D-galactósido ( $\alpha$ -galactosa C2SH)**



- 5 A una suspensión de galactosa (3 g, 16,65 mmoles) en 2-bromoetanol (30 ml) se añade resina ácida Amberlite 120-H para alcanzar pH 2. La reacción se agita durante 16 horas a 50-60 °C. La mezcla de reacción se filtra y se lava con MeOH. Se añade trietilamina para alcanzar pH 8. El bruto de la reacción se concentra y se co-evapora 3 veces con tolueno. La mezcla de reacción se disuelve en piridina (75 ml) y Ac<sub>2</sub>O (35 ml) y se añade una cantidad catalítica de DMAP a 0 °C y se agita durante 3 h a ta. La mezcla se diluye con AcOEt y se lava con 1. H<sub>2</sub>O; 2. HCl (10 %).
- 10 NaHCO<sub>3</sub> dis 4. H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se recoge y se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La CCF (hexano: AcOEt 3:1, 2 eluciones) muestra un producto principal (deseado) y una minoría de R<sub>f</sub> más bajo. El producto se purifica por cromatografía ultrarrápida usando la mezcla hexano: acetato de etilo 6:1 como eluyente y se obtiene el 2-bromoetil- $\alpha$ -galactósido (2).
- 15 El producto de la reacción previa 2 se disuelve en 27 ml de 2-butanona. A esta solución se añade una cantidad catalítica de yoduro de tetrabutilamonio y 4 equivalentes de tioacetato de potasio. La suspensión resultante se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. Durante todo este periodo la reacción se prueba por CCF (hexano-AcOEt 2:1, 2 eluciones) para la desaparición del material de partida. La mezcla se diluye con 20 ml de AcOEt y se lava con una solución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca, se filtra y se evapora a vacío. El producto se purifica en
- 20 hexano / AcOEt 2:1 → 1:1 para obtener el acetiltio- $\alpha$ -galactósido 3.
- El nuevo producto de la reacción 3 se disuelve en una mezcla diclorometano-metanol 2:1. A esta mezcla se añade una solución de metóxido de sodio 1 N (1 equivalente) y se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añade resina Amberlite IR-120H para lograr pH 5-6. La mezcla resultante se filtra a continuación y se concentra a sequedad
- 25 para obtener el producto final ( $\alpha$ -galactosa C2SH).

**Preparación del conector de amino-tiol.**



- 30 A una solución de PPh<sub>3</sub> (3 g, 11,4 mmoles) en 20 ml de THF seco se añade DIAC (2,3 g, 11,4 mmoles). La mezcla se deja con agitación a 0 °C 15 min hasta la aparición de un producto blanco. A esta mezcla se añade gota a gota (embudo de adición) una solución de hexaetilenglicol (1,45 ml, 5,7 mmoles) y HSAc (610  $\mu$ l, 8,55 mmoles) en THF seco (20 ml). Después de 15 min los productos empiezan a aparecer en CCF a R<sub>f</sub> 0,2. La solución se concentra en un evaporador. El bruto de la reacción se disuelve en 50 ml de diclorometano y se lava con una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 %.
- 35 La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se concentra a vacío. La cromatografía ultrarrápida del bruto usando AcOEt: hexano 1:1, AcOEt y finalmente DCM:MeOH 4:1 como eluyente dio el derivado de acetil-tio-hexaetilenglicol.
- 40 El producto de reacción se disuelve en 5 ml de DMF y se añaden PPh<sub>3</sub> (2,25 g, 8,55 mmoles), NaN<sub>3</sub> (0,741 g, 11,4 mmoles) y BrCl<sub>3</sub>C (0,845 ml, 8,55 mmoles) y la solución se agita posteriormente durante 40 min a temperatura

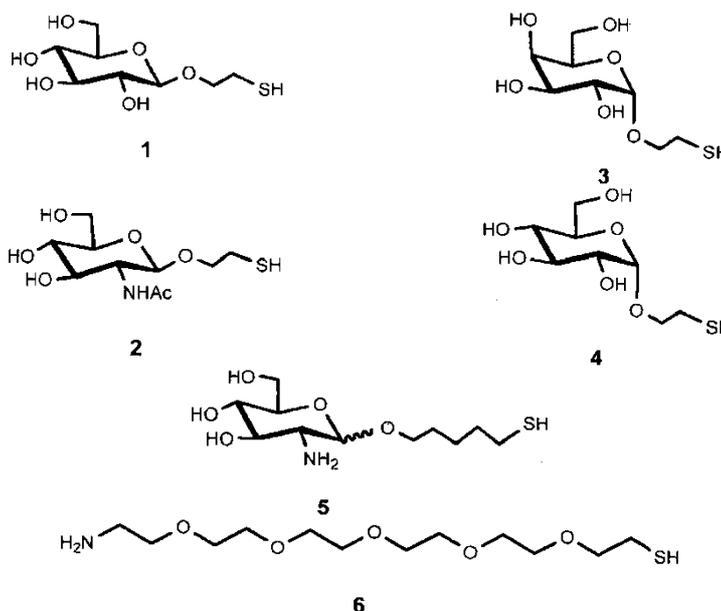
ambiente. El producto resultante tiene un Rf mayor que el producto de partida cuando se realiza CCF (DCM:MeOH 25:1). La mezcla de reacción se diluye con 100 ml de éter dietílico y se lava tres veces con H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se evapora a vacío. El producto se purifica por cromatografía ultrarrápida usando la mezcla de eluyentes DMC / MeOH 200:1 y DCM / MeOH 40:1 para obtener el derivado de azido-acetilthiohexaetilenglicol.

Para eliminar el óxido de trifenilfosfina, el producto de reacción se disuelve en 10 ml de THF y se añaden 0,5 g de MgCl<sub>2</sub> a esta solución. La reacción se agita durante 2 h a 80 °C hasta que aparece un precipitado blanco y entonces se filtra a través de Celite.

El producto se disuelve en una mezcla de etanol:H<sub>2</sub>O 3:1 y se añade polvo de Zn (0,45 g, 6,84 mmoles) y NH<sub>4</sub>Cl (0,6 g, 11,4 mmoles). La reacción se agita a reflujo durante 1 h hasta que la presencia de material de partida ya no es detectable por CCF (DCM / MeOH 25:1). La reacción se filtra a través de Celite y el disolvente se evapora. El bruto de la reacción se diluye con AcOEt y se extrae con 5 ml de H<sub>2</sub>O. La fase acuosa se evapora a sequedad para obtener el producto de amino-tiol-hexaetilenglicol.

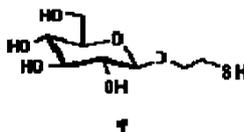
### Ejemplo 2 - Preparación de nanopartículas de oro mixtas

Se tomaron derivado de beta-glucosa C2 1, derivado de N-acetilglucosamina C2 2, derivado de alfa-galactosa C2 3, derivado de alfa-glucosa C2 4, derivado de glucosamina C5 5 y conector de hexaetilenglicol-amina 6 del catálogo de Midatech Biogune. Se compraron clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC·HCl), HAuCl<sub>4</sub>, NaBH<sub>4</sub> de Sigma-Aldrich Chemical Company. Se compró monoclóhidrato del ácido imidazol-4-acético de Alfa Aesar Company. Se usaron MeOH de alta calidad y agua Nanopure (18,1 mΩ) para todos los experimentos y soluciones.



Nomenclatura de los ligandos

GlcC2



2'-tioetil-β-D-glucopiranosido (beta)

GlcNHAcC2



2'-tioetil-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (beta)

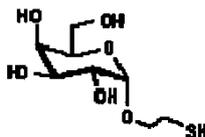
GlcNH2-IAA-C5



5'-tio-pentanol-2-desoxi-2-imidazolacetamido- $\alpha,\beta$ -D-glucopiranosido (mezcla de isómeros alfa, beta)

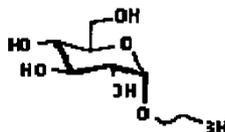
5

$\alpha$ -GalC2 (alfa)



10 2'-tioetil- $\alpha$ -D-galactopiranosido (alfa)

$\alpha$ -GlcC2 (alfa)



15 2'-tioetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido

EG6NH2



20 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol o  
1-amino-6-mercapto-hexaetilenglicol (nombre vulgar)

25 **Preparación de nanopartículas (NP) que tiene una pluralidad de ligandos**

NP-GlcC2(9)GlcNAc(1)

30 A una solución de **1** (21,6 mg, 90  $\mu$ moles) y **2** (2,8 mg, 10  $\mu$ moles) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa 0,025 M de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> (1,33 ml, 33  $\mu$ moles). La solución se agitó durante 30 segundos y a continuación se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> 1 N (0,67 ml, 0,67 mmoles) en varias porciones (134  $\mu$ l x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. Se eliminó la fase de metanol y el sedimento se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración centrífuga (10 KDa de AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, lavando con 2 ml de agua. El residuo se disolvió en 7 ml de agua. Se liofilizó una alícuota para cuantificación.  
35 [NP]=0,8 mg/ml.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, en la Figura 1 se muestra una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 9:1 de GlcC2:GlcNAc "NP-GlcC2(9)GlcNAc(1)".

40

NP-GlcC2(4)GlcNAc(1)

45 A una solución de **1** (19,2 mg, 80  $\mu$ moles) y **2** (5,6 mg, 20  $\mu$ moles) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa 0,025 M de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> (1,33 ml, 33  $\mu$ moles). La solución se agitó durante 30 segundos y a continuación se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> 1 N (0,67 ml, 0,67 mmoles) en varias porciones (134  $\mu$ l x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. Se eliminó la fase de metanol y el sedimento se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración centrífuga (10 KDa de AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, lavando con 2 ml de agua. El residuo se disolvió en 7 ml de agua. Se liofilizó una alícuota para cuantificación.  
50 [NP]=0,8 mg/ml.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, en la Figura 2 se muestra una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 4:1 de GlcC2:GlcNAc "NP-GlcC2 (4)

*GlcNAc(1)*".

NP-GlcC2(1)GlcNAc(1)

5 A una solución de **1** (12 mg, 50  $\mu$ mmoles) y **2** (14 mg, 50  $\mu$ mmoles) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa 0,025 M de HAuCl<sub>4</sub> (1,33 ml, 33  $\mu$ mmoles). La solución se agitó durante 30 segundos y a continuación se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> 1 N (0,67 ml, 0,67 mmoles) en varias porciones (134  $\mu$ l x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. Se eliminó la fase de metanol y el sedimento se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración centrífuga (10 KDa de AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces,  
10 lavando con 2 ml de agua. El residuo se disolvió en 7 ml de agua. Se liofilizó una alícuota para cuantificación. [NP]=0,9 mg/ml.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, en la Figura 3 se muestra una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcC2:GlcNAc "*NP-GlcC2(1)GlcNAc(1)*".

NP-GlcC2(1)GlcNAc(9)

20 A una solución de **1** (2,4 mg, 10  $\mu$ mmoles) y **2** (25,3 mg, 90  $\mu$ mmoles) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa 0,025 M de HAuCl<sub>4</sub> (1,33 ml, 33  $\mu$ mmoles). La solución se agitó durante 30 segundos y a continuación se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> 1 N (0,67 ml, 0,67 mmoles) en varias porciones (134  $\mu$ l x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. Se eliminó la fase de metanol y el sedimento se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración centrífuga (10 KDa de AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces,  
25 lavando con 2 ml de agua. El residuo se disolvió en 7 ml de agua. Se liofilizó una alícuota para cuantificación. [NP]=0,8 mg/ml.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, en la Figura 4 se muestra una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:9 de GlcC2:GlcNAc "*NP-GlcC2(1)GlcNAc(9)*".

NP-GlcC2(1)alfa-Gal(1)

35 A una solución de **1** (12 mg, 50  $\mu$ mmoles) y **3** (12 mg, 50  $\mu$ mmoles) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa 0,025 M de HAuCl<sub>4</sub> (1,33 ml, 33  $\mu$ mmoles). La solución se agitó durante 30 segundos y a continuación se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> 1 N (0,67 ml, 0,67 mmoles) en varias porciones (134  $\mu$ l x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. Se eliminó la fase de metanol y el sedimento se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración centrífuga (10 KDa de AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces,  
40 lavando con 2 ml de agua. El residuo se disolvió en 7 ml de agua. Se liofilizó una alícuota para cuantificación. [NP]=0,7 mg/ml.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, en la Figura 5 se muestra una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcC2:alfa-Gal "*NP-GlcC2(1)alfa-Ga1(1)*".

NP-betaGlcC2(1)EG6NH2(1)

50 A una solución de **1** (12 mg, 50  $\mu$ mmoles) y **6** (14,85 mg, 50  $\mu$ mmoles) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa 0,025 M de HAuCl<sub>4</sub> (1,33 ml, 33  $\mu$ mmoles). La solución se agitó durante 30 segundos y a continuación se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> 1 N (0,67 ml, 0,67 mmoles) en varias porciones (134  $\mu$ l x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. Se eliminó la fase de metanol y el sedimento se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración centrífuga (10 KDa de AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces,  
lavando con 2 ml de agua. El residuo se disolvió en 7 ml de agua. Se liofilizó una alícuota para cuantificación. [NP]=0,9 mg/ml.

55 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, en la Figura 6 se muestra una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de betaGlcC2:EG6NH2 "*NP-betaGlcC2(1)EG6NH2(1)*".

NP-GlcNHAc(l)EG6NH2(1)

60 A una solución de **2** (14 mg, 50  $\mu$ mmoles) y **6** (14,85 mg, 50  $\mu$ mmoles) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa 0,025 M de HAuCl<sub>4</sub> (1,33 ml, 33  $\mu$ mmoles). La solución se agitó durante 30 segundos y a continuación se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> 1 N (0,67 ml, 0,67 mmoles) en varias porciones (134  $\mu$ l x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. Se eliminó la fase de metanol y el sedimento se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración centrífuga (10 KDa de AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces,  
65 lavando con 2 ml de agua. El residuo se disolvió en 6 ml de agua. Se liofilizó una alícuota para cuantificación.

[NP]=0,6 mg/ml.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, en la Figura 7 se muestra una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcNHAc:EG6NH2 "*NP-GlcNHAc(1)EG6NH2(1)*".

#### NP-alfa-Glc(1)EG6NH2(1)

A una solución de **4** (12 mg, 50  $\mu$ moles) y **6** (14,85 mg, 50  $\mu$ moles) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa 0,025 M de HAuCl<sub>4</sub> (1,33 ml, 33  $\mu$ moles). La solución se agitó durante 30 segundos y a continuación se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> 1 N (0,67 ml, 0,67 mmoles) en varias porciones (134  $\mu$ l x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. Se eliminó la fase de metanol y el sedimento se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración centrífuga (10 KDa de AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, lavando con 2 ml de agua. El residuo se disolvió en 4 ml de agua. Se liofilizó una alícuota para cuantificación. [NP]=0,8 mg/ml.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, en la Figura 8 se muestra una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de alfa-Glc:EG6NH2 "*NP-alfa-Glc(1)EG6NH2(1)*".

#### NP-alfa-Glc

A una solución de **4** (24 mg, 100  $\mu$ moles) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa 0,025 M de HAuCl<sub>4</sub> (1,33 ml, 33  $\mu$ moles). La solución se agitó durante 30 segundos y a continuación se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> 1 N (0,67 ml, 0,67 mmoles) en varias porciones (134  $\mu$ l x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. Se eliminó la fase de metanol y el sedimento se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración centrífuga (10 KDa de AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, lavando con 2 ml de agua. El residuo se disolvió en 5 ml de agua. Se liofilizó una alícuota para cuantificación. [NP]=1,0 mg/ml.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, en la Figura 9 se muestra una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos de alfa-Glc "*NP-alfa-Glc*".

#### NP-GlcC2(1)GlcNH IAA(1)

A una solución de **1** (12 mg, 50  $\mu$ moles) y **5** (12 mg, 50  $\mu$ moles) en MeOH (8,3 ml) se añadió una solución acuosa 0,025 M de HAuCl<sub>4</sub> (1,33 ml, 33  $\mu$ moles). La solución se agitó durante 30 segundos y a continuación se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> 1 N (0,67 ml, 0,67 mmoles) en varias porciones (134  $\mu$ l x 5). La suspensión oscura se agitó durante 100 minutos. Se eliminó la fase de metanol y el sedimento se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por filtración centrífuga (10 KDa de AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, lavando con 2 ml de agua. El residuo se disolvió en 8 ml de MES 100 mM y se trató con EDC (153 mg, 0,8 mmoles) y monoclóhidrato del ácido imidazol-4-acético (81 mg, 0,5 mmoles) durante 14 horas. La mezcla se purificó por filtración centrífuga (10 KDa de AMICON 4 ml, 4500 g, 15 min, 15 °C). El proceso se repitió tres veces, lavando con 2 ml de agua. El residuo se disolvió en 4 ml de agua. Se liofilizó una alícuota para cuantificación. [NP]=0,9 mg/ml.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, en la Figura 10 se muestra una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de GlcC2:GlcNH\_IIA "*NP-GlcC2(1)GlcNH\_IIA(1)*".

#### NP-alfa-Gal(1)EG6NH2(1)

Preparación de nanopartículas amina-alfa-gal oro Lote MI-NP-10-AMINA-GAL: A una mezcla de conector de amina-mercaptohexaetilenglicol **6** y ligando de alfa-galactosa **3** en una relación 1:1 (0,58 mmoles, 3 eq.) en MeOH (49 ml) se añadió una solución acuosa de sal de oro (7,86 ml, 0,19 mmoles, 0,025 M). La reacción se agitó durante 30 segundos y a continuación se añadió una solución acuosa de NaBH<sub>4</sub> (1 N) en varias porciones (4,32 ml, 4,32 mmoles). La reacción se agitó durante 100 minutos a 900 rpm. Después de este tiempo, la suspensión se centrifugó 1 minuto a 14000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 2 ml de agua. A continuación se introdujeron 2 ml de la suspensión en dos filtros (AMICON, 10 KDa, 4 ml) y se centrifugaron 5 minutos a 4500 g. El residuo en el filtro se lavó dos veces más con agua. El residuo final se disolvió en 80 ml de agua.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, en la Figura 11 se muestra una representación esquemática de las nanopartículas resultantes que tienen una pluralidad de ligandos en la relación 1:1 de alfa-Gal:EG6NH2 "*NP-alfa-Gal(1)EG6NH2(1)*".

Para la preparación de NP de oro, la fabricación fue bajo vitrina de flujo laminar. Todo el material de vidrio y de plástico (tal como eppendorfs, viales y botellas) y disolvente (agua, HAc) se esterilizaron primero en un autoclave. Todos los otros desechables (tales como puntas y filtros) vinieron pre-esterilizados.

**Ejemplo 3 - Unión de insulina a nanopartículas**

5 El siguiente método detalla cómo se realizó la unión de insulina a NP de alfaGal(1) *EG6NH2*(1). El método usó niveles de insulina fijos y de NP variables, se usaron niveles más bajos/diferentes de NP para las otras muestras de NP probadas, pero con esta excepción el método fue el mismo para todas las NP probadas.

10 Preparación de solución madre de insulina; pesar 20 mg de insulina humana en un vial de vidrio limpio y añadir 8,7 ml de HCl 10 mM, mezclar suavemente la insulina hasta que se disuelva completamente, luego pH de nuevo a 7,5 añadiendo 1,3 ml de base Tris 100 mM, la solución se volverá turbia brevemente a medida que la insulina pasa a través de su punto isoeléctrico, comprobar que el pH es 7,5 y guardar tapada a 4 °C, está es la solución madre de 2 mg/ml de insulina.

15 Añadir cantidades variables de NP de alfaGal(1) *EG6NH2*(1) a un recipiente eppendorf o de tamaño adecuado, por ejemplo; 15, 30, 60, 120, 240 y 480 nmoles de contenido de oro de NP, enrasar a un volumen total de 200 µl con agua, luego añadir 50 µl de insulina humana (2 mg/ml en Tris-HCl a pH7,5 - véase antes para la preparación de la solución madre de insulina). Mezclar suavemente y dejar a temp ambiente durante 2 h, seguir con una centrifuga de mesa 2 minutos (2000 rpm) para precipitar el agregado. Debe realizarse un tubo estándar que solo tiene 200 µl de agua y 50 µl de insulina para dar el máximo valor de sobrenadante, como debe un blanco, es decir, 50 µl de Tris-HCl a pH 7,5 + 200 µl de agua. Si se requiere alta exactitud, una muestra que contiene una cantidad conocida de NP de alfaGal(1)*EG6NH2*(1), es decir, 10 µg de contenido de oro, se enrasa a 200 µl con agua, y se añaden 50 µl del tampón de insulina (Tris-HCl a pH7,5), esto puede usarse para corregir el resultado ligeramente positivo que la NP de alfaGal(1) *EG6NH2*(1) da en el ensayo de BCA, véase más adelante\*.

25 Ensayar los sobrenadantes, 20 µl por triplicado por ensayo de micro BCA estándar (kit de Pierce 23235), esto dará datos que muestran cuánta insulina queda en el sobrenadante. Restando este valor del valor para el patrón de insulina sola calcular la cantidad de insulina unida a NP, también puede expresarse como un porcentaje si se requiere. Los datos obtenidos aquí muestran la cantidad de alfaGal(1) *EG6NH2*(1)-NP que se requiere para unir como máximo los 100 µg de insulina usados, estas condiciones pueden aumentarse de escala para producir la cantidad de alfaGal(1) *EG6NH2*(1)-NP-insulina requerida.

35 \*Los datos puede ser corregidos para la ligera interferencia de alfaGal(1) *EG6NH2*(1)-NP libre en el ensayo de BCA. Para hacer esto, realizar un análisis de oro en todas las muestras finales y calcular cuánto oro queda en los diversos sobrenadantes, se observarán mayores niveles en muestras con un exceso de NP con respecto a insulina. Usar el valor de BCA para el contenido de 10 µg de NP para corregir con respecto al contenido de oro observado, como se demuestra por el siguiente ejemplo:

40 Si los 10 µg de contenido de oro de NP sin insulina dan 0,5 por BCA y 40 µg de sobrenadante de NP de prueba de Au da BCA de 1,25, y también muestra contenido de oro de 5 µg, esto significa 0,25 de valor de BCA (50 % de 0,5) es en realidad debido a la NP libre, de ahí que el valor corregido para 40 µg de sobrenadante de NP de prueba de Au deba ser 1,00, no 1,25. Esto es un ejemplo ilustrativo simplificado, el factor de corrección sería mínimo si el contenido de oro en el sobrenadante fuera bajo.

45 La cantidad de insulina humana unida (en nmoles) por cantidad de oro (en nmoles) se muestra en la Figura 12, en la que:

Glc = 2'-tioetil-β-D-glucopiranosido;

50 GlcNAc = 2'-tioetil-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosido;

GlcaminalAA = 5'-tiopentanol-2-desoxi-2-imidazolacetamido-α,β-D-glucopiranosido (mezcla de isómeros alfa, beta);

55 AGal = 2'-tioetil-α-D-galactopiranosido;

*EG6NH2* = 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecanol;

AGlc = 2'-tioetil-α-D-glucopiranosido; y

60 los números en la leyenda se refieren a la estequiometría del ligando.

65 Como puede apreciarse por referencia a la Figura 12, se obtuvo un grado relativamente alto de unión de insulina usando nanopartículas que tienen una corona de AGal y *EG6NH2* en la relación de aproximadamente 1:1. La unión de insulina también se presentó por nanopartículas que tenían cualquiera de las siguientes composiciones de corona:

AGal: EG6NH2 1:1 (Trazo 11 Figura 12)  
 Glc:GlcaminalAA 1:1 (Trazo 10 Figura 12)  
 AGlc: EG6NH2 1:1 (Trazo 8 Figura 12)  
 BGlc: EG6NH2 1:1 (Trazo 6 Figura 12)  
 GlcNAc: EG6NH2 1:1 (Trazo 7 Figura 12).

#### Ejemplo 4 - Caracterización de nanopartículas

##### I) Caracterización de nanopartículas de insulina-oro Lote MI-NP-10-Ins (NP-alfa-Gal(1)EG6NH2(1))

**a) Contenido de oro:** El contenido de oro se determinó usando un método basado en la formación de un complejo coloreado entre etopropazina y el oro después de la oxidación completa a Au (III). La absorbancia de la muestra se mide a 513 nm y cuantitativamente en comparación con soluciones similares que tienen una cantidad conocida de oro.

Se determinó que el contenido de oro era (lote n.º NP10):  $262,5 \pm 56,3$  mg/l.

**TEM:** Una imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la suspensión de nanopartículas se muestra en la Figura 13.

Se determinó que la muestra tenía las siguientes características de tamaño para el núcleo de oro:

Recuento = 783  
 Media (diámetro) =  $2,323 \text{ nm} \pm 0,716 \text{ nm}$   
 Mín. = 1,002 nm  
 Máx. = 4,859 nm  
 Moda = 2,104 nm

**b) Distribución de tamaño por dispersión de luz dinámica:** Se determinaron las distribuciones por número y volumen por dispersión de luz dinámica (DLS) para MI-NP-10 amina-gal (es decir, nanopartículas de NP-alfa-Gal(1)EG6NH2(1)), y se muestran en la Figura 14 A y B, respectivamente.

El valor pico para el pico mostrado en la Figura 14A es el siguiente:

Pico 1	4,875 nm
--------	----------

El valor pico para el pico mostrado en la Figura 14B es el siguiente:

Pico 1	5,289 nm
--------	----------

##### II) Preparación final de nanopartículas de insulina-oro Lote MI-NP-10-INS.

Se enrasó una solución de nanopartículas de oro MI-NP-10 (13,041 mg de oro) a 49,68 ml de agua. A la solución final se añadió ácido acético para obtener un pH=4,6. A continuación se añadieron 55,7 mg de insulina humana en 27,85 ml de Tris.HCl a pH 7,5. La suspensión se dejó 24 horas y después de este tiempo se centrifugó 1 minuto a 4500 g. Se extrajo el sobrenadante y se guardó para análisis del contenido de insulina y de oro adicional. El precipitado se resuspendió en 3,220 ml de agua para conseguir una concentración de insulina final de 500 unidades de insulina/ml. La distribución de tamaño de las nanopartículas de insulina-oro se determinó por análisis de DLS. El contenido de insulina se determinó por ensayo estándar de BCA.

\*\* La preparación final de NP de insulina-oro se fabricó bajo vitrina de flujo de laminar. Todo el material de vidrio y de plástico (tal como eppendorfs y botellas) y disolvente (tal como agua, Tris-HCl y HAC) usados se esterilizaron en un autoclave. Todos los otros desechables (tales como puntas y filtros) vinieron pre-esterilizados.

#### Caracterización:

**a)** La distribución de tamaño por dispersión de luz dinámica se muestra por número y volumen en la Figura 15A, y B, respectivamente para MI-NP-10-INS (nanopartículas de amina-gal-INSULINA).

El valor pico para el pico mostrado en la Figura 15A es el siguiente:

Pico 1	68,46 nm
--------	----------

El valor pico para el pico mostrado en la Figura 15B es el siguiente:

Pico 1	88,38 nm
--------	----------

#### b) Contenido de insulina:

El % de unión de insulina a las nanopartículas se determinó por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de insulina} = \frac{\text{insulina añadida} - \text{sobrenadante de insulina}}{\text{insulina añadida}} \times 100$$

5

Tabla 2 - Contenido de insulina

Muestra	Insulina añadida (mg)	Sobrenadante de insulina (mg)	Insulina unida (mg)	% de insulina unida
MI-NP-10 insulina	55,700	1,308	54,4	97,65

#### Concentración de insulina y oro en nanopartículas de NP-insulina:

10 Insulina: 55,7 mg de insulina  
 Oro: 13,041 mg de oro  
 Volumen total: 3,23 ml de agua  
 Concentración de insulina final: 17,25 mg de insulina/ml= 500 unidades/ml  
 Concentración de oro final: 4,037 mg de Au/ml.

15 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los presentes inventores consideran lo siguiente:

20 102 átomos de Au/NP, para los que el resultado matemático es 14 moléculas de insulina unidas a 1 NP. Como las consideraciones geométricas dejan espacio para aproximadamente 7 moléculas de insulina sobre la superficie de la nanopartícula, estos resultados sugieren que cada NP contiene 7 unidades dimericas de insulina.

Caracterización adicional de las nanopartículas de insulina-oro Lote MI-NP-10-INS dio los siguientes resultados.

25 Concentración de insulina final: 17,25 mg de insulina/ml = 500 U/ml, determinada por el ensayo colorimétrico con ácido bicinónico después de la calibración contra soluciones normalizadas de insulina de concentraciones conocidas.

Concentración de oro final: 4,037 mg de Au/ml, determinada por el ensayo colorimétrico con el ensayo con etopropazina después de la calibración contra soluciones normalizadas de oro de concentraciones conocidas.  
 Volumen total: 3,23 ml en agua MilliQ.

30 Después de las consideraciones geométricas, una nanopartícula de  $\alpha$ -galactosa-EG-amina-Au contiene un núcleo de oro con 102 átomos. Entonces:

$$4,037 \text{ mg} = 2,049\text{e-}5 \text{ moles} = 1,234\text{e}19 \text{ átomos} = 1,21\text{e}17 \text{ nanopartículas}$$

35 17,25 mg = 2,97e-6 moles = 1,789e18 moléculas

$$4,037 \text{ mg} = 2,049\text{e-}5 \text{ moles} = 1,234\text{e}19 \text{ átomos} = 1,21\text{e}17 \text{ nanopartículas}$$

$$17,25 \text{ mg} = 2,97\text{e-}6 \text{ moles} = 1,789\text{e}18 \text{ moléculas}$$

40 Por tanto, una nanopartícula de  $\alpha$ -galactosa-EG6NH2-Au se une a aproximadamente entre 14 y 15 moléculas de insulina para producir la nanopartícula final.

Resultados del análisis termogravimétrico:

45 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los presentes inventores consideran que para las NP de insulina tenemos 500 ug de peso seco en los que 410 ug están descompuestos. Por tanto, el porcentaje de orgánico es 82 %. Considerando 102 átomos de oro en una nanopartícula de  $\alpha$ -galactosa-EG6NH2-Au, el peso del oro sería 20091 (18 %) y una corona orgánica 12122. Por tanto, para tener una partícula que es 82 % de orgánico, debe tener el peso de 111616, es decir, 91525 orgánico. Como 12122 de orgánico es corona, esto deja aproximadamente 79403 del orgánico como insulina. Como la insulina tiene MW 5808, entonces los presentes inventores deben tener 14 moles insulina por partícula.

La Figura 16 muestra los datos del análisis termogravimétrico (TGA) experimental.

#### 55 Ejemplo 5 - Optimización por Zn de la unión de insulina

60 Se prepararon nanopartículas de oro (NP), NP de alfaGal(1) EG6NH2(1), como se describe en el Ejemplo 2 anterior. Con el fin de evaluar la influencia del Zn sobre la unión de la insulina a las NP, se sintetizó un primer lote de NP en ausencia de Zn. Se sintetizó un segundo lote de NP en presencia de 1,33 equivalentes de Zn. Se sintetizó un tercer lote de NP en ausencia de Zn, pero se añadieron 1,33 equivalentes de ZnCl<sub>2</sub> a las NP post-síntesis. Entonces se

midió la unión de insulina humana a los tres lotes de NP de oro.

Los resultados se muestran en la Figura 17. La Figura 17 muestra una gráfica que muestra la cantidad de 17,2 nmoles fijos de insulina que se unen a concentraciones de NP de oro variables. Comparación de NP sintetizadas sin Zn, una NP con se sintetizó con 1,33 eq, y NP libres de Zn con 1,33 eq de ZnCl<sub>2</sub>.

5 El gráfico en la Figura 17 muestra que sin cinc presente la unión de insulina es a un nivel muy bajo. Cuando el cinc está presente, la unión de insulina es significativamente mayor hasta cuantitativa. Se produce unión de insulina equivalente si el cinc está presente durante la síntesis de NP o si se añade post-síntesis.

10 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los presentes inventores creen que el catión Zn<sup>2+</sup> proporciona unión de insulina mejorada a las NP de oro. Otras formas de Zn, tales como ZnO, también pueden mediar en la unión de insulina mejorada. En particular, la presencia de ZnO en muestra de NP de oro que ha sido almacenada durante un periodo de meses indica que el ZnO puede formar y puede adicionalmente o alternativamente al catión Zn<sup>2+</sup> mediar en o facilitar la unión de insulina mejorada a las NP.

15 Se ha informado previamente de la importancia del Zn<sup>2+</sup> en la cristalización, forma y función de la insulina. Sin embargo, los datos descritos en el presente documento indican que la insulina unida a NP, que incluye en presencia de Zn<sup>2+</sup>, está en forma monomérica o dimerica en vez de la forma hexamérica más comúnmente asociada a la insulina humana en presencia de Zn<sup>2+</sup> (es decir, insulina no unida a NP). Esto puede presentar una ventaja considerable en relación con la presente invención debido a que la insulina monomérica o dimerica se prefiere en muchos ámbitos (por ejemplo, práctica clínica) en comparación con la insulina hexamérica.

20 Los presentes inventores han encontrado que la unión de GLP-1 a NP de oro (descrita en el presente documento) tiene lugar en presencia de Zn (que incluye, pero no se limita, a Zn<sup>2+</sup> y/o ZnO). La unión de GLP-1 a NP de oro descrita en el presente documento era para NP sintetizadas en presencia de Zn. Se contempla específicamente en el presente documento que el Zn pueda estar presente en composiciones de nanopartículas de oro unidas a GLP-1.

#### **Ejemplo 6 - Unión de GLP-1 a nanopartículas de oro**

30 Se prepararon nanopartículas de oro (NP), NP de alfaGal(1) EG6NH<sub>2</sub>(1), como se describe en el Ejemplo 2 anterior. En vez de añadir insulina, se añadió GLP-1. Se encontró que GLP-1 se une a las NP. La unión de 29,8 nmoles fijos de GLP-1 a concentraciones de NP de oro variables se muestra en la Figura 18. Estos resultados demuestran que un péptido distinto de insulina se une a las nanopartículas de la invención.

#### **Ejemplo 7 - Nanopartículas que se co-unen a más de una proteína: nanopartículas mixtas de insulina/GLP-1**

35 Se prepararon nanopartículas de oro (NP), NP de alfaGal(1) EG6NH<sub>2</sub>(1), como se describe en el Ejemplo 2 anterior. Se añadieron insulina y GLP-1 a las NP. Una solución acuosa de las NP de GLP-1/insulina se sometió a análisis por MALDI y los resultados se muestran en la Figura 19. Las NP de GLP-1/insulina se sometieron a HPLC y la traza se muestra en la Figura 20. Los datos de HPLC muestran que se midieron 19,8 mg de insulina y 1,33 mg de GLP-1.

La reacción de unión se realizó usando una mezcla de 26,2 mg de insulina y 1,8 mg de GLP-1. Los datos de HPLC muestran que la relación aproximada de insulina:GLP-1 se mantiene tras la unión a las nanopartículas.

45 Los datos de MALDI y HPLC demuestra la unión mixta de GLP-1 e insulina a nanopartículas de oro. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los presentes inventores creen que la co-unión de dos o más especies diferentes de péptido a la nanopartícula de la invención puede preferirse en ciertos ámbitos (por ejemplo, cierta práctica clínica) en comparación con la unión de una única especie de péptido. En particular, combinaciones de péptidos pueden ser llevadas sobre una nanopartícula de forma que los péptidos realicen mutuamente funciones beneficiosas y/o actúen de común acuerdo, tal como en un modo sinérgico.

#### **Ejemplos 8-16 - Producción y caracterización de película oral que incorpora nanopartículas de insulina (NP de insulina)**

##### **Ejemplo 8: Tiras de película de insulina (0,01 mg) para la medición del ensayo y tiras de placebo**

Se preparó la siguiente composición de película y a partir de ella se hicieron tiras de película. Una porción de las tiras de película (aproximadamente 50 tiras) se usó como muestras de placebo para prueba posterior.

60 Otra porción de las tiras de película contuvo 0,01 mg de nanopartículas de insulina (NP de insulina), preparadas como se describe en el presente documento. Se probaron las tiras que contienen NP de insulina, como se trata más adelante, para determinar la estabilidad de la insulina, es decir, que siguió siendo biológicamente activa, después del secado de la película y reposo a temperatura ambiente durante dos (2) meses.

##### **65 Composición de matriz de película**

1. 4,796 g (7,993 %) de poli(óxido de etileno) (PEO) WSR 1105 LEO (Colorcon)
2. 26,977 g (44,961 %) de PEO WSR N80 LEO (Colorcon)
3. 11,99 g (19,983 %) de PEO WSR N10 LEO (Dow)
4. 7,993 g de jarabe de maltitol (Lycasin 80/55) que contiene 5,995 g (9,991 %) de sólidos y 1,998 g de agua (Roquette)
5. 5,995 g (9,991 %) de glicerina natural (Spectrum)
6. 4,196 g (6,994 %) de HPMC E15 (Dow)
7. 0,072 g de emulsión de simeticona MED 341 (Nusil) que contiene 0,0444 g (0,074 %) de simeticona
8. 176,802 g de agua estéril USP (Braun)

(Nota: El 0,013 % restante de sólidos que contienen nanopartículas e insulina se añadirá después en el experimento)

Los componentes 1, 4, 5, 7 y 8 se añadieron a un cuenco de vidrio fabricado. El cuenco se equipó con una manta calefactora controlada Variac y se encendió la calefacción. La solución se preparó como se describe a continuación usando Degussa Dental Multivac Compact.

- 20 minutos agitación = 125 rpm vacío = 0 %
- Temperatura = 67 °C
- 40 minutos agitación = 125 rpm vacío = 0 %
- Temperatura = 63 °C, se corta la calefacción y se quita la manta calefactora
- 20 minutos agitación = 125 rpm vacío = 0 %
- Temperatura = 35 °C
- Se añade una mezcla de los componentes de 2, 3 y 6
- Se añade agua estéril para obtener c.s.p.
- 20 minutos agitación = 125 rpm vacío = 60 % (16 en Hg)
- 8 minutos agitación = 100 rpm vacío = 80 % (23 en Hg)
- 8 minutos agitación = 100 rpm vacío = 85 % (24 en Hg)
- 8 minutos agitación = 100 rpm vacío = 90 % (25 en Hg)
- 8 minutos agitación = 100 rpm vacío = 95 % (26 en Hg)
- 4 minutos agitación = 100 rpm vacío = 98 % (27 en Hg)
- Se añade agua estéril para obtener c.s.p.
- 4 minutos agitación = 100 rpm vacío = 98 % (27 en Hg)
- 4 minutos agitación = 100 rpm vacío = 100 % (28 en Hg)

La solución se coló en 4 hojas de película usando la recubridora K-Control con la barra de cuña de micrómetros fijada a 840 micrómetros sobre sustrato de Mylar para obtener muestras de placebo. Las películas se secaron 25 minutos en un horno de convección por aire a 80 °C. Las películas se secaron según la presente invención. Las películas se secaron de un modo en el que el flujo de aire fue suficientemente bajo de forma que no alteró la superficie superior o piel sobre la superficie de la película antes de la formación de una matriz viscoelástica, que se produjo en aproximadamente 2-6 minutos y que encerró la NP de insulina en su sitio de forma que se preservó la uniformidad del contenido. Las películas se cortaron en tiras de 22 X 26 mm que pesaron ~ 94 a 107 mg y tuvieron un % de humedad de 2,89. Cincuenta de estas tiras de placebo se sellaron individualmente en bolsas de RFE-042 y se etiquetaron.

Se dejaron 119,4 g de la solución que contenía 29,996 g (99,987 % de los sólidos) en el cuenco de vidrio después de preparar las tiras de placebo. A continuación se añadieron 600 microlitros de una solución que contenía NP de insulina (nanopartícula de oro-galactosa-amina-insulina bovina) que contenía 0,003 g (0,01 %) de insulina y 0,0009 g (0,003 %) de nanopartículas al cuenco. La solución se dejó con agitación durante 16 minutos a 100 rpm a un vacío del 100 % (28 en Hg) usando Degussa Dental Multivac Compact.

La película se coló en seis hojas de película usando la recubridora K-Control con un parámetro de micrómetros de 845 micrómetros sobre sustrato de Mylar. Dos películas se secaron a 60 °C durante 40 minutos, dos películas se secaron a 40 °C durante 80 minutos y dos películas se secaron a temperatura ambiente durante 19 horas. El secado se realizó de nuevo para retener y preservar la uniformidad del contenido como se describe en el presente documento. Las películas se cortaron en tiras de 22 X 26 mm que pesaron ~ 94 a 114 mg. Las tiras se sellaron individualmente en bolsas de RFE-042. Se obtuvieron cincuenta tiras en cada condición de secado. Se etiquetaron las tiras secadas a 60 °C y secadas a 40 °C. También se etiquetaron las tiras secadas a temperatura ambiente.

Las mediciones del ensayo inmunoenzimático usando mediciones de absorbancia indicaron que la insulina era estable después de secar a temperatura ambiente, 40 °C y 60 °C. Después de dejar reposar las tiras secadas a 60 °C durante 2 meses a temperatura ambiente, las tiras todavía fueron biológicamente activas.

**Ejemplo 9: Tiras de película de insulina (1 UI) para el primer estudio en ratones y placebo (método de deposición de añadir solución de NP-insulina) (método de disolución *in situ* de añadir NP-insulina)**

**Objetivo:** Fabricación de tiras de insulina y demostración de la bio-actividad de insulina inafectada tras el proceso de fabricación por inyección intraperitoneal (IP) en ratones diabéticos tratados con estreptozotocina.

Composición de la matriz de película

- 5
1. 4,796 g (7,993 %) de poli(óxido de etileno) (PEO) WSR 1105 LEO (Colorcon)
  2. 26,984 g (44,974 %) de PEO WSR N80 LEO (Colorcon)
  3. 11,99 g (19,983 %) de PEO WSR N10 LEO (Dow)
  4. 7,993 g de jarabe de maltitol (Lycasin 80/55) que contiene 5,995 g (9,991 %) de sólidos y 1,998 g de agua (Roquette)
  - 10 5. 5,995 g (9,991 %) de glicerina natural (Spectrum)
  6. 4,196 g (6,994 %) de HPMC E15 (Dow)
  7. 0,072 g de emulsión de simeticona MED 341 (Nusil) que contiene 0,0444 g (0,074 %) de simeticona
  - 15 8. 177,982 g de agua estéril USP (Braun)

Los componentes 1, 4, 5, 7 y 8 se añadieron a un cuenco de vidrio fabricado. El cuenco se equipó con una manta calefactora controlada Variac y se encendió la calefacción. La solución se preparó como se describe a continuación usando Degussa Dental Multivac Compact.

20 minutos agitación = 125 rpm vacío = 0 %  
 Temperatura = 67 °C  
 40 minutos agitación = 125 rpm vacío = 0 %  
 Temperatura = 63 °C, se corta la calefacción y se quita la manta calefactora  
 20 minutos agitación = 125 rpm vacío = 0 %  
 Temperatura = 35 °C

Se añade una mezcla de los componentes de 2, 3 y 6

Se añade agua estéril para obtener c.s.p.

20 minutos agitación = 125 rpm vacío = 60 % (16 en Hg)

8 minutos agitación = 100 rpm vacío = 80 % (23 en Hg)

8 minutos agitación = 100 rpm vacío = 85 % (24 en Hg)

8 minutos agitación = 100 rpm vacío = 90 % (25 en Hg)

8 minutos agitación = 100 rpm vacío = 95 % (26 en Hg)

Se añade 2 % de Span 80 (Spectrum) en peso a los sólidos para reducir el aire atrapado

8 minutos agitación = 100 rpm vacío = 95 % (26 en Hg)

20 La solución se coló en cuatro películas usando la recubridora K-Control con la barra de cuña ajustable de micrómetros fijada a 860 micrómetros sobre sustrato de Mylar para obtener muestras de placebo. Las películas se secaron 25 minutos en un horno de convección por aire a 80 °C. El secado se realizó de una manera controlada según la invención para prevenir la perturbación superior de la superficie superior y para prevenir el pelado antes de

25 secar la profundidad de la película y para desarrollar una matriz viscoelástica en el plazo de los seis (6) primeros minutos. La formación de la matriz viscoelástica encerró las NP de insulina de forma que no pudieran migrar y produjera uniformidad del contenido en la película y en las dosis unitarias cortadas de la misma.

30 Las películas se cortaron en tiras de 22,2 X 25,4 mm que pesaron de 93 a 113 mg. Cincuenta de estas tiras de placebo se sellaron individualmente en bolsas de RFE-042 y se etiquetaron. Cuarenta de las tiras de placebo (películas) se guardaron para el experimento de deposición de insulina de más adelante.

35 Se añadieron diez microlitros de solución de NP-5-insulina (insulina humana) preparada según la invención a cada una de las cuarenta tiras de placebo punto por punto usando una pipeta de 5 microlitros. Las tiras se secaron durante 2 horas a temperatura ambiente, se sellaron individualmente en bolsas de RFE-042 y se etiquetaron. Esto demuestra la viabilidad de añadir la solución de NP-insulina por el método de deposición directamente sobre la película.

40 Se dispusieron 120 g de la solución original en un cuenco de vidrio fabricado. A continuación se añadieron 2600 microlitros de la solución de NP-5-insulina (el objetivo fue para 3015 microlitros) al cuenco. Debido a la cantidad poco adecuada de solución de NP-5-insulina, el peso objetivo seco de la tira se ajustó de 100 mg a 117 mg para obtener 1 UI de insulina por tira de película. La solución se desaireó con agitación. La solución se coló en 6 hojas de película usando la recubridora K-Control con la barra de cuña ajustable de micrómetros fijada a 1000 a 1025 micrómetros sobre sustrato de Mylar. Dos películas se secaron a 60 °C durante 29 a 37 minutos, dos películas se

45 secaron a 80 °C durante 28 minutos y dos películas se secaron a 100 °C durante 20 minutos.

50 El secado se realizó según la invención (como fue para todos los ejemplos), es decir, se realizó secado controlado para desarrollar una matriz viscoelástica y encerrar la NP de insulina de forma que las partículas no pudieran migrar y que se lograra contenido uniforme. Se controló el flujo de aire para prevenir la perturbación de la superficie de la película y el pelado prematuro (antes de secar la profundidad de la película). Una vez se formó la matriz viscoelástica, se realizó secado adicional para garantizar que se obtuvo el nivel de contenido de agua deseado. Las

películas se cortaron en tiras de 22,2 X 25,4 mm que pesaron de 108 a 125 mg. Las tiras se sellaron individualmente en bolsas de RFE-042. Se obtuvieron de cuarenta a cuarenta y dos tiras en cada condición de secado. Las tiras secadas a 60 °C se etiquetaron, las tiras secadas a 100 °C y se etiquetaron, y las tiras secadas a 80 °C y también se etiquetaron. Este experimento demuestra la viabilidad de añadir la solución de NP-insulina *in situ* con la solución de película antes de colar la película.

Debido a la falta de ratones para el estudio, las tiras secadas a 80 ° y 100 °C no se probaron. Las nanopartículas (NP) con insulina humana unida fueron activas en reducir la glucosa en sangre a valores normoglucémicos en ratones diabéticos. La actividad siguió 400 minutos. Los datos indican que la insulina humana unida a nanopartículas no se disocia rápidamente de las nanopartículas y proporciona una administración continua de insulina, a diferencia de la insulina pura que tiene un corto periodo de actividad. Las tiras con NP-5-insulina unidas y fabricadas a 60 °C fueron capaces de reducir la glucosa en sangre a valores normoglucémicos. El proceso de fabricación y la temperatura no afectaron la bioactividad de la insulina unida a nanopartícula que indica que la insulina se estabiliza cuando se une. La nanopartícula parece ser crítica en la estabilización térmica de la insulina durante este proceso.

#### Ejemplo 10: Tiras de película de insulina (1 UI) Fórmula de disolución lenta

Composición de la matriz de película

1. 1,959 g (7,834 %) de poli(óxido de etileno) (PEO) WSR 1105 LEO (Colorcon)
2. 11,017 g (44,067 %) de PEO WSR N80 LEO (Colorcon)
3. 4,896 g (19,585 %) de PEO WSR N10 LEO (Dow)
4. 3,264 g de jarabe de maltitol (Lycasin 80/55) (Roquette) que contiene 2,448 g (9,793 %) de sólidos y 0,816 g de agua
5. 2,448 g (9,793 %) de glicerina natural (Spectrum)
6. 1,714 g (6,854 %) de HPMC E15 (Dow)
7. 0,03 g de emulsión de simeticona MED 341 (Nusil) que contiene 0,0185 g (0,074 %) de simeticona
8. 0,50 g (2,000 %) de Span 80 (Spectrum)
9. 71,684 g de agua estéril USP (McGaw)

Los componentes 4, 5, 7, 8 y 9 se añadieron a un cuenco de vidrio fabricado. A continuación se añadió el componente 1 lentamente al cuenco mientras se agitaba con una espátula. El cuenco se equipó con una manta calefactora controlada Variac y se encendió la calefacción. La solución se preparó como se describe a continuación usando Degussa Dental Multivac Compact.

8 minutos	agitación = 125 rpm	vacío = 0 %
Temperatura = 84 °C		
40 minutos	agitación = 125 rpm	vacío = 0 %
Se corta la calefacción y se quita la manta calefactora		
Se añade agua estéril para obtener c.s.p.		
Se añade una mezcla de los componentes 2, 3 y 6		
20 minutos	agitación = 125 rpm	vacío = 60 % (16 en Hg)
20 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 90 % (25 en Hg)
12 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 95 % (27 en Hg)
8 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 98 % (27,5 en Hg)
Se añade agua estéril para obtener c.s.p.		
4 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 100 % (28,5 en Hg)

Se añadieron 48,75 g de esta solución a un cuenco de vidrio fabricado. A continuación se añadieron 1,25 ml de NP-6-insulina que contenía 125 UI de insulina (da 1 IU por tira) al cuenco. Esta solución se agitó durante 4 minutos a 100 rpm y vacío = 100 % (28,5 en Hg) usando Degussa Dental Multivac Compact. Esta solución se coló en 2 hojas de película usando la recubridora K-Control con la barra de cuña ajustable de micrómetros fijada a 865 micrómetros sobre la cara de HDP del sustrato de papel. Las hojas de película se secaron en un horno de convección por aire a 60 °C durante 40 minutos. El secado se realizó según la invención como se describe en ejemplos previos para producir uniformidad del contenido en la película resultante y se cortaron dosis unitarias de la misma. Las películas se cortaron en tiras de 22,2 X 25,4 mm que pesaron de 93 a 110 mg. La película tuvo un contenido de humedad del 1,92 %. Cincuenta y cuatro tiras se sellaron individualmente en bolsas de RFE-042 y se etiquetaron.

#### Ejemplo 11: Tiras de película de insulina (1 UI) (fórmula rápida secada a 60 °C y 100 °C para el segundo estudio en ratones)

Composición de la matriz de película

1. 5,171 g (49,25 %) de poli(óxido de etileno) (PEO) WSR N10 LEO (Dow)
2. 2,586 g (24,63 %) de HPMC E15 (Dow)
3. 1,724 g de jarabe de maltitol (Lycasin 80/55) (Roquette) que contiene 1,293 g (12,31 %) de sólidos y 0,431 g

de agua

4. 1,293 g (12,31 %) de glicerina natural (Spectrum)
5. 0,053 g (0,50 %) de Span 80 (Spectrum)
6. 0,105 g (1,00 %) de dióxido de titanio USP (Brenntag)
- 5 7. 3,0 ml de NP-6-insulina que contiene 300 UI de insulina (da 1 UI por tira (Midatech))
8. 14,069 g de agua estéril USP (McGaw)

10 Los componentes 3, 4, 5, 6 y 8 se añadieron a un cuenco de vidrio fabricado. A continuación se añadió una mezcla de los componentes 1 y 2 al cuenco. La solución se preparó como se describe a continuación usando el Degussa Dental Multivac Compact.

40 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 60 % (16 en Hg)
40 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 90 % (25 en Hg)
12 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 95 % (27 en Hg)
8 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 98 % (27,5 en Hg)
Se añade agua estéril para obtener c.s.p.		
4 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 100 % (28,5 en Hg)
Se añade el componente 7		
Se añade agua estéril para obtener c.s.p.		
8 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 100 % (28,5 en Hg)

15 La solución se coló en 2 hojas de película usando la recubridora K-Control con la barra de cuña ajustable de micrómetros fijada a 440 a 460 micrómetros sobre la cara de HDP del sustrato de papel. Una película se secó 15 minutos a 100 °C en un horno de convección por aire y la otra película se secó 30 minutos a 60 °C en un horno de convección por aire. El secado se hizo según la invención para producir uniformidad del contenido en la película resultante y se cortaron dosis unitarias de la misma. Las películas se cortaron en tiras de 0,875 X 0,5 pulgadas que pesaron de 33 a 39 mg. Se obtuvieron cincuenta y cinco tiras en cada condición de secado. Las tiras se sellaron individualmente en bolsas de RFE-042. Las tiras secadas a 100 °C y las tiras secadas a 60 °C se etiquetaron.

20 **Ejemplo 12: Tiras de película de disolución rápida Fórmula de placebo para el segundo estudio en ratones**

Composición de la matriz de película

- 25 1. 18,469 g (49,25 %) de poli(óxido de etileno) (PEO) WSR N10 LEO (Dow)
2. 9,236 g (24,63 %) de HPMC E15 (Dow)
3. 6,155 g de jarabe de maltitol (Lycasin 80/55) (Roquette) que contiene 4,616 g (12,31 %) de sólidos y 1,539 g de agua
4. 4,616 g (12,31 %) de glicerina natural (Spectrum)
- 30 5. 0,188 g (0,50 %) de Span 80
6. 0,375 g (1,00 %) de dióxido de titanio USP (Brenntag)
7. 60,961 g de agua destilada

35 Los componentes 3, 4, 5, 6 y 7 se añadieron a un cuenco de vidrio fabricado. A continuación se añadió una mezcla de los componentes 1 y 2 al cuenco. El cuenco se equipó con una manta calefactora controlada Variac y se encendió la calefacción. La solución se preparó como se describe a continuación usando el Degussa Dental Multivac Compact.

12 minutos	agitación = 125 rpm	vacío = 0 %
Temperatura = 85 °C		
Se corta la calefacción y se quita la manta calefactora		
20 minutos	agitación = 125 rpm	vacío = 0 %
Se añade agua destilada para obtener QS		
20 minutos	agitación = 125 rpm	vacío = 60 % (16 en Hg)
20 minutos	agitación = 125 rpm	vacío = 90 % (25 en Hg)
12 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 95 % (27 en Hg)
8 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 98 % (27,5 en Hg)
Se añade agua estéril para obtener c.s.p.		
4 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 100 % (28,5 en Hg)
Se añade agua estéril para obtener c.s.p.		
8 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 100 % (28,5 en Hg)

40 La solución se coló en películas usando la recubridora K-Control con la barra de cuña ajustable de micrómetros fijada a 440 micrómetros sobre sustrato de Mylar. Las películas se secaron 25 minutos en un horno de convección por aire a 80 °C. El secado se hizo según la invención para producir uniformidad del contenido en la película resultante y se cortaron dosis unitarias de la misma. La película tuvo un contenido de humedad del 4,42 %. Las películas se cortaron en tiras de 0,875 X 0,5 pulgadas que pesaron de ~ 35 a 36 mg. La película tuvo resistencia a la

tracción adecuada, tuvo resistencia al desgarro de baja a moderada y tuvo flexibilidad adecuada cuando las propiedades se evaluaron subjetivamente. Una tira de película de 36 mg tuvo una solución por inmersión parcial (PID) a 37,2 °C de 5 segundos (PID es una técnica interna usada para dar una estimación del tiempo necesario para que la película se rompa cuando se expone a agua con un peso de 2,8 g unido).

5 La experiencia de proyectos de investigación previos ha mostrado que una PID de 5 a 10 segundos se corresponde con un tiempo de disolución en la boca de 1 minuto o menos.

10 Sesenta de las tiras de película se sellaron a granel en el aluminio y se etiquetaron para ser usadas como placebos para las tiras de 1 UI de insulina en la fórmula rápida para el segundo estudio en ratones (preparado en el Ejemplo 8).

**Ejemplo 13: Preparación de tiras de película oclusivas de disolución lenta para el estudio en minicerdos**

15 Composición de la matriz de película

1. 7,844 g (7,47 %) de poli(óxido de etileno) (PEO) WSR 1105 LEO (Colorcon)
2. 53,981 g (51,41 %) de PEO WSR N80 LEO (Colorcon)
- 20 3. 17,011 g de jarabe de maltitol (Lycasin 80/55) (Roquette) que contiene 12,758 g (12,15 %) de sólidos y 4,253 g de agua
4. 12,758 g (12,15 %) de glicerina natural (Spectrum)
5. 10,805 g (10,29 %) de HPMC E15 (Dow)
6. 2,10 g (2,00 %) de sucralosa
7. 4,20 g (4,00 %) de aroma de menta 2303 (Ungerer)
- 25 8. 0,525 g (0,50 %) de monooleato de glicerilo (Spectrum)
9. 0,0315 g (0,03 %) de Blue n.º 1
10. 240,747 g de agua estéril (Braun)

30 Los componentes 3, 4, 8 y 10 se añadieron a un cuenco de vidrio fabricado. A continuación se añadió el componente 1 al cuenco mientras se agitaba con una espátula. El cuenco se equipó con una manta calefactora controlada Variac y se encendió la calefacción. La solución se preparó como se describe a continuación usando el Degussa Dental Multivac Compact.

20 minutos	agitación = 150 rpm	vacío = 0 %
40 minutos	agitación = 150 rpm	vacío = 0 %
Se corta la calefacción y se quita la manta calefactora		
Se añade una mezcla de los componentes 2, 5, 6 y 9		
Se añade agua estéril para obtener c.s.p.		
20 minutos	agitación = 125 rpm	vacío = 60 % (17 en Hg)
20 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 90 % (26 en Hg)
12 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 95 % (27 en Hg)
8 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 98 % (28 en Hg)
Se añade agua estéril para obtener c.s.p.		
Se añade el componente 7		
8 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 100 % (28,5 en Hg)

35 La solución se coló en película usando la recubridora K-Control con la barra de cuña ajustable de micrómetros fijada a 900 micrómetros sobre la cara de HDPE no brillante del sustrato de papel 6330L. La película se secó 27 minutos en un horno de convección por aire a 80 °C. El secado se hizo según la invención para producir uniformidad del contenido en la película resultante y se cortaron dosis unitarias de la misma. Una tira de 22 X 11 mm de la película pesó 51 mg. Una tira de 22 X 11 de la película tuvo un valor de la disolución por inmersión parcial (PID) a 37,2 °C de 18 segundos y duró aproximadamente 13,5 minutos en el área bucal área de la boca. Las películas se cortaron en 40 tiras de 22 X 160 mm y se sellaron en aluminio para su uso en el estudio en minicerdos.

**Ejemplo 14: Preparación de tiras de película de MI-NP-10-insulina de disolución rápida para el estudio en minicerdos**

45 Los objetivos primarios de este estudio fueron probar si las preparaciones bucales de insulina llevadas por nanopartículas de oro incorporadas en la matriz de película alcanzarían las concentraciones sistémicas adecuadas para una respuesta terapéutica y para determinar la absorción de insulina a través de la mucosa bucal con el fin de establecer una dosis apropiada para ser adicionalmente investigada en seres humanos.

50 Preparación de nanopartículas de insulina-oro:

a) Se enrasó una solución de nanopartículas de oro MI-NP-10-INS (13,041 mg de oro) a 49,68 ml de agua. Se añadió ácido acético a la solución final para obtener un pH=4,6.

Se añadieron 55,7 mg de insulina humana en 27,85 ml de Tris.HCl a pH 7,5.

La suspensión se dejó 24 horas y después de este tiempo se centrifugó 1 minuto a 4500 g.

Se extrajo el sobrenadante y se guardó para análisis del contenido de insulina y de oro adicional. El precipitado se resuspendió en 3,220 ml de agua para obtener una concentración de insulina final de 500 unidades de insulina/ml.

5 La distribución de tamaño de las nanopartículas de insulina-oro se determinó por análisis de DLS. El contenido de insulina se determinó por ensayo estándar de BCA.

La preparación final de NP de insulina-oro se realizó bajo vitrina de flujo de laminar. Todo el material de vidrio y de plástico y los disolventes usados se esterilizaron en un autoclave. Todos los desechables se suministran pre-esterilizados.

10 **b) Contenido de insulina:**

El % de unión de insulina a las nanopartículas se determinó por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de insulina} = \frac{\text{insulina añadida} - \text{sobrenadante de insulina}}{\text{insulina añadida}} \times 100$$

15

**Tabla 3 - Contenido de insulina**

Muestra	Insulina añadida (mg)	Sobrenadante de insulina (mg)	Insulina unida (mg)	% de insulina unida
MI-NP-10 insulina	55,700	1,308	54,4	97,65

**Resumen del análisis**

20

Insulina: 54,4 mg de insulina

Oro: 13,041 mg de oro

Volumen total: 3,23 ml de agua

25

Concentración de insulina final: 16,8 mg de insulina/ml= 488 unidades/ml

Concentración de oro final: 4,037 mg de Au/ml.

30

c) Preparación de la composición de la matriz de película

1. 14,775 g (49,25 %) de PEO WSR N10 LEO (Colorcon)

2. 7,389 g (24,63 %) de HPMC E15 (Dow)

3. 4,924 g de jarabe de maltitol (Lycasin 80/55) (Roquette) que contiene 3,693 g (12,31 %) de sólidos y 1,231 g de agua

35

4. 3,693 g (12,31 %) de glicerina natural (Spectrum)

5. 0,15 g (0,50 %) de monooleato de glicerilo (Spectrum)

6. 0,30 g (1,00 %) de dióxido de titanio (Brenntag)

7. 53,769 g de agua estéril (Braun)

40

Los componentes 3, 4, 5, 6 y 7 se añadieron a un cuenco de vidrio fabricado. A continuación se añadió una mezcla de los componentes 1 y 2 al cuenco. La solución se preparó como se describe a continuación usando el Degussa Dental Multivac Compact.

40 minutos agitación = 100 rpm vacío = 60 % (17 en Hg)

40 minutos agitación = 100 rpm vacío = 90 % (26 en Hg)

12 minutos agitación = 100 rpm vacío = 95 % (27 en Hg)

8 minutos agitación = 100 rpm vacío = 98 % (28 en Hg)

Se añade agua estéril para obtener c.s.p.

4 minutos agitación = 100 rpm vacío = 100 % (28,5 en Hg)

45

Se añadieron diecisiete gramos de esta solución que contenía 6 gramos de sólidos a un cuenco fabricado más pequeño. A continuación se añadieron 3 ml de MI-NP-10-insulina que contenía 1500 UI de insulina (Midatech) al cuenco. La solución se agitó 10 minutos a 125 rpm y vacío = 100 % (28,5 en Hg) usando Degussa Dental Multivac Compact. La solución se coló en película usando la recubridora K-Control con la barra de cuña ajustable de micrómetros fijada a 365 micrómetros sobre la cara de HDPE no brillante del papel 6330L. La película se secó 20 minutos en un horno de convección por aire a 80 °C. El secado se hizo según la invención para producir uniformidad del contenido en la película resultante y se cortaron dosis unitarias de la misma. La película tuvo un contenido de humedad de 3,33. La película se cortó en tiras de 7 X 18 mm que pesaron de 9 a 11 mg. El peso objetivo de la tira seca fue 10 mg con un intervalo de peso aceptable para dar +/- 10 % del objetivo de 9 a 11 mg. La dosificación de insulina por tira es 2,5 UI. Las tiras tuvieron una PID de 3 segundos. Se etiquetaron diez bolsas de aluminio que

50

contenían 2 tiras a 2,5 UI de insulina por tira o 5 UI de insulina por bolsa. También se envasaron noventa de las tiras individuales que contenían 2,5 UI por tira a granel y se etiquetaron.

5 **Ejemplo 15: Laminación de la tira de película de insulina de disolución rápida sobre la película oclusiva de disolución lenta**

Composición de la matriz de película de disolución rápida

10 Tiras de película (7 X 18 mm) de la película de insulina de disolución rápida hecha en el Ejemplo 14 anterior se centraron sobre tiras (11 X 22 mm) de la película oclusiva de disolución lenta hecha en el Ejemplo 10 anterior. Las tiras de película se laminaron dejando que las tiras pasaran dos veces a través del GBC Heat Sealer H212 usando un ajuste de calefacción de 3. Se etiquetaron veinticuatro bolsas de aluminio que contenían 2 tiras laminadas a 2,5 UI de insulina por tira o 5 UI de insulina por bolsa.

15 Las películas laminadas de este ejemplo se enviaron para su uso en el estudio en minicerdos:

Veinticuatro bolsas de aluminio que contenían 2 tiras laminadas a 2,5 UI de insulina por tira o 5 UI de insulina por bolsa.

20 **Ejemplo 16: Preparación de tiras de película de placebo de disolución rápida y laminación para dar tiras de película oclusivas de disolución lenta para el estudio en minicerdos**

Composición de película de disolución rápida

- 25 1. 14,775 g (49,25 %) de PEO WSR N10 LEO (Colorcon)  
 2. 7,389 g (24,63 %) de HPMC E15 (Dow)  
 3. 4,924 g de jarabe de maltitol (Lycasin 80/55) (Roquette) que contiene 3,693 g (12,31 %) de sólidos y 1,231 g de agua  
 4. 3,693 g (12,31 %) de glicerina natural (Spectrum)  
 30 5. 0,15 g (0,50 %) de monooleato de glicerilo (Spectrum)  
 6. 0,30 g (1,00 %) de dióxido de titanio (Brenntag)  
 7. 68,769 g de agua destilada

35 Los componentes 3, 4, 5, 6 y 7 se añadieron a un cuenco de vidrio fabricado. A continuación se añadió una mezcla de los componentes 1 y 2 al cuenco. La solución se preparó como se describe a continuación usando el Degussa Dental Multivac Compact.

40 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 60 % (17 en Hg)
40 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 90 % (26 en Hg)
12 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 95 % (27 en Hg)
8 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 98 % (28 en Hg)
Se añade agua estéril para obtener c.s.p.		
4 minutos	agitación = 100 rpm	vacío = 100 % (28,5 en Hg)

40 La solución se coló en película usando la recubridora K-Control con la barra de cuña ajustable de micrómetros fijada a 365 micrómetros sobre la cara de HDPE no brillante de papel 6330L. La película se secó 20 minutos en un horno de convección por aire a 80 °C. El secado se hizo según la invención para producir uniformidad del contenido en la película resultante y se cortaron dosis unitarias de la misma. El contenido de humedad de la película fue del 4,23 % y el peso objetivo de la tira seca fue 10 mg.

45 Tiras de película (7 X 18 mm) de este placebo de disolución rápida se centraron sobre tiras (11 X 22 mm) de las tiras de película oclusivas de disolución lenta hechas en el Ejemplo 10. Las tiras se laminaron dejándolas pasar dos veces a través del GBC Heat Sealer H212 usando un ajuste de calefacción de 3. Diez bolsas de aluminio que contenían 2 de las tiras de placebo laminadas por bolsa y se etiquetaron.

50 Preparación de controles negativos y positivos

Se prepararon 2 soluciones bajo vitrina de flujo laminar.

1. CONTROL NEGATIVO:

55 A un tampón de solución salina estéril (0,85 % de NaCl) 20 ml:

se añadió:

60 Fenol (40 µl, 0,2 %) (Lote: 067K0765-Sigma-aldrich), albúmina de suero bovino (0,01 mg, 0,1 %) (K40246318 936-Merck).

La mezcla se agitó durante 15 min y a continuación el pH se ajustó a ~ 3 con HCl 1 N. La solución se pasó a través de un filtro de 0,22  $\mu$  y se cargó en un vial de 8 ml estéril y se etiquetó.

5 2. CONTROL POSITIVO:

A 10 ml de control negativo (antes de ajustar el pH):

se añadió

10

Insulina (3,45 mg, 100 UI) (11 376 497 001-Roche).

La mezcla se agitó durante 15 min y el pH se ajustó a -3,0 con HCl 1 N.

La solución se pasó a través de un filtro de 0,22  $\mu$  y se cargó en un vial estéril de 8 ml. A continuación, el vial se etiquetó.

15

3. Transporte para el estudio en minicerdos:

a. 2 viales de control positivo V = 6 ml: tampón de solución salina Insulina 0,06 mM

b. 2 viales de control negativo V = 6 ml: tampón de solución salina

20

c. 10 tiras de placebo (Ejemplo 13)

d. 24 bolsas de insulina MI-NP-10; cada bolsa contuvo 2 películas y cada película contuvo 2,5 UI de insulina: (Ejemplo 12)

Protocolo

25

Se sintetizaron construcciones de nanopartícula que se unen a insulina humana como se ha descrito anteriormente y a continuación se incorporaron en sistemas de administración de tira de película de polímero. Las tiras de película se disolvieron en agua y entonces se inyectó una alícuota en la cavidad peritoneal de ratones diabéticos para probar la actividad biológica. Tras la inyección se monitorizaron los niveles de glucosa en sangre y se representó el cambio en la glucosa en sangre para cada ratón.

30

La Figura 22 muestra los niveles de glucosa en sangre representados en una gráfica. Obsérvese que "UI" = Unidad Internacional. Los siguientes grupos se representan en el gráfico de la Figura 22:

35

Muestra 1. Blanco - inyección de agua (Blanco)

Muestra 2. Insulina humana pura a una dosis de 1 UI/kg (Insulina h.)

Muestra 3. Insulina humana pura unida a nanopartículas a dosis de 1 UI/kg (NP-Insulina)

Muestra 4. Insulina humana (1 UI/kg) disuelta en solución de una tira de blanco. (Insulina más tira del Ejemplo 13)

40

Muestra 5. Insulina humana unida a nanopartículas depositadas sobre una tira de blanco a temperatura ambiente y luego disuelta en agua. (2 UI/kg) (Tira a RT; NP-5-Insulina depositada sobre tiras del Ejemplo 13.)

Muestra 6. Insulina humana unida a nanopartículas y fabricada en una tira a 60 grados centígrados (1 UI/kg) y luego disuelta en agua. (Tira 60 (NP5-Insulina en tiras))

45

Muestra 7. Solución de una tira de blanco disuelta. (Tira de blanco; tira de película de placebo del Ejemplo 13)

Muestra 8. Insulina bovina unida a una nanopartícula y fabricada en una tira a 60 grados centígrados (1 UI/kg) y luego disuelta en agua. (Tira B; insulina bovina en tiras de película)

Conclusiones de las muestras 1-8

50

*Controles*

- El control (muestra 1) muestra que un blanco de agua no tiene actividad hipoglucemiante.
- El control (muestra 2) muestra que la insulina humana disminuyó transitoriamente la glucosa en sangre a valores normoglucémicos que luego volvieron a valores hiperglucémicos a los 400 minutos.
- 55 - El control (muestra 4) muestra que la formulación de polímero disuelta de las tiras no interfiere con la actividad de insulina.
- El control (muestra 5) muestra que las nanopartículas que contienen insulina humana que se depositaron sobre las tiras (es decir, no incorporadas en la película) y se transportaron tras la producción (control de transporte) fueron todavía activas.
- 60 - El control (muestra 7) muestra que el blanco de polímero disuelto de las tiras no tuvo actividad hipoglucemiante.

*Muestras de prueba*

- 5 - La muestra 3 mostró que las nanopartículas con insulina unidas fueron activas en reducir la glucosa en sangre a valores normoglucémicos. La actividad continuó 400 minutos. Los datos indican que la insulina humana unida a nanopartículas no se disocia rápidamente de las nanopartículas y proporciona una administración continua de insulina, a diferencia de la insulina pura que solo tiene un corto periodo de actividad.
- 10 - La muestra 6 muestra que las nanopartículas con insulina unidas y fabricadas a 60 grados centígrados fueron capaces de reducir la glucosa en sangre a niveles normoglucémicos. El proceso de fabricación y la temperatura no afectaron la bioactividad de la insulina unida a estas nanopartículas, que indica que la insulina se estabiliza cuando se une. La cinética de actividad fue similar a la de la muestra 3, sugiriendo que la insulina está todavía unida a la nanopartícula después de la fabricación en una película a 60 grados.
- 15 - La muestra 8 muestra que la insulina bovina sobre nanopartículas y la fabricación a 60 grados centígrados y que se dejó asentar a temperatura ambiente durante 2 meses era todavía biológicamente activa.

Los resultados anteriores confirman que es posible unir (o asociar estrechamente) insulina humana a una nanopartícula y que la actividad biológica de la insulina unida se mantiene durante y después del proceso de fabricación. Los datos también sugieren que la nanopartícula es crítica en la estabilización térmica de la insulina durante este proceso. La actividad biológica de la insulina humana pura sobre una nanopartícula parece ser superior a la insulina humana pura sola. También la duración de la acción de las nanopartículas de insulina es mucho más larga que la observada para la insulina humana pura. La insulina humana pura tiene una tendencia a formar agregados en solución y es solo las formas de monómero de insulina las que son activas. Estas formas de monómero son rápidamente eliminadas por el riñón, y el efecto de una inyección de insulina humana pura normalmente es durante dentro de 4 horas. Los resultados anteriores sugieren que las construcciones de nanopartículas de insulina están liberando monómeros de insulina lentamente de la partícula. A los 400 minutos no se observó pérdida de actividad de insulina en los ratones. Sin embargo, la fase inicial de actividad fue similar a la de la insulina humana pura. Las nanopartículas liberan algo de insulina inmediatamente (de acción rápida) y luego distribuyen una reserva de insulina. A las 7 horas esta reserva no se ha agotado todavía. A los pacientes diabéticos normalmente se les administra una mezcla de insulina de acción rápida (actúa durante las 6 primeras horas) e insulina de acción lenta (empieza después de 6 horas y continúa durante hasta 24 horas). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, parece de estos datos preliminares que las nanopartículas de insulina están comportándose como una combinación de insulina de acción rápida y lenta. Este comportamiento cinético también se observa para la liberación de fármacos de nanopartículas mediante glutación (una fase rápida y luego una fase de liberación lenta hasta 24 horas). Parece que mecanismos de intercambio estérico/químico similares también se aplican a la liberación de péptidos (insulina) de nanopartículas.

Estos resultados tienen implicaciones significativas para el uso de nanopartículas para la administración de péptidos tales como insulina usando tecnología de administración de película.

#### 40 Prueba *in vivo* en minicerdos

Un grupo de tres minicerdos ayunó durante la noche y luego se anestesiaron. A continuación se inyectaron con 2 UI de insulina humana subcutáneamente. Se usó un 4º animal como control y se trató idénticamente, pero se inyectó con tampón estéril. Se tomaron muestras de sangre a intervalos conocidos hasta 180 minutos. Tras este tratamiento, los minicerdos se administraron un periodo de lavado de una semana y el experimento se repitió con la inyección subcutánea (sc) sustituida con dos tiras de polímero (Ejemplo 13) que contenían nanopartículas con insulina acoplada a una concentración de 2,5 UI de insulina humana por tira para administración transbucal (tb). Se tomaron de nuevo muestras de sangre a intervalos regulares hasta un periodo de 180 minutos. El plasma sanguíneo se analizó para niveles de glucosa en sangre, insulina y péptido C.

#### Niveles de péptido C

Los resultados se muestran en la Figura 23. La medición del péptido C humano es común en pacientes diabéticos. Un nivel reducido de péptido C se considera que es una indicación de niveles elevados de insulina exógena que conduce a una reducción de insulina endógena en el paciente. En el caso del experimento de los presentes inventores, los gráficos de todos los animales están de acuerdo con la supresión de la producción de insulina endógena. Para el cerdo 2 (véase la Figura 23 B)), que tuvo el mayor intervalo dinámico, los datos sugieren que esta respuesta es más rápida que en la administración sc. Los otros animales no fueron informativos como resultado de su menor intervalo dinámico. Debe observarse que para todos los animales tratados, los niveles se redujeron por debajo del nivel mínimo detectable (36,3 pM), mientras que el animal de control mantiene niveles medibles.

#### Niveles de glucosa en sangre

65 Los datos de glucosa en sangre se representan como valores absolutos y se muestran en la Figura 24. Cada gráfico muestra las representaciones para las dos series completas, datos de inyección subcutánea a la izquierda y datos

transbucuales a la derecha. El conjunto de gráficos de las Figuras 24 A) - C) tienen los datos de control promediados a lo largo de los dos experimentos. Esto representa, por tanto, un estudio longitudinal en el que cada animal actúa eficazmente de su propio control, mostrando la parte izquierda del gráfico cómo un animal respondió a insulina sc y el lado derecho cómo el mismo animal respondió a la insulina tb siete días después. La comparación de los paneles izquierdo y derecho indica la diferencia en las respuestas, tanto con el tiempo como en magnitud. Como se ha establecido, los gráficos se representan contra el animal de control, que recibió agua estéril para el primer experimento y una tira de blanco en el segundo experimento.

Otra consideración es que la bibliografía sugiere que en minicerdos anestesiados la producción de insulina se suprime, conduciendo a niveles significativamente mayores de glucosa en sangre. La implicación aquí es que en animales no anestesiados los presentes inventores podrían esperar ver una elevada respuesta no solo a la insulina sc, sino también a la insulina transbucalmente administrada mediante las tiras.

*Conclusiones referentes a los niveles de glucosa en sangre*

1. Basándose en el comparador longitudinal para la inyección sc de control positivo, la reducción de niveles de glucosa en sangre se ha logrado en los animales tb, que está de acuerdo con la presencia de insulina y a un grado tan bueno como la administración sc.

2. Que en vista de la respuesta al anestésico usado como se indica en la bibliografía, en la que se ha observado que los niveles de glucosa aumentan, podría concluirse que los resultados obtenidos son incluso más significativos que lo que indican los niveles medidos.

Niveles de insulina

La Figura 25 muestra los datos obtenidos de la medición de insulina en las muestras.

La Figura 25 A) muestra los niveles de insulina  $\mu\text{U/ml}$  para el minicerdo 1 de control durante el experimento de insulina subcutánea (sc) y el experimento de insulina transbucal (tb).

La Figura 25 B) muestra los datos de niveles de insulina del día 0,  $\mu\text{U/ml}$ , presentes en los minicerdos 2, 3 y 4 después de la inyección de 2,5 UI de insulina humana. Los datos corregidos para cambios en los niveles de referencia mostrados en la Figura 21 A) (Animal 1 sc) se representaron desde el momento de 5 min en adelante.

La Figura 25 C) muestra los datos de niveles de insulina del día 7,  $\mu\text{U/ml}$ , presentes en los minicerdos 2, 3 y 4 después de transbucal de 5 UI de tiras de insulina humana. Datos corregidos para cambios en los niveles de referencia de insulina mostrados en la Figura 25 A) (Animal 1 tb).

Observaciones referentes a los niveles de insulina:

1. El análisis longitudinal sugiere que la administración tb fue tan buena como la insulina sc y quizás tuvo una aparición más rápida en algunos de los minicerdos.

2. Las mediciones de insulina disponibles en este momento (véase anteriormente) parecen soportar la conclusión extraída de los niveles de glucosa en sangre. Concretamente, que los presentes inventores han logrado la absorción de insulina humana de las tiras a través de la membrana bucal.

3. Las mediciones de péptido C proporcionan adicionalmente soporte para las conclusiones 1. y 2.

4. El intervalo dinámico de los presentes inventores para la respuesta en este experimento es muy pequeño, ya que los minicerdos pasaron hambre y tuvieron bajos niveles de glucosa en sangre. Los datos también muestran que, incluso con las inyecciones de insulina sc de control positivo, los menores valores que los presentes inventores pueden alcanzar razonablemente es 2,5-3 mM de glucosa en sangre. Estos animales tienen tendencia a hipoglucemia y así el hígado producirá glucosa para prevenir los niveles que caen más bajos.

5. El cerdo de control también tuvo una reducción sustancial en la glucosa en sangre, pero en una escala absoluta, los niveles más bajos siempre están por encima de los animales tratados con insulina. El cerdo de control también tuvo mayor glucosa en sangre en ayunas, pero los presentes inventores entienden que esto está dentro del intervalo normal de variabilidad para esta raza de minicerdo. Todos los minicerdos tratados tuvieron puntos de partida similares para la glucosa en sangre en reposo.

Los datos obtenidos para los niveles de glucosa en sangre, insulina y péptido C muestran que los presentes inventores han logrado la absorción transbucal de insulina de las tiras y que esto ha producido una respuesta biológica en los minicerdos a un grado tan eficaz como la respuesta de control de una inyección subcutánea de 2 UI.

## REIVINDICACIONES

1. Un sistema de administración de película terapéutica o bioeficaz que comprende:
- 5 (a) una o más matrices de película que comprenden al menos un polímero;  
 (b) una pluralidad de nanopartículas incorporadas en al menos una de dichas matrices de película, comprendiendo dichas nanopartículas:
- 10 (i) un núcleo que comprende un metal;  
 (ii) una corona que comprende una pluralidad de ligandos ligados covalentemente al núcleo, en la que al menos uno de dichos ligandos comprende un resto de hidrato de carbono; y  
 (iii) al menos un péptido unido a la corona.
2. El sistema de administración de película según la reivindicación 1, en el que el péptido está seleccionado del grupo que consiste en: insulina, GLP-1, IGF1, IGF2, relaxina, INSL5, INSL6, INSL7, polipéptido pancreático (PP), péptido tirosina tirosina (PTT), neuropéptido Y, oxitocina, vasopresina, GnRH, TRH, CRH, GHRH/somatostatina, FSH, LH, TSH, CGA, prolactina, CIIP, ACTH, MSH, enorfinas, lipotropina, GH, calcitonina, PTH, inhibina, relaxina, hCG, HPL, glucagones, insulina, somatostatina, melatonina, timosina, timulina, gastrina, grelina, timopoyetina, CCK, secretina de GIP, motina VIP, enteroglucagón, IGF-1, IGF-2, leptina, adiponectina, resistina, osteocalcina, renina, EPO, calicitrol, ANP, BNP, quimiocinas, citocinas, adipocinas y análogos biológicamente activos de los mismos.
3. El sistema de administración de película según la reivindicación 2, en el que el péptido es capaz de estimular una reducción en los niveles de glucosa en sangre en un sujeto mamífero.
- 25 4. El sistema de administración de película según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que el péptido es insulina humana monomérica y/o dimérica.
5. El sistema de administración de película según la reivindicación 1, en el que dicho al menos un péptido comprende dos, tres, cuatro, cinco o más especies diferentes de péptido.
- 30 6. El sistema de administración de película según la reivindicación 5, en el que dicho al menos un péptido comprende insulina y GLP-1.
7. El sistema de administración de película según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
- 35 (i) dicho al menos un ligando que comprende un resto de hidrato de carbono está seleccionado del grupo que consiste en: 2'-tioetil- $\alpha$ -D-galactopiranosido, 2'-tioetil- $\beta$ -D-glucopiranosido, 2'-tioetil-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido, 5'-tiopentanol-2-desoxi-2-imidazolacetamido- $\alpha,\beta$ -D-glucopiranosido y 2'-tioetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, y en donde dicho al menos un ligando que comprende un resto de hidrato de carbono está ligado covalentemente al núcleo mediante el azufre del tiol; y/o
- 40 (ii) dicha pluralidad de ligandos ligados covalentemente al núcleo comprende además al menos un ligando no de hidrato de carbono, opcionalmente en donde dicho al menos un ligando no de hidrato de carbono comprende 1-amino-17-mercapto-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecanol ligado covalentemente al núcleo mediante el azufre del tiol.
- 45 8. El sistema de administración de película según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
- al menos 5 o más moléculas de péptido están unidas por núcleo; y/o  
 dicho al menos un péptido está unido no covalentemente a la corona.
- 50 9. El sistema de administración de película según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el núcleo de nanopartícula comprende un componente divalente, opcionalmente en el que dicho componente divalente está seleccionado del grupo que consiste en cinc, magnesio, cobre, níquel, cobalto, cadmio o calcio, sus óxidos y sales de los mismos.
- 55 10. El sistema de administración de película según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
- (i) la una o más matrices de película se forman evaporando un vehículo disolvente de las matrices para formar una película viscoelástica en el plazo de los 10 primeros minutos de aplicar energía térmica o por irradiación, por lo que las nanopartículas se encierran o se previene sustancialmente que migren con las matrices para proporcionar un sistema de administración de película con una distribución uniforme de las nanopartículas;
- 60 (ii) la una o más matrices de película comprenden dos capas de película que tienen propiedades de liberación diferentes;
- (iii) la una o más matrices de película comprenden al menos un polímero soluble en agua o hinchable en agua; y/o
- 65 (iv) las nanopartículas están distribuidas dentro de dicha una de las matrices de forma que las nanopartículas o

el péptido llevado por las nanopartículas por unidad de dosificación no varía más de aproximadamente el 10 % en peso.

- 5 11. El sistema de administración de película según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un agente potenciador de la permeación y/o de la penetración, opcionalmente en donde el agente potenciador de la permeación o de la penetración está seleccionado del grupo que consiste en derivados de ácido graso de mono- y diacilglicerol de cadena media, tensioactivos sintéticos y naturales, ácidos grasos de cadena media y sales y ésteres de los mismos, sales biliares, agentes quelantes, detergentes, fosfolípidos, lecitinas, cetomacrogel, glicerol y polialquilenglicoles y sus ésteres, salicilatos, polisorbatos, sulfóxidos de alquilo, alcanoles, 10 ácidos grasos y sus ésteres y alcoholes correspondientes, urea y ureas cíclicas, derivados de pirrolidona, alquilamidas y amidas cíclicas, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos no iónicos, cetonas, óxidos de alquilo, óxidos de cicloalqueno, aceites, alquilglucósidos, zónula ocluyente, alcoholes, y combinaciones de los mismos.
- 15 12. El sistema de administración de película según la reivindicación 10, en el que el al menos un polímero soluble en agua o hinchable en agua está seleccionado del grupo que consiste en poli(óxido de etileno), celulosa, un derivado de celulosa, pululano, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), polietilenglicol, copolímeros de carboxivinilo, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, alginato de sodio, goma xantana, goma tragacanto, goma guar, goma de acacia, goma arábica, ácido poliacrílico, copolímero de metacrilato de metilo, copolímeros de carboxivinilo, almidón, gelatina y combinaciones de los mismos, solos o en combinación con poli(óxido de etileno).
- 20 13. El sistema de administración de película de la reivindicación 10, en el que el al menos un polímero soluble en agua o hinchable en agua está seleccionado del grupo que consiste en etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, acetato-ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, poli(acetato-ftalatos de vinilo), gelatina ftalatada, gelatina reticulada, copolímeros de poli(ácido láctico)/poli(ácido glicólico)/polietilenglicol, policaprolactona y combinaciones de los mismos.
- 25 14. El sistema de administración de película de la reivindicación 10, en el que el al menos un polímero soluble en agua o hinchable en agua está seleccionado del grupo que consiste en copolímero de metacrilato de metilo, polímero de ácido poliacrílico, poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), copolímeros de poli(ácido láctico)/poli(ácido glicólico)/polietilenglicol, polidioxanos, polioxalatos, poli( $\alpha$ -ésteres), polianhídridos, poliacetatos, policaprolactonas, poli(ortoésteres), poliaminoácidos, poliaminocarbonatos, poliuretanos, policarbonatos, poliamidas, poli(cianoacrilatos de alquilo), y mezclas y copolímeros de los mismos.
- 30 15. El sistema de administración de película de la reivindicación 10, en el que dicho polímero comprende además un polímero seleccionado del grupo que consiste en alginato de sodio, goma xantana, goma tragacanto, goma guar, goma de acacia, goma arábica, almidón, gelatina, carragenina, goma garrofín, dextrano, goma gellan y combinaciones de los mismos.
- 35 16. El sistema de administración de película de la reivindicación 12, en el que dicho polímero comprende además un polímero seleccionado del grupo que consiste en etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, acetato-ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, poli(acetato-ftalatos de vinilo), gelatina ftalatada, gelatina reticulada, copolímeros de poli(ácido láctico)/poli(ácido glicólico)/polietilenglicol, policaprolactona, copolímero de metacrilato de metilo, polímero de ácido poliacrílico, poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), copolímeros de poli(ácido láctico)/poli(ácido glicólico)/polietilenglicol, polidioxanos, polioxalatos, poli( $\alpha$ -ésteres), polianhídridos, poliacetatos, policaprolactonas, poli(ortoésteres), poliaminoácidos, poliaminocarbonatos, poliuretanos, policarbonatos, poliamidas, poli(cianoacrilatos de alquilo), alginato de sodio, goma xantana, goma tragacanto, goma guar, goma de acacia, goma arábica, almidón, gelatina, carragenina, goma garrofín, dextrano, goma gellan y combinaciones de los mismos.
- 40 17. El sistema de administración de película de la reivindicación 12, en el que dicho disolvente está seleccionado del grupo que consiste en agua, disolvente orgánico polar y combinaciones de los mismos.
- 45 18. El sistema de administración de película según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las nanopartículas están uniformemente distribuidas dentro de la al menos una o más matrices de película.
- 50 19. El sistema de administración de película según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el contenido de agua total es de aproximadamente el 10 % o menos en peso del sistema de administración.
- 55 20. El sistema de administración de película según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las nanopartículas se incorporan o depositan sobre la superficie de la una o más matrices de película.
- 60 21. Un proceso de preparación de una película que tiene una distribución sustancialmente uniforme de componentes, que comprende las etapas de:
- 65

- (a) formar una matriz de polímero capaz de fluir que comprende un polímero soluble en agua o hinchable en agua, un disolvente y un componente que lleva el principio activo, comprendiendo dicho componente que lleva el principio activo una pluralidad de nanopartículas que comprenden:
- 5 (i) un núcleo que comprende un metal;  
(ii) una corona que comprende una pluralidad de ligandos ligados covalentemente al núcleo, en la que al menos uno de dichos ligandos comprende un resto de hidrato de carbono; y  
(iii) un péptido unido a la corona;
- 10 teniendo dicha matriz una distribución uniforme de dicho principio activo;  
(b) colar dicha matriz de polímero capaz de fluir;  
(c) evaporar al menos una porción de dicho disolvente de dicha matriz de polímero capaz de fluir para formar una película viscoelástica en el plazo de aproximadamente 10 minutos o menos para mantener dicha distribución uniforme de dicho principio activo encerrando o previniendo sustancialmente la migración de dicho principio activo dentro de dicha película viscoelástica; y
- 15 (d) formar una película resultante de dicha película viscoelástica, en donde dicha película resultante tiene un contenido de agua del 10 % o menos y dicha distribución uniforme de principio activo se mantiene mediante dicho cierre o previniendo sustancialmente la migración de dicho principio activo.
- 20 22. El proceso según la reivindicación 21, en el que la película viscoelástica se forma en el plazo de aproximadamente 4 minutos.
23. El proceso de la reivindicación 21 o la reivindicación 22, que incluye adicionalmente la etapa de formar una segunda capa de película dispuesta encima.
- 25 24. Un proceso de preparación de una película que tiene una distribución sustancialmente uniforme de componentes, que comprende las etapas de:
- (a) formar una premezcla de mezcla madre que comprende un disolvente y un polímero seleccionado del grupo que consiste en polímeros solubles en agua, polímeros hinchables en agua y combinaciones de los mismos;
- 30 (b) añadir un componente que lleva el principio activo a una cantidad predeterminada de dicha premezcla de mezcla madre para formar una matriz de polímero capaz de fluir, comprendiendo dicho componente que lleva el principio activo una pluralidad de nanopartículas que comprenden:
- 35 (i) un núcleo que comprende un metal;  
(ii) una corona que comprende una pluralidad de ligandos ligados covalentemente al núcleo, en la que al menos uno de dichos ligandos comprende un resto de hidrato de carbono; y  
(iii) un péptido unido a la corona; teniendo dicha matriz una distribución uniforme de dicho principio activo;
- 40 (c) colar dicha matriz de polímero capaz de fluir;  
(d) evaporar al menos una porción de dicho disolvente de dicha matriz de polímero capaz de fluir para formar una película viscoelástica en el plazo de aproximadamente 10 minutos o menos para mantener dicha distribución uniforme de dicho componente que lleva el principio activo encerrando o previniendo sustancialmente la migración de dicho principio activo dentro de dicha película viscoelástica; y
- 45 (e) formar una película resultante de dicha película viscoelástica, en donde dicha película resultante tiene un contenido de agua del 10 % o menos y dicha distribución uniforme de componente que lleva el principio activo se mantiene mediante dicho cierre o previniendo sustancialmente la migración de dicho componente que lleva el principio activo.
- 50 25. Un sistema de administración de película como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 para su uso en un método de tratamiento médico.
26. Un sistema de administración de película como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 para su uso en un método de tratamiento médico, en el que el péptido es como se define en la reivindicación 3 o la
- 55 reivindicación 4 y en donde el método es un método para tratar la diabetes en un sujeto mamífero que lo necesita.
27. Un sistema de administración de película como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 para su uso según la reivindicación 26, en donde el método comprende o comprende además la administración del sistema de administración de película al sujeto mediante una superficie o una membrana mucosas o de tejido de
- 60 órgano, opcionalmente en donde el método comprende la administración transbucal del sistema de administración de película al sujeto.

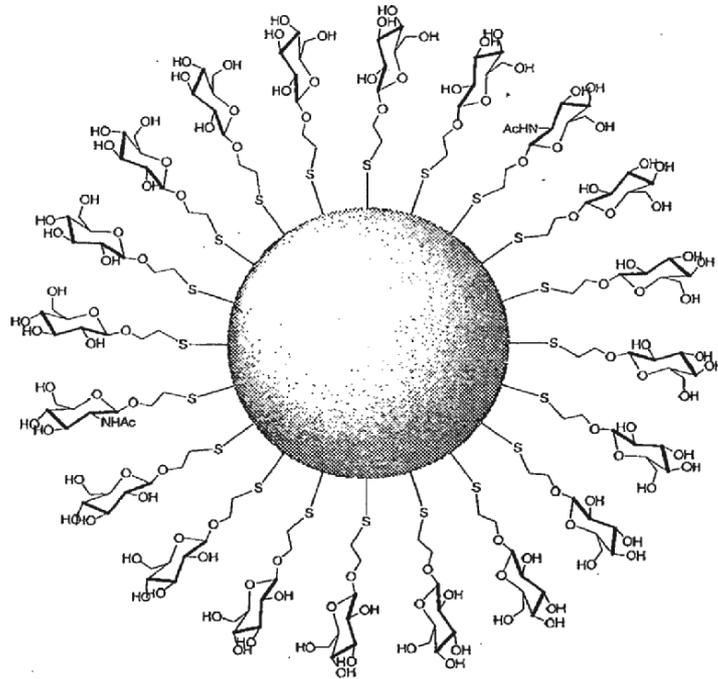


Figura 1

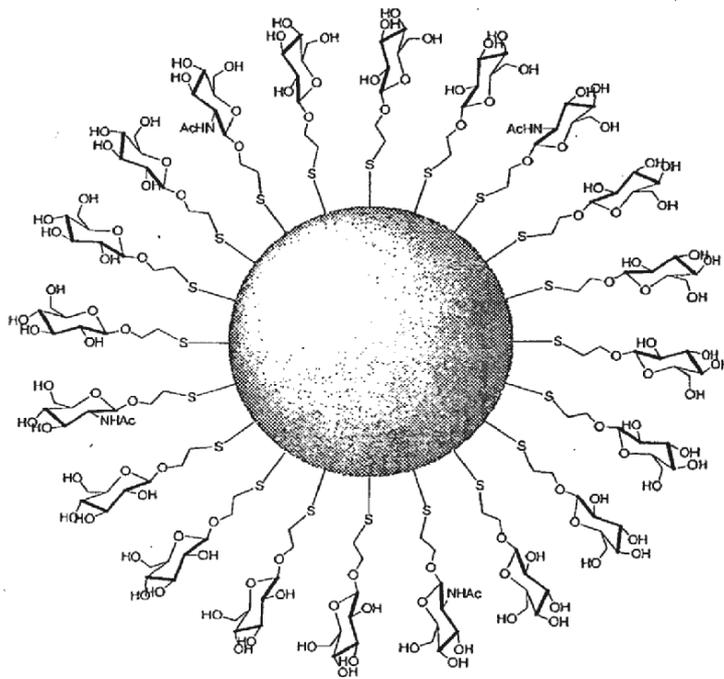


Figura 2

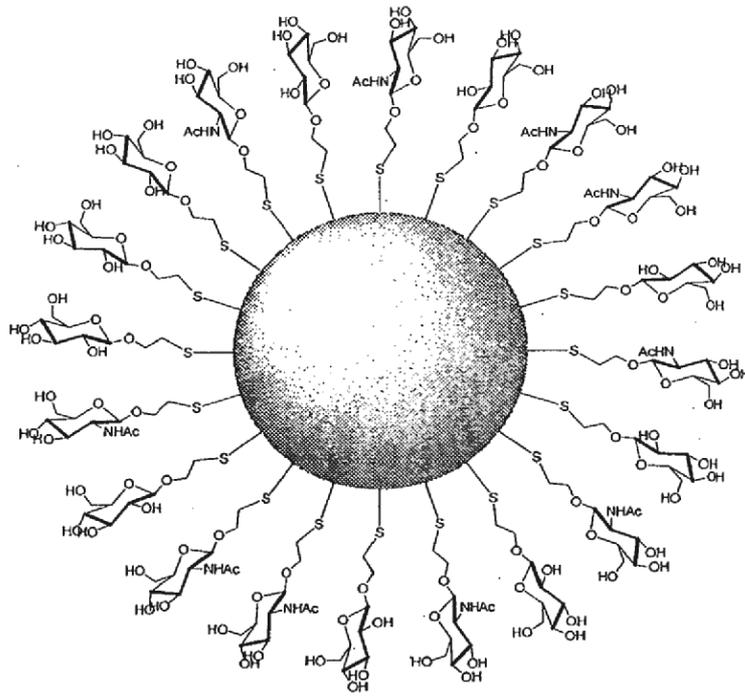


Figura 3

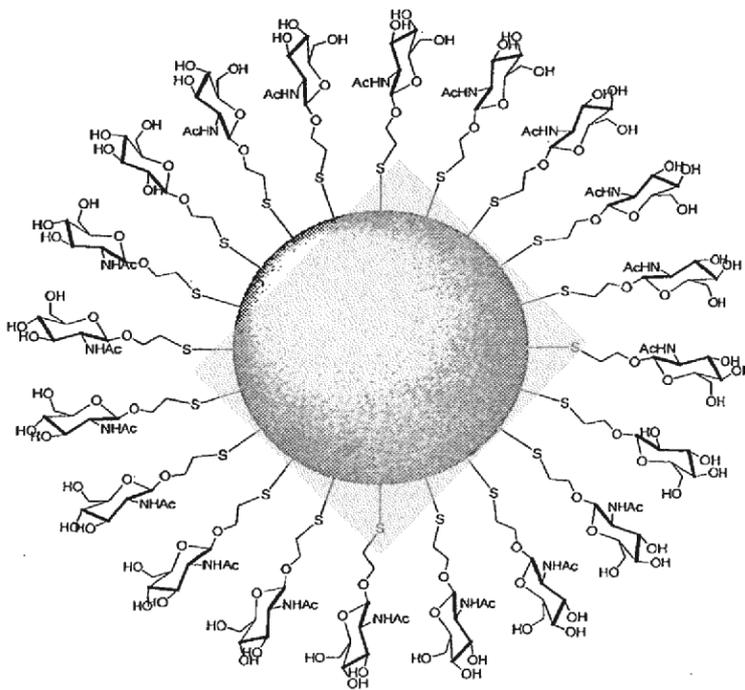


Figura 4

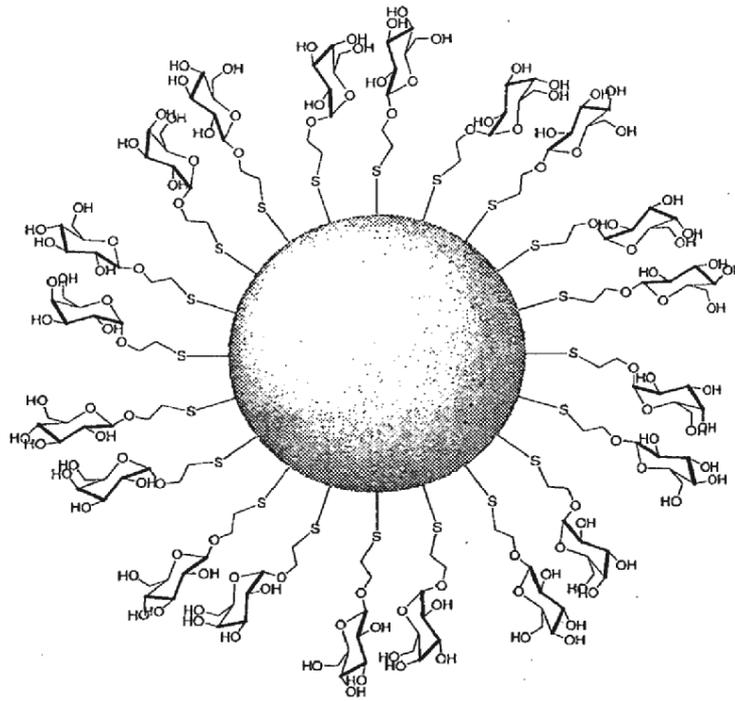


Figura 5

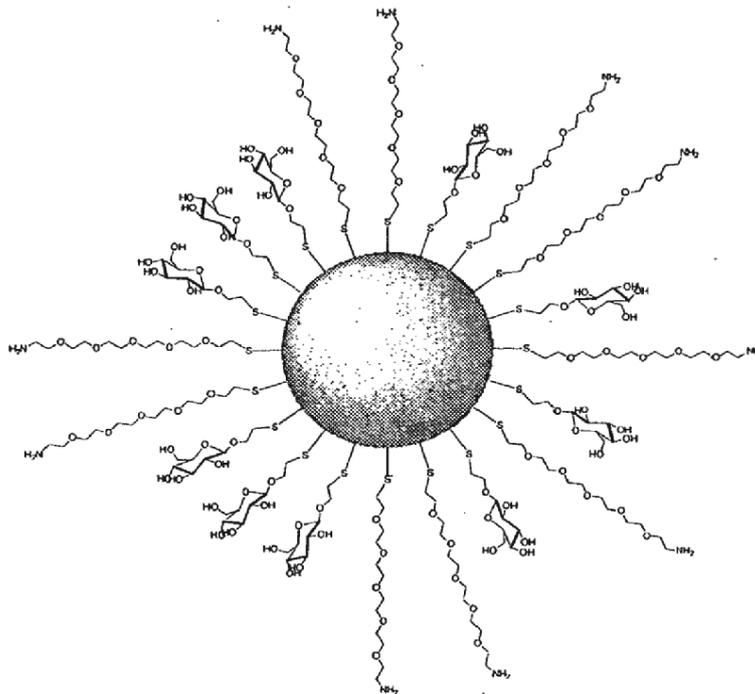


Figura 6

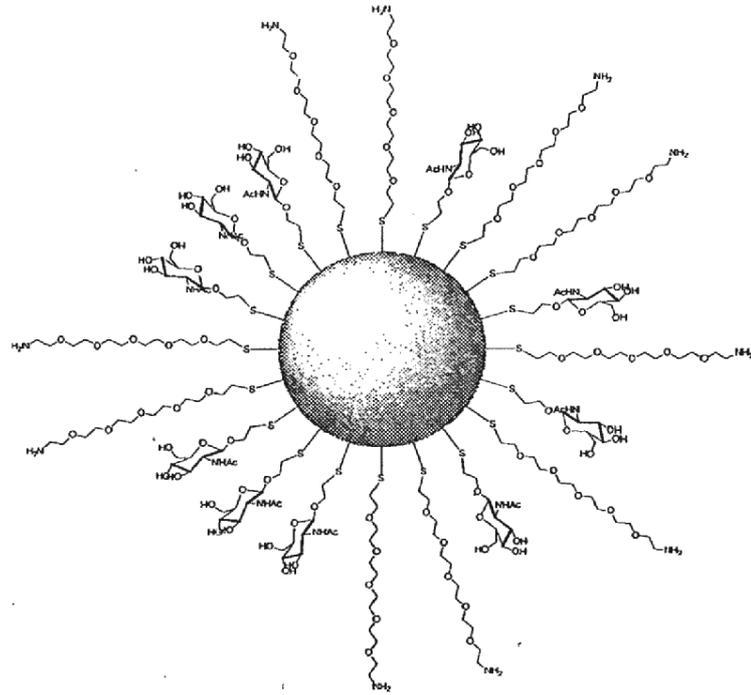


Figura 7

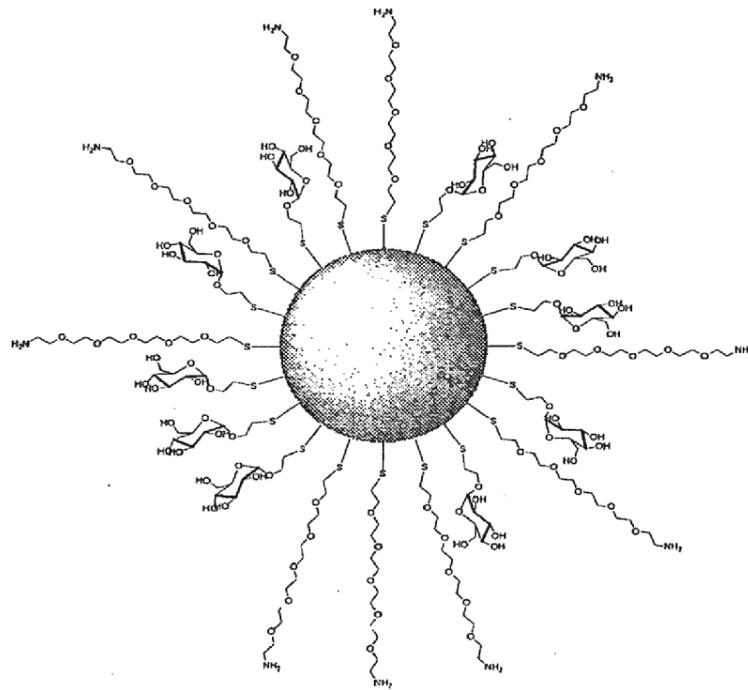


Figura 8

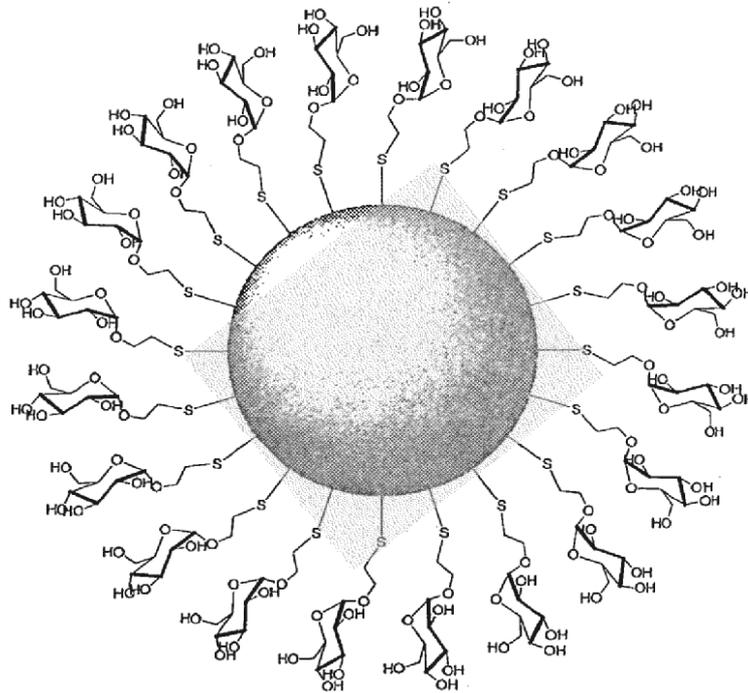


Figura 9

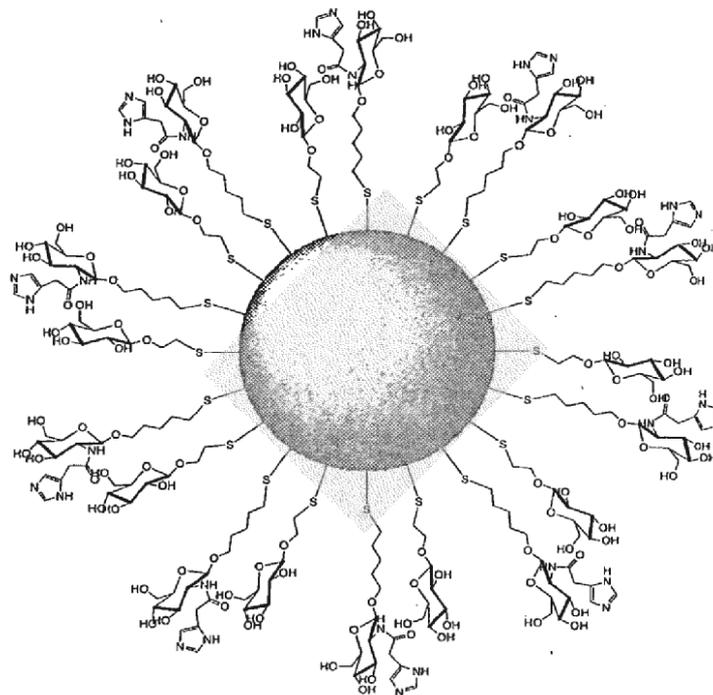


Figura 10

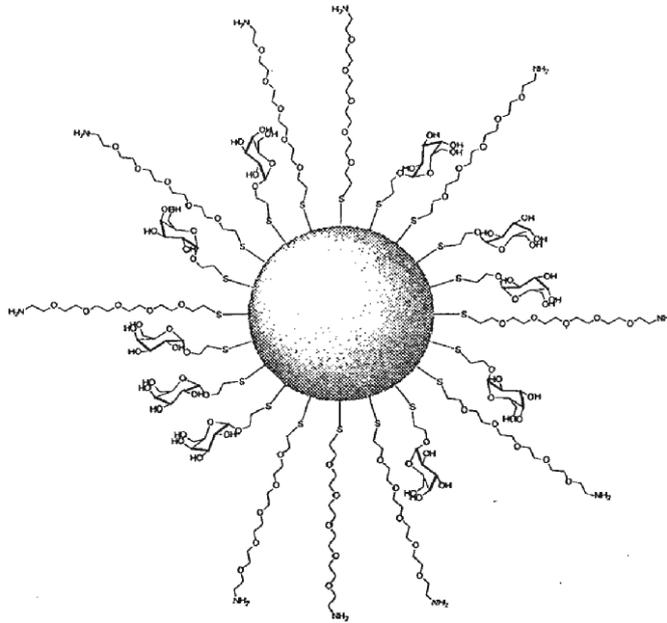


Figura 11

**Unión de insulina a 11 NP diferentes**

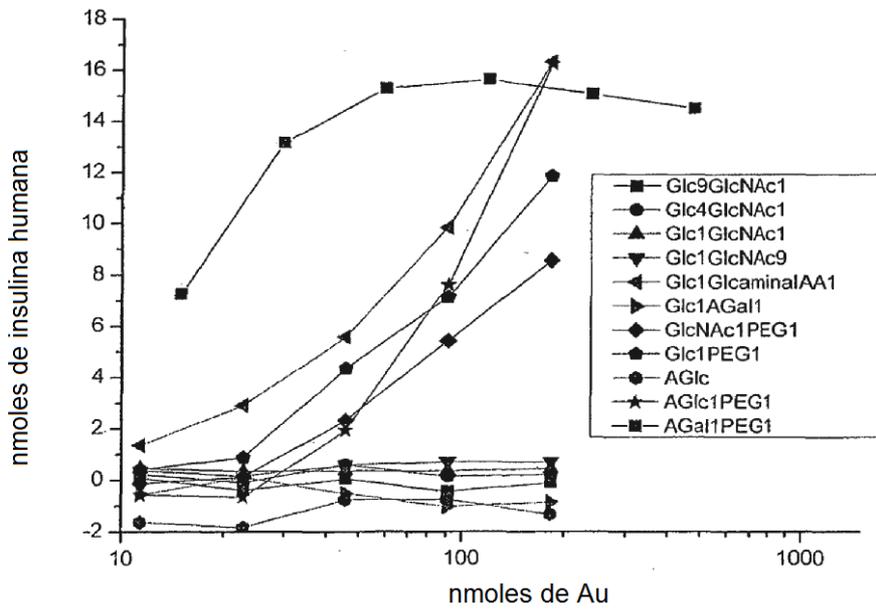
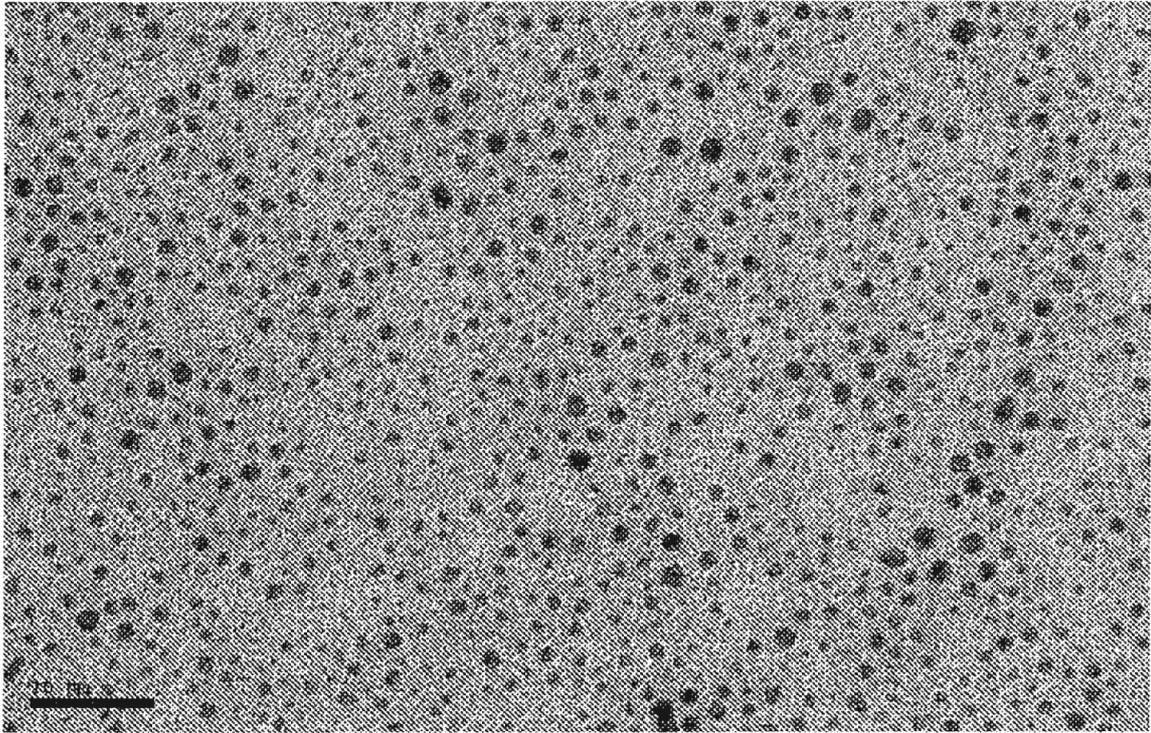


Figura 12



**Figura 13**

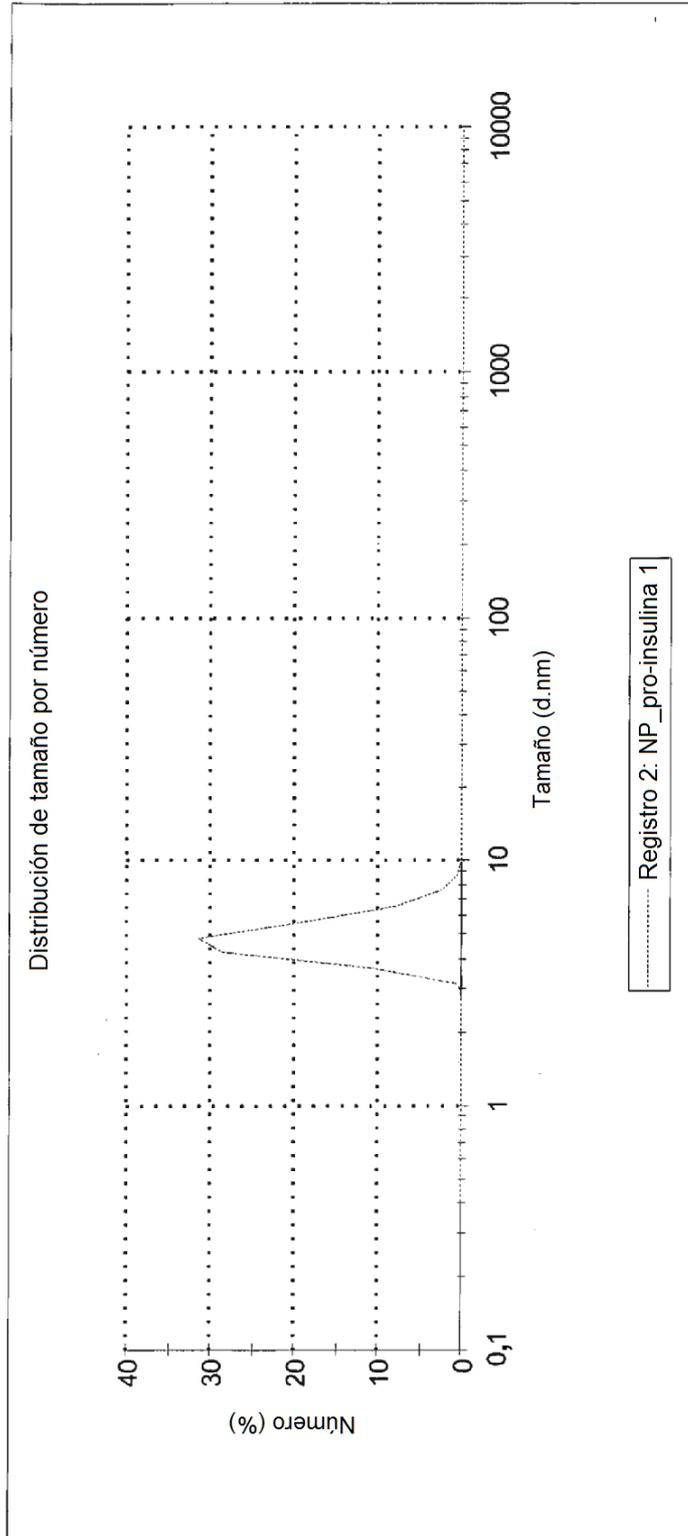


Figura 14A

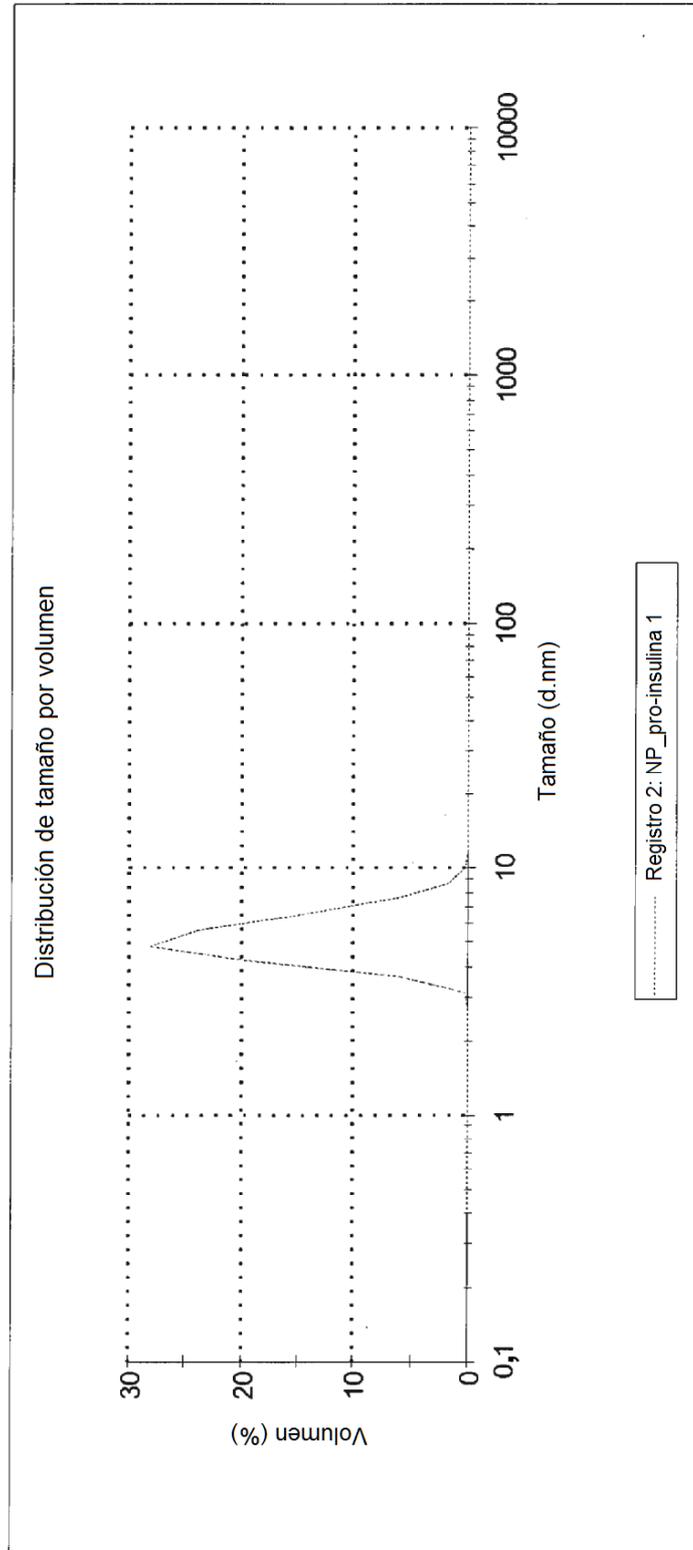


Figura 14B

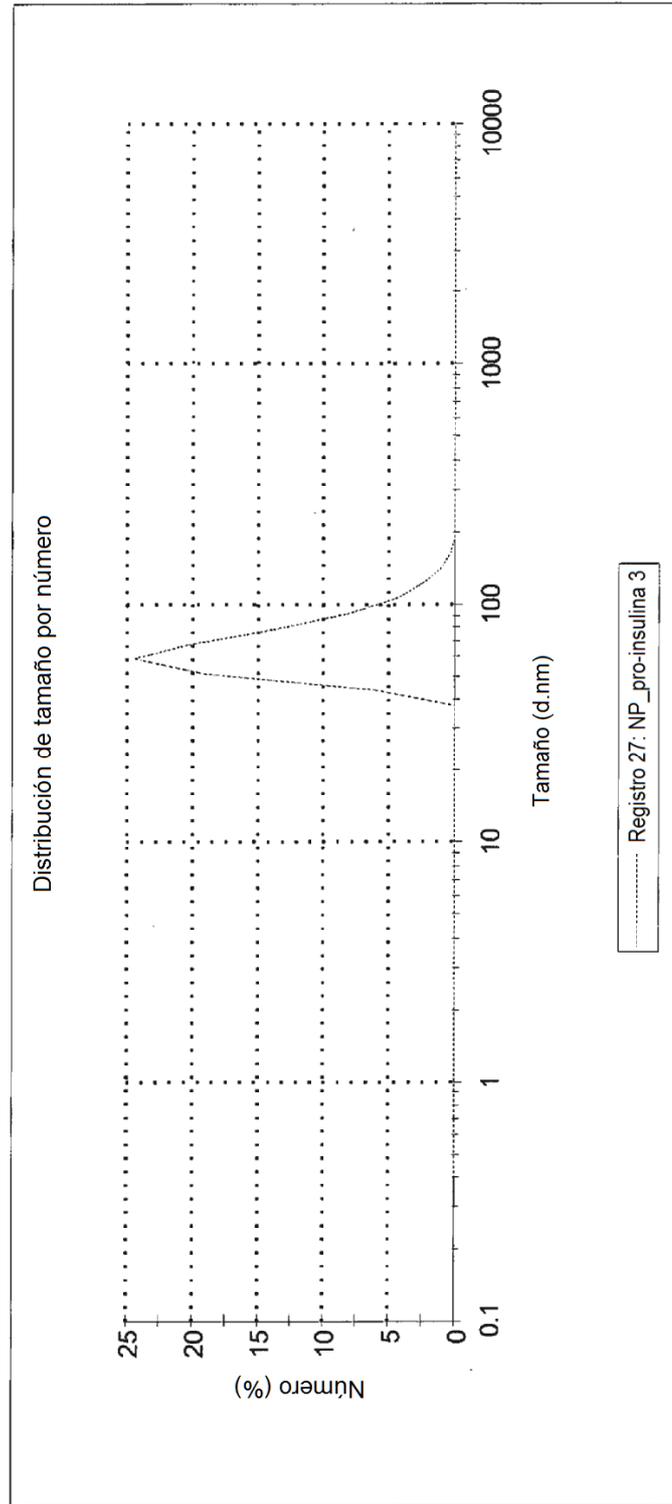


Figura 15B

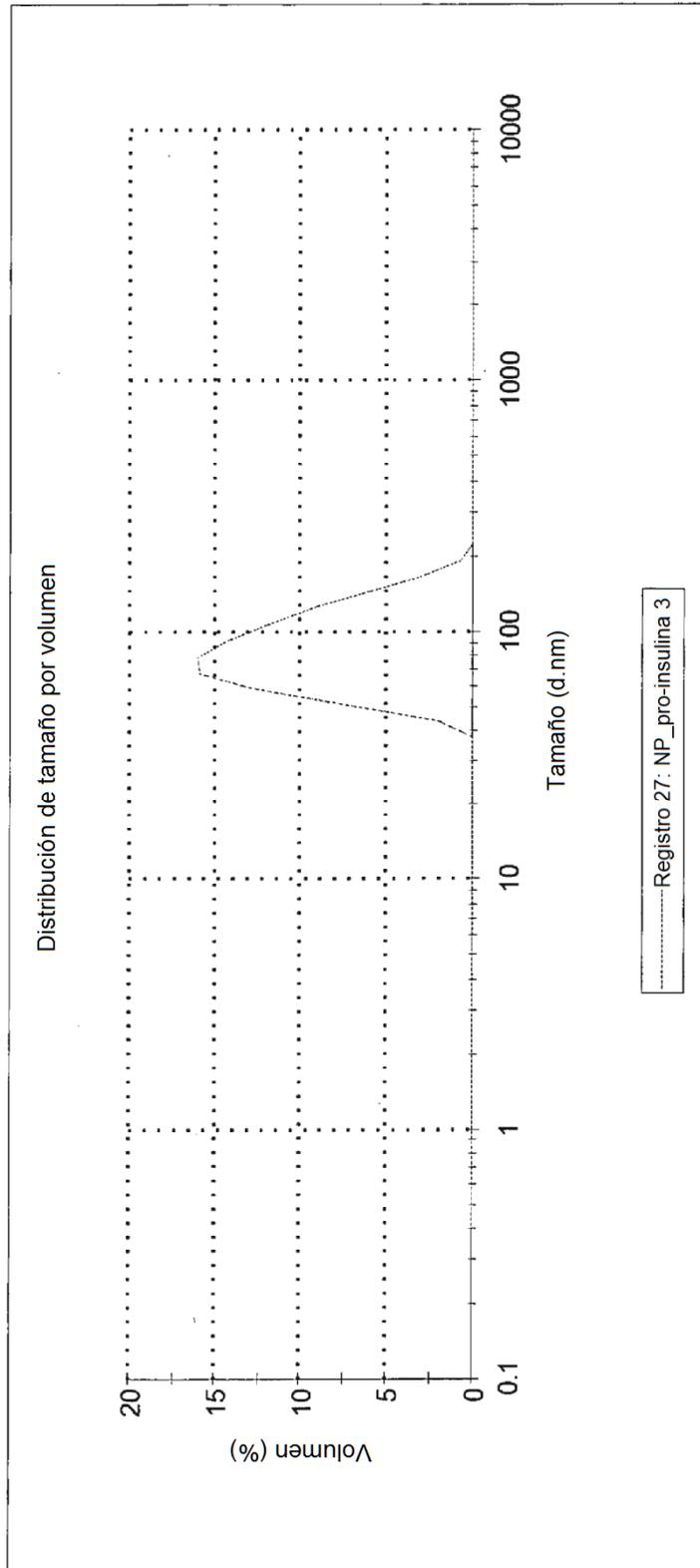


Figura 15B

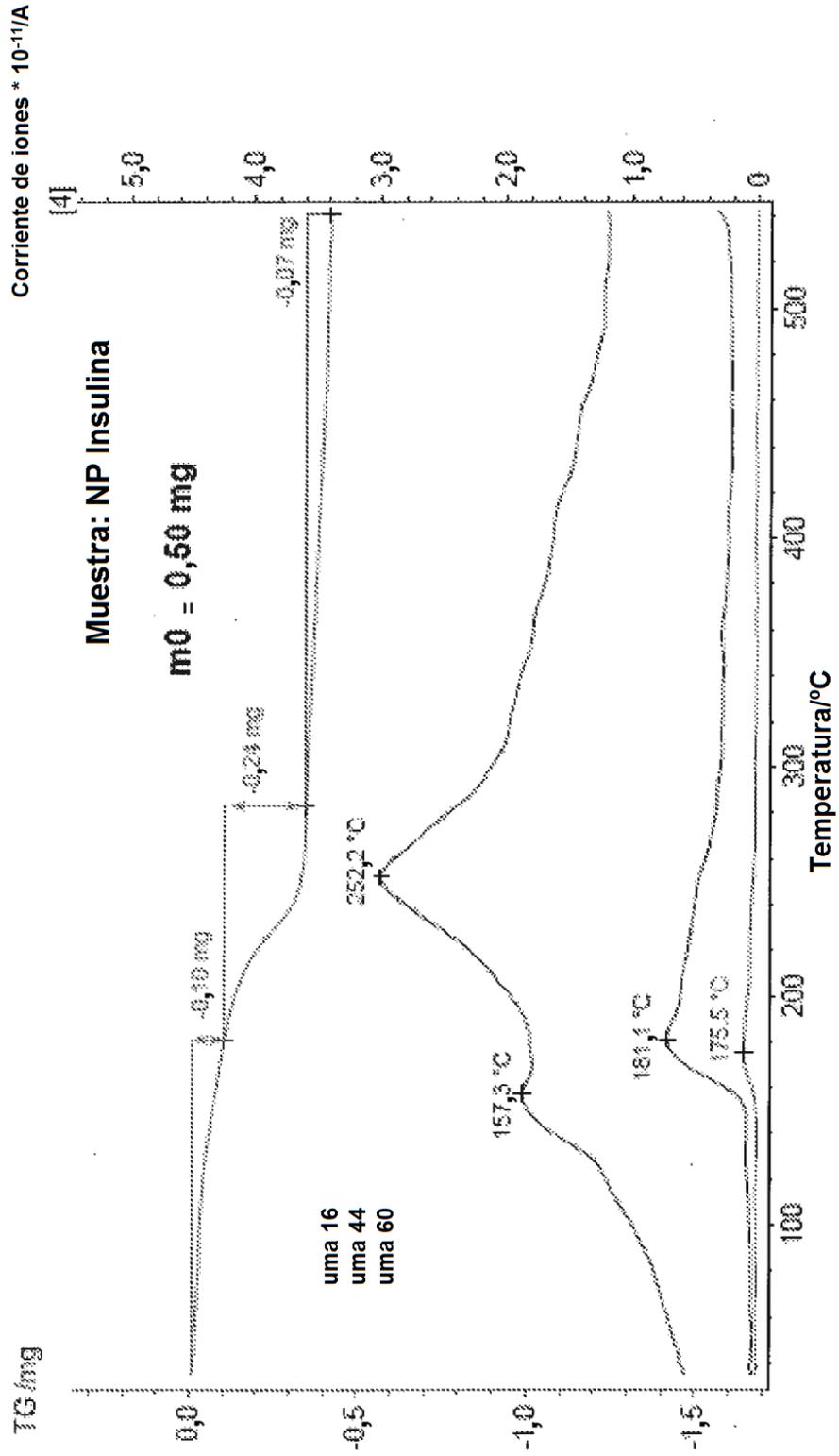


Figura 16

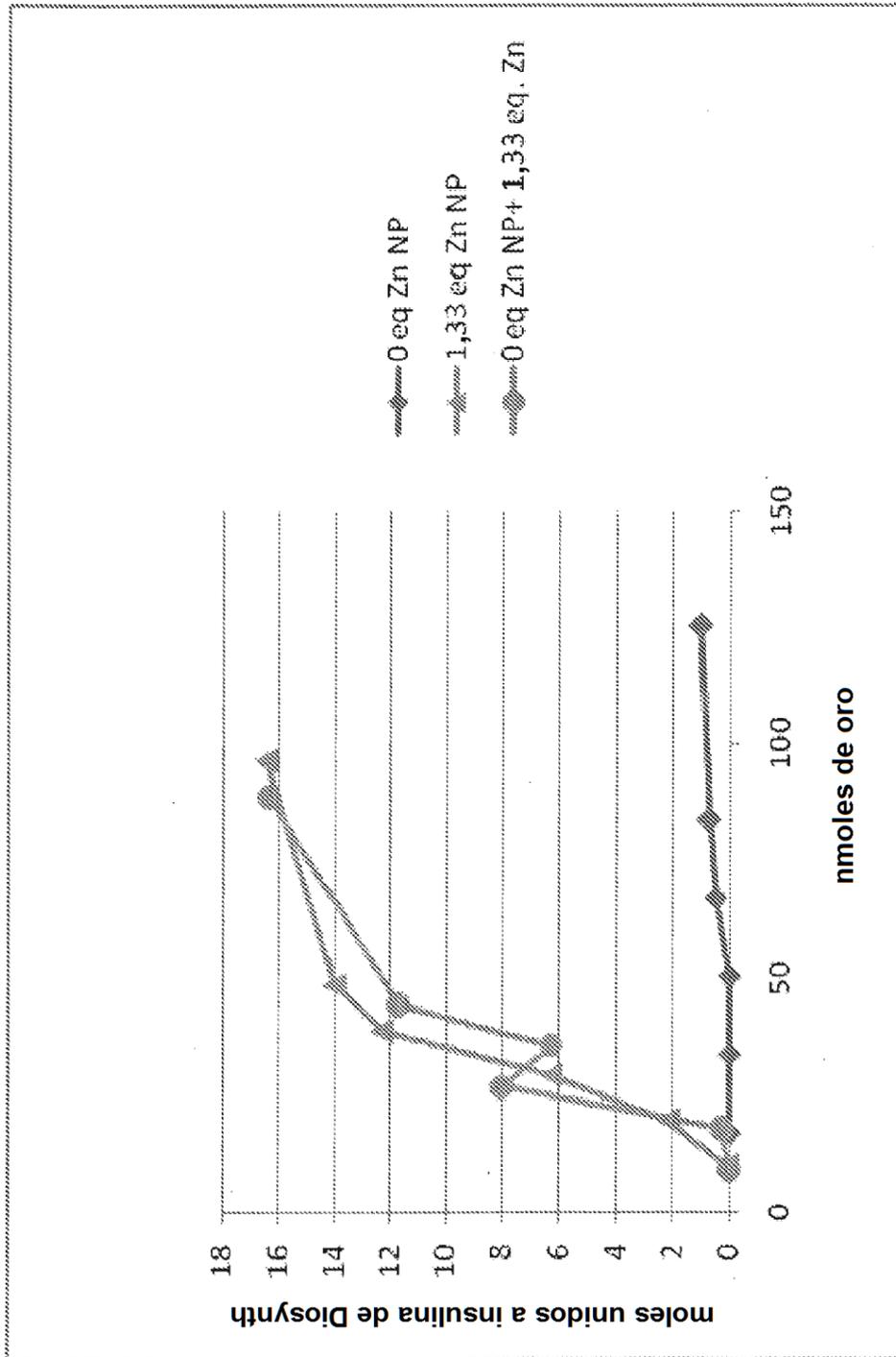


Figura 17

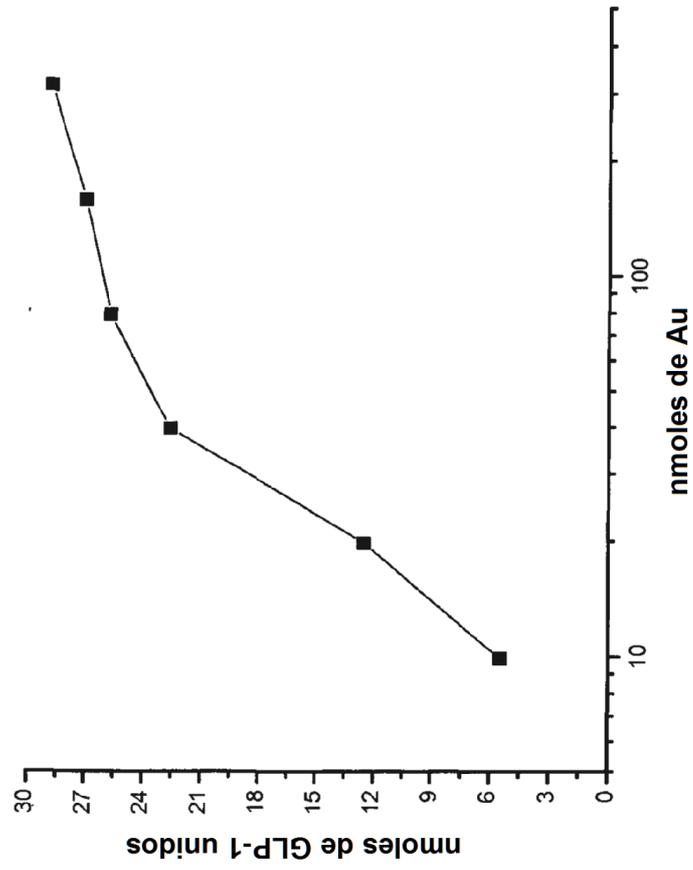


Figura 18

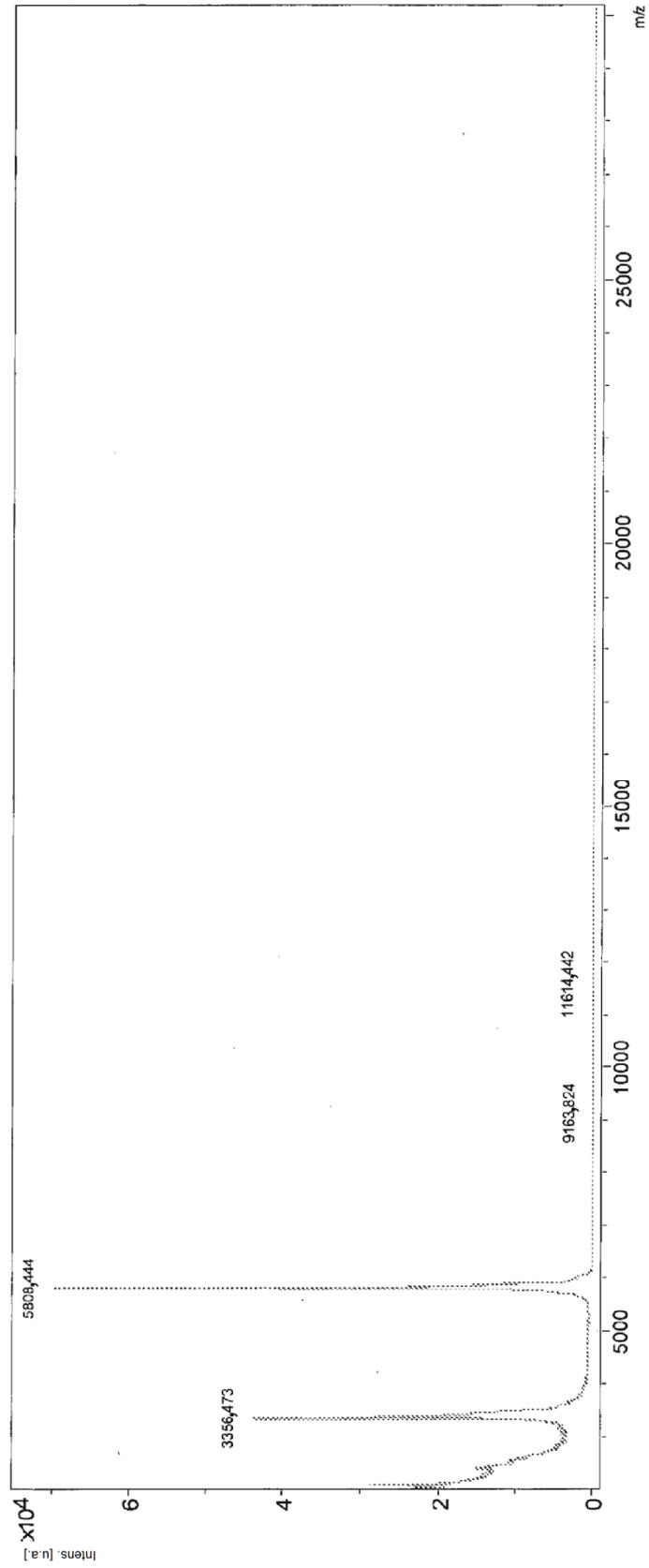


Figura 19

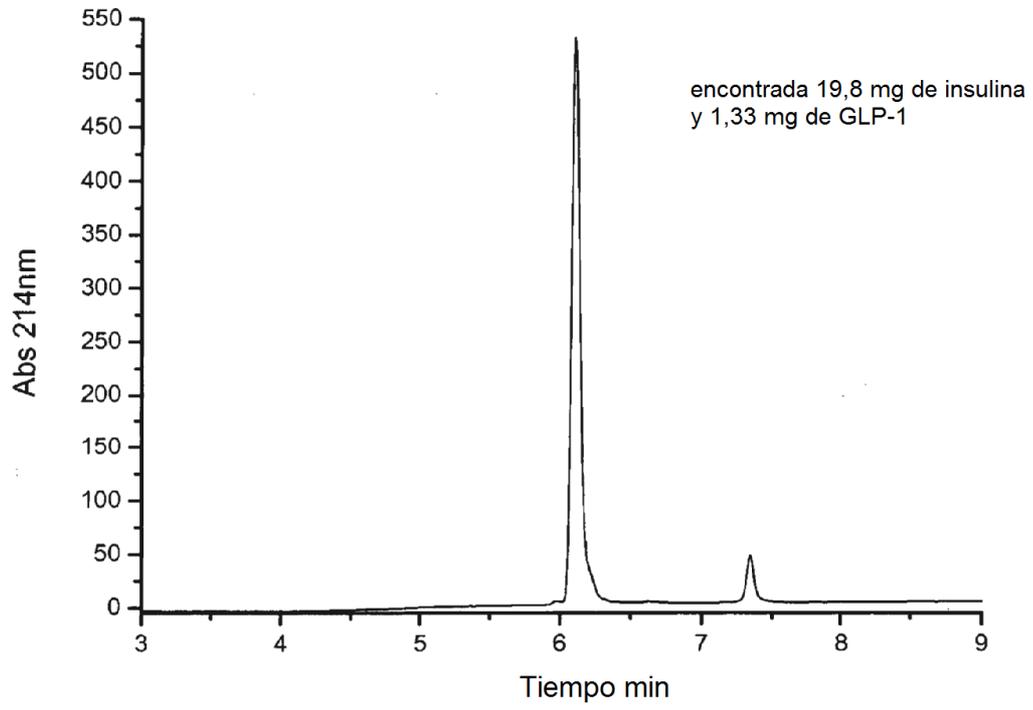
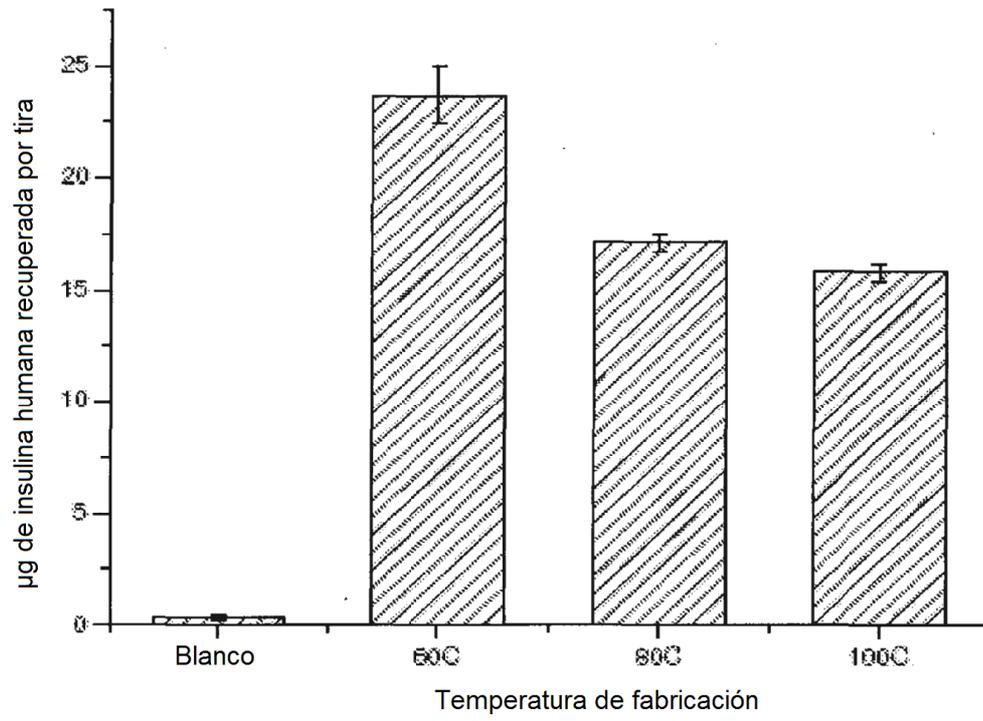


Figura 20



**Figura 21**

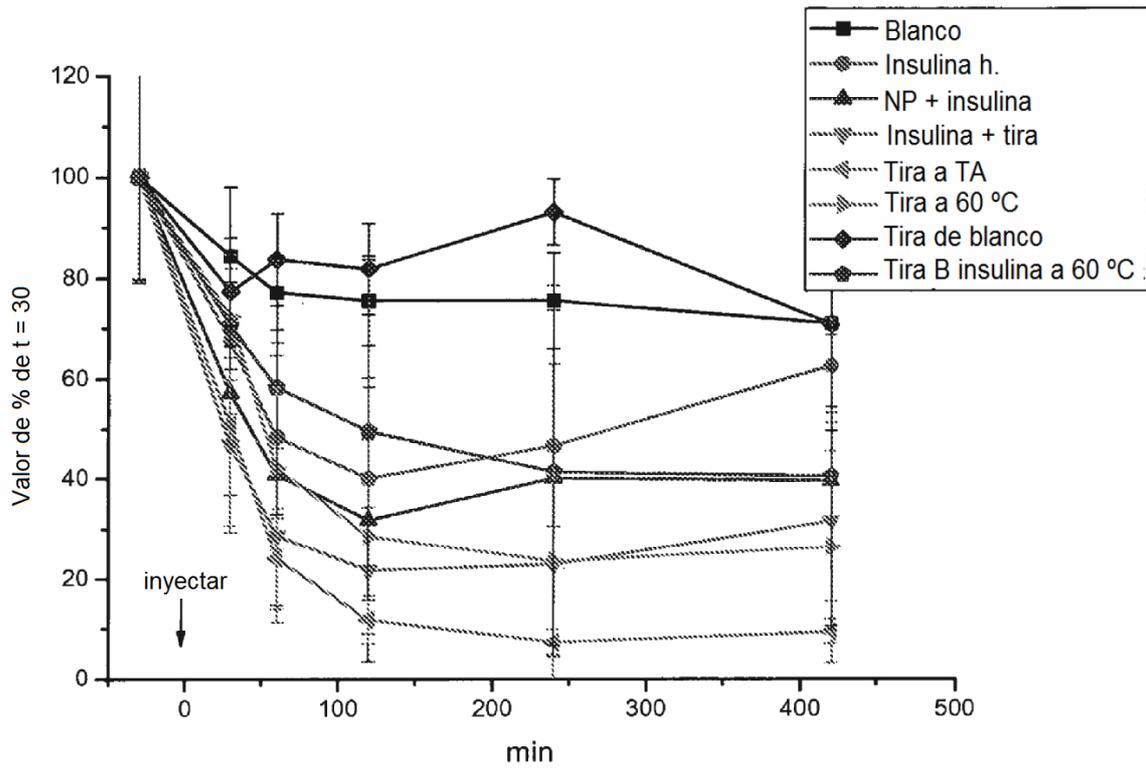


Figura 22

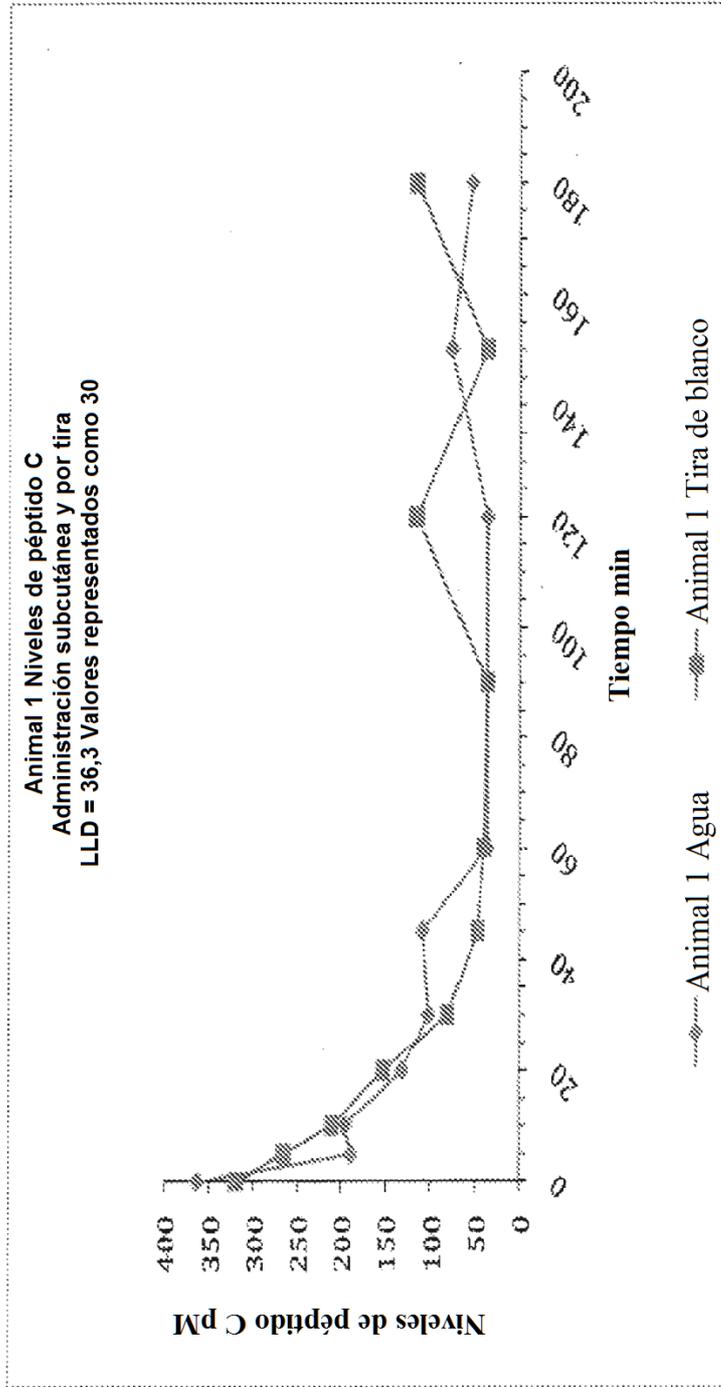


Figura 23A

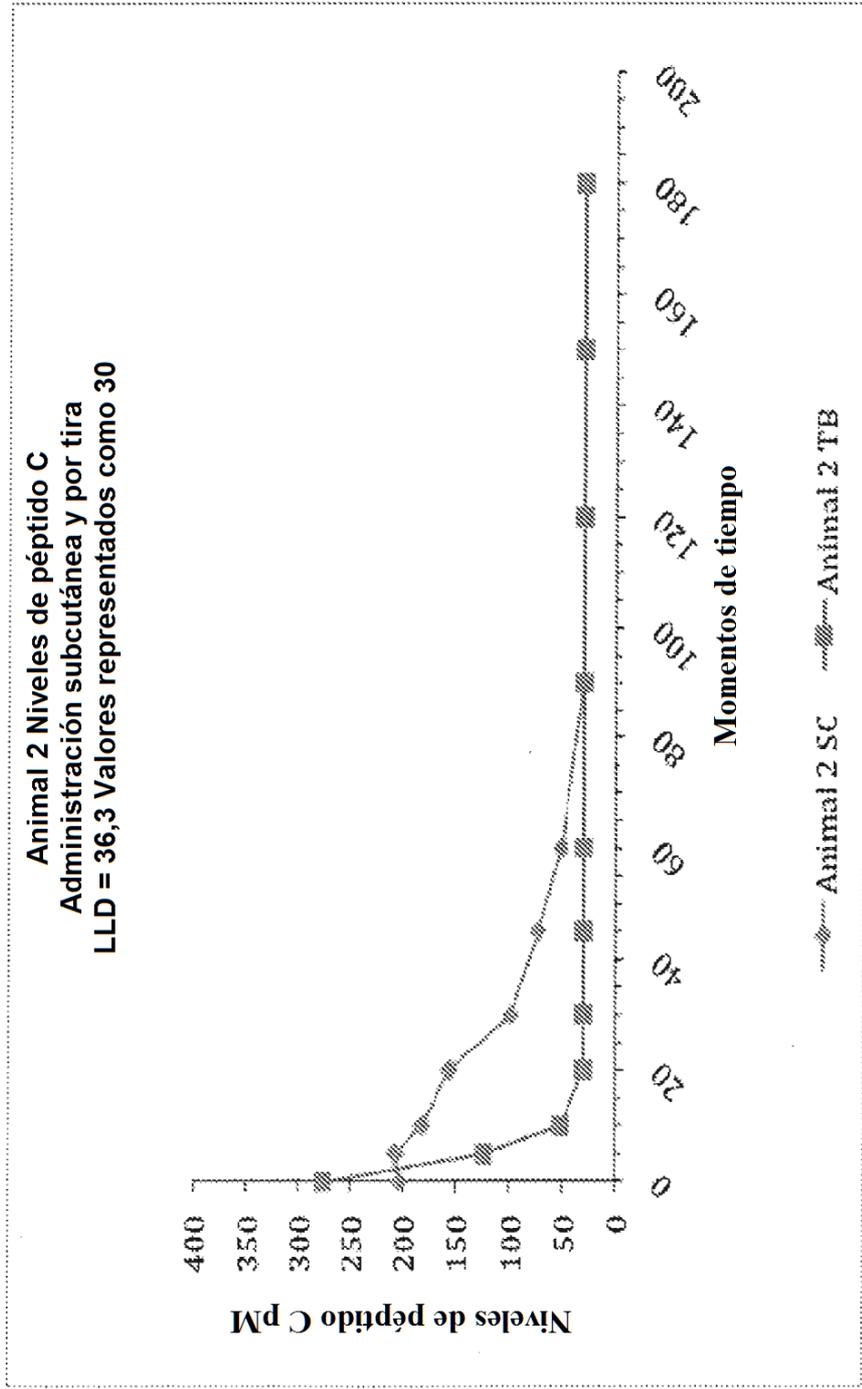
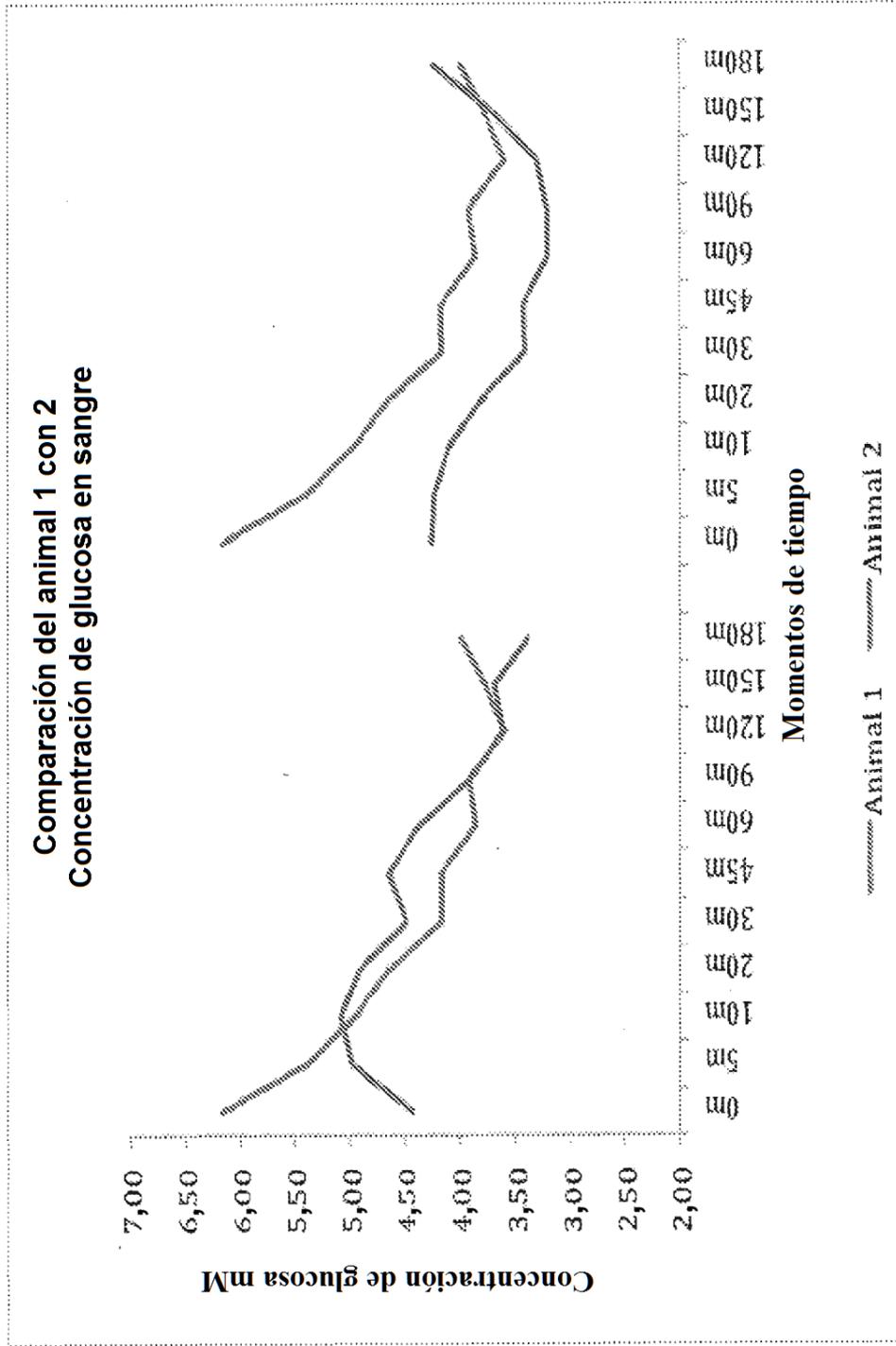


Figura 23B



**Figura 24A**

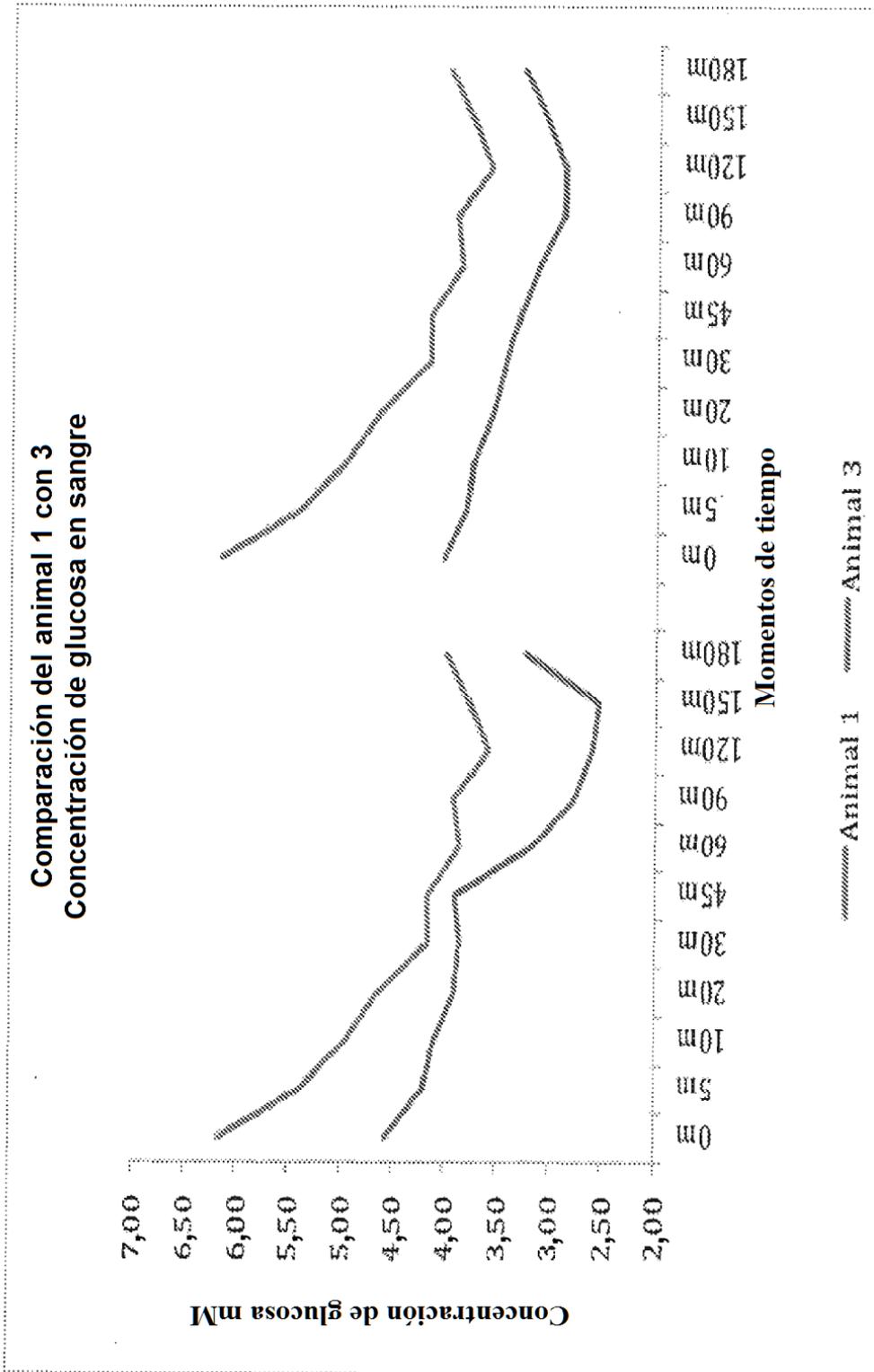


Figura 24B

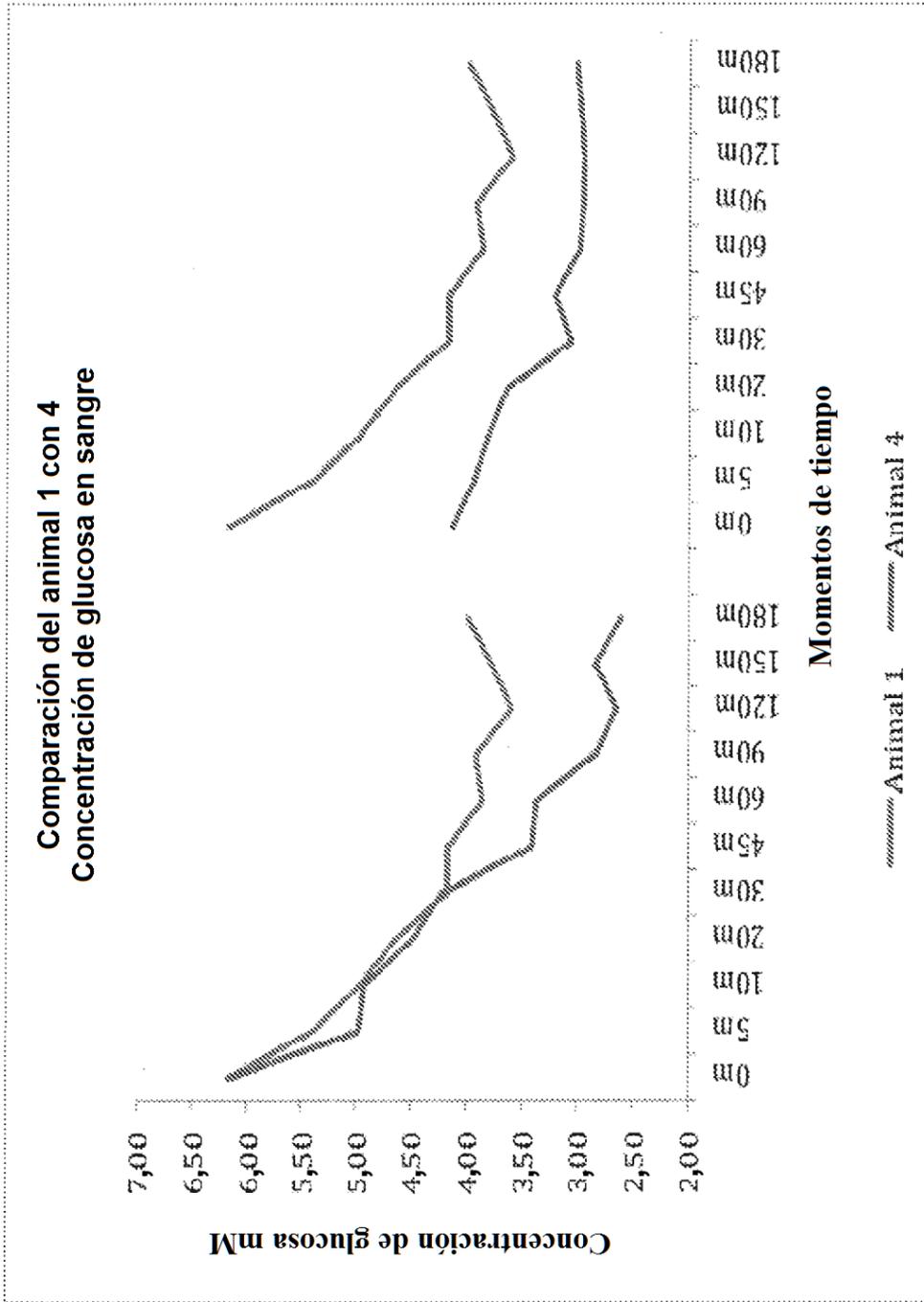
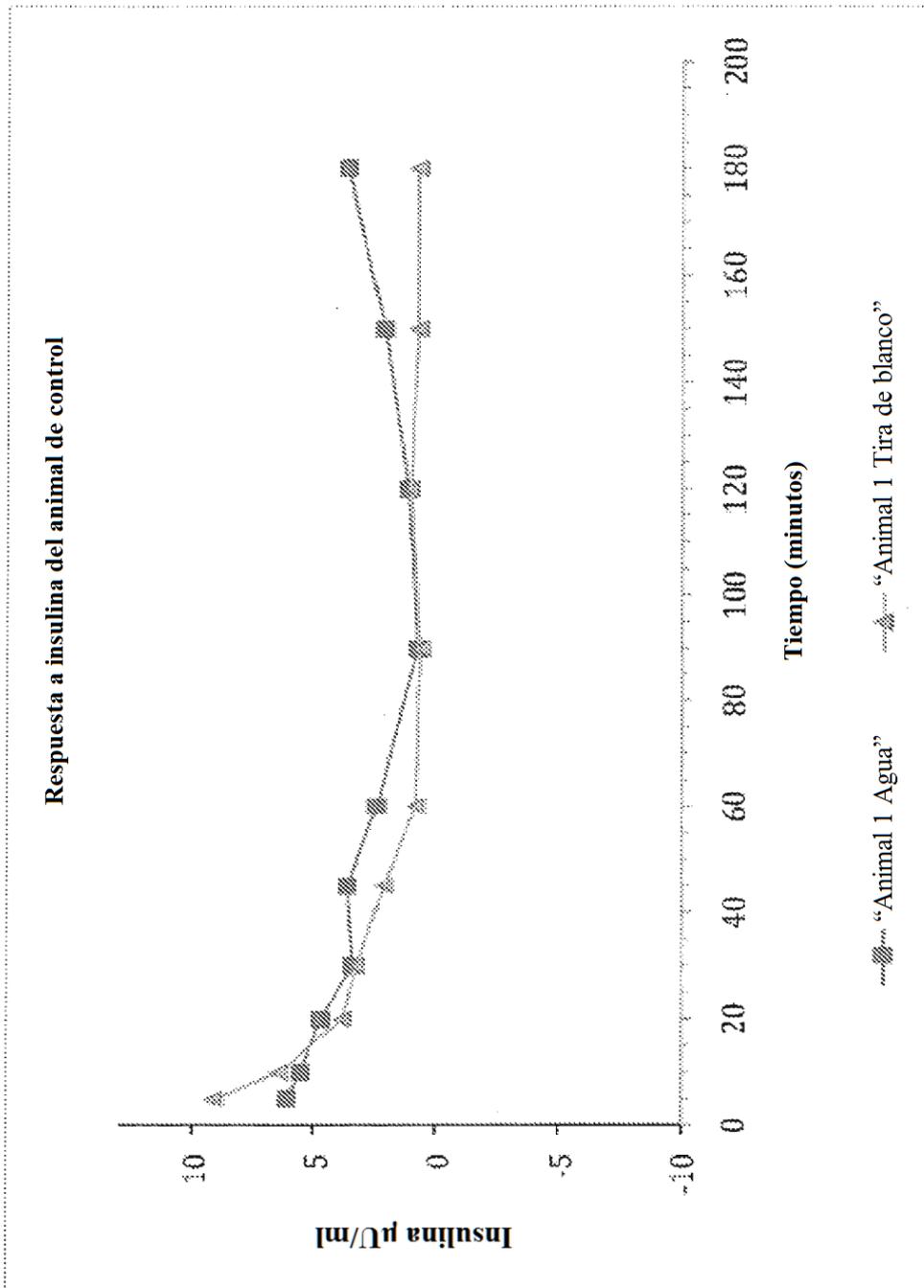


Figura 24C



**Figura 25A**

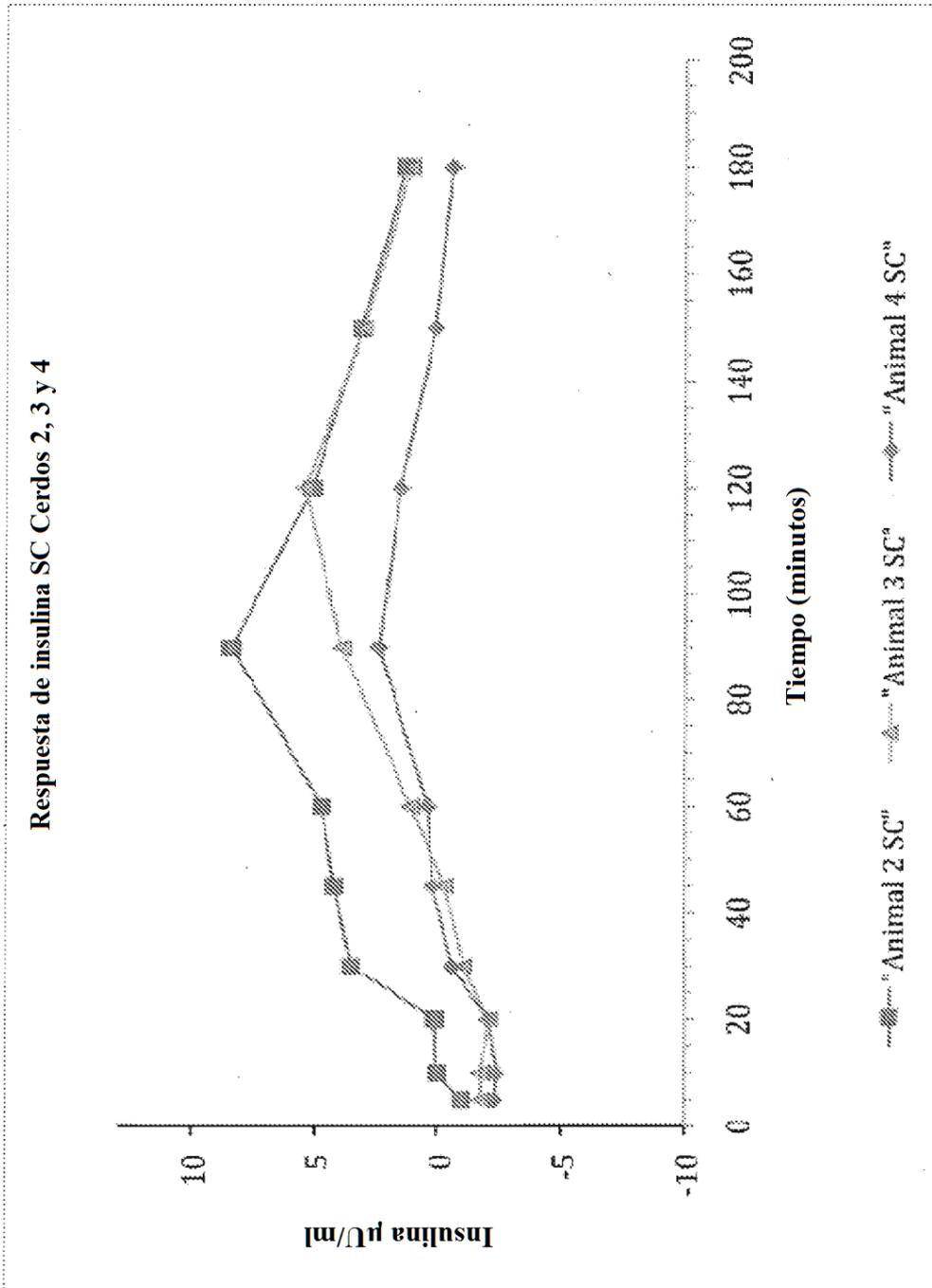
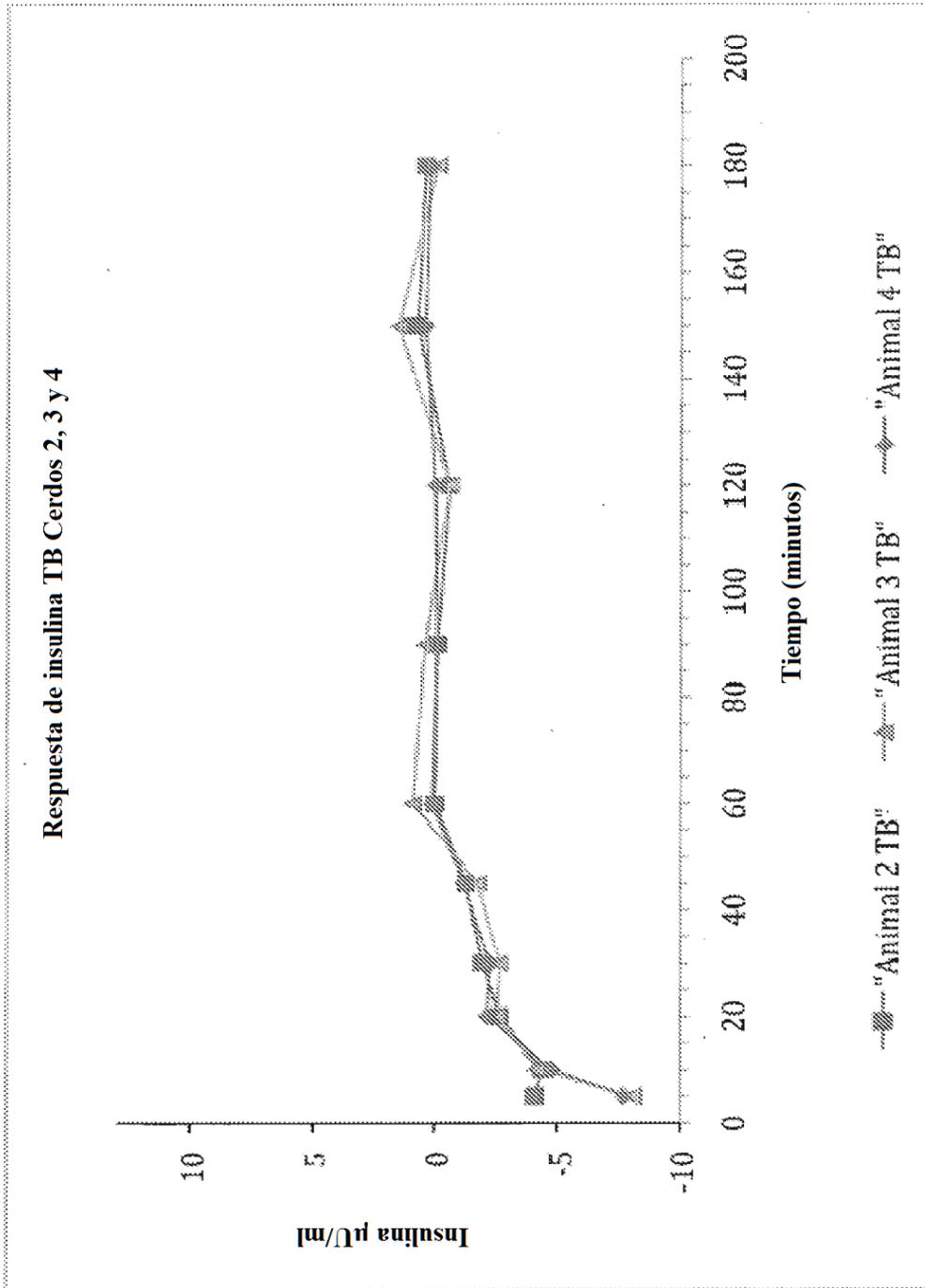


Figura 25B



**Figura 25C**