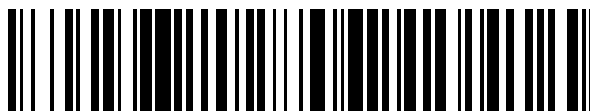


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 853**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.1997** **E 08006374 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016** **EP 1944019**

54 Título: **Método para la preparación de agentes farmacológicamente activos estabilizados con proteína**

30 Prioridad:

01.10.1996 US 720756

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DESAI, NEIL P.;
TAO, CHUNLIN;
YANG, ANDREW;
LOUIE, LESLIE;
ZHENG, TIANLI;
YAO, ZHIWEN;
SOON-SHIONG, PATRICK y
MAGDASSI, SHLOMO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 609 853 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

Método para la preparación de agentes farmacológicamente activos estabilizados con proteína

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para la producción de vehículos particulados para la administración intravenosa de agentes farmacológicamente activos, así como nuevas composiciones producidas mediante los mismos. En un aspecto particular, la invención se refiere a métodos para la administración *in vivo* de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua (p. ej., el fármaco anticanceroso Taxol). En otro aspecto, se proporcionan sistemas coloidales dispersables que contienen agentes farmacológicamente activos insolubles en agua. Las partículas suspendidas están encerradas en una envuelta polimérica formulada a partir de un polímero biocompatible y tienen un diámetro menor de aproximadamente 1 micra. Los sistemas coloidales de la invención son preparados sin usar tensioactivo convencional o cualquier matriz nuclear polimérica. En un aspecto preferido presentemente de la invención, se proporciona un método para la preparación de partículas extremadamente pequeñas, que pueden ser esterilizadas por filtración. La envuelta polimérica contiene partículas de agente farmacológicamente activo y eventualmente un agente dispersante biocompatible en el que se puede disolver o suspender el agente farmacológicamente activo. Así, la invención proporciona un sistema de administración de fármacos en forma líquida o en forma de un polvo redispersable. Cualquiera de las formas proporciona tanto moléculas de fármaco inmediatamente biodisponibles (es decir, moléculas de fármaco que están molecularmente unidas a una proteína) como partículas de fármaco puro revestidas con una proteína.

Antecedentes de la invención

La administración intravenosa de fármacos permite un equilibrio rápido y directo con el torrente sanguíneo, que lleva la medicación al resto del organismo. Para evitar los picos en los niveles de suero que se alcanzan en un corto período de tiempo tras inyección intravascular, la administración de fármacos transportados en soportes estables permitiría la liberación gradual de los fármacos dentro del compartimento intravascular tras una inyección intravenosa en bolo de las nanopartículas terapéuticas.

Las nanopartículas inyectables de liberación controlada pueden proporcionar una duración preprogramada de acción, que varía de días a semanas y a meses desde una sola inyección. También pueden ofrecer varias ventajas profundas con respecto a medicamentos convencionalmente administrados, incluyendo la aceptación asegurada automática por parte del paciente con el régimen de dosificación, así como el envío dirigido del fármaco a tejidos u órganos específicos (Tice y Gilley, Journal of Controlled Release 2:343-352 (1985)).

Las micropartículas y los cuerpos extraños presentes en la sangre son generalmente eliminados de la circulación por los "órganos filtradores de sangre", a saber, el bazo, los pulmones y el hígado. La materia particulada contenida en la sangre entera normal consiste en glóbulos rojos (típicamente 8 micras de diámetro), glóbulos blancos (típicamente 6-8 micras de diámetro) y plaquetas (típicamente 1-3 micras de diámetro). La microcirculación en la mayoría de los órganos y tejidos permite el paso libre de estas células sanguíneas. Cuando hay presencia de microtrombos (coágulos sanguíneos) de un tamaño mayor de 10-15 micras en la circulación, se produce como resultado un riesgo de infarto o bloqueo de los capilares, que da lugar a isquemia o a privación de oxígeno y posiblemente a muerte del tejido. Se ha de evitar, por lo tanto, la inyección en la circulación de partículas mayores de 10-15 micras de diámetro. Una suspensión de partículas menores de 7-8 micras es, sin embargo, relativamente segura y se ha usado para la administración de agentes farmacológicamente activos en forma de liposomas y emulsiones, agentes nutricionales y medios de contraste para aplicaciones de imagen.

El tamaño de las partículas y su modo de administración determina su comportamiento biológico. Strand y col., (en Microspheres-Biomedical Applications, ed. A. Rembaum, pp. 193-227, CRC Press (1988)) han descrito que el destino de las partículas es dependiente de su tamaño. Partículas con un rango de tamaño de unos cuantos nanómetros (nm) a 100 nm entran en los capilares linfáticos tras inyección intersticial y se puede producir fagocitosis en los nódulos linfáticos. Tras inyección intravenosa/intraarterial, las partículas menores de aproximadamente 2 micras se eliminarán rápidamente del torrente sanguíneo por el sistema reticuloendotelial (SRE), también conocido como el sistema fagocítico mononuclear (SFM). Las partículas mayores de aproximadamente 7 micras quedarán atrapadas, tras inyección intravenosa, en los capilares del pulmón. Tras inyección intraarterial, las partículas quedan atrapadas en el primer lecho capilar alcanzado. Las partículas inhaladas son atrapadas por los macrófagos alveolares.

No se pueden administrar convencionalmente productos farmacéuticos insolubles en agua o poco solubles en agua y sensibles a los ambientes ácidos del estómago (p. ej., por inyección intravenosa o administración oral). Se ha conseguido la administración parenteral de dichos productos farmacéuticos por emulsión del fármaco solubilizado en aceite con un líquido acuoso (tal como solución salina normal) en presencia de tensioactivos o estabilizadores de la emulsión para producir microemulsiones estables. Se pueden inyectar estas emulsiones intravenosamente, siempre que los componentes de la emulsión sean farmacológicamente inertes. La Patente EE.UU. N° 4.073.943 describe la administración de agentes farmacológicamente activos insolubles en agua disueltos en aceites y emulsionados con agua en presencia de tensioactivos, tales como fosfatidos de huevo, Pluronic (copolímeros de polipropilenglicol y

polietilenglicol), oleato de poliglicerol, etc. La Publicación Internacional PCT N° WO85/00011 describe microgotitas farmacéuticas de un anestésico revestido con un fosfolípido, tal como dimiristoilfosfatidilcolina, que tienen dimensiones adecuadas para inyección intradérmica o intravenosa.

Un ejemplo de fármaco insoluble en agua es el Taxol, un producto natural aislado por primera vez del Tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*, por Wani y col., (*J. Am. Chem. Soc.* 93:2325 (1971)). Entre los agentes antimitóticos, el Taxol, que contiene un esqueleto de carbono diterpénico, exhibe un modo único de acción sobre las proteínas de los microtúbulos responsables de la formación del huso mitótico. Contrariamente a otros agentes antimitóticos, tales como la vinblastina o la colchicina, que evitan el ensamblaje de la tubulina, el Taxol es el único producto vegetal que se sabe inhibe el proceso de despolimerización de la tubulina, evitando así el proceso de replicación celular.

El Taxol, un diterpenoide natural, ha mostrado tener efectos antineoplásicos y anticancerosos significativos en el cáncer de ovario refractario a fármacos. El Taxol ha mostrado una excelente actividad antitumoral en una amplia variedad de modelos tumorales, tales como el melanoma B16, las leucemias L1210, los tumores mamarios MX-1 y los xenoinjertos de tumores de colon CS-1. Varios comunicados de prensa recientes han citado al Taxol como el nuevo fármaco anticanceroso milagroso. Ciertamente, el Taxol ha sido recientemente aprobado por la Federal Drug Administration para el tratamiento del cáncer de ovario. La baja solubilidad acuosa del Taxol, sin embargo, presenta un problema para administración a humanos. Ciertamente, la administración de fármacos que son inherentemente insolubles o poco solubles en un medio acuoso puede verse seriamente alterada si la administración oral no resulta efectiva. Por consiguiente, las formulaciones de Taxol actualmente empleadas requieren un Cremaphor para solubilizar el fármaco. El rango de dosis clínico para humanos es de 200-500 mg. Esta dosis es disuelta en una solución 1:1 de etanol:Cremaphor y diluida a un litro de líquido administrado por vía intravenosa. El Cremaphor actualmente usado es el aceite de ricino polietoxilado.

En ensayos clínicos de fase I, el propio Taxol no mostró excesivos efectos excesivos, pero hubo severas reacciones alérgicas causadas por los emulsores empleados para solubilizar el fármaco. El régimen actual de administración incluye el tratamiento del paciente con antihistamínicos y esteroides antes de la inyección del fármaco para reducir los efectos colaterales alérgicos del Cremaphor.

En un esfuerzo por mejorar la solubilidad en agua del Taxol, varios investigadores han modificado su estructura química con grupos funcionales que imparten una mayor solubilidad en agua. Entre ellos están los derivados sulfonados (Kingston y col., Patente EE.UU. 5.059.699 (1991)) y los ésteres de aminoácidos (Mathew y col., *J. Med. Chem.* 35:145-151 (1992)), que muestran una actividad biológica significativa. Las modificaciones para producir un derivado hidrosoluble facilitan la administración intravenosa de Taxol disuelto en un soporte inocuo, tal como solución salina normal. Dichas modificaciones, sin embargo, se suman al coste de la preparación del fármaco, pueden inducir reacciones colaterales y/o reacciones alérgicas no deseadas y/o pueden reducir la eficacia del fármaco.

Se han descrito microesferas proteicas en la literatura como soportes de agentes farmacológicos o diagnósticos. Se han preparado microesferas de albúmina por desnaturalización por calor o por entrecruzamiento químico. Se producen microesferas desnaturalizadas por calor a partir de una mezcla emulsionada (p. ej., albúmina, el agente que se ha de incorporar, y un aceite adecuado) a temperaturas de entre 100°C y 150°C. Se lavan entonces las microesferas con un solvente adecuado y se almacenan. Leucuta y col., (*International Journal of Pharmaceutics* 41:213-217 (1988)) describen el método de preparación de microesferas desnaturalizadas por calor.

El procedimiento para preparar microesferas químicamente entrecruzadas incluye el tratamiento de la emulsión con glutaraldehído para entrecruzar la proteína, seguido de lavado y almacenamiento. Lee y col., (*Science* 213:233-235 (1981)) y Patente EE.UU. N° 4.671.954 muestran este método de preparación.

Las técnicas anteriores para la preparación de microesferas proteicas como soportes de agentes farmacológicamente activos, aunque son adecuadas para la administración de agentes hidrosolubles, son incapaces de atrapar los que son insolubles en agua. Esta limitación es inherente en la técnica de preparación, que se basa en el entrecruzamiento o la desnaturalización por calor del componente proteico en la fase acuosa de una emulsión de agua-en-aceite. Cualquier agente hidrosoluble disuelto en la fase acuosa que contiene proteína puede quedar atrapado en la matriz proteica entrecruzada o desnaturalizada por calor resultante, pero un agente poco soluble en agua o soluble en aceite no puede incorporarse a una matriz proteica formada por estas técnicas.

Un método convencional para fabricar nanopartículas que contienen fármaco consiste en disolver ácido poliláctico (u otros polímeros hidrófilos biocompatibles) en un solvente inmiscible en agua (tal como cloruro de metileno u otro solvente clorado, alifático o aromático), disolver el agente farmacéuticamente activo en la solución polimérica, añadir un tensioactivo a la fase oleosa o a la fase acuosa, formar una emulsión de aceite-en-agua por medios adecuados y evaporar la emulsión lentamente a vacío. Si las gotitas de aceite son suficientemente pequeñas y estables durante la evaporación, se obtiene una suspensión del polímero en agua. Como el fármaco está inicialmente presente en la solución polimérica, es posible obtener por este método una composición en la que las moléculas de fármaco están atrapadas en partículas compuestas por una matriz polimérica. La formación de microesferas y nanopartículas utilizando el método de evaporación de solvente ha sido descrita por varios investigadores (véanse, por ejemplo, Tice y Gilley, en *Journal of Controlled Release* 2:343-352 (1985); Bodmeier y

McGinity, en *Int. J. Pharmaceutics* 43:179 (1988); Cavalier y col., en *J. Pharm. Pharmacol.* 38:249 (1985); y D'Souza y col., WO 94/10980) utilizando diversos fármacos.

Bazile y col., en *Biomaterials* 13:1093 (1992), y Spenlehauer y col., en la Patente Francesa 2.660.556, han descrito la formación de nanopartículas utilizando dos polímeros biocompatibles, uno (p. ej., polilactida) disuelto en la fase orgánica, junto con un componente activo tal como un fármaco, y el otro polímero, tal como albúmina, utilizado como el agente tensioactivo. Tras emulsión y eliminación del solvente, se forman nanopartículas, donde el fármaco está presente dentro de la matriz polimérica de las partículas de polilactida.

Las propiedades de la solución polimérica a partir de la cual se forma la matriz polimérica son muy importantes para obtener la emulsión apropiada en la primera etapa. Por ejemplo, la polilactida (el polímero comúnmente utilizado en la preparación de nanopartículas inyectables) tiene una actividad superficial que causa la rápida adsorción de la misma en la interfase diclorometano-agua, provocando una tensión interfásica reducida (véase, por ejemplo, Boury y col., en *Langmuir* 11:1636 (1995)), que a su vez mejora el proceso de emulsión. Además, los mismos investigadores vieron que la seroalbúmina bovina (BSA) interacciona con la polilactida y penetra en la monocapa de polilactida presente en la interfase aceite-agua. Por lo tanto, se espera, en base a la referencia anterior, que la emulsión durante el método de evaporación de solvente convencional se vea muy favorecida por la presencia del polímero tensioactivo (polilactida) en la fase orgánica no acuosa. De hecho, la presencia de polilactida es no sólo una condición suficiente, sino que es realmente necesaria para la formación de nanopartículas de tamaño adecuado.

Otro procedimiento que se basa en el método de evaporación de solvente consiste en disolver el fármaco en un solvente hidrofóbico (p. ej., tolueno o ciclohexano), sin ningún polímero disuelto en el solvente orgánico, añadir un tensioactivo convencional a la mezcla como emulsor, formar una emulsión de aceite-en-agua y evaporar luego el solvente para obtener partículas secas del fármaco (véase, por ejemplo, Sjostrom y col., en *J. Dispersion Science and Technology* 15:89-117 (1994)). Al eliminar el solvente no polar, se produce precipitación del fármaco dentro de las gotitas del solvente y se obtienen partículas submicrónicas.

Se ha visto que el tamaño de las partículas es principalmente controlado por el tamaño inicial de las gotitas de la emulsión. Además, es interesante hacer notar que se dice que el tamaño final de la partícula disminuye al disminuir la concentración del fármaco en la fase orgánica. Este hallazgo está en contraposición a los resultados aquí descritos, donde no se usa ningún tensioactivo convencional para la preparación de nanopartículas. Además, los autores del artículo de Sjostrom hacen la observación de que el fármaco usado, el acetato de colesterilo, es tensioactivo en tolueno, y por ello puede orientarse en la interfase aceite-agua; por lo tanto, la concentración de fármaco en la interfase es mayor, aumentando así el potencial de precipitación.

También se ha conseguido la formación de partículas submicrónicas por un procedimiento de precipitación, como describen Calvo y col., en *J. Pharm. Sci.* 85:530 (1996). El procedimiento se basa en disolver el fármaco (p. ej., indometacina) y el polímero (policaprolactona) en cloruro de metileno y acetona y verter luego la solución en una fase acuosa que contiene un tensioactivo (Poloxámero 188), para obtener partículas de tamaño submicrónico (216 nm). Sin embargo, se lleva a cabo el procedimiento a concentraciones de solvente a las cuales no se forma ninguna emulsión.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un método para la preparación de un agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua para la administración *in vivo* en forma de partículas filtrables estériles, comprendiendo dicho método:

someter an una mezcla que comprende:

una fase orgánica que contiene dicho agente farmacológicamente activo disuelto en ella, donde dicha fase orgánica comprende una mezcla de un disolvente orgánico sustancialmente inmiscible con agua y un disolvente orgánico miscible con agua, y

un medio acuoso que contiene polímero biocompatible,

donde dicha mezcla no contiene tensioactivos,

a condiciones de alto cizallamiento en un homogeneizador de alta presión a una presión de desde aproximadamente 20,68 MPa (3000 psi) hasta 206,8 Mpa (30.000 psi).

Además, la presente invención proporciona una composición que comprende un agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua o una composición para administración *in vivo* de un agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua a un sujeto que lo necesite, preparado por el método de la invención.

Además, la presente invención proporciona un uso de la composición de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, donde el agente activo sustancialmente insoluble en agua en la composición, es un agente antineoplásico, y donde el medicamento es para la administración *in vivo* del agente

antineoplásico a un sujeto que lo necesite.

Así, es un objeto de esta invención administrar agentes farmacológicamente activos (p. ej., Taxol, taxano, taxótero y similares) en forma no modificada en una composición que no causa reacciones alérgicas debidas a la presencia de emulsores y agentes solubilizantes añadidos, tal como se emplean actualmente en la administración de fármacos.

- 5 Es otro objeto de la presente invención administrar agentes farmacológicamente activos en una composición de micropartículas o nanopartículas, eventualmente suspendidas en un líquido biocompatible adecuado.

Es aún otro objeto de la presente invención facilitar un método para la formación de partículas submicrónicas (nanopartículas) de agentes farmacológicamente activos por una técnica de evaporación de solvente a partir de una emulsión de aceite-en-agua usando proteínas como agentes estabilizadores en ausencia de ningún tensioactivo convencional y en ausencia de cualquier material nuclear polimérico.

Estos y otros objetos de la invención resultarán aparentes al revisar la descripción y las reivindicaciones.

Según la presente invención, hemos descubierto que se pueden administrar agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua en forma de micropartículas o nanopartículas que resultan adecuadas para administración parenteral en suspensión acuosa. Este modo de administración obvia la necesidad de administración de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua (p. ej., Taxol) en una emulsión que contiene, por ejemplo, etanol y aceite de ricino polietoxilado, diluidos en solución salina normal (véase, por ejemplo, Norton y col., en Abstracts of the 2nd National Cancer Institute Workshop on Taxol & Taxus, 23-24 de Septiembre de 1992). Un inconveniente de dichas composiciones conocidas es su propensión a producir efectos colaterales alérgicos.

Así, según la presente invención, se proporcionan métodos para la formación de nanopartículas de agentes farmacológicamente activos por una técnica de evaporación de solvente a partir de una emulsión de aceite-en-agua preparada en condiciones de altas fuerzas de cizallamiento (p. ej., sonicación, homogeneización a alta presión o similares) sin utilizar ningún tensioactivo convencional y sin utilizar ningún material nuclear polimérico para formar la matriz de la nanopartícula. En lugar de ello, se emplean proteínas (p. ej., seroalbúmina humana) como agente estabilizante.

La invención proporciona además un método para la formación reproducible de nanopartículas inusualmente pequeñas (menores de 200 nm de diámetro), que pueden ser esterilizadas por filtración a través de un filtro de 0,22 micras. Se consigue esto por adición de un solvente hidrosoluble (p. ej., etanol) a la fase orgánica y seleccionando cuidadosamente el tipo de fase orgánica, la fracción de fase y la concentración del fármaco en la fase orgánica. La capacidad para formar nanopartículas de un tamaño que sea filtrable a través de filtros de 0,22 micras tiene gran importancia y significación, ya que las formulaciones que contienen una cantidad significativa de cualquier proteína (p. ej., albúmina) no pueden ser esterilizadas por métodos convencionales, tales como el autoclavado, debido a la coagulación de la proteína por el calor.

Según otra realización de la presente invención, hemos desarrollado composiciones útiles para administración *in vivo* de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua. Las composiciones de la invención incluyen agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua (como sólido o líquido) contenidos en una envuelta polimérica. La envuelta polimérica es un polímero biocompatible entrecruzado. La envuelta polimérica, que contiene agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua en su interior puede ser entonces suspendida en un líquido acuoso biocompatible para administración.

La invención proporciona además con un sistema de administración de fármacos en el que parte de las moléculas de agente farmacológicamente activo se unen a la proteína (p. ej., seroalbúmina humana) y son por lo tanto inmediatamente biodisponibles tras su administración a un mamífero. La otra porción del agente farmacológicamente activo está contenida en nanopartículas revestidas de proteína. Las nanopartículas que contienen el agente farmacológicamente activo están presentes como un componente activo puro, sin dilución por ninguna matriz polimérica.

Un gran número de agentes farmacológicamente activos convencionales circulan en el torrente sanguíneo unidos a proteínas de soporte (a través de interacciones hidrofóbicas o iónicas), de las que el ejemplo más común es la seroalbúmina. Los métodos y composiciones de la invención así producidas proporcionan un agente farmacológicamente activo que está "preunido" a una proteína (por interacciones hidrofóbicas o iónicas) antes de su administración.

La presente descripción demuestra ambos modos antes descritos de biodisponibilidad para el Taxol (Paclitaxel), un fármaco anticanceroso capaz de unirse a la seroalbúmina humana (véase, por ejemplo, Kumar y col., en Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology 80:337 (1993)). La alta concentración de albúmina en las partículas de la invención, en comparación con el Taxol, proporciona una cantidad significativa del fármaco en forma de moléculas unidas a albúmina, la cual es también el soporte natural del fármaco en el torrente sanguíneo.

Además, se aprovecha la capacidad de la seroalbúmina humana para unirse al Taxol, así como a otros fármacos, la

cual aumenta la capacidad del Taxol para absorberse sobre la superficie de las partículas. Como la albúmina está presente sobre las partículas coloidales de fármaco (formadas al eliminarse el solvente orgánico), se facilita la formación de una dispersión coloidal estable durante períodos prolongados, debido a una combinación de repulsión eléctrica y estabilización estérica.

Según la presente invención, se proporcionan también partículas submicrónicas en forma de polvo, que pueden ser fácilmente reconstituidas en agua o solución salina. Se obtiene el polvo tras la eliminación del agua por liofilización. La seroalbúmina humana sirve como componente estructural de las nanopartículas de la invención y también como crioprotector y ayuda de reconstitución. La preparación de partículas filtrables a través de un filtro de 0,22 micras según el método de la invención aquí descrito, seguida de desecación o liofilización, produce una formulación sólida estéril útil para inyección intravenosa.

La invención proporciona, en un aspecto particular, una composición de fármacos anticancerosos, p. ej., Taxol, en forma de nanopartículas en una dispersión líquida o como un sólido que puede ser fácilmente reconstituido para administración. Debido a las propiedades específicas de ciertos fármacos, p. ej., Taxol, dichas composiciones no pueden ser obtenidas por métodos convencionales de evaporación de solvente, que se basan en el uso de tensioactivos. En presencia de diversos tensioactivos, se forman cristales muy grandes de fármaco (p. ej., de un tamaño de aproximadamente 5 micras a varios centenares de micras) en unos cuantos minutos de almacenamiento, después del proceso de preparación. El tamaño de dichos cristales es típicamente mucho mayor que el tamaño permitido para inyección intravenosa.

Aunque se reconoce que las partículas producidas según la invención pueden ser cristalinas, amorfas o una mezcla de las mismas, se prefiere en general que el fármaco esté presente en la formulación en forma amorfa. Esto daría lugar a una mayor facilidad de disolución y absorción, dando como resultado una mejor biodisponibilidad.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 presenta los resultados de la administración intravenosa de nanopartículas de paclitaxel a ratones portadores de tumores (n=5 en cada grupo), mostrando una completa regresión del tumor en el grupo de tratamiento (■) en comparación con un grupo control que recibió solución salina (●). Se observa un crecimiento tumoral virtualmente incontrolado en el grupo control. La dosis para el grupo de tratamiento es de 20 mg/kg de paclitaxel administrados como un bolo intravenoso durante cinco días consecutivos.

La Figura 2 presenta los resultados de la administración intraperitoneal de nanopartículas de paclitaxel en ratas que han desarrollado artritis en los pies tras inyección intradérmica de colágeno. Se miden los volúmenes de los pies y éstos indican la severidad de la enfermedad. Se normalizan los volúmenes de los pies al 100% al comienzo del tratamiento. El Día 0 representa la iniciación del tratamiento. Hay 3 grupos - grupo control que recibe solución salina (n=2, mostrado como una línea delgada y marcado en la figura como "sin tratamiento"); un primer grupo de tratamiento que recibe nanopartículas de paclitaxel a una dosis de 1 mg/kg (n=4, mostrado como una línea gruesa y marcado en la figura como "nanopartículas de paclitaxel 1,0 mg/kg"), y un segundo grupo de tratamiento que recibe terapia combinatoria de nanopartículas de paclitaxel a una dosis de 0,5 mg/kg y prednisona a una dosis de 0,2 mg/kg (n=4, mostrado como una línea gruesa y marcado en la figura como "prednisona 0,2 mg/kg + nanopartículas de paclitaxel 0,5 mg/kg"). Los dos grupos de tratamiento muestran una reducción dramática en el volumen del pie con el tiempo, lo que indica una regresión de la artritis, mientras que el grupo control mostró un aumento en el volumen del pie a lo largo del mismo período.

Descripción detallada de la invención

Según la presente invención, se proporcionan métodos para la preparación de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua para administración *in vivo*, cuyos métodos consisten en:

someter una mezcla consistente en:

una fase orgánica que contiene dicho agente farmacológicamente activo disperso en ella y

un medio acuoso que contiene polímero biocompatible,

donde dicha mezcla no contiene sustancialmente tensioactivos,

en un homogeneizador de alta presión a una presión de desde aproximadamente 20,68MPa (3.000 psi) hasta 206,84MPa (30.000 psi). Eventualmente, las fases orgánica y/o acuosa son a continuación eliminadas de la mezcla tras haber sido sometida a condiciones de alto cizallamiento.

También se proporcionan según la presente invención composiciones preparadas por el método antes descrito.

Un sistema de administración de fármacos puede comprender partículas de un agente farmacológicamente activo sólido o líquido, sustancialmente insoluble en agua, revestidas con una proteína,

donde dicho revestimiento proteico tiene proteína libre asociada al mismo,

donde una porción de dicho agente farmacológicamente activo está contenida en dicho revestimiento proteico y una porción de dicho agente farmacológicamente activo está asociada a dicha proteína libre y

- 5 donde el diámetro medio de dichas partículas no es mayor de aproximadamente 1 micra.

- 10 Las composiciones antes descritas son particularmente ventajosas, ya que se ha observado que proporcionan una forma de muy baja toxicidad de una variedad de agentes farmacológicamente activos; p. ej., la combinación de Taxol y albúmina (como polímero biocompatible) es una combinación actualmente preferida debido a su baja toxicidad. La combinación de Taxol y albúmina tiene también la ventaja añadida de ser sustancialmente no mielosupresora.

Preferiblemente, el diámetro medio de las partículas antes descritas no es mayor de aproximadamente 200 nm. Dichas partículas son particularmente ventajosas, ya que pueden ser sometidas filtración estéril, obviando así la necesidad de un tratamiento más vigoroso para conseguir la esterilización de soluciones que contienen el agente farmacológicamente activo deseado.

- 15 Tal como se usa aquí, el término "administración *in vivo*" se refiere a la administración de un agente farmacológicamente activo por las vías de administración oral, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, inhalatoria, tópica, transdérmica, por supositorio (rectal), por pesario (vaginal) y similares.

Tal como se usa aquí, el término "micra" se refiere a una unidad de medida de una milésima parte de un milímetro.

- 20 Tal como se usa aquí, el término "biocompatible" describe una sustancia que no altera apreciablemente o afecta en modo adverso alguno al sistema biológico en el que se introduce.

- 25 Las diferencias clave entre los agentes farmacológicamente activos contenidos en una envuelta polimérica según la invención y las microesferas proteicas de la técnica anterior están en la naturaleza de la formación y en el estado final de la proteína tras la formación de la partícula, y en su capacidad para transportar agentes poco hidrosolubles o sustancialmente insolubles en agua. Según la presente invención, el polímero (p. ej., una proteína) puede resultar entrecruzado debido a la exposición a condiciones de alto cizallamiento en un homogeneizador de alta presión. Se usa un elevado cizallamiento para dispersar un agente dispersante que contiene un agente farmacológicamente activo disuelto o suspendido en una solución acuosa de un polímero biocompatible, eventualmente portador de grupos sulfhidrilo o disulfuro (p. ej., albúmina), mediante lo cual se forma una envuelta de polímero entrecruzado alrededor de finas gotitas de medio no acuoso. Las condiciones de elevado cizallamiento producen cavitación en el líquido, que provoca un tremendo calentamiento local y da lugar a la formación de iones superóxido que son capaces de entrecruzar el polímero, por ejemplo por oxidación de los residuos de sulfhidrilo (y/o ruptura de los enlaces disulfuro existentes) para formar nuevos enlaces disulfuro entrecruzantes.

- 35 Contrariamente al procedimiento de la invención, el método de la técnica anterior del entrecruzamiento con glutaraldehído es inespecífico y esencialmente reactivo con cualquier grupo nucleófilo presente en la estructura de la proteína (p. ej., aminas e hidroxilos). La desnaturalización por calor mostrada por la técnica anterior altera significativa e irreversiblemente la estructura de la proteína. Por el contrario, la formación de disulfuros contemplada por la presente invención no desnaturaliza sustancialmente la proteína. Además, las partículas de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua contenidas en una envuelta difieren las microesferas proteicas entrecruzadas o desnaturalizadas por calor de la técnica anterior, ya que la envuelta polimérica producida por el procedimiento de la invención es relativamente delgada en comparación con el diámetro de la partícula revestida. Se ha determinado (por microscopía de transmisión de electrones) que el "grosor de la envuelta" del revestimiento polimérico es de aproximadamente 25 nanómetros para una partícula revestida con un diámetro de 1 micra (1.000 nanómetros). Por el contrario, las microesferas de la técnica anterior no tienen envueltas proteicas, sino que más bien tienen proteína dispersa por todo el volumen de la microesfera.

- 45 Así, según la presente invención se disuelve un agente farmacológicamente activo en un solvente adecuado (p. ej., cloroformo, cloruro de metileno, acetato de etilo, etanol, tetrahidrofurano, dioxano, acetonitrilo, acetona, sulfóxido de dimetilo, dimetilformamida, metilpirrolidinona o similares, así como mezclas de cualesquiera dos o más de éstos). Como solventes adicionales contemplados para uso en la práctica de la presente invención, se incluyen aceite de soja, aceite de coco, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de semillas de algodón, aceite de sésamo, aceite de naranja, aceite de limoneno, alcoholes C₁-C₂₀, ésteres C₂-C₂₀, cetonas C₃-C₂₀, polietilenglicoles, hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos halogenados y sus combinaciones.

A diferencia de los métodos convencionales para la formación de nanopartículas, no se disuelve un polímero (p. ej., ácido poliláctico) en el solvente. La fase oleosa empleada en la preparación de las composiciones de la invención contiene sólo el agente farmacológicamente activo disuelto en solvente.

- 55 A continuación, se añade una proteína (p. ej., seroalbúmina humana) (a la fase acuosa) para que actúe como un

agente estabilizador para la formación de nanogotitas estables. Se añade la proteína a una concentración de aproximadamente un 0,05 a un 25% (p/v), más preferiblemente de aproximadamente un 0,5% - 5% (p/v). A diferencia de los métodos convencionales para la formación de nanopartículas, no se añade ningún tensioactivo (p. ej., laurilsulfato de sodio, lecitina, Tween 80, Pluronic F-68 y similares) a la mezcla.

5 A continuación, se forma una emulsión por homogeneización a alta presión y altas fuerzas de cizallamiento. Dicha homogeneización es convenientemente llevada a cabo en un homogeneizador de alta presión, típicamente operado a presiones de desde aproximadamente 20,68MPa (3.000psi) hasta 206,84MPa (30.000psi). Preferiblemente, dichos procedimientos son llevados a cabo a presiones de desde aproximadamente 41,37MPa (6.000psi) hasta 172,37MPa (25.000psi). La emulsión resultante consiste en nanogotitas muy pequeñas del solvente no acuoso (que contienen el agente farmacológicamente activo disuelto) y nanogotitas muy pequeñas del agente estabilizador proteico. Como métodos aceptables de homogeneización, se incluyen procedimientos que imparten alto cizallamiento y cavitación, tales como la homogeneización a alta presión, las mezcladoras de alto cizallamiento, la sonicación, los propulsores de alto cizallamiento y similares.

10 Finalmente, se evapora el solvente a presión reducida para obtener un sistema coloidal compuesto por nanopartículas revestidas de proteína de agente farmacológicamente activo y proteína. Como métodos aceptables de evaporación, se incluyen el uso de evaporadores rotatorios, evaporadores de película descendente, secadores por aspersion, liofilizadores y similares.

Tras la evaporación del solvente, se puede secar la suspensión líquida para obtener un polvo que contiene el agente farmacológicamente activo y proteína. El polvo resultante puede redispersarse en cualquier momento adecuado en un medio acuoso adecuado, tal como solución salina, solución salina tamponada, agua, medios acuosos tamponados, soluciones de aminoácidos, soluciones de vitaminas, soluciones de carbohidratos o similares, así como combinaciones de cualesquiera dos o más de éstos, para obtener una suspensión que puede ser administrada a mamíferos. Como métodos contemplados para obtener este polvo, se incluyen la liofilización, la desecación por aspersion y similares.

20 Según una realización específica de la presente invención, se proporciona un método para la formación de partículas submicrónicas partículas (nanopartículas) inusualmente pequeñas, es decir, partículas menores de 200 nanómetros de diámetro. Dichas partículas son capaces de ser esterilizadas por filtración antes de su uso en forma de suspensión líquida. La capacidad para esterilizar por filtración el producto final del procedimiento de formulación de la invención (es decir, las partículas de fármaco) tiene una gran importancia, ya que es imposible esterilizar dispersiones que contienen altas concentraciones de proteína (p. ej., seroalbúmina) por medios convencionales, tales como el autoclavado.

Con objeto de obtener partículas esterilizables por filtración (es decir, partículas <200 nm), se disuelve inicialmente el agente farmacológicamente activo en un solvente orgánico sustancialmente inmiscible en agua (p. ej., un solvente que tiene menos de aproximadamente un 5% de solubilidad en agua, tal como, por ejemplo, el cloroformo) a alta concentración, formando así una fase oleosa que contiene el agente farmacológicamente activo. Se han expuesto anteriormente solventes adecuados. A diferencia de los métodos convencionales para la formación de nanopartículas, no se disuelve un polímero (p. ej., ácido poliláctico) en el solvente. La fase oleosa empleada en el procedimiento de la presente invención contiene sólo el agente farmacológicamente activo disuelto en solvente.

35 A continuación, se añade un solvente orgánico miscible en agua (p. ej., un solvente que tiene una solubilidad en agua mayor de aproximadamente un 10%, tal como, por ejemplo, el etanol) a la fase oleosa a una concentración final de aproximadamente un 1%-99% v/v, más preferiblemente de aproximadamente un 5%-25% v/v de la fase orgánica total. Se puede seleccionar el solvente orgánico miscible en agua entre solventes tales como el acetato de etilo, el etanol, el tetrahidrofurano, el dioxano, el acetonitrilo, la acetona, el sulfóxido de dimetilo, la dimetilformamida, la metilpirrolidinona y similares. Alternativamente, se prepara primeramente la mezcla de solvente inmiscible en agua con solvente miscible en agua, seguido de disolución del agente farmacéuticamente activo en la mezcla.

40 A continuación, se disuelve seroalbúmina humana o cualquier otro agente estabilizador adecuado como se ha descrito anteriormente en medio acuoso. Este componente actúa como agente estabilizador para la formación de nanogotitas estables. Eventualmente, se disuelve suficiente cantidad del primer solvente orgánico (p. ej., cloroformo) en la fase acuosa para llevarla próxima a la concentración de saturación. Se añade una cantidad aparte medida de la fase orgánica (que ahora contiene el agente farmacológicamente activo, el primer solvente orgánico y el segundo solvente orgánico) a la fase acuosa saturada, de tal forma que la fracción de fase de la fase orgánica sea de entre un 0,5% y un 15% v/v y más preferiblemente de entre un 1% y un 8% v/v.

45 A continuación, se forma una mezcla compuesta por micro- y nanogotitas por homogeneización a fuerzas de bajo cizallamiento. Se puede conseguir esto en una variedad de formas, como pueden identificar fácilmente los expertos en la técnica, empleando, por ejemplo, un homogeneizador de laboratorio convencional operado en el rango de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 15.000 rpm. Esto va seguido de homogeneización a alta presión (es decir, en el rango de aproximadamente 20,68MPa (3.000psi) a 206,84MPa (30.000 psi)). La mezcla resultante consiste en una solución acuosa de proteína (p. ej., seroalbúmina humana), el agente farmacológicamente activo insoluble en agua, el primer solvente y el segundo solvente. Finalmente, se evapora rápidamente el solvente a vacío

para obtener un sistema de dispersión coloidal (agente farmacológicamente activo y proteína) en forma de nanopartículas extremadamente pequeñas (es decir, partículas en el rango de aproximadamente 10 nm-200 nm de diámetro), y por lo tanto se puede esterilizar por filtración. El rango preferido de tamaños de las partículas es de aproximadamente 50 nm-170 nm, dependiendo de la formulación y de los parámetros operativos.

- 5 Los sistemas coloidales preparados según la presente invención pueden ser aún convertidos en forma de polvo por eliminación del agua de los mismos, p. ej., por liofilización a un perfil adecuado de temperatura-tiempo. La propia proteína (p. ej., seroalbúmina humana) actúa como un crioprotector y el polvo es fácilmente reconstituido por adición de agua, solución salina o tampón, sin necesidad de usar crioprotectores convencionales tales como el manitol, la sacarosa, la glicina y similares. Aunque no sea necesario, se entiende, por supuesto, que se pueden añadir crioprotectores convencionales a las formulaciones de la invención si así se desea.

- 10 La envuelta polimérica que contiene núcleos sólidos o líquidos de agente farmacológicamente activo permite la administración de altas dosis del agente farmacológicamente activo en volúmenes relativamente pequeños. Esto minimiza la incomodidad del paciente al recibir grandes volúmenes de líquido y minimiza la estancia hospitalaria. Además, las paredes de la envuelta o revestimiento polimérico son en general completamente degradables *in vivo* por enzimas proteolíticas (p. ej., cuando el polímero es una proteína), dando como resultado la ausencia de efectos colaterales derivados del sistema de administración, como es el caso con las formulaciones actuales.

- 15 Según esta realización de la presente invención, las partículas de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua pueden tener un diámetro transversal no mayor de aproximadamente 10 micras. Se prefiere mejor un diámetro transversal menor de 5 micras, mientras que un diámetro transversal menor de 1 micra es actualmente el más preferido para la vía de administración intravenosa.

- 20 Como agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua contemplados para uso en la práctica de la presente invención, se incluyen agentes farmacéuticamente activos, agentes diagnósticos, agentes de valor nutricional y similares. Como ejemplos de agentes farmacéuticamente activos, se incluyen:

- 25 Analgésicos/antipiréticos (p. ej., aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, naproxeno sodio, clorhidrato de buprenorfina, clorhidrato de propoxifeno, napsilato de propoxifeno, clorhidrato de meperidina, clorhidrato de hidromorfona, sulfato de morfina, clorhidrato de oxicodona, fosfato de codeína, bitartrato de dihidrocodeína, clorhidrato de pentazocina, bitartrato de hidrocodona, tartrato de levorfanol, diflunisal, salicilato de trolamina, clorhidrato de nalbufina, ácido mefenámico, tartrato de butorfanol, salicilato de colina, butalbital, citrato de feniltoloxamina, citrato de difenhidramina, metotrimoprazina, clorhidrato de cinamedrina, meprobamato y similares);

- 30 anestésicos (p. ej., ciclopropano, enflurano, halotano, isoflurano, metoxiflurano, óxido nitroso, propofol y similares);

antiasmáticos (p. ej., Azelastina, Ketotifeno, Traxanox y similares);

antibióticos (p. ej., neomicina, estreptomicina, cloranfenicol, cefalosporina, ampicilina, penicilina, tetraciclina y similares);

- 35 antidepresivos (p. ej., nefopam, oxipertina, clorhidrato de doxepina, amoxapina, clorhidrato de trazodona, clorhidrato de amitriptilina, clorhidrato de maprotilina, sulfato de fenelzina, clorhidrato de desipramina, clorhidrato de nortriptilina, sulfato de tranilcipromina, clorhidrato de fluoxetina, clorhidrato de doxepina, clorhidrato de imipramina, pamoato de imipramina, nortriptilina, clorhidrato de amitriptilina, isocarboxazid, clorhidrato de desipramina, maleato de trimipramina, clorhidrato de protriptilina y similares);

antidiabéticos (p. ej., biguanidas, hormonas, derivados de sulfonilurea y similares);

- 40 agentes antifúngicos (p. ej., griseofulvina, keloconazol, anfotericina B, nistatina, candicidina y similares);

agentes antihipertensores (p. ej., propanolol, propafenona, oxiprenolol, nifedipina, reserpina, camsilato de trimetafán, clorhidrato de fenoxibenzamina, clorhidrato de pargilina, deserpidina, diazoxida, monosulfato de guanetidina, minoxidil, rescinamina, nitroprusida sódica, *Rauwolfia serpentina*, alseroxilón, mesilato de fentolamina, reserpina y similares);

- 45 antiinflamatorios (p. ej., (no esteroideos) indometacina, naproxeno, ibuprofeno, ramifenazona, piroxicam, (esteroideos) cortisona, dexametasona, fluazacort, hidrocortisona, prednisolona, prednisona y similares);

antineoplásicos (p. ej., adriamicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, mitomicina, metotrexato, fluorouracilo, carboplatina, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatina, etopósido, interferones, camptotecina y sus derivados, fenesterina, Taxol y sus derivados, taxótero y sus derivados, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, etopósido, piposulfano y similares);

- 50 agentes ansiolíticos (p. ej., lorazepam, clorhidrato de buspirona, prazepam, clorhidrato de clordiazepóxido, oxazepam, clorazepato dipotásico, diazepam, pamoato de hidroxizina, clorhidrato de hidroxizina, alprazolam, droperidol, halazepam, cloromezanona, dantroleno y similares);

- agentes inmunosupresores (p. ej., ciclosporina, azatioprina, mizoribina, FK506 (tacrolimo) y similares);
- agentes antimigraña (p. ej., tartrato de ergotamina, clorhidrato de propanolol, mucato de isometepteno, dicloralfenazona y similares);
- 5 sedantes/hipnóticos (p. ej., barbituratos (p. ej., pentobarbital, pentobarbital sodio, secobarbital sodio), benzodiazapinas (p. ej., clorhidrato de flurazepam, triazolam, tomazepam, clorhidrato de midazolam y similares);
- agentes antiangina (p. ej., bloqueantes beta-adrenérgicos, bloqueantes de los canales del calcio (p. ej., nifedipina, clorhidrato de diltiazem y similares), nitratos (p. ej., nitroglicerina, dinitrato de isosorbida, tetranitrato de pentaeritritol, tetranitrato de eritritol y similares));
- 10 agentes antipsicóticos (p. ej., haloperidol, succinato de loxapina, clorhidrato de loxapina, tioridazina, clorhidrato de tioridazina, tiotixeno, clorhidrato de flufenazina, decanoato de flufenazina, enantato de flufenazina, clorhidrato de trifluoperazina, clorhidrato de clorpromazina, perfenazina, citrato de litio, proclorperazina y similares);
- agentes antimaníacos (p. ej., carbonato de litio);
- 15 antiarrítmicos (p. ej., tosilato de bretilio, clorhidrato de esmolol, clorhidrato de verapamilo, amiodarona, clorhidrato de encainida, digoxina, digitoxina, clorhidrato de mexiletina, fosfato de disopiramida, clorhidrato de procainamida, sulfato de quinidina, gluconato de quinidina, poligalacturonato de quinidina, acetato de flecainida, clorhidrato de tocainida, clorhidrato de lidocaína y similares);
- agentes antiartríticos (p. ej., fenilbutazona, sulindaco, penicilamina, salsalato, piroxicam, azatioprina, indometacina, meclofenamato sodio, tiomalato de oro y sodio, ketoprofeno, auranofina, aurotioglucosa, tolmetina sodio y similares);
- agentes antigota (p. ej., colchicina, alopurinol y similares);
- 20 anticoagulantes (p. ej., heparina, heparina sodio, warfarina sodio y similares);
- agentes trombolíticos (p. ej., urokinasa, estreptokinasa, alteplasa y similares);
- agentes antifibrinolíticos (p. ej., ácido aminocaproico);
- agentes hemorreológicos (p. ej., pentoxifilina);
- agentes antiplaquetarios (p. ej., aspirina, empirina, ascriptina y similares);
- 25 anticonvulsivantes (p. ej., ácido valproico, divalproato sodio, fenitoína, fenitoína sodio, clonazepam, primidona, fenobarbital, fenobarbital sodio, carbamazepina, amobarbital sodio, metsuximida, metarbitol, mefobarbital, mefenitoína, fensuximida, parametadiona, etotoína, fenacemida, secobarbital sodio, clorazepato dipotásico, trimetadiona y similares);
- agentes antiparkinsonianos (p. ej., etosuximida y similares);
- 30 antihistamínicos/antipruríticos (p. ej., clorhidrato de hidroxizina, clorhidrato de difenhidramina, maleato de clorfeniramina, maleato de bromfeniramina, clorhidrato de ciproheptadina, terfenadina, fumarato de clemastina, clorhidrato de triprolidina, maleato de carbinoxamina, clorhidrato de difenilpiralina, tartrato de fenindamina, maleato de azatadina, clorhidrato de tripelenamina, maleato de dexclorfeniramina, clorhidrato de metildilazina, tartrato de trimprazina y similares);
- 35 agentes útiles para la regulación del calcio (p. ej., calcitonina, hormona paratiroidea y similares);
- agentes antibacterianos (p. ej., sulfato de amikacina, aztreonam, cloranfenicol, palmitato de cloranfenicol, succinato de cloranfenicol sodio, clorhidrato de ciprofloxacina, clorhidrato de clindamicina, palmitato de clindamicina, fosfato de clindamicina, metronidazol, clorhidrato de metronidazol, sulfato de gentamicina, clorhidrato de lincomicina, sulfato de tobramicina, clorhidrato de vancomicina, sulfato de polimixina B, colistimetato sodio, sulfato de colistina y similares);
- 40 agentes antivíricos (p. ej., gamma-interferón, zidovudina, clorhidrato de amantadina, ribavirina, aciclovir y similares);
- antimicrobianos (p. ej., cefalosporinas (p. ej., cefazolina sodio, cefradina, cefaclor, cefapirina sodio, ceftizoxima sodio, cefoperazona sodio, cefotetano disódico, cefutoxima azotilo, cefotaxima sodio, cefadroxilo monohidrato, cefazidima, cefalexina, cefalotina sodio, clorhidrato de cefalexina monohidrato, nafato de cefamandol, cefoxitina sodio, cefonicid sodio, ceforanida, ceftriaxona sodio, ceftazidima, cefadroxilo, cefradina, cefuroxima sodio y similares), penicilinas (p. ej., ampicilina, amoxicilina, penicilina G benzatina, ciclacilina, ampicilina sodio, penicilina G potasio, penicilina V potasio, piperacilina sodio, oxacilina sodio, clorhidrato de bacampicilina, cloxacilina sodio, ticarcilina disódica, azlocilina sodio, carbenicilina indanilo sodio, penicilina G potasio, penicilina G procaína, meticilina sodio, nafcilina sodio y similares), eritromicinas (p. ej., etilsuccinato de eritromicina, eritromicina, estolato de eritromicina, lactobionato de eritromicina, siearato de eritromicina, etilsuccinato de eritromicina y similares), tetraciclinas (p. ej., clorhidrato de tetraciclina, hclato de doxiciclina, clorhidrato de minociclina y similares), y
- 45
- 50

similares);

antiinfecciosos (p. ej., GM-CSF);

5 broncodilatadores (p. ej., simpaticomiméticos (p. ej., clorhidrato de epinefrina, sulfato de metaproterenol, sulfato de terbutalina, isoetarina, mesilato de isoetarina, clorhidrato de isoetarina, sulfato de albuterol, albuterol, bitolterol, clorhidrato de mesilato de isoproterenol, sulfato de terbutalina, bitartrato de epinefrina, sulfato de metaproterenol, epinefrina, bitartrato de epinefrina), agentes anticolinérgicos (p. ej., bromuro de ipratropio), xantinas (p. ej., aminofilina, difilina, sulfato de metaproterenol, aminofilina), estabilizadores de células cebadas (p. ej., cromolín sodio), corticosteroides inhalatorios (p. ej., dipropionato de flurisolidebeclometasona, dipropionato de beclometasona monohidrato), salbutamol, dipropionato de beclometasona (BDP), bromuro de ipratropio, budesonida, ketotifeno, salmeterol, xinafoato, sulfato de terbutalina, triamcinolona, teofilina, nedocromil sodio, sulfato de metaproterenol, albuterol, flunisolida y similares);

15 hormonas (p. ej., andrógenos (p. ej., danazol, cipionato de testosterona, fluoximesterona, etiltestosterona, enaninato de testosterona, metiltestosterona, fluoximesterona, cipionato de testosterona), estrógenos (p. ej., estradiol, estropipato, estrógenos conjugados), progestinas (p. ej., acetato de metoxiprogesterona, acetato de noretindrona), corticosteroides (p. ej., triamcinolona, betametasona, fosfato de betametasona sodio, dexametasona, fosfato de dexametasona sodio, acetato de dexametasona, prednisona, suspensión de acetato de metilprednisolona, triamcinolona acetónido, metilprednisolona, fosfato de prednisolona sodio, succinato de metilprednisolona sodio, succinato de hidrocortisona sodio, succinato de metilprednisolona sodio, triamcinolona hexacatónido, hidrocortisona, cipionato de hidrocortisona, prednisolona, acetato de fluorocortisona, acetato de parametasona, tebulato de prednisolona, acetato de prednisolona, fosfato de prednisolona sodio, succinato de hidrocortisona sodio y similares), hormonas tiroideas (p. ej., levotiroxina sodio) y similares), y similares;

agentes hipoglucémicos (p. ej., insulina humana, insulina bovina purificada, insulina porcina purificada, gliburida, clorpropamida, glipizida, tolbutamida, tolazamida y similares);

agentes hipolipémicos (p. ej., clofibrato, dextrotiroxina sodio, probucol, lovastatina, niacina y similares);

25 proteínas (p. ej., ADNasa, alginasa, superóxido dismutasa, lipasa y similares);

ácidos nucleicos (p. ej., ácidos nucleicos sentido o antisentido codificantes de cualquier proteína terapéuticamente útil, incluyendo cualquiera de las proteínas aquí descritas, y similares);

agentes útiles para la estimulación de la eritropoyesis (p. ej., eritropoyetina);

agentes antiulcerosos/antirreflujo (p. ej., famotidina, cimetidina, clorhidrato de ranitidina y similares);

30 antinauseantes/antieméticos (p. ej., clorhidrato de meclizina, nabilona, proclorperazina, dimenhidrinato, clorhidrato de prometazina, tietilperazina, escopolamina y similares);

vitaminas liposolubles (p. ej., vitaminas A, D, E, K y similares);

así como otros fármacos tales como mitotano, visadina, halonitrosoureas, antrociquinas, elipticina y similares.

35 Como ejemplos de agentes diagnósticos contemplados para uso en la práctica de la presente invención, se incluyen los agentes de contraste para ultrasonidos, los agentes de radiocontraste (p. ej., yodoocanos, halocarburos, renografina y similares), agentes de contraste magnético (p. ej., fluorocarburos, compuestos paramagnéticos solubles en lípidos y similares), así como otros agentes diagnósticos que no pueden ser fácilmente administrados sin alguna modificación física y/o química para acomodarse a su naturaleza sustancialmente insoluble en agua.

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

45 Se pueden emplear una serie de polímeros biocompatibles en la práctica de la presente invención para la formación de la envuelta polimérica que rodea los agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua. Se puede utilizar esencialmente cualquier polímero, natural o sintético, eventualmente portador de grupos sulfhidrilo o de enlaces disulfuro en su estructura, para la preparación de una envuelta entrecruzada con disulfuro alrededor de partículas de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua. Los grupos sulfhidrilo o uniones disulfuro pueden preexistir en la estructura del polímero o pueden ser introducidos por una modificación química adecuada. Por ejemplo, polímeros naturales tales como proteínas, péptidos, ácidos polinucleicos, polisacáridos (p. ej., almidón, celulosa, dextranos, alginatos, quitosano, pectina, ácido hialurónico y similares), proteoglicanos, lipoproteínas, etc., son candidatos a dicha modificación.

50 Las proteínas contempladas para uso como agentes estabilizantes según la presente invención incluyen albúminas (que contienen 35 residuos de cisteína), inmunoglobulinas, caseínas, insulinas (que contienen 6 cisteínas), hemoglobinas (que contienen 6 residuos de cisteína por unidad $\alpha_2\beta_2$), lisozimas (que contienen 8 residuos de

cisteína), inmunoglobulinas, α -2-macroglobulina, fibronectinas, vitronectinas, fibrinógenos, lipasas y similares. Las proteínas, los péptidos, las enzimas, los anticuerpos y sus combinaciones son clases generales de estabilizadores contemplados para uso en la presente invención.

Una proteína actualmente preferida para uso en la formación de una envuelta polimérica es la albúmina. Eventualmente, proteínas tales como la α -2-macroglobulina, una conocida opsonina, podrían ser usadas para aumentar la captación de las partículas de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua encerradas en envuelta por células de tipo macrófago, o para aumentar la captación de las partículas encerradas en envuelta en el hígado y el bazo. También se pueden utilizar anticuerpos específicos para dirigir las nanopartículas a localizaciones específicas.

De forma similar, los polipéptidos sintéticos que contienen residuos de cisteína son también buenos candidatos para la formación de una envuelta alrededor de los agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua. Además, el alcohol polivinílico, el metacrilato de polihidroxietilo, el ácido poliacrílico, la polietiloxazolina, la poliacrilamida, la polivinilpirrolidina y similares son buenos candidatos para la modificación química (por ejemplo, por introducción de uniones sulfhidrilo y/o disulfuro) y la formación de la envuelta (provocando su entrecruzamiento). Así, por ejemplo, se contemplan para uso en la práctica de la presente invención materiales tales como poliaminoácidos sintéticos que contienen residuos de cisteína y/o grupos disulfuro; alcohol polivinílico modificado para contener grupos sulfhidrilo y/o grupos disulfuro libres; metacrilato de polihidroxietilo modificado para contener grupos sulfhidrilo y/o grupos disulfuro libres; ácido poliacrílico modificado para contener grupos sulfhidrilo y/o grupos disulfuro libres; polietiloxazolina modificada para contener grupos sulfhidrilo y/o grupos disulfuro libres; poliacrilamida modificada para contener grupos sulfhidrilo y/o grupos disulfuro libres; polivinilpirrolidina modificada para contener grupos sulfhidrilo y/o grupos disulfuro libres; polialquilenglicoles modificados para contener grupos sulfhidrilo y/o grupos disulfuro libres; polilactidas, poliglicolidas, policaprolactonas o sus copolímeros, modificados para contener grupos sulfhidrilo y/o grupos disulfuro libres; así como mezclas de cualesquiera dos o más de éstos.

En la preparación de las composiciones de la invención, se pueden emplear una amplia variedad de medios orgánicos para suspender o disolver el agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua. Los medios orgánicos contemplados para uso en la práctica de la presente invención incluyen cualquier líquido no acuoso capaz de suspender o disolver el agente farmacológicamente activo, pero que no reaccione químicamente con el polímero empleado para producir la envuelta o con el mismo agente farmacológicamente activo. Como ejemplos, se incluyen aceites vegetales (p. ej., aceite de soja, aceite de oliva y similares), aceite de coco, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de naranja, aceite de limoneno, hidrocarburos alifáticos, cicloalifáticos o aromáticos de 4-30 átomos de carbono (p. ej., n-dodecano, n-decano, n-hexano, ciclohexano, tolueno, benceno y similares), alcoholes alifáticos o aromáticos de 2-30 átomos de carbono (p. ej., octanol y similares), ésteres alifáticos o aromáticos de 2-30 átomos de carbono (p. ej., caprilato (octanoato) de etilo y similares), éteres alquílicos, arílicos o cíclicos de 2-30 átomos de carbono (p. ej., éter dietílico, tetrahydrofurano y similares), haluros de alquilo o arilo de 1-30 átomos de carbono (y eventualmente más de un sustituyente halógeno, p. ej., CH_3Cl , CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}-\text{CH}_2\text{Cl}$ y similares), cetonas de 3-30 átomos de carbono (p. ej., acetona, metilacetona y similares), polialquilenglicoles (p. ej., polietilenglicol y similares), o combinaciones de cualesquiera dos o más de éstos.

Las combinaciones especialmente preferidas de medios orgánicos contempladas para uso en la práctica de la presente invención típicamente tienen un punto de ebullición no mayor de aproximadamente 200°C e incluyen líquidos volátiles, tales como diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, benceno y similares (es decir, solventes que tienen un alto grado de solubilidad para el agente farmacológicamente activo y son solubles en el otro medio orgánico empleado), junto con un medio orgánico de peso molecular superior (menos volátil). Cuando se añaden al otro medio orgánico, estos aditivos volátiles ayudan a conducir la solubilidad del agente farmacológicamente activo en el medio orgánico. Esto es deseable, ya que esta etapa normalmente consume tiempo. Tras la disolución, el componente volátil puede ser eliminado por evaporación (eventualmente a vacío).

Se administran partículas de agente farmacológicamente activo asociadas a una envuelta polimérica, preparadas como se ha descrito anteriormente, en forma de una suspensión en un líquido acuoso biocompatible. Este líquido puede ser seleccionado entre agua, solución salina, una solución que contenga tampones apropiados, una solución que contenga agentes nutricionales tales como aminoácidos, azúcares, proteínas, carbohidratos, vitaminas o grasa y similares.

Aparte de aplicaciones biomédicas, tales como la administración de fármacos, agentes diagnósticos (en aplicaciones de imagen), sangre artificial y agentes nutricionales parenterales, las estructuras de envuelta polimérica de la invención pueden ser incorporadas en aplicaciones cosméticas, tales como cremas para la piel o productos para el cuidado del cabello, en aplicaciones de perfumería, en tintas sensibles a la presión y similares.

La invención será ahora descrita con mayor detalle por los siguientes ejemplos en tanto en cuanto están subiertos por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

Preparación de nanopartículas por homogeneización a alta presión

Se disuelven 30 mg de paclitaxel en 3,0 ml de cloruro de metileno. Se añadió la solución a 27,0 ml de solución de seroalbúmina humana (1% p/v). Se homogeneizó la mezcla durante 5 minutos a bajas RPM (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I. Q.) para formar una emulsión bruta y se transfirió después a un homogeneizador de alta presión (Avestin). Se llevó a cabo la emulsión a 62,05-124,10 Mpa (9.000-18.000 psi) al tiempo que se reciclaba la emulsión durante al menos 5 ciclos. Se transfirió el sistema resultante a un evaporador rotatorio y se eliminó rápidamente el cloruro de metileno a 40°C y a presión reducida (30 mm Hg) durante 20-30 minutos. La dispersión resultante era translúcida y el diámetro típico de las partículas resultantes de paclitaxel era de 160-220 (media Z, Malvern Zetasizer).

La dispersión se liofilizó adicionalmente durante 48 horas sin añadir ningún crioprotector. Se pudo reconstituir fácilmente la torta resultante para obtener la dispersión original por adición de agua o solución salina estéril. El tamaño de partícula tras la reconstitución era el mismo que antes de la liofilización.

Ejemplo 2Preparación de nanopartículas por sonicación

El objetivo de este ejemplo es demostrar la formación de nanopartículas de Paclitaxel utilizando cavitación y fuerzas de alto cizallamiento durante un proceso de sonicación. Así, se disuelven 20 mg de paclitaxel en 1,0 ml de cloruro de metileno. Se añade la solución a 4,0 ml de solución de seroalbúmina humana (5% p/v). Se homogeneiza la mezcla durante 5 minutos a bajas RPM (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I.Q.) para formar una emulsión bruta y se transfiere luego a una célula sonicadora de 40 kHz. Se opera el sonicador a una potencia del 60-90% a 0 grados durante 1 min. (550 Sonic Dismembrator). Se transfiere la mezcla a un evaporador rotatorio y se elimina rápidamente el cloruro de metileno a 40°C y a presión reducida (30 mm Hg) durante 20-30 minutos. El diámetro típico de las partículas resultantes de paclitaxel era de 350-420 nm (media Z, Malvern Zetasizer).

Se liofilizó después la dispersión durante 48 h sin añadir ningún crioprotector. La torta resultante pudo ser fácilmente reconstituida para obtener la dispersión original por adición de agua o solución salina estéril. El tamaño de partícula tras la reconstitución era el mismo que antes de la liofilización.

Ejemplo 3El uso de tensioactivos convencionales y de proteínas da como resultado la formación de grandes cristales

El siguiente ejemplo demuestra el efecto de la adición de tensioactivos utilizados en el método convencional de evaporación de solvente. Se realizaron una serie de experimentos empleando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, pero se añadió un tensioactivo tal como el Tween 80 (de un 1% a un 10%) al solvente orgánico. Se vio que, después de la eliminación del cloruro de metileno, se obtenía un gran número de cristales de paclitaxel con un tamaño medio de 1-2 micras, según se vio por microscopía óptica y bajo luz polarizada. Los cristales crecen en unas cuantas horas para formar cristales muy grandes de tipo aguja, con un tamaño en el rango de aproximadamente 5-15 micras. Se observa un fenómeno similar con otros tensioactivos de uso común, tales como el Pluronic F-68, el Pluronic F 127, el Cremophor EL y el Brij 58.

A partir de estos resultados, se puede concluir que el método convencional de evaporación de solvente utilizando tensioactivos convencionales en combinación con una proteína tal como la albúmina no es adecuado para la formación de partículas de fármaco (p. ej., Paclitaxel) submicrónicas sin un núcleo polimérico, utilizando un solvente polar (p. ej., cloruro de metileno).

Ejemplo 4El uso de tensioactivos convencionales por sí solos da como resultado la formación de grandes cristales

Este ejemplo demuestra que no es posible formar nanopartículas utilizando tensioactivos convencionales sin un material de núcleo polimérico con agentes farmacológicamente activos que son solubles en solventes polares inmiscibles en agua (p. ej., cloroformo).

Se disuelven 30 mg de Taxol en 0,55 ml de cloroformo y 0,05 ml de etanol. Se añade la solución a 29,4 ml de solución de Tween 80 (1% p/v), que está presaturada con un 1% de cloroformo. Se homogeneiza la mezcla durante 5 minutos a bajas RPM (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I. Q.) para formar una emulsión bruta y se transfiere después a un homogeneizador de alta presión (Avestin). Se lleva a cabo la emulsión a 62,05-124,10MPa (9.000-18.000 psi), al tiempo que se recicla la emulsión durante al menos 6 ciclos. Se transfirió el sistema resultante a un evaporador rotatorio y se eliminó rápidamente el cloroformo a 40°C y a presión reducida (30 mm Hg) durante 15-30 minutos. La dispersión resultante era opaca y contenía grandes cristales de tipo aguja del fármaco. El tamaño inicial de los cristales (observado también por luz polarizada) era de 0,7-5 micras. El almacenamiento de la dispersión durante varias horas a temperatura ambiente dio lugar a un mayor aumento del tamaño del cristal y en último lugar a precipitación.

Ejemplo 5Preparación de nanopartículas esterilizables por filtración de menos de 200 nm

- Este ejemplo describe el procedimiento mediante el cual se pueden obtener partículas de fármaco esterilizables por filtración. Así, se disuelven 30 mg de Taxol en 0,55 ml de cloroformo y 0,05 ml de etanol. Se añade la solución a 29,4 ml de solución de seroalbúmina humana (1% p/v), que está presaturada con un 1% de cloroformo. Se homogeneiza la mezcla durante 5 minutos a bajas RPM (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I. Q.) para formar una emulsión bruta y se transfiere después a un homogeneizador de alta presión (Avestin). Se lleva a cabo la emulsión a 62,05-124,10MPa (9.000-18.000psi) al tiempo que se recicla la emulsión durante al menos 6 ciclos. Se transfiere el sistema resultante a un evaporador rotatorio y se elimina rápidamente el cloroformo a 40°C y a presión reducida (30 mm Hg) durante 15-30 minutos. La dispersión resultante es translúcida y el diámetro típico de las partículas resultantes de Taxol es de 140-160 nm (media Z, Malvern Zeta Sizer). Se filtra la dispersión a través de un filtro de 0,22 micras (Millipore), sin ningún cambio significativo en la turbidez o en el tamaño de partícula. El análisis de HPLC del contenido en Taxol reveló que se había recuperado más del 97% del Taxol tras la filtración, obteniéndose así una dispersión de Taxol estéril.
- Se liofilizó luego la dispersión estéril durante 48 h sin añadir ningún crioprotector. Se pudo reconstituir fácilmente la torta resultante a la dispersión original por adición de agua o solución salina estéril. El tamaño de partícula tras la reconstitución era el mismo que antes de la liofilización.

Ejemplo 6Preparación de nanopartículas esterilizables por filtración menores de 200 nm

- Este ejemplo describe el procedimiento mediante el cual se pueden obtener partículas de fármaco esterilizables por filtración. Así, se disuelven 225 mg de Taxol en 2,7 ml de cloroformo y 0,3 ml de etanol. Se añade la solución a 97 ml de solución de seroalbúmina humana (3% p/v). Se homogeneiza la mezcla durante 5 minutos a bajas RPM (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I. Q.) para formar una emulsión bruta y se transfiere luego a un homogeneizador de alta presión (Avestin). Se lleva a cabo la emulsión a 62,05-124,10MPa (9.000-18.000 psi) al tiempo que se recicla la emulsión durante al menos 6 ciclos. Se transfiere el sistema resultante a un evaporador rotatorio y se elimina rápidamente el cloroformo a 40°C y a presión reducida (30 mm Hg) durante 15-30 minutos. La dispersión resultante es translúcida y el diámetro típico de las partículas resultantes de Taxol es de 140-160 nm (media Z, Malvern Zeta Sizer). Se filtra la dispersión a través de un filtro de 0,22 micras (Sartorius, sartobran 300), sin cambio alguno significativo en la turbidez o en el tamaño de partícula. El análisis de HPLC del contenido en Taxol típicamente reveló que se podía recuperar un 70-100% del Taxol tras la filtración, dependiendo de las condiciones empleadas. Se obtuvo así una dispersión estéril de Taxol.

Se introdujo la dispersión estéril asépticamente en viales de vidrio estériles y se liofilizó sin añadir ningún crioprotector. Se pudo reconstituir fácilmente la torta resultante a la dispersión original por adición de agua o solución salina estéril. El tamaño de partícula tras la reconstitución era el mismo que antes de la liofilización.

Ejemplo 7Efecto de la fracción de fase del solvente orgánico sobre el tamaño de partícula

El siguiente ejemplo demuestra la importancia de tener una fracción de fase inusualmente baja de solvente orgánico en el sistema.

- Así, se realizaron una serie de experimentos siguiendo un procedimiento similar al descrito para el Ejemplo 5, excepto por el hecho de que se alteró la fracción de fase del solvente orgánico y de que se mantuvo el contenido en etanol al 10% v/v en la fase orgánica. Se vio que el aumento de la fracción de fase daba lugar a un aumento significativo del tamaño de partícula: a un 4% v/v de fracción de fase (por encima de la concentración de saturación, o 5% v/v de concentración total de cloroformo), las partículas resultantes tienen un diámetro de 250 nm; a un 3% v/v de fracción de fase, las partículas tienen un diámetro de 200 nm, y a un 2% v/v de fracción de fase, las partículas tienen un diámetro de 150 nm.

Claramente, sólo las partículas preparadas a una fracción de fase muy baja podían ser esterilizadas por filtración.

Ejemplo 8Efecto de la concentración del fármaco sobre el tamaño de partícula

- Se demuestra el papel de la concentración del fármaco en la fase orgánica en el siguiente ejemplo. Se realizaron dos experimentos, en los cuales la concentración de Taxol en la fase orgánica era de 50 mg/ml o de 75 mg/ml, mientras que el resto de los parámetros eran los mismos que los descritos en el Ejemplo 3. Se vio que la baja concentración de fármaco daba partículas con un diámetro de aproximadamente 150 nm, mientras que las preparadas a la carga superior de fármaco eran de menor tamaño, es decir, de 130-138 nm. Cuando se realizó un experimento similar, pero con una concentración de etanol en la fase orgánica de aproximadamente un 50%, se

observó una tendencia similar, es decir, que las partículas tenían un diámetro de 210 nm y 156 nm, para una concentración de fármaco de 25 mg/ml y 50 mg/ml, respectivamente.

Estos hallazgos contradicen directamente los descritos por Sjostrom y col., antes citado, para la formación de nanopartículas en presencia de tensioactivos.

5 Ejemplo 9

Formación de nanopartículas de un fármaco modelo

- Se disuelven 30 mg de iso-reserpina (un fármaco modelo) en 3,0 ml de cloruro de metileno. Se añade la solución a 27,0 ml de solución de seroalbúmina humana (1% p/v). Se homogeneiza la mezcla durante 5 minutos a bajas RPM (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I. Q.) para formar una emulsión bruta y se transfiere luego a un homogeneizador de alta presión (Avestin). Se lleva a cabo la emulsión a 62,05-124,10MPa (9.000-18.000 psi) al tiempo que se recicla la emulsión durante al menos 5 ciclos. Se transfiere el sistema resultante a un evaporador rotatorio y se elimina rápidamente el cloruro de metileno a 40°C y a presión reducida (30 mm Hg) durante 20-30 minutos. La dispersión resultante es translúcida y el diámetro típico de las partículas resultantes de paclitaxel es de 120-140 nm (media Z, Malvern Zetasizer). Se filtra la dispersión a través de un filtro de 0,22 micras (Millipore).
- Se liofiliza después la dispersión estéril durante 48 h sin añadir ningún crioprotector. Se puede reconstituir fácilmente la torta resultante a la dispersión original por adición de agua o solución estéril. El tamaño de partícula tras la reconstitución es el mismo que antes de la liofilización.

Ejemplo 10

Formación de partículas extremadamente pequeñas con un fármaco modelo

- Se demuestra el efecto de la adición de etanol sobre la reducción del tamaño de partícula para la iso-reserpina. Así, se disuelven 30 mg de iso-reserpina en 2,7 ml de cloruro de metileno y 0,3 ml de etanol. Se añade la solución a 27,0 ml de solución de seroalbúmina humana (1% p/v). Se homogeneiza la mezcla durante 5 minutos a bajas RPM (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I.Q.) para formar una emulsión bruta y se transfiere después a un homogeneizador de alta presión (Avestin). Se lleva a cabo la emulsión a 62,05-124,10MPa (9.000-18.000 psi) al tiempo que se recicla la emulsión durante al menos 5 ciclos. Se transfiere el sistema resultante a un evaporador rotatorio y se elimina rápidamente el cloruro de metileno a 40°C y a presión reducida (30 mm Hg) durante 20-30 minutos. La dispersión resultante es translúcida y el diámetro típico de las partículas resultantes de paclitaxel es de 90-110 nm (media Z, Malvern Zetasizer). Se filtra la dispersión a través de un filtro de 0,22 micras (Millipore).
- Se liofiliza después la dispersión estéril durante 48 h sin añadir ningún crioprotector. Se puede reconstituir fácilmente la torta resultante a la dispersión original por adición de agua o solución salina estéril. El tamaño de partícula tras la reconstitución es el mismo que antes de la liofilización.

Ejemplo 11

Uso de sólo un solvente miscible en agua, sobresaturado con fármaco - No adecuado para el procedimiento de la invención

- Se dispersan 30 mg de Taxol en 0,6 ml de etanol. A esta concentración (50 mg/ml), el Taxol no es completamente soluble y forma una dispersión sobresaturada. Se añade la dispersión a 29,4 ml de solución de seroalbúmina humana (1% p/v). Se homogeneiza la mezcla durante 5 minutos a bajas RPM (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I. Q.) para formar una dispersión bruta y se transfiere luego a un homogeneizador de alta presión (Avestin). Se lleva a cabo la emulsión a 62,05-124,10MPa (9.000-18.000 psi) al tiempo que se recicla la emulsión durante al menos 6 ciclos. Se transfiere el sistema resultante a un evaporador rotatorio y se elimina rápidamente el etanol a 40°C y a presión reducida (30 mm Hg) durante 15-30 minutos. El tamaño de partícula de la dispersión resultante es extremadamente amplio, variando entre aproximadamente 250 nm y varias micras.

- La observación al microscopio reveló la presencia de grandes partículas y de cristales típicos en forma de aguja de Taxol. Estas partículas eran demasiado grandes para inyección intravenosa. Este experimento demuestra que el uso de solventes tales como el etanol, que son libremente miscibles en agua, en el procedimiento de la invención da lugar a la formación de grandes partículas con una distribución muy amplia del tamaño de partícula, y como tales no pueden ser usados solos para el procedimiento de la invención. Por lo tanto, el procedimiento de la invención excluye específicamente el uso de solventes miscibles en agua cuando se usan solos para la disolución o dispersión del componente farmacológico. El procedimiento de la invención requiere mezclar dichos solventes, cuando se utilizan, con solventes esencialmente inmiscibles en agua para permitir la producción de las nanopartículas de la invención.

Ejemplo 12

Uso de sólo un solvente miscible en agua que contiene fármaco disuelto - No adecuado para el procedimiento de la

invención

Se dispersan 30 mg de Taxol en 1,3 ml de etanol. A esta concentración (aprox. 24,5 mg/ml), el Taxol es completamente soluble en etanol. Se añade la solución a 28,7 ml de solución de seroalbúmina humana (1% p/v). Se homogeneiza la mezcla durante 5 minutos a bajas RPM (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I. Q.) para formar una dispersión bruta y se transfiere después a un homogeneizador de alta presión (Avestin). Se lleva a cabo la emulsión a 62,05-124,10MPa (9.000-18.000 psi) al tiempo que se recicla la emulsión durante al menos 6 ciclos. Se transfiere el sistema resultante a un evaporador rotatorio y se elimina rápidamente el etanol a 40°C y a presión reducida (30 mm Hg) durante 15-30 minutos. El tamaño de partícula de la dispersión resultante es extremadamente amplio, variando entre aproximadamente 250 nm y varias micras. La observación al microscopio revela la presencia de grandes partículas y de cristales típicos con forma de aguja de Taxol. Estas partículas son demasiado grandes para inyección intravenosa.

Este ejemplo, además del Ejemplo 11 anterior, demuestra que el uso en el procedimiento de la invención de solventes tales como el etanol, que son libremente miscibles en agua, da lugar a la formación de grandes partículas con una distribución muy amplia de tamaños de partícula, y como tales no pueden ser usados por sí solos para el procedimiento de la invención. Por lo tanto, el procedimiento de la invención excluye específicamente el uso de solventes miscibles en agua cuando se usan solos para la disolución o dispersión del componente farmacológico. El procedimiento de la invención requiere mezclar dichos solventes, cuando se utilizan, con solventes esencialmente inmiscibles en agua para permitir la formación de las nanopartículas de la invención.

Ejemplo 13Determinación del estado físico del Paclitaxel en forma de nanopartículas por difracción de polvo por rayos X

La materia prima del paclitaxel está habitualmente presente como cristales en forma de agujas de tamaños variables, típicamente de entre 5-500 micras. La presencia de cristales en una formulación de fármaco para inyección intravenosa es obviamente perjudicial si los cristales están presentes en un tamaño superior a varias micras, debido a un bloqueo potencial de los capilares. Además, la solubilidad de los cristales de fármaco en general sería menor que para el fármaco amorfo, disminuyendo así la biodisponibilidad del fármaco tras administración intravenosa. También se sabe que, al aumentar la carga del fármaco en una formulación, también aumenta la tendencia a la cristalización. Es, por lo tanto, ventajoso que la formulación contenga el fármaco en forma esencialmente amorfa.

Se usó difracción del polvo por rayos X para determinar la naturaleza cristalina o no cristalina del paclitaxel en la formulación de polvo liofilizado. Se analizaron las siguientes muestras: Muestra 1 - paclitaxel en polvo; Muestra 2 - seroalbúmina liofilizada; Muestra 3 - una mezcla física de paclitaxel y albúmina; y Muestra 4 - paclitaxel formulado. Se sometió cada muestra a rayos X a ángulos de 2° a 70° 2θ usando radiación CuKα, un voltaje de aceleración de 40 KeV/30 mA, un tamaño de paso de 0,05° 2θ y un tiempo de adquisición de datos de 2,0 segundos por paso. La Muestra 1 mostró fuertes picos típicos de una muestra cristalina. El pico más intenso de paclitaxel se localizaba a 5,1° 2θ. La Muestra 2 mostró amplias crestas típicas de material amorfo. La Muestra 3 mostró en gran parte las amplias crestas de la Muestra 2, pero además el pico a 5,1° 2θ del paclitaxel era visible. La Muestra 4, el paclitaxel formulado, no mostró evidencia de cristalinidad característica del paclitaxel y parecía idéntica a la Muestra 2, lo que indica la presencia de agente farmacológicamente activo sustancialmente amorfo en la muestra formulada.

La naturaleza amorfa de las nanopartículas producidas según la invención está en contraste directo con los productos producidos por otros métodos descritos en la técnica para producir nanopartículas. Por ejemplo, el uso de técnicas de trituración, como se describe en la Patente EE.UU. 5.145.684 (Liversidge y col.) y como describen Liversidge-Merisko y col., Pharmaceutical Research 13(2):272-278 (1996), produce un producto sustancialmente cristalino.

Ejemplo 14Tratamiento de tumores en un modelo animal con nanopartículas de paclitaxel

Se prepararon nanopartículas de paclitaxel (Taxol) como se ha descrito antes en el Ejemplo 1. Se estudió esta formulación del fármaco en un modelo de xenoinjerto de tumor mamario humano MX-1 en ratones. Se implantó a los ratones subcutáneamente el tumor mamario MX-1 y se inició el tratamiento cuando el tumor alcanzó aproximadamente 150-300 mg de tamaño. Esto ocurrió hacia el día 12 y se inició el tratamiento el día 13 tras la siembra inicial.

Se trataron ratones portadores de tumores con nanopartículas de paclitaxel a una dosis de 20 mg/kg, dada por inyección intravenosa en bolo como una suspensión en solución salina durante cinco días consecutivos. El grupo tratado incluía cinco animales. El grupo portador de tumor control de cinco animales recibió sólo solución salina según el mismo protocolo. Se monitorizó el tamaño de los tumores en función del tiempo. El grupo control mostró un tremendo aumento en el peso del tumor. Todos los animales de este grupo fueron sacrificados entre el día 28 y el día 39. El grupo de tratamiento, por otra parte, mostró una notable eficacia, ya que ninguno de los animales tenía tumores mensurables hacia el día 25. Todos los animales de este grupo fueron sacrificados el día 39, en cuyo

momento no mostraban evidencia de recurrencia ni evidencia de tumor. En la Figura 1 se muestran los resultados.

Ejemplo 15

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

Se usó el modelo de artritis inducida por colágeno en rata Louvain para estudiar el efecto terapéutico de las nanopartículas de paclitaxel sobre la artritis. Se monitorizaron los tamaños del pie de los animales experimentales para evaluar la gravedad de la artritis.

Después de que la artritis se hubo desarrollado por completo (normalmente ~9-10 días después de la inyección de colágeno), los animales experimentales fueron divididos en diferentes grupos para recibir o bien nanopartículas de paclitaxel a 1 mg/kg en días alternos, o bien nanopartículas de paclitaxel a 0,5 mg/kg + Prednisona a 0,2 mg/kg en días alternos (tratamiento de combinación) intraperitonealmente durante 6 dosis y luego a razón de una dosis por semana durante tres semanas. Se midieron los tamaños de los pies al comienzo del tratamiento (día 0) y cada vez que se inyectaba el fármaco. Un grupo recibió sólo solución salina normal como control. Hacia el final del experimento, el grupo que recibió nanopartículas de paclitaxel alcanzó una reducción del 42% en el tamaño del pie y el grupo del tratamiento de combinación mostró una reducción del 33% en el tamaño del pie, mientras que el grupo control tenía un aumento de aproximadamente el 20% en el tamaño del pie. El tamaño original del pie antes de inducir la artritis era del 50%. En la Figura 2 se muestran los resultados.

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

Ejemplo 16

Envío dirigido *in vivo* de nanopartículas

Mediante incorporación de ciertos restos de abordaje, tales como proteínas, anticuerpos, enzimas, péptidos, oligonucleótidos, azúcares, polisacáridos y similares, al revestimiento proteico de las nanopartículas, es posible abordar sitios específicos del organismo. Esta capacidad de abordaje puede ser utilizada para fines terapéuticos o diagnósticos.

Ejemplo 17

Sistemas de administración intravenosa formulados a partir de una variedad de materiales

Los materiales usados para la preparación de sistemas administración intravenosa pueden ser poliméricos (p. ej., tubos de polietileno, polivinilo o polipropileno y similares) o de vidrio. Se sabe que los tubos de grado médico estándar contienen restos hidrofóbicos en sus superficies internas. Estos restos están, por lo tanto, disponibles para entrar en contacto con la solución de inyección. Ciertamente, dichos tubos están específicamente confeccionados, al igual que los catéteres, para presentar restos hidrofóbicos en contacto con la solución de tratamiento para reducir la absorción de material acuoso hacia el tubo. Sin embargo, cualquier resto hidrofóbico en la solución de tratamiento se unirá probablemente tanto al tubo del catéter como a otros componentes del sistema de administración. Como resultado, una porción substancial de un agente farmacológicamente activo hidrofóbico puede quedar secuestrada en las paredes internas del tubo del catéter y del recipiente de administración. Por consiguiente, la dosificación de los agentes farmacológicamente activos hidrofóbicos puede ser errática, ya que una porción substancial del agente activo puede absorberse hacia las paredes del tubo. En tratamientos terapéuticos críticos, donde el agente farmacológicamente activo hidrofóbico es usado para tratar una enfermedad, una reducción significativa en la dosis efectiva del agente activo puede dar lugar a un fallo terapéutico. El fallo es particularmente sorprendente cuando se emplean restos terapéuticos que requieren que el agente activo esté presente por encima de un cierto nivel, y sin embargo la ventana terapéutica es estrecha.

Se ha desarrollado ahora un nuevo método para la introducción intravenosa de un agente farmacológicamente activo hidrofóbico. Protegiendo los restos hidrofóbicos del agente activo, por asociación con los restos hidrofóbicos con un revestimiento biocompatible (p. ej., albúmina), se reduce dramáticamente la propensión del agente activo a unirse al tubo. Así, la presente invención permite el uso de fármacos altamente hidrofóbicos, en combinación con polímeros de grado médico estándar y vidrios hidrofóbicos, donde el fármaco está protegido y por lo tanto no se absorbe sobre la superficie. El método de la invención consiste en poner un revestimiento protector de un polímero biocompatible (p. ej., albúmina) alrededor del fármaco hidrofóbico y en poner la composición resultante en un sistema de administración polimérico hidrofóbico. Los métodos de la invención son, por lo tanto, capaces de mejorar la administración de una variedad de agentes terapéuticos hidrofóbicos.

Ejemplo 18

Administración intravenosa de agentes terapéuticos

La administración intravenosa de agentes terapéuticos, por ejemplo fármacos, agentes de imagen y similares, predispone al agente terapéutico a al menos un paso a través del hígado. Al filtrarse ese agente terapéutico a través del hígado, una porción significativa de ese agente terapéutico es captada y secuestrada por el hígado y, por lo tanto, no queda disponible para distribución sistémica. Más aún, una vez captado por el hígado, es probable que se metabolice y los subproductos metabólicos resultantes tienen con frecuencia toxicidades sistémicas generales. Encapsulando el fármaco u otro agente terapéutico en un revestimiento según la invención (p. ej., usando una proteína tal como albúmina), se palia el secuestro por el hígado tras la administración intravenosa. Se sabe que la albúmina, por ejemplo, pasa a través del hígado y se distribuye generalmente por todo el paciente. Así, el secuestro de la albúmina por el hígado no se produce en el mismo grado que los compuestos tóxicos o los fármacos que tienen receptores hepáticos (u otros mecanismos) que inician procesos que dan lugar a su eliminación del torrente sanguíneo. Protegiendo el agente terapéutico con un revestimiento de un polímero biocompatible (p. ej., un revestimiento de albúmina humana), el fármaco circunvala entonces el hígado y se distribuye generalmente por todos los sistemas orgánicos. Según un aspecto de la presente invención, se facilita un nuevo método para evitar el paso por el hígado, que consiste en encapsular un fármaco en una albúmina hepática humana (esencialmente un componente fisiológico). De este modo, queda más fármaco disponible para terapia sistémica. Además de la mayor disponibilidad del fármaco, se produce una disminución en la producción de subproductos metabólicos de la degradación hepatocelular del fármaco. Tanto el aumento en la circunvalación hepática como la disminución en los subproductos del metabolismo del fármaco proporcionan un mejoramiento sinérgico de la eficacia global del fármaco. Esta mejor eficacia se extiende a todos los fármacos y materiales que están encapsulados en albúmina humana.

Ejemplo 19

Reducción de los efectos mielosupresores y de la toxicidad general de los fármacos

Diversos fármacos quimioterápicos tienen una toxicidad limitante de dosis debido a sus efectos mielosupresores. El Taxol (paclitaxel) es un ejemplo clásico de tal fármaco. Cuando se administra en su formulación actualmente aprobada de Cremaphor/etanol, el Taxol produce efectos mielosupresores que limitan la administración repetida del fármaco e impiden el retratamiento de un paciente durante al menos 3 semanas para permitir que los recuentos sanguíneos del paciente vuelvan a la normalidad. Se postuló que, debido a la naturaleza compatible no tóxica del soporte del fármaco de la presente invención, a saber, la albúmina humana, se puede reducir en gran medida el efecto colateral tóxico de mielosupresión.

Se dio paclitaxel a ratas Sprague-Dawley en una formulación comercial (de Bristol Myers Squibb (BMS) en Cremaphor/etanol) o preparado por el método de la invención como nanopartículas con albúmina. Ambas formulaciones fueron administradas por inyección en la vena de la cola. Se administró un solo nivel de dosis de 5 mg/kg para la formulación BMS, mientras que se administraron dos niveles de dosis de 5 mg/kg y 12 mg/kg para la formulación de la invención (Capxol). Se monitorizaron los recuentos de leucocitos de las ratas diariamente tras la administración como índice de mielosupresión.

Para la formulación BMS (5 mg/kg), se vio que los recuentos de leucocitos caían en un 47,6% y un 63,5% el día 1 y el día 2 después de la administración, respectivamente, mientras que, para la formulación de Capxol a 5 mg/kg, los recuentos de leucocitos aumentaron en un 14,7% y un 2,4% el día 1 y el día 2, respectivamente. Para la dosis superior de Capxol a 12 mg/kg, los recuentos de leucocitos aumentaron en un 6,5% y un 3,6% el día 1 y el día 2, respectivamente.

Estos resultados indican que la mielosupresión a corto plazo se reduce mucho por administración del fármaco en la formulación de la presente invención.

Otro indicador de toxicidad general es el peso corporal del animal. Se monitorizaron también los pesos corporales de las ratas tras la administración de paclitaxel. A una dosis de 5 mg/kg, la formulación BMS dio lugar a una reducción del peso corporal de un 10,4% en 3 días después de la administración, mientras que la misma dosis de paclitaxel administrada en la formulación de la invención (Capxol) dio lugar a una reducción del peso corporal de sólo un 3,9%, lo que indica la muy reducida toxicidad de la formulación de la invención.

Ejemplo 20

Administración de dosis en bolo de formulación de nanopartículas

El fármaco anticanceroso, paclitaxel, en su formulación comercial BMS con Cremaphor/etanol, no puede ser administrado como un bolo intravenoso. Esto es debido a la gran toxicidad del vehículo, que da lugar a reacciones anafilácticas severas y requiere que los pacientes que reciben el fármaco estén premedicados con esteroides, antihistamínicos y similares. La formulación BMS es administrada como una infusión intravenosa que puede durar entre 1 hora y 24 horas. Por el contrario, las formulaciones según la presente invención, debido al uso de un soporte no tóxico, pueden ser administradas a un paciente fácilmente como un bolo intravenoso (es decir, en un período menor de 1 hora) sin los problemas de toxicidad observados en la formulación BMS usada en la clínica actualmente.

La dosis efectiva de paclitaxel para un paciente es típicamente de entre 200 y 500 mg, dependiendo del peso

corporal o de la superficie corporal del paciente. La formulación BMS ha de ser administrada a una concentración de dosificación final de 0,6 mg/ml, lo que requiere grandes volúmenes de infusión (típicamente del orden de aproximadamente 300-1.000 ml. Por el contrario, las formulaciones de la invención (p. ej., Capxol) no tienen estas limitaciones y pueden ser administradas a una concentración deseada. Ello permite a los clínicos tratar a los

5 pacientes mediante un rápido bolo intravenoso, que puede ser administrado en tan sólo unos minutos. Por ejemplo, si la formulación de la invención es reconstituida a una concentración de dosificación de 20 mg/ml, el volumen de infusión para una dosis total de 200-500 mg es de sólo 10-25 ml, respectivamente. Esto supone una gran ventaja en la práctica clínica.

Ejemplo 21

10 Reducción de la toxicidad del Paclitaxel en la formulación de nanopartículas en comparación con la formulación comercial de Cremaphor/etanol

Es bien sabido que el fármaco anticanceroso, paclitaxel, en su formulación comercial BMS con Cremaphor/etanol, tiene una amplia toxicidad que da lugar a reacciones anafilácticas severas y requiere que los pacientes que reciben el fármaco sean premedicados con esteroides, antihistamínicos y similares. Se comparó la toxicidad de la

15 formulación BMS con la formulación de nanopartículas de la presente invención.

Así, se inyectaron las formulaciones intravenosamente en la vena de la cola de ratones C57BL a diferentes niveles de dosis y se monitorizaron los efectos tóxicos por observación general de los ratones tras la inyección.

Para la formulación BMS, una dosis de 30 mg/kg era letal de manera uniforme en los 5 minutos siguientes a la administración intravenosa. Para la misma dosis, la formulación de nanopartículas según la invención no mostró

20 efectos tóxicos aparentes. La formulación de nanopartículas a una dosis de 103 mg/kg mostró alguna reducción en el peso corporal de los ratones, pero incluso esta elevada dosis no resultó letal. Dosis de aproximadamente 1.000 mg/kg, 800 mg/kg y 550 mg/kg resultaron todas letales, pero diferían en el tiempo necesario para la letalidad, que variaba entre unas cuantas horas y 24 horas. La dosis letal de la formulación de la invención es superior a 103 mg/kg, pero inferior a 550 mg/kg.

25 Por lo tanto, la dosis letal de la formulación de la invención de paclitaxel es sustancialmente superior a la de la formulación BMS comercial. Esto tiene un gran significado en la práctica clínica, donde se pueden administrar dosis superiores de fármacos quimioterápicos para una actividad oncolítica más efectiva con toxicidad muy reducida.

Ejemplo 22

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

30 Se disuelven 30 mg de ciclosporina en 3,0 ml de cloruro de metileno. Se añade entonces la solución a 27,0 ml de solución de seroalbúmina humana (1% p/v). Se homogeneiza la mezcla durante 5 minutos a bajas RPM (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I.Q.) para formar una emulsión bruta y se transfiere después a un homogeneizador de alta presión (Avestin). Se lleva a cabo la emulsión a 62,05-124,10MPa (9.000-18.000 psi) al tiempo que se recicla la emulsión durante al menos 5 ciclos. Se transfiere el sistema resultante a un Rotavap y se

35 elimina rápidamente el cloruro de metileno a 40°C y a presión reducida (30 mm Hg) durante 20-30 minutos. La dispersión resultante es translúcida y el diámetro típico de las partículas de ciclosporina resultantes es de 160-220 (media Z, Malvern Zetasizer).

Se liofilizó luego la dispersión durante 48 horas, sin añadir ningún crioprotector. Se pudo reconstituir fácilmente la torta resultante a la dispersión original por adición de agua o solución salina estéril. El tamaño de partícula tras la

40 reconstitución era el mismo que antes de la liofilización.

Ejemplo 23

Preparación de nanogotitas de ciclosporina (Capsorine Oral) por homogeneización a alta presión

Se disuelven 30 mg de ciclosporina en 3,0 ml de un aceite adecuado (aceite de sésamo que contiene un 10% de aceite de naranja). Se añade entonces la solución a 27,0 ml de solución de seroalbúmina humana (1% v/p). Se

45 homogeneiza la mezcla durante 5 minutos a bajas RPM (homogeneizador Vitris, modelo: Tempest I.Q.) para formar una emulsión bruta y se transfiere luego a un homogeneizador de alta presión (Avestin). Se lleva a cabo la emulsión a 62,05-124,10MPa (9.000-18.000 psi) al tiempo que se recicla la emulsión durante al menos 5 ciclos. La dispersión resultante tiene un diámetro típico de 160-220 (media Z, Malvern Zetasizer).

Se puede usar la dispersión directamente o liofilizarla durante 48 horas añadiendo eventualmente un crioprotector adecuado. Se pudo reconstituir fácilmente la torta resultante a la dispersión original por adición de agua o solución salina estéril.

50

Ejemplo 24

Datos farmacocinéticos (FC) para nanopartículas de ciclosporina (Capsorine I.V.) tras administración intravenosa

Comparación con Sandimmune I.V. (formulación actualmente comercializada por Sandoz)

- 5 Se reconstituyeron nanopartículas de ciclosporina (Capsorine I.V.) preparadas como se ha descrito anteriormente (Ejemplos 22 y 23) en solución salina y se administraron a un primer grupo de 3 ratas Sprague-Dawley por bolo intravenoso. Un segundo grupo de 3 ratas recibieron Sandimmune I.V., que contiene Cremophor/etanol, tras dilución en solución salina. Cada grupo recibió la misma dosis de 2,5 mg/kg. Se tomaron muestras de sangre a tiempos de 0, 5, 15, 30 (minutos) 1, 2, 4, 8, 24, 36 y 48 (horas). Se estudiaron los niveles de ciclosporina en sangre por HPLC y se determinaron los parámetros FC típicos. Las curvas FC mostraron una caída típica en el tiempo como sigue:

Caída en el tiempo		
	AUC, mg-h/ml	C _{máx} , ng/ml
10 Capsorine I.V.	12,228	2,853
Sandimmune I.V.	7,791	2,606

- 15 Además, debido a la toxicidad de la formulación de Sandimmune I.V., 2 de 3 ratas en ese grupo murieron dentro de las 4 horas siguientes a la administración de la dosis. Por lo tanto, la formulación de nanopartículas (Capsorine I.V.) según la presente invención muestra una mayor AUC y una ausencia de toxicidad en comparación con la formulación comercial (Sandimmune I.V.).

Ejemplo 25Datos farmacocinéticos (FC) para nanogotitas de ciclosporina (Capsorine Oral) tras administración oralComparación con Neoral (formulación actualmente comercializada por Sandoz)

- 20 Se administraron nanogotitas de ciclosporina preparadas como se ha descrito anteriormente en zumo de naranja a un primer grupo de 3 ratas Sprague-Dawley por sondaje oral. Un segundo grupo de 3 ratas recibió Neoral, una formulación en microemulsión comercial que contiene emulsores, tras dilución en zumo de naranja, también por sondaje oral. Cada grupo recibió la misma dosis de 12 mg/kg en un volumen idéntico de zumo de naranja. Se tomaron muestras de sangre a tiempos de 0, 5, 15, 30 (minutos) 1, 2, 4, 8, 24, 36 y 48 (horas). Se estudiaron los niveles de ciclosporina en sangre por HPLC y se determinaron los parámetros FC típicos. Las curvas FC mostraron una caída típica en el tiempo como sigue:

Caída en el tiempo		
	AUC, mg-h/ml	C _{máx} , ng/ml
Capsorine I.V.	3,195	887
30 Neoral	3,213	690

Por lo tanto, la formulación de nanogotitas (Capsorine Oral) de la presente invención muestra un comportamiento FC similar a la formulación comercial (Neoral).

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de un agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua para la administración *in vivo* en forma de partículas filtrables estériles, comprendiendo dicho método:
5 someter una mezcla que comprende: una fase orgánica que contiene dicho agente farmacológicamente activo disuelto en ella, donde dicha fase orgánica comprende una mezcla de un disolvente orgánico sustancialmente inmiscible con agua y un disolvente orgánico miscible con agua, y
un medio acuoso que contiene polímero biocompatible,
donde dicha mezcla no contiene tensioactivos,
a condiciones de alto cizallamiento en un homogeneizador de alta presión a una presión en el intervalo de
10 aproximadamente 20,68 MPa (3000 psi) hasta 206,8 MPa (30.000 psi).
2. El método según la reivindicación 1, que comprende además eliminar dicha fase orgánica de dicha mezcla.
3. El método según la reivindicación 2, en el que la fase orgánica se elimina mediante evaporación a presión reducida.
4. El método según la reivindicación 1, que comprende además eliminar dicha fase acuosa de dicha mezcla.
- 15 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha mezcla no contiene tensioactivo.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua se selecciona entre un agente farmacéuticamente activo, un agente diagnóstico o un agente de valor nutricional.
- 20 7. El método según la reivindicación 6, donde dicho agente farmacéuticamente activo es un agente antineoplásico o inmunosupresor.
8. El método según la reivindicación 7, donde dicho antineoplásico se selecciona entre adriamicina, ciclofosfamida, actinomicina, bleomicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, mitomicina, metotrexato, fluorouracilo, carboplatina, carmustina (BCNU), metil-CCNU, cisplatino, etopósido, interferón, camptotecina y sus derivados,
25 fenesterina, taxano en forma sin modificar, paclitaxel y sus derivados, taxótero y sus derivados, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, etopósido y piposulfano.
9. El método según la reivindicación 8, en el que dicho antineoplásico es un taxano en forma no modificada.
10. El método según la reivindicación 8, en el que dicho antineoplásico es paclitaxel o un derivado del mismo.
11. El método según la reivindicación 10, donde dicho antineoplásico es paclitaxel.
- 30 12. El método según la reivindicación 8, donde dicho antineoplásico es un taxótero o derivado del mismo.
13. El método según la reivindicación 12, donde dicho antineoplásico es un taxótero.
14. El método según la reivindicación 7, en el que dicho agente inmunosupresor es ciclosporina, azatioprina, mizoribina o FK506 (tacrolimo).
- 35 15. El método según la reivindicación 6, en el que dicho agente diagnóstico es un agente de contraste de ultrasonido, un agente de radiocontraste o un agente de contraste magnético.
16. El método según la reivindicación 6, donde dicho agente de valor nutricional es un aminoácido, azúcar, proteína, carbohidrato, vitamina soluble en grasa, o grasa, o una combinación de cualesquiera dos o mas de los mismos.
17. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho polímero biocompatible puede reticularse mediante puentes disulfuro.
- 40 18. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho polímero biocompatible es un polímero que ocurre de forma natural, un polímero sintético o una combinación de los mismos.
19. El método según la reivindicación 18, en el que dicho polímero que ocurre de forma natural es una proteína.
20. El método según la reivindicación 19, donde dicha proteína es la albúmina.
21. El método según la reivindicación 20, donde dicha albúmina es la seroalbúmina humana.

22. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 19, 20 y 21, donde la concentración de proteína en la fase acuosa es aproximadamente 0,05% a 25% (peso/volumen).
23. El método según la reivindicación 22, donde la concentración de proteína en la fase acuosa es aproximadamente 0,5% a 5% (peso/volumen).
- 5 24. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dichas condiciones de alto cizallamiento comprenden poner en contacto dicha fase orgánica y dicho medio acuoso en un homogeneizador de alta presión a una presión en el intervalo de aproximadamente 41,36 MPa (6.000 psi) a aproximadamente 172,37 MPa (25.000 psi).
- 10 25. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dichas condiciones de alto cizallamiento comprenden poner en contacto dicha fase orgánica y dicho medio acuoso en un homogeneizador de alta presión a una presión en el intervalo de aproximadamente 62,05 MPa (9.000 psi) a aproximadamente 124,11 MPa (18.000 psi).
- 15 26. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dichas condiciones de alto cizallamiento producen partículas que comprenden dicho agente farmacológicamente activo revestido con dicho polímero biocompatible.
27. El método según la reivindicación 26, en el que dichas partículas comprenden un agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua sólido o líquido.
28. El método según la reivindicación 26, en el que dichas partículas son amorfas, cristalinas o una mezcla de las mismas.
- 20 29. El método según la reivindicación 26, en el que dichas partículas son sustancialmente amorfas.
30. El método según la reivindicación 29, en el que dichas partículas son amorfas.
31. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende filtrar dicha mezcla a través de un filtro de 0,22 micras.
- 25 32. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha mezcla se forma combinando dicha fase orgánica y dicho medio acuoso y sometiendo a condiciones de bajo cizallamiento en un homogeneizador a 2.000 a 15.000 rpm.
33. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho disolvente sustancialmente insoluble en agua es cloroformo.
- 30 34. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho disolvente orgánico soluble en agua es etanol.
35. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha mezcla comprende una fracción fase de la fase orgánica de 0,5%-15% volumen/volumen.
36. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el disolvente orgánico sustancialmente inmiscible con agua tiene menos de aproximadamente 5% de solubilidad en agua.
- 35 37. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el disolvente orgánico miscible con agua tiene más de aproximadamente 10% de solubilidad en agua.
38. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración del disolvente orgánico miscible con agua en la fase orgánica es aproximadamente 5% a aproximadamente 25% (volumen/volumen).
- 40 39. El método según la reivindicación 35, en el que dicha mezcla comprende una fracción fase de la fase orgánica de entre 1% y 8% (volumen/volumen).
40. Una composición que comprende un agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua, comprendiendo dicha composición un producto preparado según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39.
- 45 41. Una composición para administración *in vivo* de un agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua a un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicha composición el producto preparado según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39.

42. Uso de una composición que comprende el producto preparado de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, donde el agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua, en la composición es un agente antineoplásico, y donde el medicamento es para la administración *in vivo* del agente antineoplásico a un sujeto que lo necesite.

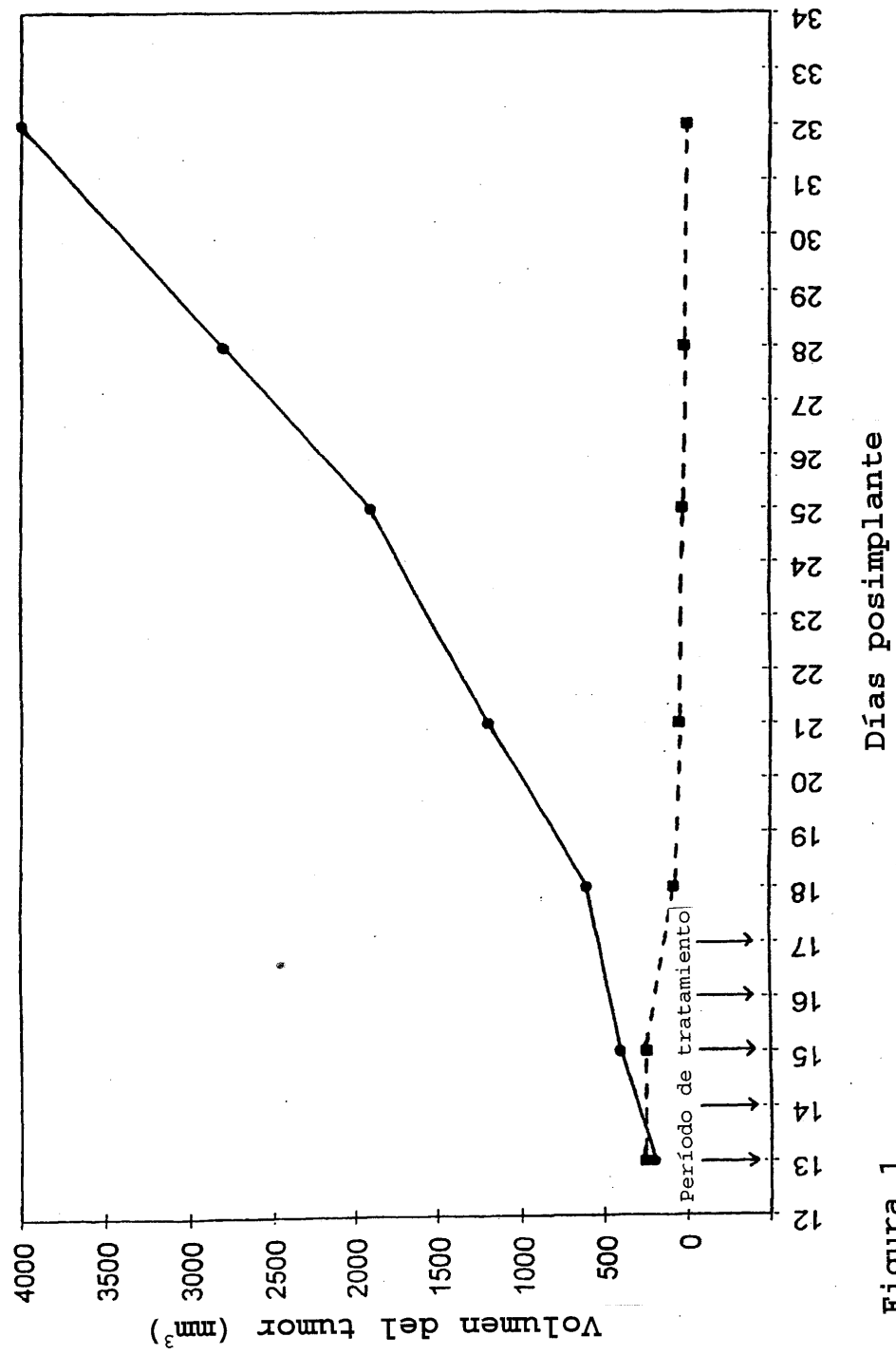


Figura 1

Tamaño del pie antes y después del tratamiento

