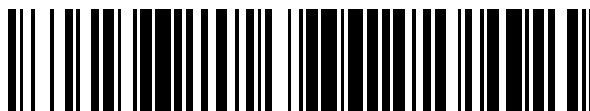


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 995**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 47/60 (2007.01)

A61K 31/5025 (2006.01)

A61K 47/69 (2007.01)

A61K 9/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014** **PCT/US2014/023922**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014** **WO14164957**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014** **E 14722412 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018** **EP 2968153**

54 Título: **Formulaciones de nanopartículas y macropartículas**

30 Prioridad:

12.03.2013 US 201361776964 P

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

04.06.2018

73 Titular/es:

CEPHALON, INC. (100.0%)
41 Moores Road P.O. Box 4011
Frazer, PA 19355, US

72 Inventor/es:

BROWN, PETER, D. y
DRAGER, ANTHONY, S.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 670 995 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).

Formulaciones de nanopartículas y macropartículas**Descripción**

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se dirige a partículas preparadas mediante la polimerización de al menos un tensioactivo y un compuesto que contiene isocianato. Las composiciones farmacéuticas preparadas usando estas partículas también se describen.

10

ANTECEDENTES

[0002] Las nanopartículas y macropartículas, incluidas las nanocápsulas, se han investigado como vehículos para la administración de fármacos. Sin embargo, todavía se necesita el desarrollo de nuevas partículas que puedan proteger eficazmente a los agentes terapéuticos contra la degradación prematura para aumentar la biodisponibilidad.

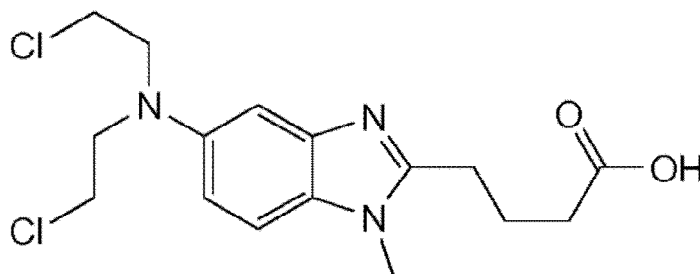
15

[0003] La bendamustina, ácido 4-{5-[bis(2-cloroetilo)amino]-1-metilo-2-bencimidazolilo}butírico tiene la siguiente fórmula:

20

25

30



35

[0004] El hidrocloreto de bendamustina se sintetizó inicialmente en 1963 en la República Democrática Alemana (RDA) y estuvo disponible desde 1971 hasta 1992 bajo el nombre comercial Cytostasan®. Véase, por ejemplo, W. Ozegowski y D. Krebs, IMET 3393 cloruro de ©-[1-metilo-5-bis-(β-cloroetilo)-aminobenzimidazolo-(2)]-butirilo, un nuevo agente citostático del grupo de bencimidazol mostazas de nitrógeno. Zbl. Pharm. 110, (1971) Heft 10, 1013 - 1019, que describe la síntesis de monohidrato de hidrocloreto de bendamustina. Desde entonces, se ha comercializado en Alemania con el nombre comercial Ribomustin®. La bendamustina es un agente alquilante que ha demostrado tener utilidad terapéutica en el tratamiento de enfermedades como la leucemia linfocítica crónica, la enfermedad de Hodgkin, el linfoma no Hodgkin, el mieloma múltiple y el cáncer de mama. El hidrocloreto de bendamustina se comercializa en los Estados Unidos con el nombre comercial Treanda®.

40

[0005] Aunque la bendamustina ha demostrado eficacia, se sabe que es inestable, especialmente en soluciones acuosas, lo que conduce a dificultades técnicas en su preparación y administración. Como resultado, el hidrocloreto de bendamustina solo se ha comercializado como una preparación liofilizada que se reconstituye inmediatamente antes de la infusión. Además, debido a esta inestabilidad en un entorno acuoso, el fármaco tiene una vida media relativamente corta, lo que limita la idoneidad de las formulaciones actuales para tratar ciertos tipos de tumores sólidos. Debido a las limitaciones asociadas con las formulaciones actualmente disponibles, la expansión del uso terapéutico de bendamustina ha sido limitada. Se necesitan nuevas formulaciones de bendamustina.

45

50 RESUMEN

[0006] La presente invención se dirige a métodos para preparar partículas que contienen base libre de bendamustina que comprenden formar una emulsión mezclando una fase continua que comprende un disolvente orgánico, una fase dispersa que comprende una solución acuosa de una sal de bendamustina farmacéuticamente aceptable, y al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico; tratar la emulsión con una cantidad de base suficiente para convertir la sal farmacéuticamente aceptable de bendamustina en base libre de bendamustina; tratar la emulsión con un compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato; dejar tiempo suficiente para que el compuesto que contiene isocianato se polimerice con el al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico en la interfaz de alcohol agua-polihídrico para formar las partículas que contienen base libre de bendamustina; y opcionalmente aislar las partículas.

55

60

[0007] La invención también se refiere a métodos para preparar partículas que comprenden la formación de una emulsión que comprende una fase continua que comprende un disolvente orgánico, una fase acuosa dispersa y al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico; tratar la emulsión con un compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato; permitir tiempo suficiente para que el compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato se polimerice con el al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico en la interfaz de fase acuosa-alcohol

65

polihídrico para formar las partículas; y opcionalmente aislar las partículas.

[0008] Se describen también partículas, que incluyen nanocápsulas, preparadas según estos métodos, así como composiciones farmacéuticas que incluyen las partículas de la descripción. Los métodos para usar estas partículas también se describen.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0009]

La Figura 1 representa una imagen de microscopía electrónica de una realización de partículas que contienen base libre de bendamustina de la descripción.

La Figura 2 representa una imagen de microscopía electrónica de una realización de partículas que contienen base libre de bendamustina de la descripción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES ILUSTRATIVAS

[0010] La presente invención se dirige a métodos de preparación de partículas. En los métodos preferidos de la invención, las partículas son partículas que contienen base libre de bendamustina, preferiblemente, nanopartículas que contienen base libre de bendamustina.

[0011] Dentro del alcance de la invención, las "partículas" pueden ser nanopartículas o macropartículas. Las "nanopartículas" se entienden en la técnica que tienen un diámetro medio de entre aproximadamente 10 nm y 1.000 nm. Preferiblemente, las partículas tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 300 nm, aproximadamente de 60 nm a aproximadamente 600 nm, de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 800 nm, o de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 600 nm. Se entiende que las macropartículas formadas de acuerdo con la invención en la técnica tienen un diámetro promedio de más de 0,2 mm y hasta 100 mm o hasta 1000 mm. Los métodos adecuados para la determinación del tamaño de partícula incluyen métodos de dispersión dinámica de la luz (DLS) o microscopía electrónica de transmisión (MET).

[0012] También dentro del alcance de la invención, las partículas que son "nanopartículas" pueden ser nanocápsulas. Las "nanocápsulas" tienen generalmente forma esférica con una cubierta polimérica continua y un espacio interno adecuado para encapsular agentes terapéuticos. Se entiende que las nanocápsulas en la técnica tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 10 nm y 1.000 nm. Preferiblemente, las nanocápsulas tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 300 nm, aproximadamente de 60 nm a aproximadamente 600 nm, de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 800 nm, o de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 600 nm.

[0013] "Agentes terapéuticos", como se usa en la presente invención, se refiere a cualquier compuesto útil para fines terapéuticos o de diagnóstico. Los agentes terapéuticos que pueden usarse en la presente invención incluyen cualquier agente soluble en agua, tal como, por ejemplo, péptidos, enzimas, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros, polinucleótidos, compuestos farmacéuticos, incluidas sales farmacéuticamente aceptables de compuestos farmacéuticos.. Un agente terapéutico particularmente preferido es la bendamustina.

[0014] La descripción incluye nanocápsulas que comprenden una cubierta polimérica y un núcleo que contiene una base libre de bendamustina. Preferiblemente, estas nanocápsulas tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 1.000 nm. Alternativamente, estas nanocápsulas tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 60 nm y aproximadamente 600 nm.

[0015] Las partículas de la divulgación se preparan formando una emulsión. Las "emulsiones" se entienden en la técnica como una mezcla de líquidos que normalmente son inmiscibles. Mezclando manual o mecánicamente, estos líquidos normalmente inmiscibles forman una fase dispersa dentro de un medio de dispersión (o "fase continua"). Con emulsiones de aceite en agua, el "aceite" generalmente es la fase dispersa, "gotita" y el agua (o una solución acuosa) es el medio de dispersión. Con las emulsiones de agua en aceite, la fase acuosa que contiene agua se convierte en la fase dispersa de "gota" dentro de una fase continua del "aceite" u otro disolvente inmiscible en agua usado como medio de dispersión. El tamaño de las gotitas dentro de la emulsión puede diseñarse para que sea más grande o más pequeño dependiendo de factores conocidos en la técnica, por ejemplo, el tipo de mezcla, la velocidad de mezcla, el tiempo de mezcla, las propiedades del aceite, la relación de aceite a agua, etc.

[0016] Las emulsiones dentro del alcance de la invención pueden ser nanoemulsiones o macroemulsiones. Las nanoemulsiones tienen un diámetro medio de gotita para la fase dispersa que varía de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1.000 nm. Otras nanoemulsiones preferidas tienen diámetros de gota promedio de entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 300 nm, aproximadamente de 60 nm a aproximadamente 600 nm, de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 800 nm, o de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 600 nm. Las macroemulsiones tienen un diámetro medio de gota mayor de aproximadamente 1 mm, hasta aproximadamente 100 mm. Los métodos adecuados para determinar el tamaño de las gotitas incluyen métodos de dispersión dinámica

de la luz (DLS) o microscopía electrónica de transmisión (MET).

[0017] Las emulsiones de la descripción se forman mezclando una fase continua que comprende un disolvente orgánico, una fase acuosa dispersa y al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico. La fase acuosa preferiblemente incluye agua y un agente terapéutico soluble en agua, tal como, por ejemplo, un péptido o proteína, o un polinucleótido. El agente terapéutico también puede ser un compuesto de fármaco de molécula pequeña. Las sales farmacéuticamente aceptables de agentes terapéuticos también se pueden usar dentro del alcance de la invención.

[0018] En realizaciones preferidas de la divulgación, la emulsión se forma mezclando una fase continua que comprende un disolvente orgánico, una fase dispersa que comprende una solución acuosa de una sal farmacéuticamente aceptable de bendamustina, por ejemplo, hidrocloreto de bendamustina, y al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico.

[0019] Los "disolventes orgánicos" para uso en la invención son aquellos disolventes orgánicos con miscibilidad limitada en agua, es decir, que tienen una solubilidad de menos de 9 g/100 mL en agua. Los disolventes orgánicos preferidos para uso en la invención incluyen alcanos C5-10 (pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano y similares, así como mezclas de los mismos), acetato de etilo, diclorometano, éter dietílico y similares, siendo particularmente preferidos los alcanos C5-10. Hexano es un disolvente orgánico ejemplar para uso en la invención.

[0020] Dentro del alcance de la invención, se incluyen tensioactivos de alcohol polihídrico para ayudar a estabilizar la emulsión. Los "tensioactivos de alcoholes polihidroxiados" para uso en la invención incluyen una pluralidad de restos -OH, al menos algunos de los cuales son capaces de reaccionar con un resto isocianato para formar un grupo O-C(O)-NH-. Los tensioactivos de alcoholes polihidroxiados son conocidos en la técnica e incluyen ésteres de sorbitán, por ejemplo, tensioactivos basados en polisorbato que son derivados de polioxietileno de monolaurato de sorbitán. Los ejemplos de tales tensioactivos de alcoholes polihidroxiados incluyen Tween 20™ y Tween 80™. Otros ejemplos de ésteres de sorbitán incluyen tensioactivos derivados de sorbitán polietoxilado y ácido oleico, tales como Span 20™.

[0021] En aquellas realizaciones de la invención que comprenden una forma de sal farmacéuticamente aceptable de un agente terapéutico, la emulsión se puede tratar con una cantidad de base o una cantidad de ácido suficiente para convertir la forma de sal farmacéuticamente aceptable del agente terapéutico en la forma de ácido libre o base libre del agente terapéutico. Las bases adecuadas incluyen a base de amina tal como amoníaco o una alquilamina. Las alquilaminas preferidas incluyen amina dietilo y hexadecilamina de N,N-dimetilo. Los ácidos preferidos incluyen ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido acético, ácido fosfórico y similares.

[0022] En realizaciones preferidas de la invención, las emulsiones se forman mezclando una fase continua que comprende un disolvente orgánico, una fase dispersa que comprende una solución acuosa de una sal farmacéuticamente aceptable de bendamustina y al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico. La emulsión se trata a continuación con una cantidad de base suficiente para convertir la sal de bendamustina farmacéuticamente aceptable en base libre de bendamustina. La base es preferiblemente una base de amina tal como amoníaco o una alquilamina, siendo particularmente preferida la N,N-dimetilhexadecilamina. Se cree que convirtiendo la forma de sal de bendamustina en base libre de bendamustina, que es mucho menos soluble en agua, una porción significativa de la base libre se precipita fuera de la solución acuosa, mientras que se retiene en las "gotitas" dispersas, por lo tanto minimizando el grado en que la bendamustina se degrada por contacto con la solución acuosa.

[0023] De acuerdo con la invención, las emulsiones de la invención se tratan con un compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato (-N=C=O). Aunque los compuestos que incluyen una pluralidad de restos de isocianato, por ejemplo, más de 20 restos de isocianato, están dentro del alcance de la invención, los compuestos preferidos para uso en la invención tienen entre dos y diez restos de isocianato. Las realizaciones ejemplares de la invención incluyen compuestos que tienen dos o cuatro restos de isocianato, siendo particularmente preferidos los compuestos de diisocianato (es decir, compuestos que tienen dos restos de isocianato). Los compuestos que contienen al menos dos restos de isocianato son conocidos y/o están disponibles comercialmente. En la mayoría de las realizaciones preferidas de la invención, el compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato es un alquildisocianato, por ejemplo, diisocianato de 1,6-hexilo.

[0024] El tratamiento de la emulsión con el compuesto que contiene isocianato da como resultado la polimerización de los grupos isocianato con al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico. La polimerización se produce mediante la reacción de al menos algunos de los restos -OH del al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico con al menos algunos de los grupos isocianato del compuesto que contiene isocianato para formar enlaces -O-C(O)-NH-. Dentro del alcance de la invención, los compuestos tensioactivos de alcohol polihidroxiado son los únicos monómeros en la emulsión disponibles para la polimerización con el contenido de isocianato. Como tal, los polímeros resultantes se forman solo a partir del compuesto que contiene isocianato y el al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico. Estos polímeros resultantes forman las partículas de la divulgación, que pueden incluir o no agentes terapéuticos. Preferiblemente, estos polímeros resultantes forman las cubiertas poliméricas de las nanocápsulas de la divulgación.

[0025] La polimerización del compuesto que contiene isocianato y el al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico se produce en la interfaz agua-alcohol polihídrico para formar las partículas de la divulgación. La polimerización puede incluir reticulación, es decir, unión de una cadena de polímero a otra. El grado de polimerización puede calcularse usando la ecuación de Carother, que se entiende por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Cowie J.M.G. "Polymers: Chemistry & Physics of Modern Materials" (2ª edición, Blackie 1991), p.29; Rudin Alfred "The Elements of Polymer Science and Engineering", Academic Press 1982, p.117; Allcock Harry R., Lampe Frederick W. y Mark James E. "Contemporary Polymer Chemistry" (3ª edición, Pearson 2003) p.324; Carothers, Wallace (1936). "Polymers and polyfunctionality". Transaction of the Faraday Society 32: 39-49.

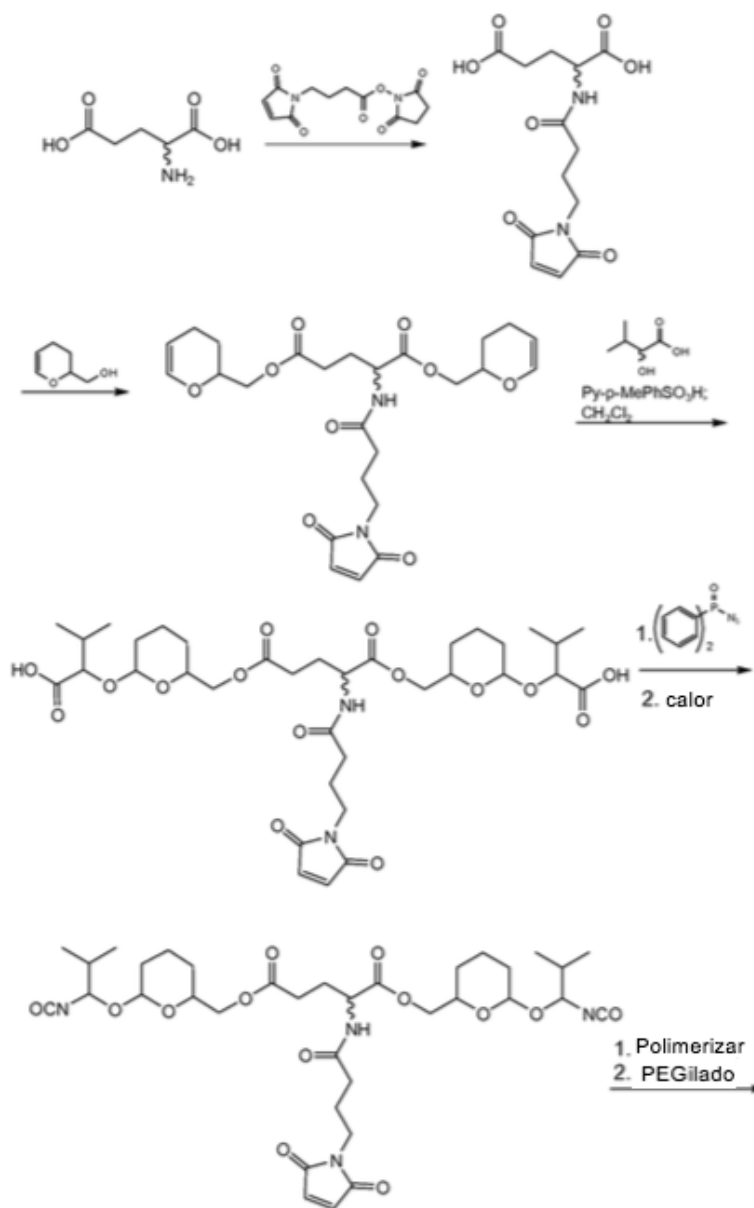
[0026] La cantidad de compuesto que contiene isocianato necesaria para polimerizar suficientemente con el tensioactivo de alcohol polihídrico para formar las partículas de la divulgación variará dependiendo de la cantidad de tensioactivo de alcohol polihídrico usado, así como de la composición química del tensioactivo de alcohol polihídrico usado. Los expertos en la técnica, sin embargo, podrán determinar fácilmente la cantidad de compuesto que contiene isocianato necesario para polimerizar suficientemente con el tensioactivo de alcohol polihídrico para formar las partículas de la descripción usando experimentación rutinaria.

[0027] La cantidad de tiempo del compuesto necesario para polimerizar suficientemente el compuesto que contiene isocianato con el tensioactivo de alcohol polihídrico para formar las partículas de la divulgación variará dependiendo, por ejemplo, de las composiciones químicas respectivas del compuesto que contiene isocianato y el tensioactivo de alcohol polihídrico. Los expertos en la técnica, sin embargo, podrán determinar la cantidad de tiempo suficiente para formar las partículas de la descripción usando experimentación rutinaria.

[0028] En algunas realizaciones de la invención, la emulsión se trata con un compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato durante un tiempo suficiente para que el compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato se polimerice con el al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico en la interfaz de fase acuosa-alcohol polihídrico para formar las partículas de la divulgación.

[0029] En realizaciones preferidas de la invención, la emulsión se trata con un compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato durante un tiempo suficiente para que el compuesto que contiene isocianato se polimerice con el al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico en la interfaz agua-alcohol polihídrico para formar las partículas que contienen base libre de bendamustina de la descripción. En realizaciones particularmente preferidas, este proceso produce nanocápsulas que contienen base libre de bendamustina de la descripción.

[0030] En algunas realizaciones de la invención, el compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato puede comprender además al menos un resto sensible al pH. Se prevé que el resto sensible al pH, cuando las partículas de la divulgación se expongan a un pH mayor o menor, se escindan, hidrolicen o de otro modo cambien las propiedades químicas o físicas de las partículas de la divulgación. Un resto ejemplar sensible al pH es un resto tetrahidropirano, que se hidroliza a pH ácido. Otros restos sensibles al pH incluyen ésteres, hidrazonas, anhídridos carboxi-dimetilmaleicos, ortoésteres, iminas, β -tiopropionatos, viniléteres y fosforamidas. Véase, por ejemplo, Gao, W. et al., PH-Responsive Nanoparticles for Drug Delivery, Molecular Pharmaceutics, vol. 7, no. 6, 1913-1920 (2010). Un método para incorporar un resto sensible al pH en los compuestos de la divulgación se establece en el siguiente esquema:



[0031] En algunas realizaciones de la invención, el compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato puede comprender también al menos un resto solubilizante en agua. Los "restos solubilizadores de agua" dentro del alcance de la invención incluyen grupos hidrófilos. Los grupos hidrófilos son conocidos en la técnica e incluyen grupos hidroxilo, grupos carbonilo, grupos de ácido carboxílico, grupos amino, grupos tiol, grupos fosfato, grupos éter, grupos éster, grupos fosfodiéster, grupos glucolíticos y grupos péptidos. Los ejemplos de restos solubilizantes en agua incluyen aquellos compuestos que tienen restos de polietilenglicol (PEG), restos de PEG funcionalizados y mezclas de los mismos. En estas realizaciones de la invención, las partículas resultantes incluirán restos solubilizadores de agua.

[0032] En algunas realizaciones de la invención, el compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato puede comprender también al menos un resto de maleimida. Los restos de maleimida son alquenos activados que son excelentes aceptores de Michael. Los restos de maleimida pueden reaccionar con una variedad de nucleófilos (donantes de Michael) para unir el nucleófilo al resto de maleimida. Los nucleófilos adecuados pueden comprender restos sensibles al pH tales como los descritos en este documento.

[0033] Los nucleófilos adecuados para la adición de Michael con el resto de maleimida también pueden comprender al menos un resto solubilizante en agua tal como los descritos en este documento. Los ejemplos de nucleófilos que comprenden al menos un resto solubilizante en agua, adecuado para la reacción con los restos maleimida de la

invención, incluyen tiol-PEG (compuestos que contienen SH-PEG) y amino-PEG (compuestos que contienen NH₂-PEG).

[0034] En ciertas realizaciones de nanocápsulas de la invención, la cubierta polimérica de las nanocápsulas puede comprender opcionalmente al menos un resto sensible al pH. Se prevé que el resto sensible al pH, cuando se expone a un pH mayor o menor, se rompa o se hidrolice. Esta escisión o hidrólisis dará como resultado la "apertura" de la cubierta polimérica de las nanocápsulas para permitir que cualquier agente terapéutico encapsulado dentro de las nanocápsulas se libere al ambiente circundante. Un resto ejemplar sensible al pH es un resto tetrahidropirano, que se hidroliza a pH ácido. Otros restos sensibles al pH incluyen ésteres, hidrazonas, anhídridos carboxi-dimetilmaleicos, ortoésteres, iminas, β -tiopropionatos, viniléteres y fosforamidas. Véase, por ejemplo, Gao, W. et al., PH-Responsive Nanoparticles for Drug Delivery, Molecular Pharmaceutics, vol. 7, no. 6, 1913-1920 (2010).

[0035] En ciertas realizaciones de la invención, la cubierta polimérica de las partículas puede comprender opcionalmente al menos un resto de maleimida. En una realización de la invención, las partículas que comprenden al menos un resto de maleimida pueden hacerse reaccionar con un nucleófilo que comprende al menos un compuesto solubilizante en agua para unir el compuesto solubilizante en agua a la partícula, usando el resto de maleimida como un enlazador. Los ejemplos de nucleófilos que comprenden al menos un resto solubilizante en agua, adecuado para la reacción con los restos maleimida de la invención, incluyen tiol-PEG (compuestos que contienen SH-PEG) y amino-PEG (compuestos que contienen NH₂-PEG). Como tal, algunas realizaciones de la invención incluyen partículas en las que la cubierta polimérica comprende al menos un resto de PEG.

[0036] En algunas realizaciones de la invención, la cubierta polimérica de las partículas comprende opcionalmente al menos un ligando de direccionamiento. Como se usa en el presente documento, "ligando de direccionamiento" incluye cualquier compuesto, resto o residuo que tiene, o es capaz de promover, una actividad de direccionamiento hacia tejidos y/o receptores in vivo. Los objetivos con los que se puede asociar un ligando de direccionamiento incluyen tejidos tales como, por ejemplo, tejido miocárdico (que incluye células de miocardio y cardiomiocitos), tejidos membranosos (que incluyen endotelio y epitelio), láminas, tejido conjuntivo (incluido tejido intersticial) o tumores; coágulos de sangre; y receptores tales como, por ejemplo, receptores de superficie celular para hormonas peptídicas, neurotransmisores, antígenos, fragmentos de complemento, inmunoglobulinas y receptores citoplásmicos para hormonas esteroides. Los ejemplos de ligandos de direccionamiento adecuados incluyen, por ejemplo, proteínas, que incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, moléculas receptoras, moléculas de unión a receptores, glicoproteínas y lectinas; péptidos, que incluyen oligopéptidos y polipéptidos; peptidomiméticos; sacáridos, incluidos mono y polisacáridos; vitaminas; esteroides, análogos de esteroides, hormonas, cofactores, agentes bioactivos que incluyen pequeñas moléculas sustituidas y material genético, incluyendo nucleósidos, nucleótidos y polinucleótidos y miméticos de los mismos, tales como ácidos nucleicos peptídicos.

[0037] En algunas realizaciones de la invención, las partículas formadas de acuerdo con los métodos descritos se pueden aislar. Las partículas se pueden aislar usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, el aislamiento de las partículas incluye la evaporación opcional del disolvente orgánico y la dispersión de las partículas en una solución acuosa para formar una dispersión acuosa de las partículas. Las partículas se pueden aislar adicionalmente mediante secado por pulverización de la dispersión acuosa de las partículas. Alternativamente, la dispersión acuosa de las partículas se puede liofilizar usando métodos conocidos en la técnica.

[0038] También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden las partículas de la divulgación y un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Un "vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, agentes de carga, agentes estabilizantes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir uno o más agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares tales como trehalosa y sacarosa, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. También se describen sustancias farmacéuticamente aceptables tales como humectación o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones.

[0039] Las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen nanocápsulas de la divulgación, preferiblemente nanocápsulas que contienen bendamustina, y un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Un diluyente farmacéuticamente aceptable a modo de ejemplo es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

[0040] Las partículas de la divulgación se pueden usar, solas o como parte de una composición farmacéutica, para tratar el cáncer en un paciente. Estos métodos comprenden administrar las partículas de la descripción, ya sea solo o como parte de una composición farmacéutica, a un paciente que necesita tratamiento. Los cánceres preferidos que se pueden tratar usando los métodos de la divulgación incluyen tumores sólidos o no sólidos tales como, por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin indolente (linfoma de células T, linfoma de células B), linfoma no Hodgkin agresivo, mieloma múltiple, leucemia linfocítica aguda, cáncer de mama o cáncer de pulmón. Otros tumores de cáncer sólidos y no sólidos también se consideran tratables con compuestos y

composiciones de la divulgación, tales como, por ejemplo, sarcoma, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer testicular, melanoma, glioblastoma, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario y cáncer de próstata. Los tumores de cáncer sólidos y no sólidos adicionales también se consideran como tratables con compuestos de la divulgación, por ejemplo, cáncer de mama.

[0041] En una realización de la divulgación, los compuestos y las composiciones de la divulgación se usan para tratar pacientes que son resistentes a uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como, por ejemplo, agentes alquilantes. Los ejemplos de agentes alquilantes a los que los pacientes pueden ser resistentes incluyen: mostazas nitrogenadas; etilenimas; alquilsulfonatos; triazenos; piperazinas; y nitrosureas. Los ejemplos más específicos de los diversos tipos de agentes quimioterapéuticos a los que los pacientes pueden volverse resistentes se enumeran a continuación. Los pacientes resistentes a uno o más de estos agentes se beneficiarían por tratamiento con los compuestos y composiciones de la divulgación.

Mostazas de nitrógeno

[0042] La mecloretamina, comercializada bajo el nombre comercial de Mustargen®, se administra por inyección para tratar la enfermedad de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin, y como terapia paliativa para los cánceres de mama y de pulmón, y se administra como un tratamiento tópico para las lesiones cutáneas de la micosis fungoide (linfoma cutáneo de células T).

[0043] La ifosfamida, vendida con el nombre comercial Ifex®, se usa para tratar el linfoma de Hodgkin y el de no Hodgkin, así como cáncer de testículo recurrente y tumores de células germinales, sarcomas, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de cuello uterino.

[0044] El melfalán es un fármaco de quimioterapia comercializado bajo la marca comercial Alkeran®, y también se lo denomina L-PAM o mostaza de fenilalanina. Se usa para tratar el mieloma múltiple, el cáncer de ovario, el neuroblastoma, el rabdomiosarcoma y el cáncer de mama.

[0045] El clorambucilo se vende con el nombre comercial Leukeran®, y se usa más ampliamente para tratar la leucemia linfocítica crónica, linfomas malignos que incluyen linfosarcoma, linfoma folicular gigante y enfermedad de Hodgkin. También se ha utilizado con éxito para tratar el linfoma no Hodgkin, el cáncer de mama, de ovario y testicular, la macroglobulinemia de Waldenstrom, la trombocitemia y el coriocarcinoma.

[0046] La ciclofosfamida se comercializa como Cytosan® o Neosar®, y se usa para tratar el linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, el linfoma de Burkitt, la leucemia linfocítica crónica, la leucemia mielocítica crónica, la leucemia mielocítica aguda, la leucemia linfocítica aguda, el linfoma de células T, mieloma múltiple, neuroblastoma, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma de Ewing; cánceres de mama, testículo, endometrio, ovario y pulmón.

Nitrosoureas

[0047] La estreptozocina se vende bajo el nombre comercial Zanosar®, y se usa para tratar el cáncer pancreático de células de los islotes.

[0048] La carmustina también se conoce como BiCNU® o BCNU, y se usa para algunos tipos de tumores cerebrales, glioblastoma, glioma del tronco encefálico, meduloblastoma, astrocitoma, ependimoma y tumores cerebrales metastásicos. También se usa en el tratamiento del mieloma múltiple, la enfermedad de Hodgkin, el linfoma no Hodgkin, el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de colon.

[0049] La lomustina, también conocida como CCNU o CeeNU®, se usa para tratar tumores cerebrales primarios y metastásicos, enfermedad de Hodgkin y linfoma no Hodgkin, y también se ha usado para el cáncer de melanoma, pulmón y colon.

Sulfonatos de alquilo

[0050] El busulfano, vendido bajo los nombres comerciales de Busulfex® y Myleran®, se usa para tratar la leucemia mielógena crónica.

Triazinas

[0051] La dacarbazina se vende bajo el nombre comercial DTIC-Dome® y se usa para tratar el melanoma maligno metastásico, la enfermedad de Hodgkin, los sarcomas de tejidos blandos, el neuroblastoma, los fibrosarcomas, el rabdomiosarcoma, el carcinoma de células de los islotes y el carcinoma medular de tiroides.

[0052] La temozolomida se vende bajo el nombre comercial Temodar®, y se usa para tratar los tipos específicos de tumores cerebrales, astrocitoma anaplásico y glioblastoma multiforme.

Etileniminas

[0053] La tiotepa, conocida bajo el nombre comercial de Thioplex®, es un agente alquilante utilizado para tratar el cáncer de mama, el cáncer de ovario, la enfermedad de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin.

[0054] Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 8 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, butilo, pentilo, isoamilo, neopentilo, 1-etilpropilo, 3- metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, hexilo, octilo, etc. El resto alquilo de grupos que contienen alquilo, tales como grupos alcoxi, alcoxicarbonilo y alquilaminocarbonilo, tiene el mismo significado que alquilo definido anteriormente. Los grupos alquilo inferior, que se prefieren, son grupos alquilo como se define anteriormente que contienen de 1 a 4 carbonos. Una designación como "alquilo C₁-C₄" se refiere a un radical alquilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono.

[0055] Como se usa en el presente documento, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos divulgados en los que el compuesto original se modifica preparando sales ácidas o básicas de los mismos. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Por lo tanto, el término "sal de adición de ácido" se refiere al derivado de sal correspondiente de un compuesto original que se ha preparado mediante la adición de un ácido. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto precursor formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos. Por ejemplo, tales sales convencionales incluyen, pero no se limitan a, aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidrox maleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isetionico y similares. Ciertos compuestos ácidos o básicos de la presente invención pueden existir como zwitteriones. Se contempla que todas las formas de los compuestos, que incluyen ácido libre, base libre y zwitteriones, están dentro del alcance de la presente descripción. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden preparar de acuerdo con procedimientos farmacéuticos aceptables, tal como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª edición, ed. Alfonso R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA (1985).

[0056] Como se usa en el presente documento, "tumor sólido" se refiere a un tumor maligno que es una masa de tejido localizado. Los ejemplos de tumores de cáncer sólido incluyen linfomas, sarcomas y carcinomas e incluyen cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de hueso, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón y similares.

[0057] Como se usa en el presente documento, un "cáncer de tumor no sólido" se refiere más comúnmente a cánceres hematológicos, es decir, cánceres malignos de la sangre. Los ejemplos de cánceres de tumores no sólidos incluyen leucemia linfocítica crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin indolente (linfoma de células T, linfoma de células B), mieloma múltiple y similares.

Procedimiento general para preparar partículas de la divulgación

[0058] Las nanocápsulas se formaron usando un proceso de nanoemulsión W/O, que toma hidrócloruro de bendamustina disuelto en una fase acuosa (W) y lo emulsiona con una fase oleosa (O) que contiene un sistema tensioactivo de alcohol polihídrico. La emulsión W/O resultante se trató entonces con una base (NH₃ o alquilamina) que precipitó la sal hidrócloruro de bendamustina como la base libre, aumentando la estabilidad del compuesto a la hidrólisis en el entorno acuoso. Se demostró que el proceso de precipitación no desestabiliza el tamaño de partícula de las gotitas de agua resultantes. El sistema se trató luego con un compuesto de diisocianato que reacciona con los tensioactivos de alcohol polihídrico (Span y Tween) que reaccionan como un agente de reticulación para los grupos diisocianatos. La polimerización de condensación resultante se produjo principalmente en la interfaz agua-aceite cuando el resto de isocianato se puso en contacto con los grupos de cabeza de agente tensioactivo. Se demostró que la encapsulación de la base libre de benda-mustina era completa con tan solo 25 µL de diisocianato de 1,6-hexilo.

[0059] El disolvente (hexanos) se eliminó a continuación mediante calentamiento, evaporación rotatoria o secado por pulverización para obtener las partículas de cubierta polimérica de la descripción en forma de nanocápsulas. Las nanocápsulas se convirtieron en un sistema acuoso por dispersión en agua usando un sistema tensioactivo apropiado (HSA, PVA, etc.). Las cáscaras de las nanocápsulas comprendían mezclas de carbamatos y ureas que resistían la disolución son disolventes orgánicos puros. Las nanopartículas liofilizadas se reconstituyeron y se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión criogénica (c-MET). La mayoría de las nanopartículas eran esferas sólidas de 20-40 nm que se dispersaron fácilmente en agua. Una minoría de partículas estaba en el rango de 125 nm. Todas las partículas tenían una superficie lisa.

[0060] Nanocápsulas de bendamustina: se preparó una fase oleosa mezclando 10 ml de Span 20 y 10 mL de Tween 80 en 113 mL de hexano. La fase oleosa se añadió a continuación a una fase acuosa que comprendía 20 mL

de una sal de HCl de bendatoquina de 25 mg/mL. Esta mezcla se procesó usando un homogeneizador manual IKA Ultra-Turrex para obtener una nanoemulsión con un tamaño de partícula de 59,7 nm. La nanoemulsión se agitó después usando una barra de agitación magnética y se trató con 500 µL de N,N-dimetilhexadecilamina para convertir la sal de bendamustina HCl en la base libre de bendamustina, que precipita en el compartimento acuoso de la nanocápsula. Después de aproximadamente 5 minutos, se añadieron 500 µL de 1,6-diisocianato de hexilo y esta mezcla se agitó durante 60 minutos para permitir la formación del polímero. La suspensión en hexano de nanocápsulas se mezcló con 300 mL de agua (SWFI) y se emulsionó usando un homogeneizador de sonda sónica. El hexano y una porción del agua se eliminaron de la suspensión acuosa resultante usando un evaporador rotatorio para llevar el volumen a ~150 mL. Los 150 mL se mezclaron luego con 12 g de PVP C-17 y 30 g de manitol como agentes de carga y el volumen total se ajustó a 200 mL. Esta suspensión se dividió luego en alícuotas de 10 mL en viales de suero de 30 mL y se liofilizó.

[0061] Experimento de reticulación. Se prepararon tres nanoemulsiones de bendamustina a 25 mg/mL en PVA al 0,5% (2 mL). Las nanoemulsiones se trataron entonces con 5 µL, 15 µL o 25 µL de diisocianato de hexilo. Las mezclas se analizaron, usando HPLC, antes, inmediatamente después de la adición, y 12 horas después de la adición. Las muestras tomadas antes de la adición de diisocianato de hexilo mostraron niveles esperados de bendamustina a través de HPLC. Las muestras tomadas a las 12 horas después de la adición mostraron que se requieren entre 15 y 25 µL de monómero (diisocianato de hexilo) para la encapsulación de bendamustina dentro de las nanocápsulas de la descripción.

Preparación de rejilla EM

[0062] La muestra se solubilizó añadiendo 2,0 ml de ddH₂O a 5 mg de muestra y agitando en vórtex durante un minuto. La muestra se conservó en hielo vitrificado soportado por películas de carbón holey recubiertas de carbono sobre rejillas de cobre de 400 mallas. La muestra se preparó aplicando una gota de 3 ml de solución de muestra no diluida a una rejilla limpia, secando con papel de filtro e inmediatamente procediendo a la vitrificación en etano líquido. Las grillas se almacenaron bajo nitrógeno líquido hasta que se transfirieron al microscopio electrónico para obtener imágenes.

Imágenes EM

[0063] La microscopía electrónica se realizó usando un microscopio electrónico FEI Tecnai T12, que funciona a 120KeV y está equipado con una cámara FEI Eagle 4K x 4 K CCD. La rejilla se transfirió al microscopio electrónico utilizando un criostato que mantiene las rejillas a una temperatura inferior a -170 C. Las imágenes de la cuadrícula se adquirieron en escalas múltiples para evaluar la distribución general de la muestra. Después de identificar las áreas objetivo potencialmente adecuadas para imágenes con aumentos menores, se adquirieron imágenes de gran aumento a aumentos nominales de 110.000x (0,10 nm/píxel), 67.000x (0,16 nm/píxel), 52.000x (0,21 nm/píxel) y 21.000 x (0,50 nm/píxel). Las imágenes se adquirieron en un punto bajo nominal de -2,5 a -1,5µM (1 10.000x), -3µM (67.000x), -4µM (52.000x) y -5µM (21.000x) y dosis de electrones de ~ 10-15 e/Å².

[0064] La microscopía electrónica de transmisión criogénica de ciertas nanocápsulas de la divulgación demostró que la capa externa de las nanocápsulas es consistente con la aparición de una bicapa lipídica tanto en apariencia como en grosor (aproximadamente 6-8 nm). El diámetro de las nanocápsulas varió de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 600 nm. Las nanocápsulas rellenas contienen lo que parecían ser nanopartículas más pequeñas.

[0065] La Figura 1 representa una imagen de una muestra de nanocápsulas que contienen base libre de bendamustina de la descripción, conservada en hielo vítreo con un aumento de 52.000x. La inserción muestra un área pequeña de la imagen a mayor escala.

[0066] La Figura 2 representa una imagen de una muestra de nanocápsulas que contienen una base libre de bendamustina de la descripción, conservada en hielo vítreo con un aumento de 11 0.000x.

Reivindicaciones

1. Un método para preparar partículas que comprende:

formar una emulsión que comprende una fase continua que comprende un disolvente orgánico, una fase acuosa dispersa y al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico;
tratar la emulsión con un compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato;
permitir tiempo suficiente para que el compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato se polimerice con el al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico en la interfaz de fase acuosa-alcohol polihídrico para formar las partículas; y
opcionalmente aislando las partículas.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 de preparar partículas que contienen base libre de bendamustina que comprende:

formar una emulsión mezclando una fase continua que comprende un disolvente orgánico, una fase dispersa que comprende una solución acuosa de una sal de bendamustina farmacéuticamente aceptable, y al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico;
tratar la emulsión con una cantidad de base suficiente para convertir la sal farmacéuticamente aceptable de bendamustina en base libre de bendamustina;
tratar la emulsión con un compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato;
dejar tiempo suficiente para que el compuesto que contiene isocianato se polimerice con el al menos un tensioactivo de alcohol polihídrico en la interfaz agua-alcohol polihídrico para formar las partículas que contienen bendamustina; y opcionalmente aislar las partículas.

3. El método de la reivindicación 1, en el que la fase acuosa comprende agua y un agente terapéutico soluble en agua.

4. El método de la reivindicación 3, en el que el agente terapéutico es un péptido o proteína;

o en donde el agente terapéutico es un polinucleótido.

5. El método de la reivindicación 3, en el que el agente terapéutico está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable; y, opcionalmente, el método comprende adicionalmente tratar la emulsión con una cantidad de base o una cantidad de ácido suficiente para convertir la forma de sal farmacéuticamente aceptable del agente terapéutico en la forma de ácido libre o de base libre del agente terapéutico.

6. El método de la reivindicación 2 o la reivindicación 5, en el que la base es amoníaco o una alquilamina.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la emulsión es una nanoemulsión; y/o en donde las partículas son nanopartículas; y/o en el que las partículas son nanocápsulas; y/o en el que las partículas tienen un diámetro medio de entre 50 nm y 300 nm, de 60 nm a 600 nm, de 20 nm a 800 nm o de 20 nm a 600 nm medido mediante dispersión dinámica de luz (DLS) o microscopio electrónico de transmisión (MET).

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el disolvente orgánico es un alcano C₅₋₁₀, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo o una mezcla de los mismos; opcionalmente, el alcano C₅₋₁₀ es pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano o una mezcla de los mismos; opcionalmente, en donde el disolvente orgánico es hexano.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el tensioactivo de alcohol polihídrico es un tensioactivo derivado de sorbitán polietoxilado y ácido oleico, derivados de polioxietileno de monolaurato de sorbitán, un tensioactivo que es un éster de sorbitán, o una mezcla de los mismos.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato comprende además al menos un resto sensible al pH; y, opcionalmente, en donde el resto sensible al pH es un resto tetrahidropirano.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato comprende además al menos un resto de maleimida.

12. El método de la reivindicación 11, en el que el al menos un resto de maleimida sirve como un enlazador para conectar el al menos un resto sensible al pH; opcionalmente, en donde el resto sensible al pH es un resto tetrahidropirano.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto que comprende al

menos dos restos de isocianato comprende además al menos un resto solubilizante en agua; opcionalmente, donde al menos un resto solubilizante en agua es un resto de PEG, un resto de PEG funcionalizado, o una mezcla de los mismos.

- 5 **14.** El método de la reivindicación 11, en el que el al menos un resto de maleimida sirve como un enlazador para conectar al menos un resto solubilizante en agua; opcionalmente, en donde el al menos un resto solubilizante en agua es un resto de PEG, un resto de PEG funcionalizado, o una mezcla de los mismos.
- 10 **15.** El método de la reivindicación 11, que comprende además la etapa de tratar las partículas con al menos un compuesto solubilizante en agua; opcionalmente, en donde el al menos un compuesto solubilizante en agua es un compuesto que contiene SH-PEG o un compuesto que contiene NH₂-PEG.
- 15 **16.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato tiene entre cuatro y diez restos de isocianato.
- 15 **17.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato es un diisocianato; opcionalmente, donde el compuesto que comprende al menos dos restos de isocianato es un diisocianato de alquilo, preferiblemente diisocianato de 1,6-hexilo.
- 20 **18.** El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de aislar las partículas comprende los pasos de:
 - a. opcionalmente evaporar el disolvente orgánico; y
 - b. dispersar las partículas en una solución acuosa para formar una dispersión acuosa de las partículas;
- 25 y, opcionalmente, el método comprende adicionalmente la etapa de liofilizar la dispersión acuosa.

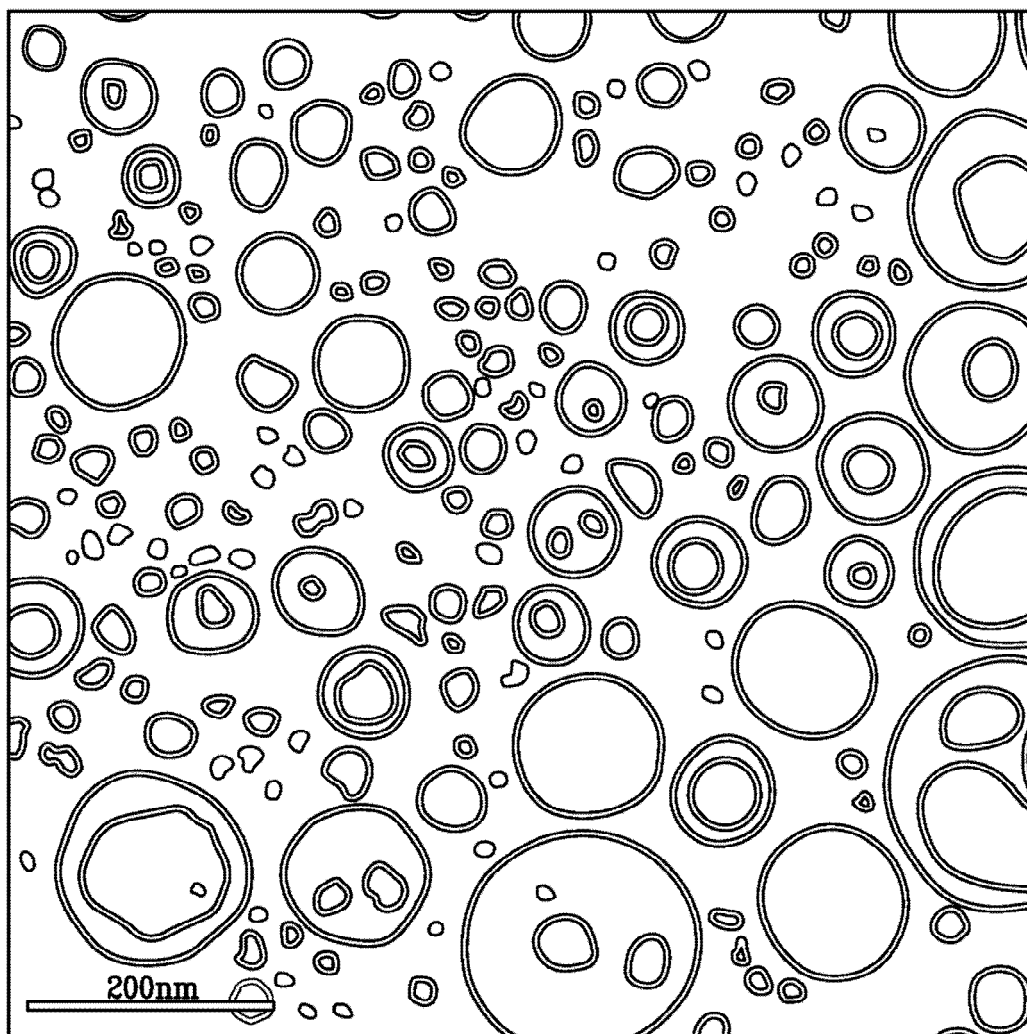


FIG. 1

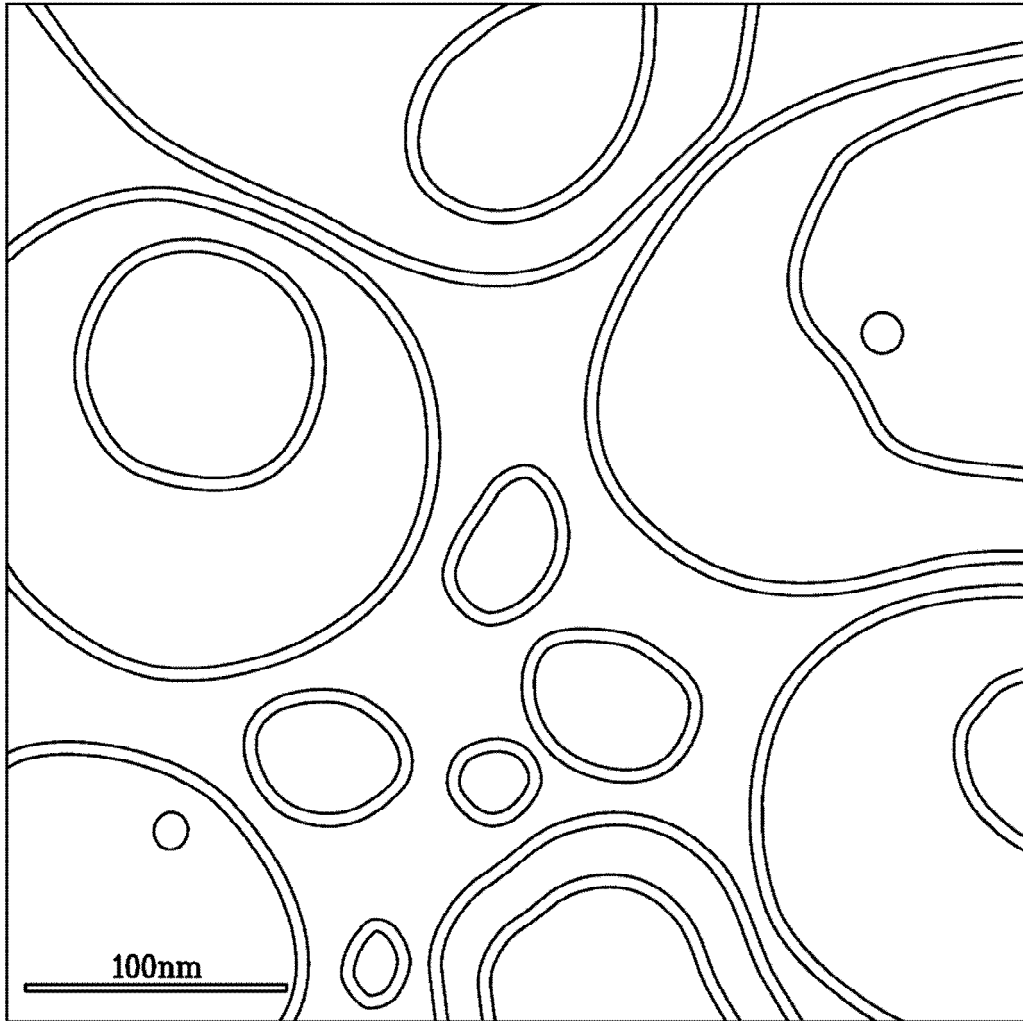


FIG. 2