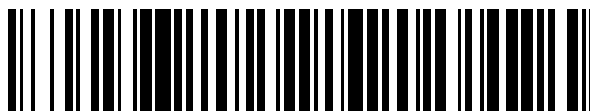


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 242**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/13** (2006.01)  
**A61K 47/20** (2006.01)  
**A61K 9/14** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)  
**A61K 9/51** (2006.01)  
**A61K 31/337** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2008 PCT/SE2008/051515**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2009 WO09078802**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2008 E 08861526 (5)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2231189**

54 Título: **Sistema de suministro de fármacos para la administración de sustancias farmacéuticamente activas poco solubles en agua**

30 Prioridad:  
**19.12.2007 WO PCT/SE2007/001127**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.01.2018**

73 Titular/es:  
**ARDENIA INVESTMENTS LTD. (100.0%)  
FIRST FLOOR 45 WELBECK STREET  
LONDON, GREATER LONDON W1G 8DZ, GB**

72 Inventor/es:  
**ALEKSOV, JULIAN y  
LOKOT, IGOR**

74 Agente/Representante:  
**ELZABURU, S.L.P**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 650 242 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

Sistema de suministro de fármacos para la administración de sustancias farmacéuticamente activas poco solubles en agua

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere a un sistema de suministro de fármacos para la administración de sustancias farmacéuticamente activas poco solubles en agua, a una composición farmacéutica que comprende dicho sistema de suministro de fármacos. También se describe un método para controlar el tamaño de partículas y/o la forma de las partículas y/o la distribución del tamaño de partículas en dicho sistema de suministro de fármacos, y a un método para aumentar la capacidad de carga de fármaco de las partículas. Además, la invención también se refiere al uso de dicho sistema de suministro de fármacos para preparar un medicamento para el tratamiento del cáncer.

**Antecedentes de la invención**

15 Hay una necesidad crítica en la industria farmacéutica y otras relacionadas de formular sustancias insolubles en agua o poco solubles en agua industrialmente útiles, en formulaciones para el suministro oral, inyectable, por inhalación, oftálmico y otras vías de suministro. Las sustancias insolubles en agua o poco solubles en agua industrialmente útiles incluyen compuestos biológicamente útiles insolubles en agua o poco solubles en agua, agentes de generación de imágenes, compuestos farmacéuticamente útiles y en particular fármacos insolubles en agua y poco solubles en agua para medicina humana y veterinaria.

20 No se impone limitación de la clase de sustancias insolubles en agua o poco solubles en agua para usar en la presente invención. Los ejemplos incluyen antipiréticos, antiinflamatorios, analgésicos, tranquilizantes, sedantes, agentes antitumorales, antimicrobianos, antibióticos, antilipémicos, antitusivos/expectorantes, relajantes musculares, antiepilépticos, antiulcerosos, antidepresivos, antialérgicos, cardiotónicos, antiarrítmicos, vasodilatadores, hipotensores/diuréticos, medicamentos para la diabetes, tuberculostáticos, antirreumáticos, esteroides, antagonistas narcóticos, hormonas, vitaminas liposolubles, anticoagulantes, medicamentos para enfermedades isquémicas, medicamentos para enfermedades inmunes, medicamentos para la enfermedad de Alzheimer, medicamentos para la osteoporosis, medicamentos para la angiopoyesis, medicamentos para la retinosis, medicamentos para la oclusión de la vena retiniana, degeneración macular disciforme senil, medicamentos para espasmos cerebrovasculares, medicamentos para trombosis cerebral, medicamentos para infarto cerebral, medicamentos para oclusión cerebral, medicamentos para hemorragia intracerebral, medicamentos para hemorragia subaracnoidea, medicamentos para encefalopatía hipertensiva, medicamentos para ataque isquémico cerebral transitorio, medicamentos para demencia multiinfarto, medicamentos para la esclerosis arterial, medicamentos para la enfermedad de Huntington, medicamentos para trastornos del tejido cerebral, medicamentos para neuropatía óptica, medicamentos para glaucoma, medicamentos para hipertensión ocular, medicamentos para desprendimiento de retina, medicamentos para artritis, fármacos antisépticos, fármacos antichoque séptico, fármacos antiasmáticos, medicamentos para incontinencia/polaquiuria, medicamentos para rinitis atópica, medicamentos para rinitis alérgica, composiciones cosméticas, composiciones agroquímicas, insecticidas, bactericidas, herbicidas, composiciones de bebidas o alimentos, inmunosupresores y composiciones de fármacos para animales.

35 El hecho de que solo puedan administrarse por vía intravenosa sustancias solubles en agua, empobrece considerablemente la variedad de moléculas orgánicas que se pueden usar como fármacos antineoplásicos, ya que muchos de ellos, si no la mayoría, son poco solubles en agua.

40 La incorporación de grupos funcionales polares en dichas sustancias no resuelve este problema porque los cambios de la estructura conducen a la pérdida de las propiedades farmacológicas relevantes de los fármacos.

El desarrollo de sistemas de suministro de fármacos que pudieran permitir la disolución de compuestos poco solubles en disoluciones acuosas sería una gran contribución a los esfuerzos de desarrollar el potencial antineoplásico de un gran número de sustancias, y proporcionaría la creación de nuevas generaciones de fármacos.

45 El paclitaxel y docetaxel pertenecen a la clase de los taxanos de fármacos antineoplásicos porque ellos o sus precursores son producidos por plantas del género *Taxus* (tejos). El paclitaxel todavía se produce por aislamiento de fuentes naturales, mientras que el docetaxel, un análogo semisintético del paclitaxel, se sintetiza a partir de la 10-desacetil-baccatina. El paclitaxel difiere del docetaxel por un grupo funcional hidroxilo acetilado en la posición 10 y un resto benzoilo en lugar de terc-butilo en la cadena lateral del fenilpropionato. El mecanismo de acción de los taxanos se basa en su capacidad para unirse a la subunidad  $\beta$  de la tubulina, lo que interfiere con la despolimerización de microtúbulos, dañando así las células que se dividen. Esta especificidad de la acción se usa ampliamente en oncología para tratar diferentes tumores sólidos, en especial el cáncer de ovario, pulmón, mama, vejiga, cabeza y cuello.

55 El paclitaxel y el docetaxel tienen poca biodisponibilidad oral y por lo tanto la infusión intravenosa (i.v.) es la única forma de administración. La escasa solubilidad en agua también hace imposible el uso de soluciones acuosas de estos taxanos. Se han aplicado varios vehículos de suministro para resolver este problema.

El Taxol® se basa en la capacidad del Cremophor® EL, un aceite de ricino polietoxilato, para disolver el paclitaxel en una relación en peso/peso (p/p) de 87:1. Cronológicamente es la primera formulación de taxano comercial que ha abierto la era del uso de taxanos en oncología. Sin embargo, más tardes se encontró que el Cremophor® es la causa de las reacciones de hipersensibilidad durante la infusión de Taxol®, y para minimizar la incidencia y gravedad de estas reacciones se convirtió en práctica estándar la premedicación con bloqueadores de histamina y glucocorticoides, así como programas de infusión continua.

En un segundo sistema de suministro llamado Taxotere®, el polisorbato 80 (conocido con la marca registrada TWEEN®80), un derivado de sorbitol y ácido oleico polietoxilado, tiene la función de vehículo. En este caso la relación en p/p es 24:1. Como el Cremophor® EL, el polisorbato 80 es un detergente no iónico formado de cadenas de polietoxi y también puede inducir reacciones de hipersensibilidad.

El Abraxane®, un tercer sistema de suministro, consiste en nanopartículas de paclitaxel estabilizadas por albúmina de suero humano en una relación en p/p 9:1, siendo el diámetro medio de las nanopartículas de 130 nm. La ausencia de tensioactivos no iónicos simplifica el tratamiento ya que no es necesaria la premedicación y el tiempo de infusión se acorta. Por otro lado, la formulación de Abraxane® es menos potente que el Taxol® porque las nanopartículas de Abraxane® como otras partículas con un tamaño de más de 100 nm, son un sustrato para el sistema reticuloendotelial. Otra desventaja de este vehículo de suministro de fármacos es que se usa albúmina de suero humana aislada de sangre de donante, lo que siempre conlleva un riesgo pequeño pero definido de transmisión de enfermedades víricas.

Finalmente, se ha encontrado que el paclitaxel y docetaxel se pueden disolver en disoluciones acuosas de derivados del ácido retinoico solubles en agua que actúan como tensioactivos aniónicos.

La singularidad de la estructura de estos derivados permite que disuelvan el paclitaxel y docetaxel en una relación sorprendentemente baja en p/p de 0,5:1.

La ixabepilona, (análogo de la epotilona B) es muy similar a los taxanos en términos de modo de acción y solubilidad en soluciones acuosas. Está indicada para el tratamiento de cáncer de mama metastásico o localmente avanzado. La formulación de ixabepilona para administración IV, Ixemptra, desarrollada por BMS, como el Taxol, se basa en Cremophor EL y por lo tanto es necesaria una premedicación e infusión prolongada para reducir las reacciones de hipersensibilidad.

El etopósido, análogo de la toxina podofilotoxina, es un inhibidor de la topoisomerasa II y se usa para el tratamiento del sarcoma de Ewing, cáncer de pulmón, cáncer testicular, linfoma y leucemia no linfocítica. Las formulaciones de etopósido para la administración IV se basan en derivados de PEG tales como polisorbato 80 (Tween 80) o Macrogol 300, con el fin de solubilizar el ingrediente farmacéutico activo apenas soluble en agua.

Los retinoides comprenden una familia de poliisoprenoides que incluye la vitamina A (retinol) y sus análogos naturales (ácido retinoico) y sintéticos (fenretinida, etretinato, tazaroteno, bexaroteno, adapaleno). Estos compuestos muestran un amplio espectro de actividad biológica, incluyendo la participación en el control de la proliferación celular, diferenciación celular y desarrollo embrionario que permite usar retinoides como agentes antineoplásicos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer tales como leucemia, linfoma, sarcoma de Kaposi, cáncer de pulmón y cáncer de mama. Estos compuestos también se usan para el tratamiento de diferentes enfermedades de la piel como la psoriasis, acné y piel dañada por el sol. Los retinoides normalmente son compuestos muy lipófilos y su uso en forma de disolución acuosa requiere la aplicación de algún sistema de suministro. Sin embargo, hasta ahora no hay ninguna formulación de retinoides soluble en agua desarrollada comercialmente y están disponibles exclusivamente para la administración oral.

La ciclosporina, sirolimus, tacrolimus y everolimus son inmunosupresores que son apenas solubles en agua. La biodisponibilidad de los fármacos en la administración oral es solo aproximadamente 20%. Las formulaciones disponibles en el comercio de estos inmunosupresores se basan solo en el uso de aceite de ricino polioxielilado, que produce reacciones de hipersensibilidad cuando se administra por vía intravenosa.

La ciclosporina es un fármaco inmunosupresor usado ampliamente después de trasplante de órgano alogénico para reducir la actividad del sistema inmunitario del paciente y por lo tanto el riesgo de rechazo de órgano. Se ha estudiado en trasplantes de piel, corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas, médula ósea e intestino delgado. La ciclosporina A aislada inicialmente en una muestra de suelo noruego, la forma principal del fármaco es un péptido cíclico no ribosómico de 11 aminoácidos (un undecapéptido) producido por el hongo *Tolypocladium inflatum Gams* y contiene D-aminoácidos, que raramente se encuentran en la naturaleza.

La búsqueda y desarrollo de nuevos sistemas de suministro de fármacos ha aumentado con la comprensión del hecho de que los fármacos en concentraciones demasiado altas son tóxicos y, en el mejor de los casos, inactivos en concentraciones demasiado bajas; sin embargo, la exposición de una célula a concentraciones demasiado bajas de fármacos a menudo activa mecanismos de resistencia al fármaco. El intervalo de concentraciones donde el fármaco produce la respuesta deseada con menos efectos secundarios se llama la "ventana terapéutica".

Se ha probado que las infusiones prolongadas reducen la toxicidad de agentes antineoplásicos, pero este modo de

administración es significativamente más complicado desde un punto de vista práctico.

Se ha encontrado que se puede lograr la liberación lenta de fármaco usando fármacos que están unidos o encapsulados en nanopartículas de diferentes tipos. Estas partículas pueden circular en la sangre durante varios días teniendo una función de "depósitos". La liberación del fármaco se produce por difusión de los fármacos encapsulados o por erosión y descomposición de las partículas. Los tipos más populares de nanopartículas en este campo de investigación son micelas y liposomas, ya que la formación de dichas nanopartículas es un proceso dirigido por la entropía bastante sencillo, es decir, surgen espontáneamente y sus propiedades se programan mediante las condiciones de la formación. El tamaño de las partículas usadas en estos sistemas de suministro está dentro del intervalo de 8 a 200 nm e incluso mayor.

5 Sin embargo, con el aumento del tamaño, una partícula se vuelve "visible" al sistema reticuloendotelial, una parte del sistema inmunitario que consiste en células fagocíticas localizadas en un tejido conjuntivo reticular de ganglios linfáticos, hígado y bazo. La extensión de la depuración del sistema reticuloendotelial aumenta con el tamaño de las partículas, reduciendo significativamente la cantidad total del fármaco en el flujo sanguíneo.

10 Otro reto fascinante en el campo del suministro de fármacos es el dirigir los fármacos para incidir en compartimentos lo que aumentaría la eficacia terapéutica a niveles superiores. Se ha encontrado que las nanopartículas son muy útiles en relación con esto. Los tumores sólidos difieren en la anatomía patológica de los tejidos sanos por una angiogénesis extensa, así como una arquitectura de la vasculatura hiperpermeable y defectuosa. En otras palabras, el tamaño de los capilares tumorales es mayor, haciendo que sea potencialmente posible aumentar el transporte pasivo de nanopartículas cargadas con carga citotóxica al tumor en comparación con un endotelio sano.

15 El documento US 2004048923 describe un grupo de retinoides que incluyen entre otros muchos la sal de sodio del éster metílico del ácido N-(todo-trans-retinoil)-L-cisteico y la sal de sodio del éster metílico del ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico. Se afirma que las sustancias permiten la fabricación de nuevas formulaciones de micelas de compuestos farmacéuticos poco solubles como el paclitaxel y docetaxel.

20 El documento WO 02092600 se refiere a un método de preparación de una formulación soluble en agua de paclitaxel, que comprende las etapas de disolver el paclitaxel en un primer disolvente, disolver un compuesto elegido entre el ácido N-(todo-trans-retinoil)-L-cisteico, ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico, ácido N-(todo-trans-retinoil)-L-homocisteico, ácido N-(13-cis-retinoil)-L-homo-cisteico, ácido N-(todo-trans-retinoil)-L-cisteinasulfínico, y ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteinasulfínico, en un segundo disolvente, mezclar las partes alícuotas de las disoluciones resultantes del paclitaxel y dicho compuesto en una relación molar deseada y evaporar la mezcla resultante hasta sequedad.

25 Aunque la poca solubilidad de los compuestos farmacéuticos puede sugerir que están en forma de partículas, ninguno de los documentos US 2004048923 y WO 02092600 dice nada relacionado con el tamaño y la morfología de las partículas. En particular no hay indicación o sugerencia de que deberían estar en estado amorfo, o incluso de que podrían existir en dicho estado. Mucho menos se describe ninguna forma de proporcionar partículas en dicho estado. Como saben bien los expertos en polimorfismo, la inclusión del posible amorfismo es básicamente impredecible para sustancias orgánicas.

30 El documento US 2004/0048923 describe formulaciones de docetaxel y paclitaxel y de sales sódicas de ésteres de ácido cisteico. Además, el documento US 2004/0048923 no describe un sistema de suministro de fármacos con una sustancia farmacéuticamente activa en forma de partículas con 90% de las partículas con un diámetro medio Z menor de 50 nm.

#### 40 **Breve resumen de la invención**

Sería muy conveniente, la creación de un nuevo sistema de suministro de fármacos con liberación del fármaco controlada o programada con antelación imitando las administraciones prolongadas.

Un objeto de la presente invención es proporcionar dicho sistema de suministro de fármacos.

45 Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a un sistema de suministro de fármacos para la administración de al menos una sustancia farmacéuticamente activa que tiene una solubilidad por sí misma en agua menor de aproximadamente 100 µg/ml, estando dicha sustancia en forma de partículas con un tamaño de partículas medio efectivo menor de 50 nm, en donde las partículas de sustancia son esencialmente amorfas; las partículas de sustancia están atrapadas en nanopartículas formadas por una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas; y la relación en peso de la sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o la combinación de las mismas, a dicha sustancia en el intervalo de 0,5:1 a 20:1.

#### 50 **Breve descripción de los dibujos**

55 La presente invención se describirá ahora con más detalle en la siguiente descripción, ejemplos y dibujos adjuntos, en los que

La figura 1 muestra la dependencia del tamaño de partículas con la relación en p/p de la sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico al paclitaxel, con diferentes concentraciones de paclitaxel en una disolución acuosa de cloruro sódico en una concentración de 9 mg/ml.

5 La figura 2 muestra la dependencia del tamaño de partículas formadas por la sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico y docetaxel (relación en p/p 1:1) en diferentes concentraciones de cloruro sódico con diferentes concentraciones de paclitaxel.

10 La figura 3 muestra la dependencia del tamaño de partículas formadas por la sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico y paclitaxel (la relación en p/p de paclitaxel:éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico es 1:2) con la concentración de cloruro de calcio en una disolución acuosa de cloruro sódico en una concentración de 9 mg/ml.

15 Las figuras 4 y 5 muestran la evolución temporal del tamaño de partículas y el potencial Z de una formulación obtenida por reconstitución de una mezcla liofilizada de paclitaxel, sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico y sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico en una relación en p/p/p 1:0,75:0,75 en una disolución acuosa de cloruro sódico (9 mg/ml), cloruro de calcio (2 mmol/l) y cloruro de magnesio (1 mmol/l).

Las figuras 6 y 7 muestran la evolución temporal del tamaño de partículas y el potencial Z de una formulación obtenida por reconstitución de una mezcla liofilizada de docetaxel y sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico en una relación en p/p 1:2 en una disolución acuosa de cloruro sódico (9 mg/ml) y cloruro de calcio (3 mmol/l)

20 La figura 8 muestra una evaluación comparativa de la citotoxicidad de las formulaciones formadas por la mezcla de docetaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil cisteico (p/p/p = 1:1:1) en cultivos de la línea celular SKOV3 de adenocarcinoma de ovario humano.

25 La figura 9 muestra una evaluación comparativa de la citotoxicidad de las formulaciones formadas por la mezcla de paclitaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico mixture (p/p/p = 1:0,75:0,75) en cultivos de la línea celular SKOV3 de adenocarcinoma de ovario humano.

30 La figura 10 muestra la dependencia del tamaño de partículas con la relación en p/p de sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico a ciclosporina A en diferentes concentraciones de ciclosporina A en una solución acuosa de cloruro sódico en una concentración de 9 mg/ml.

### Descripción de realizaciones de la invención

Debe indicarse que, como se usa en esta presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares “un”, “una” y “el”, “la” incluyen las referencias en plural salvo que el contexto dicte claramente otra cosa.

35 En esta memoria descriptiva, salvo que se exponga otra cosa, el término “aproximadamente” que modifica la cantidad de un ingrediente en los sistemas de suministro de fármacos o las composiciones de la invención o usado en los métodos de la invención, se refiere a la variación que puede ocurrir en la cantidad numérica, por ejemplo, por los procedimientos típicos de medición y manipulación de líquidos usados para preparar concentrados o usar disoluciones en el mundo real; por los errores accidentales en estos procedimientos; por diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los ingredientes usados para hacer los sistemas de suministro de fármacos o las composiciones o llevar a cabo los métodos; y similares. El término “aproximadamente” también abarca cantidades que difieren debido a las diferentes condiciones de equilibrio para una composición que resulta de una mezcla inicial particular. Estén o no modificados por el término “aproximadamente”, las reivindicaciones incluyen equivalentes a las cantidades.

45 En esta memoria descriptiva, salvo que se exponga otra cosa, la expresión “sistema de suministro de fármacos” se refiere a una formulación o dispositivo que libera agente o agentes terapéuticos en un sitio o sitios del cuerpo deseado y/o proporciona la liberación adecuada del o de los agentes terapéuticos.

50 En esta memoria descriptiva, salvo que se exponga otra cosa, la expresión “tamaño de partículas” se refiere al diámetro medio Z medido por dispersión dinámica de la luz usando láser rojo con una longitud de onda de 633 nm. Por “un tamaño de partículas medio efectivo menor de aproximadamente 100 nm” se entiende que al menos 90% de las partículas tienen un tamaño menor de aproximadamente 100 nm cuando se mide por la técnica indicada antes.

En esta memoria descriptiva, salvo que se exponga otra cosa, el término “nanopartícula” se refiere a una partícula microscópica cuyo tamaño se mide en nanómetros. Las nanopartículas de la invención típicamente están en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 999 nm de diámetro, y pueden incluir una molécula biológicamente activa atrapada, encapsulada o encerrada.

En esta memoria descriptiva, el término “solubilidad” de una sustancia se refiere a la capacidad de esa sustancia para disolverse en un disolvente específico a aproximadamente temperatura ambiente, que significa entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 38°C.

5 En esta memoria descriptiva, el término “amorfo” se pretende que indique una estructura sólida que es no cristalina o consiste en cristales muy pequeños que tienen un tamaño de partículas de aproximadamente 10 nm o menos.

En esta memoria descriptiva, salvo que se exponga otra cosa, la expresión “compuesto citotóxico” se refiere a un compuesto que tiene la capacidad de detener el crecimiento o de matar células.

10 En esta memoria descriptiva, salvo que se exponga otra cosa, la expresión “compuesto citostático” se refiere a un compuesto que tiene la capacidad de llevar a las células, aunque no necesariamente lisarlas o matarlas, a un estado no proliferativo permanente.

En esta memoria descriptiva, salvo que se exponga otra cosa, el término “inmunosupresor” se refiere a un compuesto que tiene la capacidad de inhibir la actividad del sistema inmunitario, en particular para prevenir el rechazo de un órgano trasplantado y en trastornos donde el sistema inmunitario del cuerpo ataca sus propios tejidos.

15 En esta memoria descriptiva, salvo que se exponga otra cosa, el término “derivado” se refiere a un compuesto formado a partir de la estructura original sea directamente, por reacción química de la estructura original, o por una “modificación” que es una sustitución parcial de la estructura original, o por diseño y síntesis nueva. Los derivados pueden ser sintéticos o pueden ser productos metabólicos de una célula o de una reacción enzimática in vitro.

Las partículas de sustancia en el sistema de suministro de fármacos de la invención tienen un tamaño de partículas medio efectivo menor de aproximadamente 50 nm.

20 En otra realización, las partículas de sustancia en el sistema de suministro de fármacos de la invención tienen un tamaño de partículas medio efectivo en el intervalo de aproximadamente 5-50 nm.

En otra realización más, las partículas de sustancia en el sistema de suministro de fármacos de la invención tienen un tamaño de partículas medio efectivo en el intervalo de aproximadamente 8-30 nm.

25 En una realización de la presente invención, la relación en peso/peso de la sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o la combinación de las mismas, a la sustancia farmacéuticamente activa está en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1.

30 En una realización de la presente invención, la sustancia farmacéuticamente activa es un compuesto citotóxico o citostático; en un aspecto de esta realización el compuesto citotóxico o citostático es biscloronitrosourea (carmustina); en otro aspecto de esta realización el compuesto citotóxico o citostático es etopósido, en otro aspecto más de esta realización el compuesto citotóxico o citostático es un taxano, y en un aspecto más específico el taxano se elige entre paclitaxel, docetaxel, y sus derivados. En otro aspecto específico de dicha realización, la invención se refiere a dicho sistema de suministro de fármacos para usar en el tratamiento del cáncer.

35 En una realización de la presente invención, la sustancia farmacéuticamente activa es un inmunosupresor; en un aspecto de esta realización el inmunosupresor se elige entre ciclosporina, sirolimus, tacrolimus y sus derivados. En otro aspecto de dicha realización, la invención se refiere a dichos sistema de suministro de fármacos para usar después de trasplante de órgano alogénico.

40 Otra realización de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un sistema de suministro de fármaco de este tipo. En otro aspecto de esta realización, la sustancia farmacéuticamente activa es un compuesto citotóxico o citostático; en un aspecto de esta realización el compuesto citotóxico o citostático es biscloronitrosourea (carmustina); en otro aspecto de esta realización el compuesto citotóxico o citostático es etopósido; en otro aspecto más de esta realización el compuesto es taxano, que se puede elegir entre paclitaxel, docetaxel y sus derivados; en otro aspecto de esta realización de la presente invención, la sustancia farmacéuticamente activa es un inmunosupresor; en un aspecto de esta realización el inmunosupresor se elige entre ciclosporina, sirolimus, tacrolimus y sus derivados. En un aspecto de esta realización, la composición farmacéutica se puede proporcionar en forma de una solución acuosa, un gel, una crema, una pomada, un comprimido, una cápsula o una gelatina blanda.

50 Una realización adicional de la invención se refiere al uso de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, una sal de sodio del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, en la preparación de dicho sistema de suministro de fármacos.

Otra realización más, que no está dentro del alcance de la invención, se refiere a un método para la preparación de un sistema de suministro de fármacos que comprende nanopartículas formadas por una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, y al menos una sustancia farmacéuticamente activa que tiene una solubilidad por sí

misma en agua menor de aproximadamente 100 µg/ml, en donde dicha sustancia se proporciona en forma de partículas sustancialmente amorfas con un tamaño medio de partículas efectivo menor de aproximadamente 100 nm; el tamaño de dichas nanopartículas se controla para que tengan un tamaño medio de partículas efectivo menor de aproximadamente 100 nm ajustando la relación en peso/peso de la sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, a dicha sustancia para que esté en el intervalo de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 20:1.

Una realización adicional más, que no está dentro del alcance de la invención, se refiere a un método para controlar el tamaño de partículas y/o la forma de las partículas y/o la distribución del tamaño de partículas de nanopartículas formadas por una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, y al menos una sustancia farmacéuticamente activa que tiene una solubilidad por sí misma en agua menor de aproximadamente 100 µg/ml, en un procedimiento para preparar un sistema de suministro de fármacos, en donde dicha sustancia se proporciona en forma de partículas sustancialmente amorfas con un tamaño medio de partículas efectivo menor de aproximadamente 100 nm; el tamaño de partículas y/o la forma de las partículas y/o la distribución del tamaño de partículas de dichas nanopartículas se controla ajustando la relación en peso/peso de la sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, a dicha sustancia para que esté en el intervalo de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 20:1. En un aspecto de esta realización, el tamaño de las nanopartículas se controla para que esté en el intervalo de aproximadamente 10-100 nm.

Otra realización más, que no está dentro del alcance de la invención, se refiere a un método para controlar el tamaño de partículas de nanopartículas formadas por una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, y al menos una sustancia farmacéuticamente activa que tiene una solubilidad por sí misma en agua menor de aproximadamente 100 µg/ml, en un procedimiento para preparar un sistema de suministro de fármacos, en donde dicha sustancia se proporciona en forma de partículas sustancialmente amorfas con un tamaño medio de partículas efectivo menor de aproximadamente 100 nm; dichas partículas esencialmente amorfas se presentan a y/o se producen en una disolución acuosa que contiene al menos una sal ionizada, teniendo dicha disolución acuosa una fuerza iónica I; y el tamaño de partículas de las nanopartículas se aumenta aumentando I o se disminuye disminuyendo I.

En un aspecto de esta realización, que no está dentro del alcance de la invención, la sustancia farmacéuticamente activa es un taxano, y dicha al menos una sal ionizada es cloruro sódico. Esto es útil para la producción de disoluciones para infusión i.v., ya que los iones de sodio y cloruro son los iones más abundantes en el cuerpo humano y también en los cuerpos de muchos animales.

En otro aspecto de esta realización, que no está dentro del alcance de la invención, la sal ionizada comprende cationes polivalentes, tales como por ejemplo cationes con valencia doble. Dichos cationes no solo aumentan la fuerza iónica del disolvente en general, aumentando así el tamaño de partículas, si no que también estabilizan las partículas formadas.

El uso de partículas que contienen taxano que tienen un tamaño en el intervalo de aproximadamente 10-100 nm mejora significativamente la eficacia terapéutica de estos compuestos antineoplásicos por la extensión en la circulación sanguínea de los fármacos, disminuyendo su depuración reticuloendotelial y penetración selectiva de la vasculatura defectuosa. A parte de las ventajas del uso de taxanos en forma de dichas nanopartículas in vivo, es decir, la liberación lenta del fármaco y mayor permeabilidad de la vasculatura tumoral, también se ha encontrado que la actividad de las formulaciones de taxano que contienen dichas nanopartículas es más expresado in vitro en diferentes líneas celulares de tumores sólidos. Además, la citotoxicidad de estas formulaciones depende drásticamente del tamaño de partículas.

Otra realización, que no está dentro del alcance de la invención, se refiere a un método para aumentar la capacidad de carga de fármaco de las nanopartículas formadas por una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, y al menos una sustancia farmacéuticamente activa que tiene una solubilidad por sí misma en agua menor de aproximadamente 100 µg/ml, en un procedimiento para preparar un sistema de suministro de fármacos, proporcionando dicha sustancia en forma de partículas esencialmente amorfas con un tamaño medio de partículas efectivo menor de aproximadamente 100 nm; y ajustando la relación en peso/peso de la sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, a dicha sustancia para que esté en el intervalo de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 20:1.

En cada uno de dichos métodos, que no forman parte de la invención, la sustancia farmacéuticamente activa se puede proporcionar en forma de partículas esencialmente amorfas con un tamaño medio de partículas efectivo menor de aproximadamente 100 nm, mediante un método que comprende las etapas de: disolver dicha sustancia en un disolvente orgánico adecuado para proporcionar una disolución orgánica de dicha sustancia; añadir aproximadamente 0,01-3 equivalentes molares de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-

cisteico, una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, a dicha disolución orgánica; y evaporar dicho disolvente orgánico de dicha disolución orgánica para proporcionar un residuo que comprende la sustancia farmacéuticamente activa en forma de partículas esencialmente amorfas. En una realización de este método se añaden aproximadamente 0,1-1 equivalentes molares de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, a la disolución orgánica.

El método propuesto, que no está dentro del alcance de la invención, se basa en la capacidad de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, así como de una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, para prevenir la cristalización de la sustancia farmacéuticamente activa tal como, por ejemplo, taxanos.

Durante la evaporación del disolvente orgánico la sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o la combinación de las mismas, cocrystalizan con la sustancia farmacéuticamente activa formando una película. El agua añadida a esta película disuelve la sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o la combinación de las mismas, y proporciona la sustancia farmacéuticamente activa en una forma altamente amorfa con una superficie específica enormemente aumentada.

La disolución así obtenida de partículas esencialmente amorfas de la sustancia farmacéuticamente activa se puede usar directamente sin aislar o purificar para infusiones o para la fabricación de productos liofilizados para futuras reconstituciones.

Alternativamente, las partículas esencialmente amorfas de la sustancia farmacéuticamente activa se pueden proporcionar en forma seca mediante, por ejemplo, evaporación, y después más tarde se puede disolver en una disolución acuosa que comprende aproximadamente 0,01-50 equivalentes molares de la sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o la combinación de las mismas. En una realización, dichas partículas de sustancia activa se pueden disolver en dicha disolución que comprende aproximadamente 0,1-5 equivalentes molares de la sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o la combinación de las mismas. Las partículas esencialmente amorfas se pueden disolver en una disolución de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o la combinación de las mismas, en un par de minutos.

En otra alternativa, se añade una disolución de la sustancia farmacéuticamente activa en un disolvente orgánico a una disolución acuosa de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, donde después se evapora el disolvente orgánico dejando una disolución acuosa que comprende la sustancia farmacéuticamente activa en una forma amorfa.

Este método se puede optimizar y simplificar disponiendo un flujo de entrada de una disolución orgánica de la sustancia farmacéuticamente activa en un matraz de evaporación que contiene una disolución acuosa de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, simultáneamente con evaporación.

El caudal de entrada de la disolución orgánica, la presión interna en el sistema de evaporación, así como la temperatura de evaporación se pueden elegir de forma que la concentración de la disolución orgánica no supere 15%.

El disolvente orgánico usado en el procedimiento para proporcionar la sustancia farmacéuticamente activa en la forma de partículas esencialmente amorfas puede ser un alcohol tal como, por ejemplo, metanol o etanol. El uso de metanol que tiene un punto de ebullición menor en lugar de etanol simplifica la evaporación de las mezclas de alcohol-agua.

Sin embargo, puesto que los residuos del disolvente orgánico pueden ser menos adecuados para la aplicación directa in vivo, las disoluciones orgánicas de las partículas esencialmente amorfas de la sustancia farmacéuticamente activa se pueden, por ejemplo, liofilizar para separar el disolvente orgánico, dejando las partículas esencialmente amorfas de la sustancia farmacéuticamente activa en una forma de polvo conveniente para el almacenamiento y la preparación de nuevas formulaciones.

De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención se proporciona también:

- el uso del sistema de suministro de fármacos de la invención para preparar un medicamento para el tratamiento del cáncer, y un método para el tratamiento del cáncer en donde el sistema de suministro de fármacos de la invención se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz a un paciente que necesite dicho tratamiento; y

- el uso de la composición farmacéutica de la invención para preparar un medicamento para el tratamiento del cáncer, y un método para el tratamiento del cáncer, en donde la composición farmacéutica de la invención se



administra en una cantidad terapéuticamente eficaz a un paciente que necesite dicho tratamiento;

- el uso del sistema de suministro de fármacos de la invención para preparar un medicamento para usar después de trasplante de órgano alogénico, y un método para después del trasplante de órgano alogénico en donde el sistema de suministro de fármacos de la invención se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz a un paciente que necesite dicho tratamiento; y

- el uso de la composición de la invención para preparar un medicamento para usar después de trasplante de órgano alogénico, y un método para después del trasplante de órgano alogénico, en donde la composición farmacéutica de la invención se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz a un paciente que necesite dicho tratamiento.

Las formulaciones de taxano solubles en agua obtenidas con el uso de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, son estables durante varias horas en un amplio intervalo de condiciones de formación de estas formulaciones.

Por lo tanto, la presente invención permite proporcionar disoluciones de taxanos con, por otra parte, poca solubilidad, como paclitaxel y docetaxel, para infusión sin usar ningún tensioactivo no iónico. Esto reduce significativamente la reacción de hipersensibilidad contra las disoluciones para infusión, reduce el tiempo de infusión, y obvia la necesidad de medicación previa de los pacientes contra dicha hipersensibilidad.

La invención se ilustrará con mayor detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

## Ejemplos

### Materiales y métodos

Las formulaciones de los ingredientes farmacéuticamente activos con una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, se prepararon por reconstitución de residuos recién evaporados o liofilizados de un ingrediente activo con los derivados de ácido retinoil-cisteico, mediante una disolución específica para la reconstitución.

El paclitaxel, ciclosporina A y el ácido todo-trans-retinoico se adquirieron en Sigma-Aldrich Suecia AB. El docetaxel se adquirió en ScinoPharm Taiwan, Ltd. La ixabepilona se adquirió en Chemtronica KB, Suecia. La fenretinida se sintetizó de acuerdo con un procedimiento estándar (*Cancer Research*, 39, 1339-1346, Abril 1979). El Taxol, Taxotere y Abraxane se adquirieron en farmacias y se reconstituyeron según la información prescrita por los fabricantes.

El tamaño de partículas de las formulaciones se midió usando un método de dispersión dinámica de luz con el uso de un láser rojo (633 nm). El potencial Zeta (Z) se midió por un método de dispersión de luz electroforética. Se usó Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd.) para determinar tanto el tamaño de partículas como el potencial zeta. Se calcularon los valores medio de tres mediciones independientes para la representación gráfica del tamaño de partículas y comportamiento del potencial zeta. Las barras de error Y están hechas por +/- desviación estándar de las mediciones.

Para evaluar la citotoxicidad in vitro, se adquirieron células de diferentes líneas celulares de tumores humanos de la American Type Culture Collection (Rockville, Md., EE.UU.): línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 (ATCC-HTB-26, Lote 3576799), línea celular de adenocarcinoma de ovario humano SKOV-3 (ATCC-HTB-77, Lote 3038337) y línea celular de cáncer de pulmón no microcítico A549 (ATCC-CCL-185, Lote 3244171). Las células MDA-MB-231 se propagaron en medio de cultivo MEM con L-glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 10% (FBS) y antibióticos. Las células SKOV-3 se cultivaron en medio de cultivo McCoy's 5A, complementado con L-glutamina 1,5 mM, FBS al 10% y antibióticos. Todos los medios y complementos se adquirieron en Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Mi., EE.UU.). La propagación de células de todas las líneas se llevó a cabo en matraces de cultivo BD Falcon™ de 25 o 75 cm<sup>2</sup> (Becton Dickinson Labware). Las células A549 se cultivaron en medio de cultivo F-12 de Ham con L-glutamina 1 mM, FBS al 10% y antibióticos. La propagación de células de todas las líneas se llevó a cabo en matraces de cultivo BD Falcon™ de 25 o 75 cm<sup>2</sup>.

El ensayo de citotoxicidad de fármacos se llevó a cabo usando placas de cultivo de 96 pocillos BD Falcon™ para células adherentes (Becton Dickinson Labware). Estas placas se sembraron con células con 8x10<sup>3</sup> células/pocillo para MDA-MB-231, 10x10<sup>3</sup> células/pocillo para SKOV-3 o 6x10<sup>3</sup> células/pocillo para A549 en un volumen de 200 µl/pocillo. Tanto los matraces como las placas de cultivo se incubaron para el crecimiento celular a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

Los cultivos celulares en las placas de cultivo se dejaron que se adhirieran durante 24 horas de incubación. Un día después de la siembra de células, se añadieron a los pocillos con cultivos 4 µl de disoluciones de las formulaciones a ensayar con diferentes concentraciones en disolventes adecuados (experimentos de dosis-respuesta). En los cultivos de control, se añadieron 4 µl de disolventes como control de disolvente. Las células se incubaron en 2-4 días consecutivos. Al final del periodo de incubación, las células adherentes se desprendieron por tripsinización y se

- 5 contó el número de células viables usando el ensayo con azul tripán y un hemocitómetro. Todos los experimentos se llevaron a cabo al menos tres veces y los datos se obtuvieron de una media de tres determinaciones cada una en cuatro repeticiones. Los resultados se expresan como el número de células medio  $\pm$  EE y las diferencias entre las series de control y de ensayo se evaluaron mediante la prueba t de Student. La citotoxicidad del fármaco se evaluó basándose en la extensión de la inhibición del crecimiento celular. La inhibición del crecimiento celular por los fármacos ensayados se calculó como sigue:

$$\% \text{ de Inhibición del crecimiento celular} = \frac{\text{control} - \text{series de ensayo}}{\text{control}} \times 100$$

- 10 En las series de control se añadieron 4  $\mu$ l de diferentes disolventes usados para el ensayo de fármaco a los cultivos como controles de disolvente negativos. Las diferencias entre las series de control eran insignificantes; por lo tanto, se aplicó una media de los controles negativos para los cálculos.

Se usaron disoluciones de paclitaxel y docetaxel, así como sus formulaciones comerciales, como controles positivos. Las diferencias en la inhibición del crecimiento por estos fármacos en diferentes disolventes eran insignificantes; por lo tanto, se calculó una inhibición media de los controles positivos para los cálculos.

Se calculó la  $CI_{50}$  media  $\pm$  EE basándose en al menos tres experimentos separados.

- 15 Los factores de potenciación (FP) se calcularon dividiendo la  $CI_{50}$  del fármaco de comparación de control entre la  $CI_{50}$  de la formulación de la invención.

La fuerza iónica de una disolución es una función de la concentración de todos los iones presentes en una disolución.

$$I_c = \frac{1}{2} \sum_{B=1}^n c_B z_B^2$$

- 20 donde  $c_B$  es la concentración del ion B,  $z_B$  es el número de carga de ese ion, y la suma se toma para todos los iones de la disolución.

Ejemplo 1

Preparación de paclitaxel amorfo

- 25 12 ml de disolución madre de paclitaxel en metanol ( $c=2,5$  mg/ml) y 2 ml de una disolución acuosa de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico ( $c=15$  mg/ml), se evaporaron a vacío hasta sequedad en un matraz de fondo redondo de 50 ml. Se añadieron 15 ml de metanol al matraz y el residuo se disolvió. La disolución obtenida se evaporó hasta sequedad. La película obtenida después de evaporación consistía en una mezcla de paclitaxel amorfo y una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico.

Ejemplo 2

- 30 Preparación de docetaxel amorfo

- 35 27 ml de disolución madre de docetaxel en metanol ( $c=0,5$  mg/ml) y 1 ml de una disolución acuosa de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico ( $c=15$  mg/ml), se combinaron en un matraz de fondo redondo de 100 ml. La disolución obtenida se evaporó a vacío hasta sequedad; el residuo se disolvió en 20 ml de metanol seguido de una nueva evaporación del metanol a vacío. La película obtenida después de evaporación consistía en una mezcla de docetaxel amorfo y una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico.

Ejemplo 3

Disolución de paclitaxel amorfo en una disolución micelar de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico

- 40 Se añadieron 13 ml de agua y 2 ml de una disolución acuosa de la sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico ( $c=15$  mg/ml) al matraz que contenía la película con el paclitaxel amorfo preparada en el ejemplo 1. La película de paclitaxel se disolvió completamente mediante agitación suave del vial durante 10 min. La disolución obtenida era clara y transparente. Contenía paclitaxel disuelto en una concentración de 2 mg/ml. La filtración de la disolución a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m no dio como resultado ninguna reducción de la concentración de paclitaxel.

- 45 Ejemplo 4

Disolución de docetaxel amorfo en disolución acuosa de una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-

cisteico

5 Se añadieron 24,4 ml de agua al docetaxel amorfo obtenido en el ejemplo 2, y la mezcla se agitó mediante agitador magnético durante 5 minutos. Después se añadieron 2,6 ml de una disolución acuosa de una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico (c=15 mg/ml) a la suspensión y la mezcla se agitó durante 15 min. La disolución obtenida era clara y transparente. Contenía docetaxel disuelto en una concentración de 0,5 mg/ml. La filtración de la disolución a través de un filtro de 0,2 µm no puso de manifiesto ninguna reducción de la concentración de docetaxel.

Ejemplo 5

10 Preparación de formulación acuosa de paclitaxel mediante mezclado por etapas de una disolución acuosa de una mezcla de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico y una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico y disolución de paclitaxel en metanol

15 Se añadieron gota a gota 10 ml de una disolución de paclitaxel en metanol (10 mg/ml) a un matraz de fondo redondo de 500 ml que contenía 120 ml de una disolución acuosa de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico (2,5 mg/ml) y una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico (2,5 mg/ml) mientras se agitaba mediante un agitador magnético. Después el contenido del matraz se evaporó en un rotavapor a 90 rpm y una temperatura del baño de 45°C hasta que la presión interna del sistema de vacío cerrado que consistía en el matraz, el evaporador y una bomba de vacío disminuyó a 70 mbar. Se repitió dos veces dicha adición de disolución de paclitaxel en metanol como se ha descrito antes seguido de evaporación. El volumen total de la disolución en metanol añadido era 30 ml. La disolución acuosa que quedaba después de evaporación se transfirió del matraz a una probeta de 250 ml. El matraz se lavó tres veces con 5 ml de agua y las disoluciones de lavado se vertieron en el cilindro. Se añadió agua a las disoluciones combinadas hasta lograr un volumen total de 150 ml. La disolución obtenida se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se liofilizó. La concentración de paclitaxel en la formulación obtenida era 2 mg/ml.

Ejemplo 6

25 Preparación de formulación acuosa de docetaxel mediante mezclado por etapas de una disolución acuosa de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico y disolución de paclitaxel en etanol

30 Se añadieron gota a gota 6 ml de una disolución de docetaxel (5 mg/ml) en etanol al 95% a un matraz de fondo redondo de 500 ml que contenía 100 ml de una disolución acuosa de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico (3 mg/ml) mientras se agitaba mediante un agitador magnético. La mayor parte del etanol se evaporó en un rotavapor a 90 rpm y una temperatura del baño de 55°C hasta que la presión interna del sistema de vacío cerrado que consistía en el matraz, el evaporador y una bomba de vacío disminuyó a 60 mbar. Se repitió dos veces dicha adición de disolución de docetaxel en etanol como se ha descrito antes seguido de evaporación. El volumen total de la disolución en etanol añadida era 30 ml. La disolución acuosa que quedaba después de evaporación del etanol se transfirió del matraz a una probeta de 250 ml. El matraz se lavó tres veces con 5 ml de agua y las disoluciones de lavado se vertieron en el cilindro. Se añadió agua a las disoluciones combinadas hasta lograr un volumen total de 150 ml. Después de filtración a través de un filtro de 0,2 µm la formulación se liofilizó. La concentración de docetaxel en la formulación obtenida era 1 mg/ml.

Ejemplo 7

40 Preparación de formulación acuosa de docetaxel por mezclado de una disolución acuosa de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico y una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico y disolución de docetaxel en etanol

45 Un matraz de fondo redondo de 1000 ml que contenía 150 ml de una disolución acuosa de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico (3 mg/ml) y una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico (3 mg/ml) se conectó a un rotavapor equipado con un tubo de entrada para la alimentación de disoluciones de taxanos en alcohol, de modo que el tubo de entrada no entrara en contacto con la disolución acuosa. La evaporación empezó con una temperatura del baño de 45°C y una velocidad de rotación de 100 rpm. Después de 1 min, se inició la adición gota a gota (60 gotas/min o 3 ml/min) de 80 ml de una disolución de docetaxel en metanol (5 mg/ml). Después de completarse esta adición, la evaporación se continuó durante 5 min. La disolución acuosa que quedaba después de evaporación del metanol se transfirió desde el matraz de evaporación a una probeta de 250 ml. El matraz se lavó tres veces con 10 ml de agua y las disoluciones de lavado se vertieron en la probeta. Se añadió agua a las disoluciones combinadas para lograr un volumen total de 200 ml. Después de filtración a través de un filtro de 0,2 µm la formulación se liofilizó. La concentración de docetaxel en la formulación obtenida era 2 mg/ml.

Ejemplo 8

55 Investigación de la dependencia del tamaño de partículas con la relación en p/p de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico/paclitaxel en formulaciones formadas por reconstitución de residuos recién

evaporados de una sal sódica del éster metílico del ácido n-todo-trans-retinoil-cisteico y paclitaxel con disolución acuosa de cloruro sódico en concentración de 9 mg/ml.

Tabla 1

relación en p/p de sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico/paclitaxel	Concentración de paclitaxel 0,5 mg/ml		Concentración de paclitaxel 1 mg/ml		Concentración de paclitaxel 2 mg/ml		Concentración de paclitaxel 4 mg/ml	
	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.
1,1	27,9	2,0	32,2	1,2	35,7	1,3	40,3	1,1
1,2	21,4	0,6	22,0	1,1	23,5	1,2	25,6	0,8
1,5	13,1	0,6	14,8	0,5	14,9	1,0	15,3	0,7
3,0	12,6	0,3	13,3	0,7	13,8	0,4	14,8	0,5
8,0	11,0	0,5	11,5	0,6	12,8	0,4	13,3	0,3

- 5 Como se muestra en la tabla 1 y figura 1, el tamaño de partículas disminuye con la reducción de la cantidad de paclitaxel que se carga en las micelas.

## Ejemplo 9

Investigación de la dependencia del tamaño de partículas de la formulación de docetaxel con la concentración de cloruro sódico

- 10 Las disoluciones se prepararon por reconstitución de polvo liofilizado que contenía docetaxel y una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico en la relación en p/p 1:1.

Tabla 2

Concentración de NaCl, mg/ml	Concentración de docetaxel 0,5 mg/ml		Concentración de docetaxel 1 mg/ml		Concentración de docetaxel 2 mg/ml		Concentración de docetaxel 4 mg/ml	
	Tamaño medio, nm	Desv. est.	Tamaño medio, nm	Desv. est.	Tamaño medio, nm	Desv. est.	Tamaño medio, nm	Desv. est.
4	7,2	0,7	6,7	0,6	6,4	0,4	5,9	2,5
8	7,8	0,7	8,2	0,7	9,3	1,4	12,7	1,4
12	12,1	1,0	13,4	0,9	14,6	1,0	40,0	4,9
16	17,0	2,3	29,0	4,2	51,3	3,7	82,7	3,7
20	22,4	1,8	39,3	2,8	72,3	3,7	107,7	6,2
24	28,3	4,6	86,0	4,2	108,3	7,5	144,3	9,9

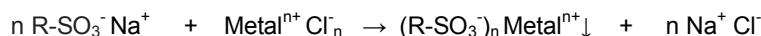
- 15 Como se muestra en la tabla 2 y la figura 2, el aumento en la concentración de cloruro sódico, es decir, la fuerza iónica, hace a las partículas más grandes.

Las partículas con un tamaño medio mayor de 50 nm no forman parte de la invención.

## Ejemplo 10

Transformación de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico en su sal de calcio.

- 20 Se mezclaron disoluciones acuosas de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico (5 ml, 15 mg/ml) y cloruro de calcio (3 ml, 30 mg/ml) en un tubo de ensayo de 10 ml. Durante la mezcla surgió un precipitado fino. El precipitado se separó por centrifugación del tubo de ensayo a 3000 rpm durante 10 min. Se separó el líquido sobrenadante y el precipitado se agitó con 8 ml de agua seguido de una nueva centrifugación. Después de tres procedimientos de lavado adicionales como se ha descrito antes, el líquido sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,2 µm con el fin de separar posibles agregados grandes del producto. La solubilidad de la sal de calcio del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico se correspondía con su concentración en la disolución filtrada y era igual a 0,2 mg/ml medida por el método de UV descrito antes. La reacción se ilustra mediante el siguiente esquema general a continuación que implica cloruros de cualesquiera iones metálicos polivalentes, no solo iones de calcio.
- 25



Sal sódica soluble en agua del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico o éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico

Sal insoluble en agua del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico o éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico

Ejemplo 11

5 Investigación de la dependencia del tamaño de partículas de la formulación de paclitaxel con la concentración de cloruro de calcio

Las disoluciones se prepararon por reconstitución de polvo liofilizado que contenía paclitaxel, una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico y una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico en la relación en p/p/p 1:1:1. Los disolventes para la reconstitución se prepararon disolviendo las cantidades adecuadas de cloruro calcio dihidrato en una disolución acuosa de cloruro sódico con una concentración de 9 mg/ml.

10 Tabla 3

Concentración de CaCl <sub>2</sub> , mmol/l	Concentración de paclitaxel 0,5 mg/ml		Concentración de paclitaxel 1 mg/ml		Concentración de paclitaxel 2 mg/ml	
	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.
0	12,7	0,4	16,3	1,1	22,1	0,2
2	23,8	1,7	24,6	0,5	27,3	0,2
4	27,4	0,2	30,1	0,4	32,0	0,1
6	51,0	0,6	55,2	5,1	58,6	1,6

Como se muestra en la tabla 3 y figura 3, el tamaño de las partículas en las formulaciones aumenta casi de forma lineal con el aumento de concentración de CaCl<sub>2</sub>.

Las partículas con un tamaño medio mayor de 50 nm no forman parte de la invención.

15 Ejemplo 12

Evolución temporal del tamaño de partículas y el potencial Z de la formulación obtenida por reconstitución de la mezcla liofilizada de paclitaxel, una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico y una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico en una relación en p/p/p de 1:0,75:0,75 en disolución acuosa de cloruro sódico (9 mg/ml), cloruro de calcio (2 mmol/l) y cloruro de magnesio (1 mmol/l)

20 Tabla 4

tiempo después de reconstitución	Concentración de paclitaxel 0,5 mg/ml		Concentración de paclitaxel 1 mg/ml		Concentración de paclitaxel 2 mg/ml	
	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.
0	22,1	0,5	23,5	0,5	25,6	0,8
1	22,7	0,7	24,1	0,8	26,3	0,7
2	23,1	0,5	24,3	0,4	26,2	0,5
4	23	0,4	24,4	0,3	26,6	0,2
8	23,4	0,7	24,0	0,6	27,0	0,4

Tabla 5

Tiempo después de reconstitución	Concentración de paclitaxel 0,5 mg/ml		Concentración de paclitaxel 1 mg/ml		Concentración de paclitaxel 2 mg/ml	
	Potencial zeta, mV	Desv. est.	Potencial zeta, mV	Desv. est.	Potencial zeta, mV	Desv. est.
0	-24,5	1,3	-28,7	1,2	-29,9	1,1
1	-26,3	1,8	-30,1	1,0	-32,7	0,8
2	-25,2	0,4	-30,4	1,0	-30,6	0,5
4	-27,0	0,5	-29,6	0,6	-31,2	0,3
8	-27,1	0,4	-30,4	0,3	-32,4	0,6

Las tablas 4 y 5 y las figuras 4 y 5 muestran que no hay ningún cambio significativo en los valores del tamaño de partículas, así como en el potencial zeta durante el almacenamiento de la formulación durante 8 horas.

## Ejemplo 13

- 5 Evolución temporal del tamaño de partículas y el potencial Z de la formulación obtenida por reconstitución de la mezcla liofilizada de docetaxel y una sal sódica del éster metílico del ácido n-todo-trans-retinoil-cisteico en una relación en p/p de 1:2 en disolución acuosa de cloruro sódico (9 mg/ml) y cloruro de calcio (3 mmol/l)

Tabla 6

Tiempo después de reconstitución	Concentración de docetaxel 0,5 mg/ml		Concentración de docetaxel 1 mg/ml		Concentración de docetaxel 2 mg/ml	
	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.
0	11,9	0,3	12,6	0,2	13,1	0,4
1	12,3	0,3	13,2	0,4	13,4	0,2
2	12,4	0,2	13,0	0,2	13,7	0,4
4	12,2	0,4	12,9	0,1	13,4	0,2
8	12,5	0,3	13,2	0,2	13,8	0,2

Tabla 7

Tiempo después de reconstitución	Concentración de paclitaxel 0,5 mg/ml		Concentración de paclitaxel 1 mg/ml		Concentración de paclitaxel 2 mg/ml	
	Potencial zeta, mV	Desv. est.	Potencial zeta, mV	Desv. est.	Potencial zeta, mV	Desv. est.
0	-22,2	2,1	-22,6	1,3	-22,8	0,6
1	-23,4	0,9	-22,4	1,2	-24,1	0,8
2	-22,7	0,4	-23,7	0,9	-23,3	0,4
4	-21,9	0,3	-23,1	0,8	-23,1	0,2
8	-21,7	0,6	-23,4	0,6	-23,5	0,5

10

Las tablas 6 y 7 y las figuras 6 y 7 muestran que no hay ningún cambio significativo en los valores del tamaño de partículas, así como en el potencial zeta, durante el almacenamiento de la formulación durante 8 horas.

## Ejemplo 14

## Preparación de ciclosporina A amorfa

- 15 50 ml de una disolución madre de ciclosporina A en metanol (c=1,0 mg/ml) y 4,2 ml de una disolución acuosa de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico (c=12 mg/ml) se evaporaron a vacío hasta sequedad en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Se añadieron 15 ml de metanol al matraz y el residuo se disolvió. La disolución obtenida se evaporó hasta sequedad. La película obtenida después de la evaporación consistía en una mezcla de ciclosporina A amorfa y una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico.
- 20

## Ejemplo 15

Disolución de ciclosporina A amorfa en disolución micelar de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico

- 25 Se añadieron 45,8 ml de agua y 4,2 ml de una disolución acuosa de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico (c=12 mg/ml) al matraz que contenía la película de ciclosporina A amorfa preparada en el ejemplo nº 14. La película de ciclosporina A se disolvió completamente por agitación suave del vial durante 10 min. La disolución obtenida era clara y transparente. Contenía la ciclosporina A en una concentración de 1 mg/ml. La filtración de la disolución a través de un filtro de 0,2 µm no dio como resultado ninguna reducción de la concentración de ciclosporina A.

## 30 Ejemplo 16

Investigación de la dependencia del tamaño de partículas con la relación en p/p de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico/ciclosporina A en formulaciones formadas por la reconstitución de residuos recién evaporados de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico y ciclosporina A con disolución acuosa de cloruro sódico en concentración de 9 mg/ml.

Tabla 8

relación en p/p de sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans- retinoil- cisteico/ciclosporina A	Concentración de ciclosporina A 0,5 mg/ml		Concentración de ciclosporina A 1 mg/ml		Concentración de ciclosporina A 2 mg/ml		Concentración de ciclosporina A 4 mg/ml	
	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.	Tamaño medio de partículas, nm	Desv. est.
1,3	57,3	1,6	63,2	2,2	69,7	2,0	78,0	3,6
1,4	42,2	1,8	46,9	1,8	50,8	1,8	58,8	2,7
1,6	28,6	1,4	30,9	1,7	32,3	1,1	37,8	2,5
2,0	20,2	1,2	22,1	1,1	25,5	0,6	25,9	0,9
8,0	10,4	0,8	11,5	0,4	11,9	0,5	12,9	0,5

Como se muestra en la tabla 8 y figura 10, el tamaño de partículas disminuye con la reducción de la cantidad de ciclosporina A que se carga en las micelas

- 5 Las partículas con un tamaño medio mayor de 50 nm no forman parte de la invención.

Evaluación biológica - Ejemplos 17 - 21

- 10 Los experimentos in vitro mostraron que la actividad de las formulaciones de taxano en diferentes líneas celulares de tumores sólidos se manifiesta más por el uso de nanopartículas como proporciona la presente invención. Además, la citotoxicidad de estas formulaciones depende enormemente del tamaño de las nanopartículas. El mayor tamaño de las nanopartículas en el sistema de suministro de fármacos de la invención conduce a un menor transporte de taxanos en una célula, lo cual a su vez produce una reducción de la citotoxicidad.

- 15 La mayor actividad se observó cuando el tamaño era entre 25 y 13 nm para las disoluciones de paclitaxel y docetaxel, respectivamente: los experimentos in vitro dieron factores de potenciación para estas formulaciones de 41,7 y 31,7, respectivamente el día 3 de exposición. La muestra de control en este experimento contenía taxanos en disoluciones en etanol (sin ninguna nanopartícula).

Otras comparaciones in vitro de formulaciones de taxanos de acuerdo con la invención con formulaciones de taxanos disponibles en el mercado, mostraron que las formulaciones de acuerdo con la invención tienen mayor actividad citotóxica contra diferentes líneas de cultivo de células malignas, como el adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma de ovario y cáncer de pulmón no microcítico.

- 20 Ejemplo 17

Evaluación comparativa de la citotoxicidad de las formulaciones formadas por la mezcla de docetaxel - sal sódica del éster metílico del ácido n-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico (p/p/p = 1:1:1) en cultivos de la línea celular SKOV3 de adenocarcinoma de ovario humano

- 25 El polvo liofilizado que consistía en docetaxel, una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico y una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, se disolvió en etanol al 70% o en disolución de cloruro sódico (9 mg/ml) que contenía una cantidad adecuada de cloruro de calcio. Se tomaron muestras de las disoluciones obtenidas y se usaron para la medición del tamaño medio de partículas.

Tabla 9

Disolvente	Concentración de CaCl <sub>2</sub> , mmol/l	Tamaño de partículas, nm	Día 3 Cl <sub>50</sub>	FP* día 3	Día 4 Cl <sub>50</sub>	FP* día 4	Día 5 Cl <sub>50</sub>	FP* día 5
EtOH al 70% disolución de NaCl	-	-	2,0·10 <sup>-7</sup>	-	7,2·10 <sup>-9</sup>	-	7,6·10 <sup>-10</sup>	-
	0	11,3	1,2·10 <sup>-7</sup>	1,7	7,2·10 <sup>-9</sup>	1	6,5·10 <sup>-10</sup>	1,2
disolución de NaCl	1	12,2	3,4·10 <sup>-8</sup>	5,9	5,6·10 <sup>-9</sup>	1,3	4,2·10 <sup>-10</sup>	1,8
disolución de NaCl	2	13,1	6,3·10 <sup>-9</sup>	31,7	2,1·10 <sup>-9</sup>	3,4	9,4·10 <sup>-11</sup>	8,1
disolución de NaCl	3	14,6	2,0·10 <sup>-8</sup>	10	3,4·10 <sup>-9</sup>	2,1	1,4·10 <sup>-10</sup>	5,4

\* La formulación con etanol se usó como control positivo para calcular el FP

- 30 La tabla 9 y figura 8 muestran que la formulación que contenía 2 mmol/l de calcio es la más activa. Después con el aumento y disminución de la concentración de calcio se reduce la citotoxicidad de la formulación.

Ejemplo 18

Evaluación comparativa de la citotoxicidad de las formulaciones formadas por mezcla de paclitaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico (p/p/p = 1:0,75:0,75) en cultivos de la línea celular SKOV3 de adenocarcinoma de ovario humano

- 5 El polvo liofilizado que consistía en paclitaxel, una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico y una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, se disolvió en etanol al 70% o en disolución de cloruro sódico (9 mg/ml) que contenía una cantidad adecuada de cloruro de calcio. Se tomaron muestras de las disoluciones obtenidas y se usaron para la medición del tamaño medio de partículas.

Tabla 10

Disolvente	Concentración de CaCl <sub>2</sub> , mmol/l	Tamaño de partículas, nm	Día 3 Cl <sub>50</sub>	FP* día 3	Día 4 Cl <sub>50</sub>	FP* día 4	Día 5 Cl <sub>50</sub>	FP* día 5
70% EtOH	-	-	5,0·10 <sup>-6</sup>	-	2,1·10 <sup>-7</sup>	-	6,8·10 <sup>-8</sup>	-
disolución de NaCl	0	17	3,0·10 <sup>-6</sup>	1,7	1,3·10 <sup>-7</sup>	1,6	5,5·10 <sup>-8</sup>	1,2
disolución de NaCl	1	19	1,7·10 <sup>-6</sup>	2,9	8,4·10 <sup>-8</sup>	2,5	9,8·10 <sup>-9</sup>	6,9
disolución de NaCl	2	25	1,2·10 <sup>-7</sup>	41,7	2,3·10 <sup>-8</sup>	9,1	7,2·10 <sup>-10</sup>	94,0
disolución de NaCl	3	29	2,4·10 <sup>-7</sup>	20,8	4,3·10 <sup>-8</sup>	4,9	1,2·10 <sup>-8</sup>	5,7

- 10 \* La formulación con etanol se usó como control positivo para calcular el FP

La tabla 10 y figura 9 muestran que la formulación que contenía 2 mmol/l de calcio es la más activa. Después con el aumento y disminución de la concentración de calcio se reduce la citotoxicidad de las formulaciones.

Ejemplo 19

- 15 Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de "paclitaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico (p/p/p 1:0,75:0,75)" con Taxol®, Abraxane® y paclitaxel solo en cultivos de la línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano.

- 20 La formulación del título se preparó disolviendo polvo liofilizado en una disolución acuosa que contenía cloruro sódico (6 mg/ml), cloruro potásico (0,3 mg/ml), cloruro de calcio hexahidrato (0,4 mg/ml), lactato sódico (3,1 mg/ml). El paclitaxel se usó en una disolución en metanol. Las muestras de Taxol® y Abraxane® se prepararon de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes por dilución de un concentrado de Taxol® (6 mg/ml) disponible en el mercado, en disolución de cloruro sódico (9 mg/ml) y por reconstitución de paclitaxel unido a albúmina liofilizado con disolución de cloruro sódico (9 mg/ml) a una concentración de paclitaxel de 5 mg/ml. Todas las muestras se usaron en el espacio de 1 hora después de la preparación. Los efectos de potenciación se calcularon respecto a la disolución de paclitaxel en metanol. Los resultados se exponen en la tabla 11 a continuación.

25 Tabla 11

Formulación	Tamaño de partículas, nm	Cl <sub>50</sub> día 3	FP día 3	Cl <sub>50</sub> día 4	FP día 4
Paclitaxel	-	(3,80 ± 0,15) × 10 <sup>-8</sup>	-	(3,4 ± 0,12) × 10 <sup>-8</sup>	-
Taxol®	-	(2,04 ± 0,05) × 10 <sup>-8</sup>	1,9	(2,0 ± 0,10) × 10 <sup>-8</sup>	1,7
Abraxane®	130	(4,2 ± 0,09) × 10 <sup>-8</sup>	0,9	(3,4 ± 0,16) × 10 <sup>-8</sup>	1
Paclitaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico	24	(4,2 ± 0,14) × 10 <sup>-9</sup>	4,9	(3,2 ± 0,09) × 10 <sup>-9</sup>	10,6

Ejemplo 20

- 30 Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de "docetaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico (p/p/p 1:0,5:0,5)" con Taxotere®, y docetaxel solo en cultivos de la línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano.

La formulación del título se preparó disolviendo polvo liofilizado en una disolución acuosa que contenía cloruro sódico (6 mg/ml), cloruro potásico (0,3 mg/ml), cloruro de calcio hexahidrato (0,4 mg/ml), lactato sódico (3,1 mg/ml). El docetaxel se usó en una disolución en metanol. La muestra de Taxotere® se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante por dilución de un concentrado disponible en el mercado (40 mg/ml) primero con



disolución de etanol a la concentración de 10 mg/ml seguido por la dilución adicional en disolución de cloruro sódico (9 mg/ml). Todas las muestras se usaron en el espacio de 1 hora después de la preparación. Los efectos de potenciación se calcularon respecto a la disolución de docetaxel en metanol. Los resultados se exponen en la tabla 12 a continuación.

5 Tabla 12

Formulación	Tamaño de partículas, nm	CI <sub>50</sub> día 3	FP día 3	CI <sub>50</sub> día 4	FP día 4
Docetaxel	-	$(1,25 \pm 0,11) \times 10^{-8}$	-	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-8}$	-
Taxotere®	-	$(1,08 \pm 0,09) \times 10^{-8}$	1,2	$(9,60 \pm 0,18) \times 10^{-9}$	1,0
Docetaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico	12	$(3,1 \pm 0,1) \times 10^{-9}$	4,0	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-9}$	8,3

## Ejemplo 21

10 Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de "paclitaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico (p/p/p 1:0,75:0,75)" con Taxol®, Abraxane® y paclitaxel solo en cultivos de la línea celular SKOV-3 de adenocarcinoma de ovario humano.

15 La formulación del título se preparó disolviendo polvo liofilizado en una disolución acuosa que contenía cloruro sódico (6 mg/ml), cloruro potásico (0,3 mg/ml), cloruro de calcio hexahidrato (0,4 mg/ml), lactato sódico (3,1 mg/ml). El paclitaxel se usó en una disolución en metanol. Las muestras de Taxol® y Abraxane® se prepararon de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes por dilución de un concentrado de Taxol® (6 mg/ml) disponible en el mercado, en disolución de cloruro sódico (9 mg/ml) y por reconstitución de paclitaxel unido a albúmina liofilizado con disolución de cloruro sódico (9 mg/ml) a una concentración de paclitaxel de 5 mg/ml. Todas las muestras se usaron en el espacio de 1 hora después de la preparación. Los efectos de potenciación se calcularon respecto a la disolución de paclitaxel en metanol. Los resultados se exponen en la tabla 13 a continuación.

Tabla 13

Formulación	Tamaño de partículas, nm	CI <sub>50</sub> día 3	FP día 3	CI <sub>50</sub> día 4	FP día 4
Paclitaxel	-	$(5,94 \pm 0,21) \times 10^{-7}$	-	$(6,22 \pm 0,18) \times 10^{-8}$	-
Taxol®	-	$(3,24 \pm 0,16) \times 10^{-7}$	1,8	$(4,20 \pm 0,25) \times 10^{-8}$	1,5
Abraxane®	130	$(6,3 \pm 0,32) \times 10^{-7}$	0,94	$(6,5 \pm 0,30) \times 10^{-8}$	0,96
Paclitaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico	24	$(2,05 \pm 0,08) \times 10^{-7}$	2,3	$(2,17 \pm 0,15) \times 10^{-8}$	2,9

20

## Ejemplo 22

Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de "docetaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico (p/p/p 1:0,5:0,5)" con Taxotere®, y docetaxel solo en cultivos de la línea celular SKOV-3 de adenocarcinoma de ovario humano.

25 La formulación del título se preparó disolviendo polvo liofilizado en una disolución acuosa que contenía cloruro sódico (6 mg/ml), cloruro potásico (0,3 mg/ml), cloruro de calcio hexahidrato (0,4 mg/ml), lactato sódico (3,1 mg/ml). El docetaxel se usó en una disolución en metanol. La muestra de Taxotere® se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante por dilución de un concentrado disponible en el mercado (40 mg/ml) primero con disolución en etanol a la concentración de 10 mg/ml seguido por la dilución adicional en disolución de cloruro sódico (9 mg/ml). Todas las muestras se usaron en el espacio de 1 hora después de la preparación. Los efectos de potenciación se calcularon respecto a la disolución de docetaxel en metanol. Los resultados se exponen en la tabla 14 a continuación.

30

Tabla 14

Formulación	Tamaño de partículas, nm	Cl <sub>50</sub> día 3	FP día 3	Cl <sub>50</sub> día 4	FP día 4
Docetaxel	-	$(9,07 \pm 0,38) \times 10^{-8}$	-	$(2,85 \pm 0,26) \times 10^{-8}$	-
Taxotere <sup>®</sup>	-	$(1,18 \pm 0,09) \times 10^{-7}$	0,8	$(2,03 \pm 0,15) \times 10^{-8}$	1,4
Docetaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico	12	$(3,24 \pm 0,18) \times 10^{-8}$	2,8	$(2,86 \pm 0,13) \times 10^{-9}$	10,0

## Ejemplo 23

5 Evaluación de la toxicidad de la formulación de "paclitaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico (p/p/p 1:0,75:0,75)" con Taxol<sup>®</sup>, Abraxane<sup>®</sup> y paclitaxel solo en cultivos de la línea celular A549 de cáncer de pulmón no microcítico humano.

10 La formulación del título se preparó disolviendo polvo liofilizado en una disolución acuosa que contenía cloruro sódico (6 mg/ml), cloruro potásico (0,3 mg/ml), cloruro de calcio hexahidrato (0,4 mg/ml), lactato sódico (3,1 mg/ml). El paclitaxel se usó en una disolución en metanol. Las muestras de Taxol<sup>®</sup> y Abraxane<sup>®</sup> se prepararon de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes por dilución de un concentrado de Taxol<sup>®</sup> (6 mg/ml) disponible en el mercado, en disolución de cloruro sódico (9 mg/ml) y por reconstitución de paclitaxel unido a albúmina liofilizado con disolución de cloruro sódico (9 mg/ml) a una concentración de paclitaxel de 5 mg/ml. Todas las muestras se usaron en el espacio de 1 hora después de la preparación. Los efectos de potenciación se calcularon respecto a la disolución de paclitaxel en metanol. Los resultados se exponen en la tabla 15 a continuación.

15 Tabla 15

Formulación	Tamaño de partículas, nm	Cl <sub>50</sub> día 3	FP día 3	Cl <sub>50</sub> día 4	FP día 4
Paclitaxel	-	$(8,02 \pm 0,11) \times 10^{-9}$	-	$(5,28 \pm 0,13) \times 10^{-9}$	-
Taxol <sup>®</sup>	-	$(6,49 \pm 0,08) \times 10^{-9}$	1,2	$(3,77 \pm 0,09) \times 10^{-9}$	1,4
Abraxane <sup>®</sup>	130	$(1,2 \pm 0,06) \times 10^{-8}$	0,67	$(5,2 \pm 0,15) \times 10^{-9}$	1
Paclitaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico	24	$(1,61 \pm 0,11) \times 10^{-9}$	5,0	$(7,02 \pm 0,12) \times 10^{-10}$	7,5

## Ejemplo 24

20 Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de "docetaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico (p/p/p 1:0,5:0,5)" con Taxotere<sup>®</sup>, y docetaxel solo en cultivos de la línea celular A549 de cáncer de pulmón no microcítico humano.

25 La formulación del título se preparó disolviendo polvo liofilizado en una disolución acuosa que contenía cloruro sódico (6 mg/ml), cloruro potásico (0,3 mg/ml), cloruro de calcio hexahidrato (0,4 mg/ml), lactato sódico (3,1 mg/ml). El docetaxel se usó en una disolución en metanol. La muestra de Taxotere<sup>®</sup> se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante por dilución de un concentrado disponible en el mercado (40 mg/ml) primero con disolución en etanol a la concentración de 10 mg/ml seguido por la dilución adicional en disolución de cloruro sódico (9 mg/ml). Todas las muestras se usaron en el espacio de 1 hora después de la preparación. Los efectos de potenciación se calcularon respecto a la disolución de docetaxel en metanol. Los resultados se exponen en la tabla 16 a continuación.

Tabla 16

Formulación	Tamaño de partículas, nm	Cl <sub>50</sub> día 3	FP día 3	Cl <sub>50</sub> día 4	FP día 4
Docetaxel	-	$(5,76 \pm 0,26) \times 10^{-9}$	-	$(4,97 \pm 0,27) \times 10^{-9}$	-
Taxotere <sup>®</sup>	-	$(4,81 \pm 0,34) \times 10^{-9}$	1,2	$(4,63 \pm 0,17) \times 10^{-9}$	1,1
Docetaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico	12	$(9,14 \pm 0,47) \times 10^{-10}$	6,3	$(5,35 \pm 0,15) \times 10^{-10}$	7,9

30

Ejemplo 25: Estudio de toxicidad de un mes de la formulación de "paclitaxel - sal sódica del éster metílico del ácido

N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico (p/p/p 1:0,75:075)" en ratas

La formulación ensayada se preparó por reconstitución en disolución salina de mezcla liofilizada de paclitaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico (p/p/p 1:0,75:075). 80 ratas Wistar (BRLHan:Wist@Mol (GALAS)), 40 machos y 40 hembras, se dividieron en 4 grupos, cada uno de 10 machos y 10 hembras. Las formulaciones ensayadas se administraron por inyección intravenosa una vez por semana a lo largo de 5 semanas. El grupo 1 recibió disolución salina y actuaba como controles, el grupo 2 recibió 5 mg/kg de formulación de paclitaxel con aceite de ricino polioxielilado (Taxol®), el grupo 3 recibió 5 mg/kg de la formulación del título, y el grupo 4 recibió 10 mg/kg de la formulación del título. Originalmente, el estudio se diseñó de modo que el grupo 2 recibiría 10 mg/kg de Taxol® como una comparación directa con el grupo 4, sin embargo, debido a la mortalidad, esta dosificación se redujo a 5 mg/kg de modo que era más adecuada una comparación directa con el grupo 3. Hubo 8 muertes durante el estudio. Siete ratas que recibieron 10 mg/kg de Taxol® murieron poco después de su primera dosis. Cinco de esas ratas se sustituyeron por reservas, y la dosis se redujo a 5 mg/kg. Para las hembras en los grupos 2, 3 y 4 los valores medios para los parámetros de glóbulos rojos (Hb, RBC y HT) eran menores que para los controles. Aunque no se vio un cambio similar en los machos, los valores del índice MCV de los glóbulos rojos en machos del grupo 2 eran elevados. Los valores medios para los glóbulos blancos, en particular neutrófilos, linfocitos, eosinófilos y en los machos los monocitos, en los animales tratados eran menores que para los controles. Los valores medios de la bilirrubina sérica para los machos en el grupo 4 y hembras en el grupo 2 y 4 eran mayores que para los controles. La bilirrubina para las hembras en el grupo 2 (Taxol®) era significativamente más alta que para las hembras en el grupo 3. El peso del hígado en machos de los grupos 2 y 4 era significativamente menor que para los controles. El peso del timo para machos y hembras en el grupo 4 y para machos en el grupo 2 era significativamente menor que para el control. Se registró una incidencia relativamente alta de atrofia linfoide de mínima a pequeña en el bazo, los ganglios linfáticos mesentéricos y mandibulares del grupo 4. Se registró una incidencia baja de atrofia linfoide de mínima a pequeña en el bazo de los grupos 2 y 3. La incidencia de la atrofia linfoide del bazo era ligeramente mayor en los machos del grupo 2. Se registró una incidencia baja de atrofia linfoide de mínima a pequeña en los ganglios linfáticos mesentéricos y mandibulares del grupo 2. Se registró aumento de mínimo a pequeño de linfocitosis cortical en todos los machos del grupo 2. En la glándula mamaria de los machos de los grupos 2 y 4, se registró mayor incidencia de disminución multifocal mínima de vacuolas secretoras/hipoplasia de alveolos comparado con el control y el grupo 3. Se registró mayor incidencia de figuras mitóticas/cuerpos apoptóticos en el revestimiento epitelial de la glándula mamaria en aproximadamente la mitad de los machos de todos los grupos tratados.

Este ejemplo demuestra que la formulación de nanopartículas de "paclitaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico (p/p/p 1:0,75:075)" tiene una menor toxicidad comparada con concentraciones idénticas de formulación convencional de paclitaxel con aceite de ricino polioxielilado.

Ejemplo 26

Ventajas de la formulación de nanopartículas de "paclitaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico" comparado con la formulación convencional de paclitaxel con aceite de ricino polioxielilado (Taxol®). Los principales resultados y conclusiones se resumen en la siguiente tabla 17.

Tabla 17. Comparación de las formulaciones de paclitaxel (resultados y ajuste de la formulación del título de acuerdo con un estudio de tratamiento de 34 pacientes con enfermedad de tumor maligno sódico histológicamente probado, para los que no estaba disponible o había fallado la terapia convencional; información sobre Taxol® de acuerdo con BMS PI Rev Julio 2007)

	Paclitaxel - sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico - sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico	Paclitaxel - aceite de ricino polioxielilado
Nivel de dosis/m <sup>2</sup>	250	175
Premedicación con esteroides, antieméticos y antihistaminas	Ninguna	Si
Anafilaxis y reacciones de hipersensibilidad graves	Ninguna (sin premedicación)	5% (todos los pacientes recibieron premedicación)
Tiempo de infusión	1 hora	3 horas

Aunque la invención se ha descrito con respecto a algunas realizaciones, que incluyen el mejor modo que conocen actualmente los autores de la invención, debe entenderse que se pueden hacer diferentes cambios y modificaciones como será obvio para un experto en la técnica, sin salirse del alcance de la invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un sistema de suministro de fármacos para la administración de al menos una sustancia farmacéuticamente activa que tiene una solubilidad por sí misma en agua menor de 100 µg/ml a 15-38°C, estando dicha sustancia en forma de partículas con al menos 90% de las partículas con un diámetro medio Z menor que 50 nm cuando se mide por dispersión dinámica de la luz usando láser rojo con una longitud de onda de 633 nm, caracterizado porque
- las partículas de sustancia son no cristalinas o consisten en cristales que tienen un tamaño de partículas de 10 nm o menos;
- 10 - las partículas de sustancia están atrapadas en nanopartículas formadas por una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas; y
- la relación en peso/peso de dicha sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, a dicha sustancia está en el intervalo de 0,5:1 a 20:1.
- 15 2.- Un sistema de suministro de fármacos según la reivindicación 1, caracterizado porque la relación en peso/peso de dicha sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, a dicha sustancia está en el intervalo de 1:1 a 10:1.
- 3.- Un sistema de suministro de fármacos según cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque dicha sustancia es un compuesto citotóxico o citostático.
- 20 4.- Un sistema de suministro de fármacos según la reivindicación 3, caracterizado porque dicho compuesto citotóxico o citostático es un taxano.
- 5.- Un sistema de suministro de fármacos según la reivindicación 4, caracterizado porque dicho taxano se elige entre paclitaxel y docetaxel.
- 6.- Un sistema de suministro de fármacos según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, para usar en el tratamiento del cáncer.
- 25 7.- Un sistema de suministro de fármacos según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizado porque dicha sustancia es un inmunosupresor.
- 8.- Un sistema de suministro de fármacos según la reivindicación 7, caracterizado porque dicho inmunosupresor se elige entre ciclosporina, sirolimus y tacrolimus.
- 30 9.- Un sistema de suministro de fármacos según una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, para usar después de trasplante de órgano alogénico.
- 10.- Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y el sistema de suministro de fármacos según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, 7 y 8.
- 35 11.- Uso de una sal sódica del éster metílico del ácido N-todo-trans-retinoil-cisteico, una sal sódica del éster metílico del ácido N-13-cis-retinoil-cisteico, o una combinación de las mismas, en la preparación de un sistema de suministro de fármacos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, 7 y 8.
- 12.- Uso de un sistema de suministro de fármacos según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 40 13.- Uso de un sistema de suministro de fármacos según una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, para la preparación de un medicamento para usar después de trasplante de órgano.

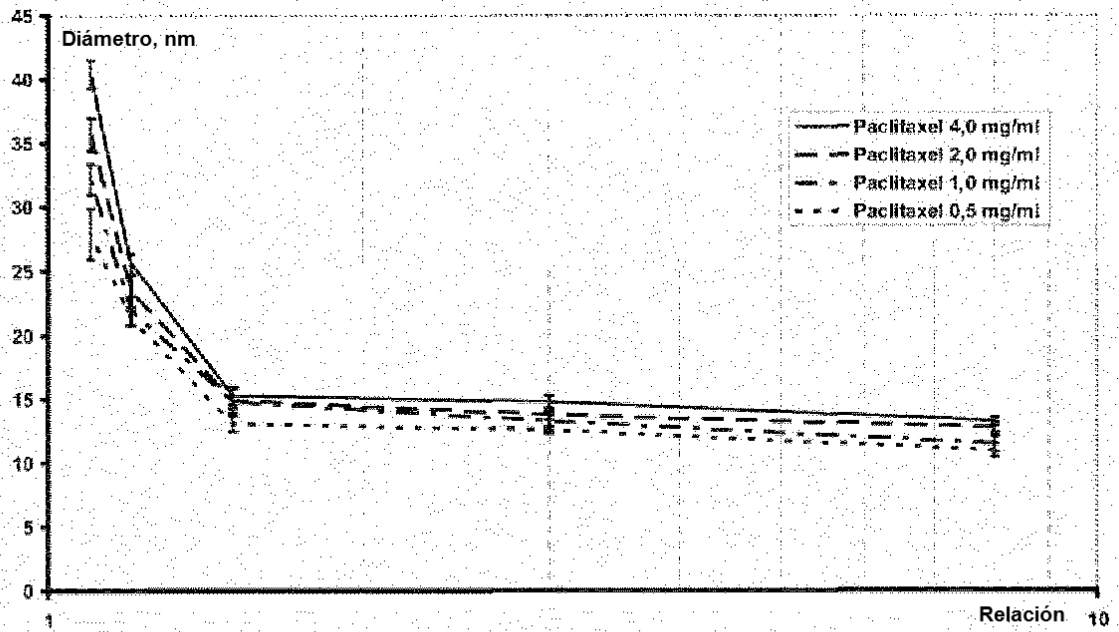


Fig. 1

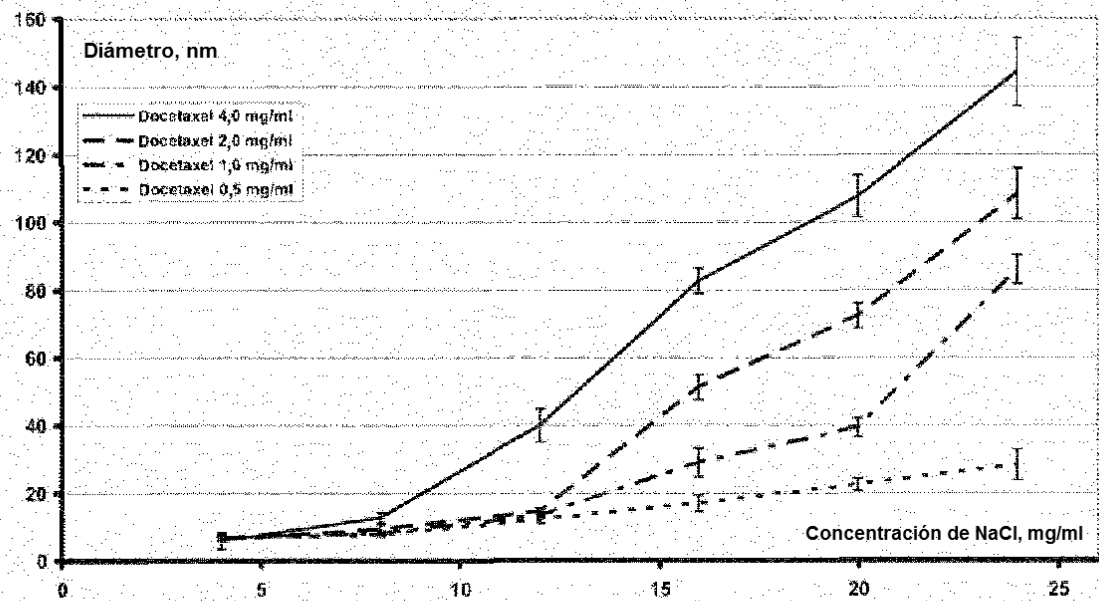


Fig. 2

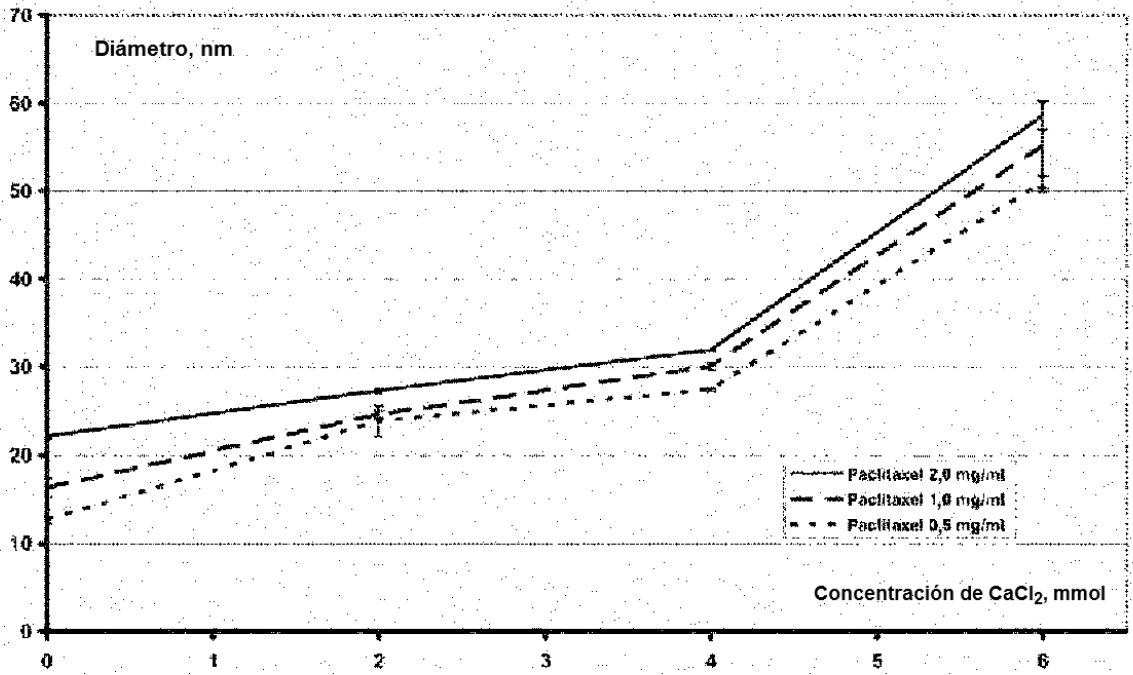


Fig. 3

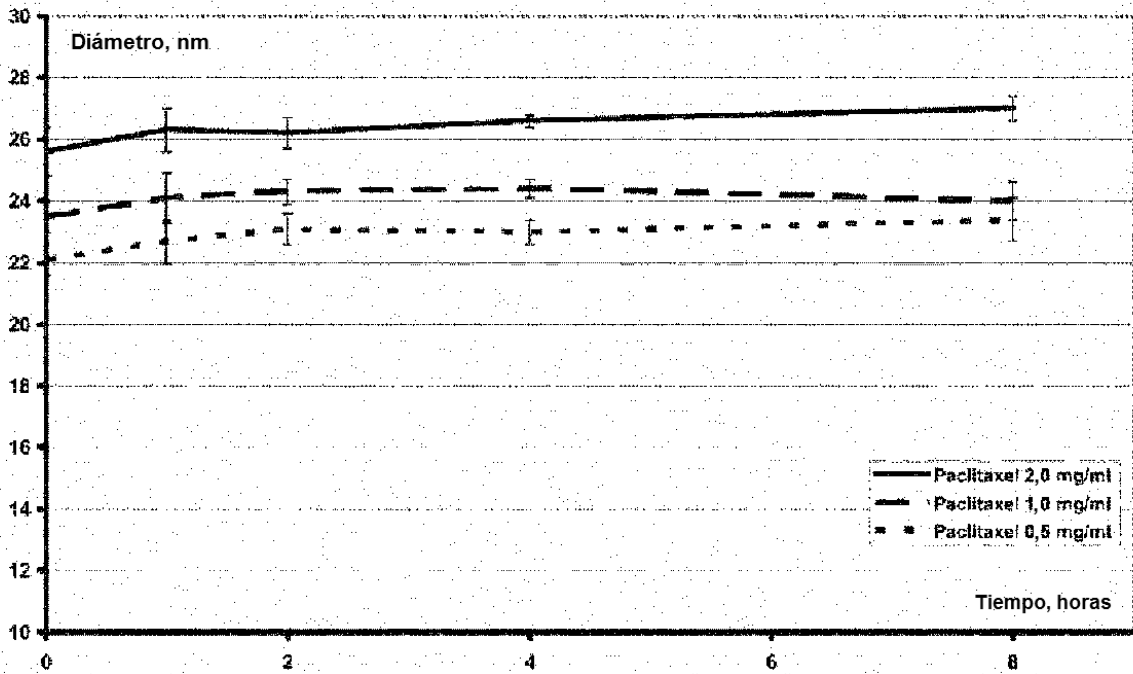


Fig. 4

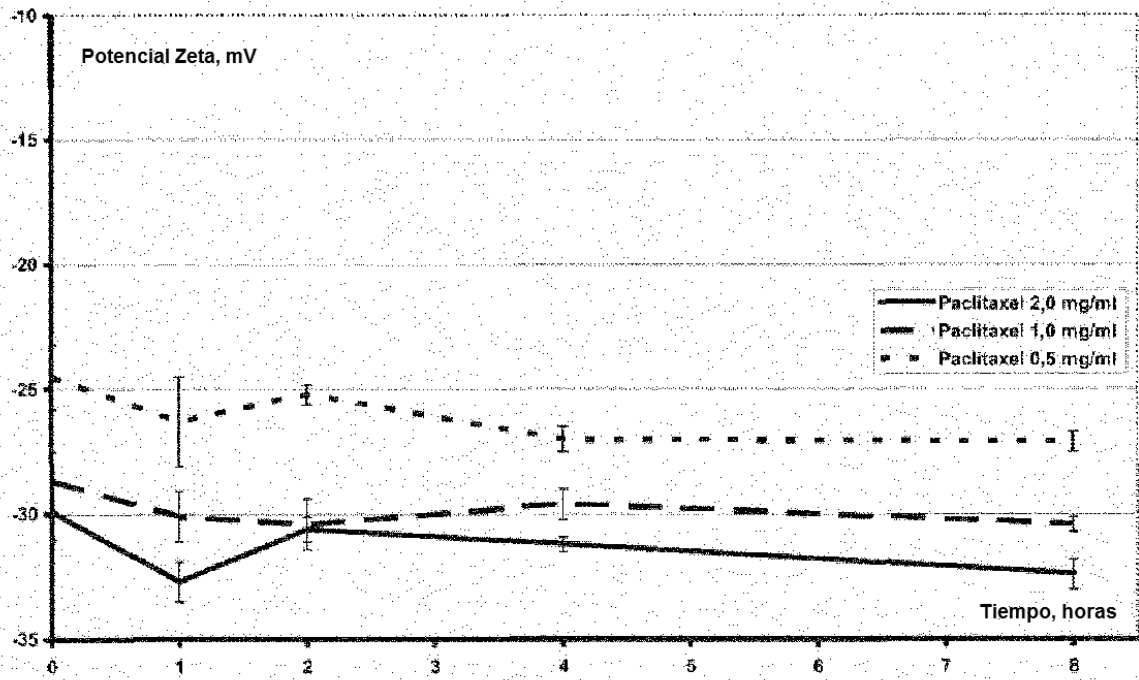


Fig. 5

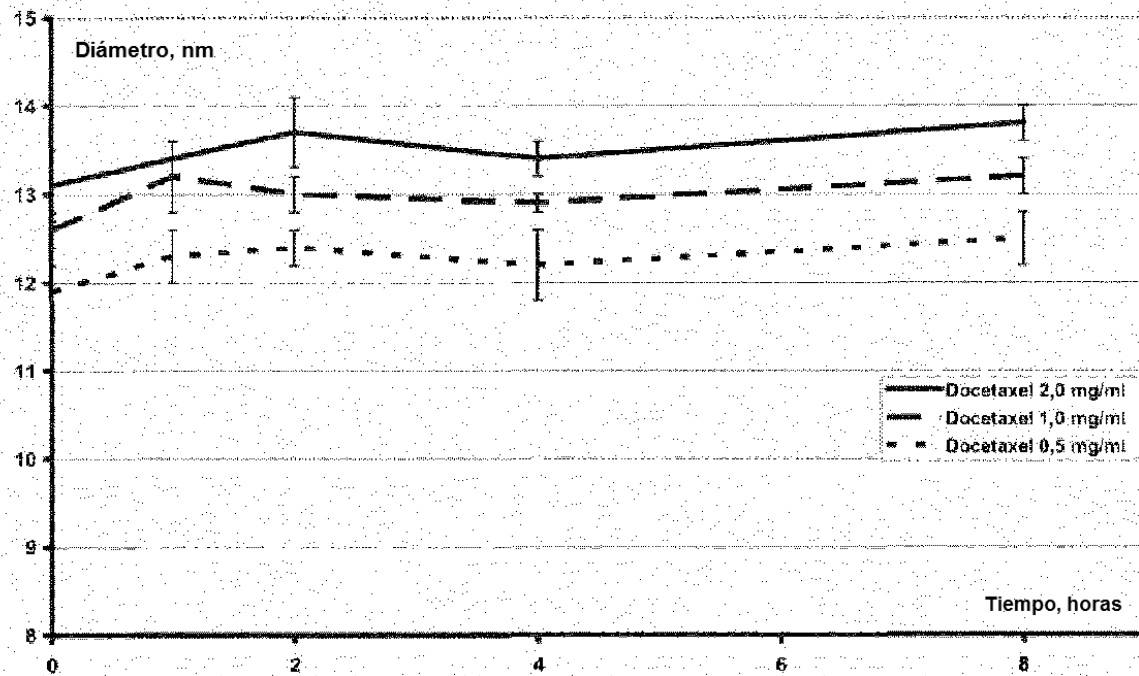


Fig. 6

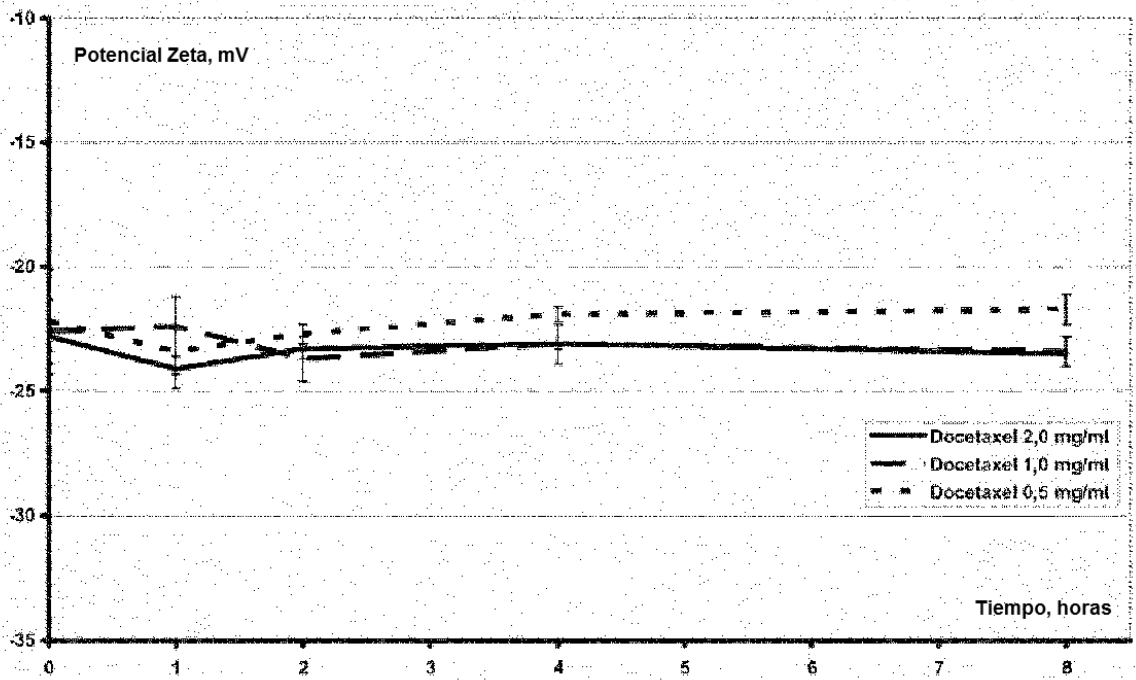


Fig. 7

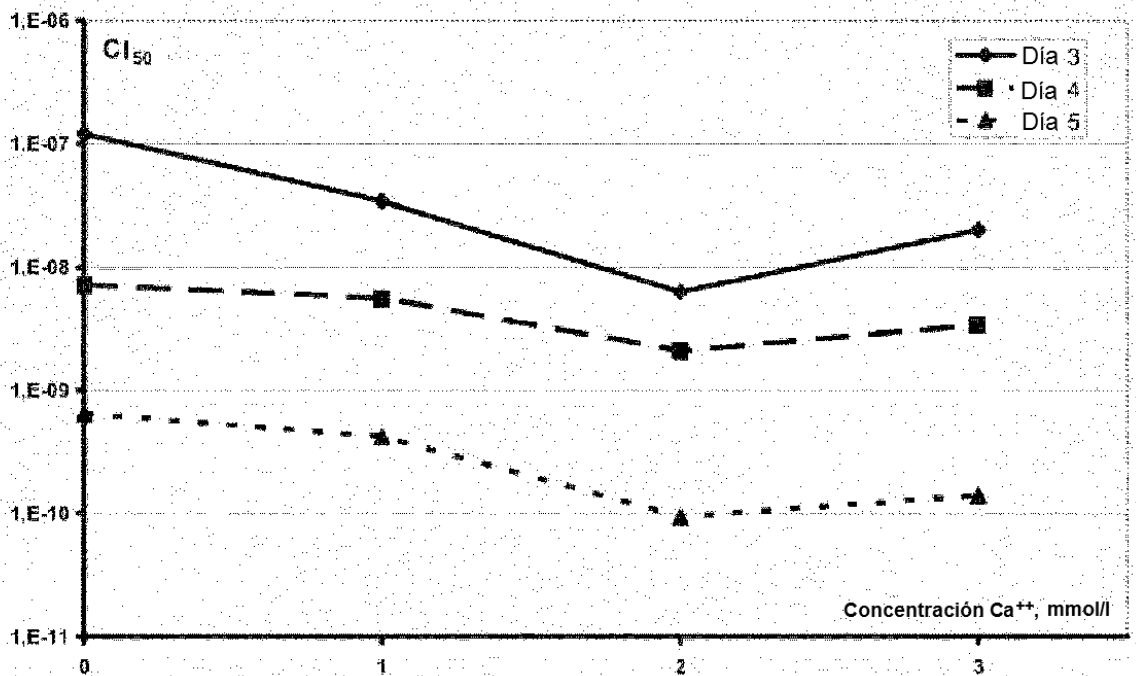


Fig. 8



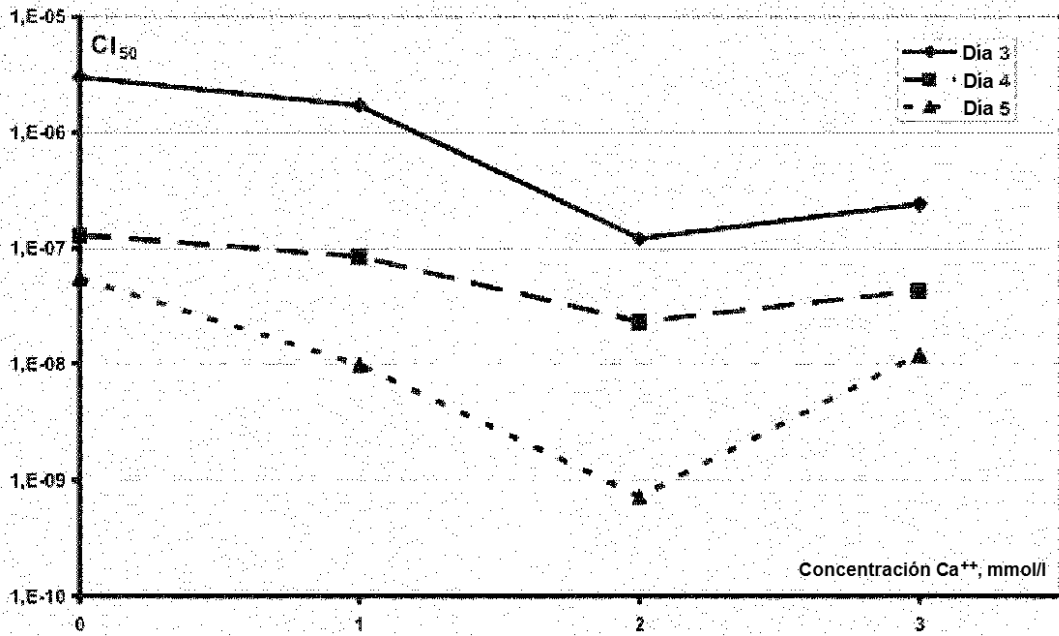


Fig. 9

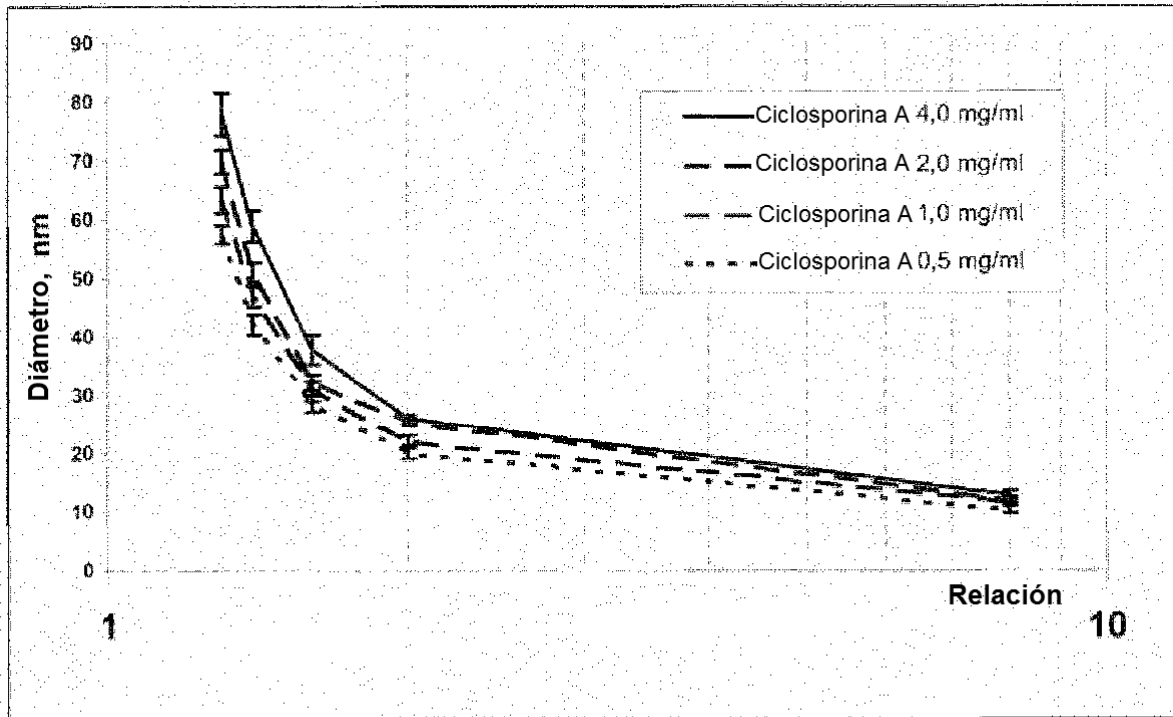


Fig. 10