

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 554**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 47/69** (2007.01)

**A61K 31/337** (2006.01)

**B82Y 5/00** (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2008 PCT/ES2008/000269**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2008 WO08129106**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2008 E 08761515 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2153826**

54 Título: **Nanopartículas que comprenden una ciclodextrina y paclitaxel y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**20.04.2007 ES 200701074**

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

**03.10.2018**

73 Titular/es:

**INNOUP FARMA, S.L. (100.0%)  
Pol. Mocholi, Plaza CEIN, 5-Nave T1  
31110 Noain, Navarra, ES**

72 Inventor/es:

**AGÜEROS BAZO, MAITE;  
SALMAN, HESHAM H.A.;  
IRACHE GARRETA, JUAN MANUEL y  
CAMPANERO MARTÍNEZ, MIGUEL ANGEL**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones:**

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

ES 2 684 554 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**

Nanopartículas que comprenden una ciclodextrina y paclitaxel y usos de las mismas

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a nanopartículas, con características bioadhesivas, que comprenden un polímero biodegradable, una ciclodextrina o un derivado de la misma, y una molécula biológicamente activa. La invención también se refiere a un procedimiento para su producción, con composiciones que contienen dichas nanopartículas y con sus aplicaciones.

**Antecedentes de la invención**

10 En los últimos años, se ha desarrollado el uso de nanopartículas poliméricas biodegradables como vehículos para la administración de fármacos, especialmente, por vía oral. Las nanopartículas se definen, en general, como sistemas coloidales de tipo partícula sólida, con un tamaño inferior al micrómetro, formadas por polímeros naturales o sintéticos. Dependiendo del procedimiento seguido en su elaboración, pueden obtenerse dos tipos de estructuras: nanoesferas o nanocápsulas. Las nanoesferas tienen una estructura de tipo matriz polimérica, en la que el principio activo está dispersado, mientras que las nanocápsulas poseen un núcleo que contiene el principio activo, rodeado de una cubierta, tal como una cubierta polimérica. Debido a la elevada superficie específica de estos sistemas, el principio activo también puede adsorberse sobre la superficie del sistema nanoparticulado.

15 La vía oral es la vía más popular y atractiva para la administración de productos medicinales. El uso de esta vía está asociado con un aumento significativo de la aceptación del medicamento por parte del paciente y con menores costes sanitarios. Sin embargo, un importante número de fármacos presentan una eficacia muy baja cuando se administran por medio de esta vía. Este fenómeno puede deberse a uno o varios de los siguientes factores que condicionan la biodisponibilidad oral de un fármaco: (i) baja permeabilidad de la molécula activa para atravesar la mucosa (asociado generalmente a fármacos hidrófilos), (ii) baja estabilidad en el entorno gastrointestinal (presencia de valores de pH extremos, enzimas, etc.), (iii) liberación incompleta del fármaco desde la forma de dosificación, (iv) baja solubilidad del principio activo en el entorno gastrointestinal (asociado a fármacos hidrófobos) y (v) metabolismo presistémico.

20 Los sistemas nanoparticulados permiten, en numerosas ocasiones, aumentar de forma significativa la biodisponibilidad de la molécula biológicamente activa y, así, ofrecer nuevas estrategias de administración. La mejora de la biodisponibilidad obtenida tras utilizar estos vehículos puede explicarse por la capacidad de las nanopartículas poliméricas para desarrollar interacciones bioadhesivas con el tracto de la mucosa gastrointestinal. Por tanto, cuando una suspensión de nanopartículas se administra por vía oral, estos vehículos pueden interaccionar y desarrollar interacciones adhesivas con varios componentes de la mucosa. Dependiendo de ciertos parámetros fisicoquímicos (tales como la naturaleza del polímero, tamaño, carga superficial o la presencia de ciertos recubrimientos o ligandos en el vehículo), las características bioadhesivas de las nanopartículas pueden variar y permitir, en ciertos casos, alcanzar la superficie del enterocito y, posiblemente, desarrollar interacciones bioadhesivas en regiones muy específicas del tracto gastrointestinal. Todos estos fenómenos conducen a (i) un aumento del tiempo de residencia de la forma de dosificación en contacto íntimo con la superficie de la mucosa, o a (ii) una localización específica del vehículo (con la sustancia farmacológica) en una determinada zona. Una vez que las nanopartículas están adheridas a la mucosa, pueden promover la absorción del fármaco transportado y su acceso a la circulación sistémica mediante diversos mecanismos.

35 40 Ejemplos ilustrativos de fármacos cuya biodisponibilidad oral aumenta mediante su encapsulación o asociación a nanopartículas incluyen calcitonina de salmón, furosemida, avarol, dicumarol, nifedipino, fluoropirimidinas, plásmidos, etc.

45 Como polímeros biodegradables para la fabricación de sistemas particulados tienen especial importancia los homo y copolímeros de ácidos láctico y glicólico (PLGA) ya que presentan una buena compatibilidad tisular, no son tóxicos y se han usado durante muchos años como material de sutura reabsorbible. Estos (co)polímeros son solubles en disolventes orgánicos, tales como cloroformo, diclorometano, acetona y acetato de etilo e insolubles en medios acuosos; sin embargo, pueden captar agua e hincharse en mayor o menor grado, dependiendo de su peso molecular y de su composición. Entre los inconvenientes de estos polímeros merece la pena resaltar que el PLGA puede resultar bastante hidrófobo en comparación con muchos de los antígenos que transporta. Además, tanto la hidratación como la degradación del PLGA son requisitos esenciales para la liberación del antígeno durante la fase de erosión. Esta erosión produce un microentorno bastante ácido debido a la acumulación de los productos de degradación del polímero, ácidos láctico y glicólico; el pH puede bajar hasta ser del orden de 2-3. En estas condiciones, las proteínas liberadas experimentan hidrólisis y agregación en el medio acidificado y muchos antígenos pierden su capacidad antigénica. Finalmente, su alto coste podría limitar su uso y favorecería la búsqueda de otros materiales menos caros.

55 Como alternativa a los poliésteres, las nanopartículas preparadas con otros polímeros han demostrado ser adecuadas para la administración oral de fármacos. Uno de los polímeros más utilizados es el quitosano. El quitosano es un polímero similar a la celulosa que proviene de la desacetilación de la quitina, componente

mayoritario del exoesqueleto de los crustáceos. El quitosano puede formularse en nanopartículas de diferentes tamaños en las que lleva el fármaco incorporado. Las partículas de quitosano pueden aumentar la absorción de proteínas en la superficie mucosa, induciendo una apertura transitoria de las uniones estrechas. Además, el quitosano puede tener un efecto inmunomodulador, estimulando la producción de citocinas *in vitro* y mejorando el equilibrio Th2/Th3 natural a nivel de la mucosa en ausencia de antígeno.

Recientemente, se ha propuesto el copolímero de metil vinil eter y anhídrido maleico (PVM/MA) [Gantrez®], como material biodegradable para producir nanopartículas (Arbos *et al.*, J. Control. Release, 83 (2002) 321-330). Estos copolímeros de PVM/MA se usan ampliamente como espesantes, estabilizadores de disoluciones acuosas, componentes de adhesivos dentales, parches transdérmicos y en comprimidos bucales. Entre las principales ventajas de estos polianhídridos merece la pena destacar su bajo coste, su baja toxicidad oral y la disponibilidad de grupos funcionales que pueden reaccionar fácilmente con moléculas que contienen grupos hidroxilo o amino (Arbos *et al.*, J. Control. Release, 89 (2003) 19-30). Por tanto, en un medio acuoso, el grupo anhídrido se hidroliza originando dos grupos carboxilos y esta reacción permite unir ligandos fácilmente a la cadena polimérica o a la superficie de las nanopartículas preparadas.

Las ciclodextrinas (CD) son un grupo de oligosacáridos cíclicos obtenidos por degradación enzimática del almidón. Están formadas por unidades de  $\alpha$ -1,4-glucopiranosas unidas entre sí, formando una estructura de tipo cono truncado con una cavidad interna hidrófoba. Las CD pueden contener más de 15 unidades de  $\alpha$ -1,4-glucopiranosas, aunque las más abundantes contienen 6 ( $\alpha$ -CD), 7 ( $\beta$ -CD) u 8 ( $\gamma$ -CD) unidades de  $\alpha$ -1,4-glucopiranosas. En aplicaciones farmacéuticas, la  $\beta$ -CD y sus derivados son las más utilizadas, en particular, la 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (OH- $\beta$ -CD). Esta CD tiene una elevada solubilidad acuosa, una toxicidad inferior así como una cavidad más hidrófoba en comparación con el compuesto de origen ( $\beta$ -CD). Los complejos formados mediante la utilización de ciclodextrinas pueden proporcionar, a la molécula huésped, estabilidad y aumento de la solubilidad acuosa, lo que puede conducir a aumentos de la biodisponibilidad de esa molécula (por ejemplo, fármaco) y/o a la reducción de efectos secundarios. Además, se ha descrito en la bibliografía la capacidad de aumentar la capacidad de carga de liposomas y micropartículas. Asimismo, las CD pueden modificar también el perfil de liberación del fármaco encapsulado.

Varios agentes antitumorales se administran por vía parenteral, lo que provoca diversos problemas. Entre las principales ventajas implicadas en la administración oral de agentes antitumorales, merece la pena destacar el aumento de la calidad de vida de los pacientes así como la reducción de los costes sanitarios. Esta vía de administración permitiría una exposición continua de las células cancerosas al fármaco antitumoral a un nivel de concentración apropiado y sostenido, lo que puede mejorar el índice terapéutico y reducir los efectos secundarios. Sin embargo, la mayoría de estos fármacos (por ejemplo, paclitaxel) tienen una baja biodisponibilidad cuando se administran por vía oral.

El paclitaxel (Taxol®, Bristol Myers Squibb Company), un producto extraído del árbol *Taxus brevifolia*, se describió por primera vez en 1.971 y desde 1.993 es el agente quimioterápico contra el cáncer más usado en todo el mundo. El paclitaxel actúa a nivel celular promoviendo la polimerización de la tubulina. Por tanto, los microtúbulos formados en presencia de paclitaxel son extraordinariamente estables y no funcionales, provocando así la muerte celular por la incapacidad dinámica y funcional de los microtúbulos para la división celular. En Europa, este fármaco está indicado tanto como agente individual como en combinación con otros tratamientos oncológicos para el tratamiento de cáncer de ovario, cáncer de mama y cáncer de pulmón de células no pequeñas, tanto avanzados como metastásicos.

El principal inconveniente de este fármaco radica en su escasa biodisponibilidad oral debido a su baja solubilidad acuosa y al efecto de metabolismo de primer paso principalmente. Tras la administración oral, el paclitaxel es sustrato de la glicoproteína-P, así como de otros miembros de la superfamilia ABC (*ATP-binding cassette*, casete de unión a ATP), tales como BCRP y MRP2. La superfamilia ABC transportadora de proteínas desempeña un papel central en la defensa del organismo frente a compuestos tóxicos y frente a algunos agentes anticancerígenos. Dichas proteínas (glicoproteína-P, MRP2 y BCRP) están localizadas en la zona apical de las membranas intestinal, hepática y renal, mediando en el bombeo de xenobióticos y toxinas a la luz intestinal, biliar y la orina. Además, tanto la glicoproteína-P como MRP2 se localizan conjuntamente junto con CYP3A4, glutatión-S-transferasas y UDP-glucuronosiltransferasas, lo que implica una actuación sinérgica en la regulación de la biodisponibilidad oral de los fármacos administrados.

Por todo ello, actualmente, el paclitaxel se formula para su uso en clínica y por vía intravenosa en un vehículo compuesto por Cremophor EL:etanol (1:1). Con el fin de prevenir y minimizar los efectos tóxicos del Cremophor EL por vía intravenosa y mejorar el índice terapéutico del fármaco, recientemente, se ha comercializado una nueva formulación basada en la encapsulación del fármaco en nanopartículas de albúmina denominadas Abraxane® (Green *et al.* Annals of Oncology 17:1263-1268, 2006).

Se dan a conocer nanopartículas que comprenden poli(cianoacrilato de alquilo), ciclodextrina y paclitaxel en el documento US 6.881.421.

Es necesario desarrollar sistemas de administración de fármacos que puedan aumentar, cuando se administran por

vía oral, la biodisponibilidad de varios principios activos, especialmente, de aquellos fármacos de naturaleza lipófila y/o que sean sustrato de la glicoproteína-P (por ejemplo, paclitaxel). Ventajosamente, dichos sistemas de administración deben tener propiedades bioadhesivas, deben tener la capacidad de incorporar cantidades variables de fármacos lipófilos e, idealmente, deben poder evitar el efecto de la glicoproteína-P sobre el fármaco transportado. Estos objetivos pueden lograrse mediante las nanopartículas proporcionadas por la presente invención.

### Sumario de la invención

Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que la asociación de las nanopartículas del polímero biodegradable copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA), con ciclodextrinas unidas a moléculas biológicamente activas, permite obtener nanopartículas con características fisicoquímicas y características de bioadhesión a la mucosa gastrointestinal que las convierten en sistemas de gran interés como transportadores de todo tipo de moléculas biológicamente activas, especialmente, moléculas biológicamente activas hidrófobas (lipófilas), tales como paclitaxel. Dichas nanopartículas pueden prolongar el tiempo de residencia en la mucosa tras su administración oral. Además, dichas nanopartículas pueden mejorar la biodisponibilidad de moléculas biológicamente activas que pueden ser un sustrato de la glicoproteína-P. Asimismo, dichas nanopartículas pueden utilizarse como sistemas para la administración de fármacos con alta toxicidad (por ejemplo, citostáticos) al ofrecer niveles plasmáticos sostenidos y constantes de la molécula biológicamente activa durante periodos de tiempo de hasta 24 horas, lo que posibilita tratamientos alternativos a la perfusión hospitalaria, permitiendo una reducción del coste sanitario de los tratamientos con este tipo de fármacos.

Por tanto, la invención proporciona nanopartículas con capacidad para asociar grandes cantidades de moléculas biológicamente activas, especialmente, de naturaleza hidrófoba, para su administración eficaz a través de mucosas, especialmente, por vía oral, debido al hecho de que presentan características bioadhesivas adecuadas que favorecen la interacción de las nanopartículas (que contienen la molécula biológicamente activa) con la superficie de la mucosa y, sobre todo, pueden liberar la molécula biológicamente activa proporcionando unos niveles plasmáticos sostenidos y constantes de la misma cuando se administran por vía oral o a través de cualquier otra mucosa del organismo. Debido a que la molécula biológicamente activa transportada es sustrato de la glicoproteína-P, las nanopartículas pueden evitar la acción de esta proteína sobre la molécula biológicamente activa en cuestión.

Las nanopartículas proporcionadas por esta invención comprenden un polímero biodegradable, una ciclodextrina o un derivado de la misma, y la molécula biológicamente activa paclitaxel, tal como se define en las reivindicaciones. Se ha encontrado que nanopartículas formadas por un copolímero de polivinil metil éter y anhídrido maleico y  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (OH- $\beta$ -CD) o 6-monodesoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina (NH- $\beta$ -CD) son fáciles de producir y proporcionan excelentes características de bioadhesión, tamaño y potencial zeta que las hace adecuadas para la administración de la molécula biológicamente activa hidrófoba paclitaxel. Además, se ha encontrado que la selección del tipo de ciclodextrina utilizada en su producción permite modular adecuadamente las características de estas nanopartículas, lo que puede usarse ventajosamente según el tipo de molécula biológicamente activa que va a transportarse y/o el método de administración de la formulación farmacéutica. Por último, se ha encontrado que la incorporación del paclitaxel en estas nanopartículas permite aumentar de forma muy importante la biodisponibilidad oral del mismo, minimizando el efecto de la glicoproteína-P a nivel de la mucosa gastrointestinal.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a nanopartículas que comprenden un polímero biodegradable, una ciclodextrina o un derivado de la misma, y una molécula biológicamente activa, útiles para el transporte de moléculas biológicamente activas. El polímero biodegradable es un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA). La ciclodextrina es una ciclodextrina que tiene al menos un grupo hidroxilo terminal modificado. En una realización particular, la ciclodextrina es  $\beta$ -CD, OH- $\beta$ -CD o NH- $\beta$ -CD.

La molécula biológicamente activa presente en las nanopartículas de la invención es paclitaxel. En este caso, las nanopartículas permiten aumentos espectaculares de la biodisponibilidad oral del paclitaxel, cuya absorción oral es prácticamente nula debido a sus características fisicoquímicas (elevada lipofiliidad) y al hecho de que es un sustrato de la glicoproteína-P localizada en el tracto gastrointestinal.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende dichas nanopartículas.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de dichas nanopartículas.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una gráfica que muestra la variación de la cantidad de ciclodextrina (CD) asociada a las nanopartículas de PMV/MA según el tipo de CD utilizada [ $\beta$ -CD:  $\beta$ -ciclodextrina; OH- $\beta$ -CD: 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina; NH- $\beta$ -CD: 6-monodesoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina] y del tiempo de incubación de esta última con el copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) (100 mg) antes de la preparación de las nanopartículas. Los resultados muestran la media  $\pm$  desviación estándar (n = 8).

La figura 2 es una fotografía del resultado obtenido al someter una muestra liofilizada de nanopartículas a base de

PVM/MA con  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD-NP) a microscopía electrónica de barrido.

La figura 3 es un gráfico que muestra la liberación de RBITC desde nanopartículas que contienen ciclodextrinas ( $\beta$ -CD-NP: nanopartículas a base de PVM/MA con  $\beta$ -CD; OH- $\beta$ -CD-NP: nanopartículas a base de PVM/MA con OH- $\beta$ -CD; NH- $\beta$ -CD-NP: nanopartículas a base de PVM/MA con NH- $\beta$ -CD) y desde las nanopartículas control (NP) tras su incubación en medio gástrico simulado (durante la primera hora: 0-1 h) y en medio intestinal simulado (de 1 a 24 h) a  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ).

La figura 4 muestra un gráfico de barras que representa la distribución de (A) nanopartículas a base de PVM/MA con hidroxipropil- $\beta$ -CD (OH- $\beta$ -CD-NP); (B) nanopartículas a base de PVM/MA con  $\beta$ -CD; y (C) nanopartículas control (NP), en la mucosa del tracto gastrointestinal tras la administración oral de 10 mg de nanopartículas marcadas fluorescentemente con RBITC. El eje x representa los diferentes segmentos de la mucosa; el eje y representa la fracción de nanopartículas adheridas a la mucosa; y el eje z representa el tiempo después de la administración.

La figura 5 es un gráfico que muestra las curvas de bioadhesión obtenidas al representar la fracción de nanopartículas adheridas en el tracto gastrointestinal entero respecto al tiempo. Las formulaciones representadas son ( $\bullet$ ) OH- $\beta$ -CD-NP; ( $\blacktriangle$ )  $\beta$ -CD-NP; y ( $\blacksquare$ ) NP Control. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ).

La figura 6 es un conjunto de fotografías que muestran la visualización por microscopía de fluorescencia de las nanopartículas control (A) y OH- $\beta$ -CD-NP (B, C) adheridas al íleon de rata tras 2 horas de la administración oral de una única dosis de 10 mg.

La figura 7 es un gráfico que muestra la evolución de la cantidad de paclitaxel (PTX) encapsulado en diferentes formulaciones en función del tipo de ciclodextrina utilizada y la cantidad de fármaco añadido inicialmente. Los resultados muestran la media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 6$ ). PTX-NP: nanopartículas convencionales de PVM/MA con paclitaxel; PTX- $\beta$ -CD-NP: nanopartículas de PVM/MA y  $\beta$ -CD con paclitaxel; PTX-OH- $\beta$ -CD-NP: nanopartículas de PVM/MA y OH- $\beta$ -CD con paclitaxel; y PTX-NH- $\beta$ -CD-NP: nanopartículas de PVM/MA y NH- $\beta$ -CD con paclitaxel.

La figura 8 es un conjunto de gráficos que representan las concentraciones plasmáticas de paclitaxel (PTX) en función del tiempo tras la administración en animales de laboratorio de las distintas formulaciones de PTX. Los resultados muestran la media  $\pm$  desviación estándar. (A) Vía intravenosa, dosis: 10 mg/kg. Taxol®: formulación comercial de paclitaxel. (B) Vía oral, dosis: 10 mg/kg. Taxol®: formulación comercial de paclitaxel; PTX- $\beta$ -CD: complejo  $\beta$ -CD con paclitaxel; PTX-OH- $\beta$ -CD: complejo OH- $\beta$ -CD con paclitaxel; PTX-NH- $\beta$ -CD: complejo NH- $\beta$ -CD con paclitaxel. (C) Vía oral, dosis: 10 mg/kg. PTX-NP: nanopartículas convencionales de PVM/MA con paclitaxel; PTX- $\beta$ -CD-NP: nanopartículas de PVM/MA y  $\beta$ -CD con paclitaxel; PTX-OH- $\beta$ -CD-NP: nanopartículas de PVM/MA y OH- $\beta$ -CD con paclitaxel; PTX-NH- $\beta$ -CD-NP: nanopartículas de PVM/MA y NH- $\beta$ -CD con paclitaxel; Taxol®: formulación comercial con paclitaxel. Los valores obtenidos para la formulación de taxol comercial y PTX-NP se superponen y aparecen sobre el eje de las X (tabla 9).

## Descripción detallada de la invención

### Nanopartículas

En un aspecto, la invención se refiere a nanopartículas, en adelante nanopartículas de la invención, que comprenden un polímero biodegradable, una ciclodextrina o un derivado de la misma, y una molécula biológicamente activa, en las que dicho polímero biodegradable es un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA), dicho derivado de ciclodextrina es una ciclodextrina que tiene al menos un grupo hidroxilo terminal modificado y dicha molécula biológicamente activa es paclitaxel.

Las nanopartículas de la invención poseen características fisicoquímicas adecuadas, características de especificidad y de bioadhesión a la mucosa gastrointestinal, lo que las convierte en sistemas potencialmente útiles para el transporte de paclitaxel, que es un sustrato de glicoproteína-P. Las nanopartículas pueden mejorar la biodisponibilidad de moléculas biológicamente activas. De hecho, las nanopartículas pueden prolongar el tiempo de residencia en la mucosa tras su administración por vía oral. Asimismo, las nanopartículas pueden usarse como sistema de transporte de moléculas biológicamente activas con elevada toxicidad, por ejemplo, citostáticos, debido al hecho de que ofrecen niveles plasmáticos sostenidos y constantes de tales fármacos durante periodos de tiempo de hasta 24 horas, lo que permite el diseño de tratamientos alternativos a la perfusión hospitalaria, dando como resultado la reducción del coste sanitario de los tratamientos con este tipo de fármacos.

El término "nanopartícula", tal como se usa en el presente documento, se refiere a esferas o formas similares con un tamaño medio inferior a 1,0 micrómetro ( $\mu\text{m}$ ). En general, las nanopartículas tienen un tamaño medio de partícula comprendido entre 1 y 999 nanómetros (nm), preferentemente entre 10 y 900 nm. En una realización particular, las nanopartículas presentan un tamaño medio de partícula comprendido entre 100 y 400 nm.

Por "tamaño medio" se entiende el diámetro medio de la población de nanopartículas que se mueve conjuntamente en un medio acuoso. El tamaño medio de estos sistemas puede medirse por procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia y que se describen, a modo ilustrativo, en la parte experimental que

acompaña a los ejemplos descritos más adelante. El tamaño medio de partícula puede verse influenciado principalmente por la cantidad y el peso molecular del polímero biodegradable, por la naturaleza y cantidad de la ciclodextrina, o derivado de la misma, y por la naturaleza y cantidad de la molécula biológicamente activa, presentes en las nanopartículas (en general, a mayor cantidad o peso molecular de dichos componentes, el tamaño medio de la nanopartícula aumentará), y por algunos parámetros del procedimiento de producción de dichas nanopartículas, tales como la velocidad de agitación, etc.

#### Polímero biodegradable

Las nanopartículas de la invención comprenden un polímero biodegradable. El término "biodegradable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a polímeros que se disuelven o degradan en un periodo de tiempo que es aceptable para la aplicación deseada, en este caso terapia *in vivo*, una vez que se exponen a una disolución fisiológica con un pH comprendido entre 1 y 9, normalmente, entre 4 y 9, a una temperatura comprendida entre 25°C y 40°C.

El polímero biodegradable utilizado es el copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico en forma anhídrida (PVM/MA). En una realización concreta puede utilizarse, por ejemplo, el copolímero de PVM/MA comercializado con la denominación comercial Gantrez® AN. En una realización particular, dicho copolímero de PVM/MA tiene un peso molecular comprendido entre 100 y 2.400 kDa, preferentemente entre 200 y 2.000 kDa, más preferentemente entre 180 y 250 kDa. Este polímero biodegradable (PVM/MA) resulta particularmente ventajoso ya que se utiliza ampliamente en tecnología farmacéutica debido a su baja toxicidad ( $DL_{50} = 8-9$  g/kg por vía oral) y excelente biocompatibilidad. Además, es fácil de obtener, tanto por la cantidad como por su precio. Este polímero biodegradable (PVM/MA) puede reaccionar con distintas sustancias hidrófilas, debido a la presencia de sus grupos anhídridos, sin tener que recurrir a reactivos orgánicos habituales (glutaraldehído, derivados de carbodiimida, etc.) que poseen una toxicidad considerable. En un medio acuoso, el copolímero de PVM/MA es insoluble, pero sus grupos anhídrido se hidrolizan dando lugar a grupos carboxílicos. La disolución es lenta y depende de las condiciones en las que se produce. Debido a la disponibilidad de grupos funcionales en PVM/MA, la unión covalente de moléculas con grupos nucleófilos, tales como hidróxido o amino, tiene lugar por simple incubación en un medio acuoso.

La solicitud de patente internacional WO 02/069938 describe nanopartículas de copolímero de PVM/MA. A modo ilustrativo, dichas nanopartículas de copolímero de PVM/MA pueden obtenerse fácilmente por desolvatación del copolímero, mediante la adición, a una disolución orgánica del mismo, de un primer disolvente polar (miscible con una disolución del copolímero) y posterior adición de un segundo líquido no disolvente, tal como una disolución hidroalcohólica. Opcionalmente, puede añadirse un agente reticulante.

#### Ciclodextrina y sus derivados

Las nanopartículas de la invención comprenden, además del polímero biodegradable, una ciclodextrina o un derivado de la misma.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término "ciclodextrina" incluye cualquier oligosacárido cíclico compuesto por unidades de glucosa unidas por enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,4 ( $\alpha$ -1,4-glucopiranosas). Estas unidades se producen como resultado de una reacción de transglicosilación intramolecular de la degradación del almidón por la enzima ciclodextrina glucanotransferasa (CGTasa).

La "ciclodextrina" puede contener más de 15 unidades de  $\alpha$ -1,4-glucopiranosas, aunque las más abundantes contienen 6, 7 u 8 unidades de  $\alpha$ -1,4-glucopiranosas, formando las denominadas alfa-ciclodextrinas ( $\alpha$ -CD), beta-ciclodextrinas ( $\beta$ -CD) o gamma-ciclodextrinas ( $\gamma$ -CD), respectivamente. Todas ellas tienen una estructura de tipo cono truncado, con una cavidad interna hidrófoba y una cara externa hidrófila. Esto se debe a que los grupos hidroxilo se encuentran orientados hacia el exterior de la ciclodextrina mientras que en su cavidad interna hidrófoba está cubierta por los hidrógenos del grupo metileno así como por oxígenos tipo éter. Por tanto puede actuar como hospedador atrapando a la molécula huésped de forma completa o parcial. En una realización particular, dicha ciclodextrina es una alfa-ciclodextrina, una beta-ciclodextrina o una gamma-ciclodextrina.

El término "derivado de ciclodextrina", tal como se utiliza en esta descripción, incluye cualquier ciclodextrina que presenta, al menos, un grupo hidroxilo terminal modificado. La modificación química de las ciclodextrinas puede alterar sus propiedades quimicofísicas, mejorando la solubilidad, estabilidad y controlando la actividad química de las moléculas con las que están unidas (moléculas huésped). Se ha descrito la incorporación, mediante reacción de los grupos OH de las ciclodextrinas, de grupos alquilo, arilo, carboxialquilo, cianoalquilo, hidroxialquilo, sulfoalquilo, amino, azido, heterocíclicos, acetilo, benzoilo, succinilo, y otros grupos que contienen fósforo, azufre, etc. (Robyt (1998) "Essentials of carbohydrate chemistry", Ed. Charles R. Cantor, Springer Advanced Text in Chemistry). En una realización particular, al menos, uno de dichos grupos hidroxilo terminales se modifica, sustituyendo el hidrógeno por un grupo alquilo  $C_1-C_8$  lineal o ramificado, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, etc.; trialquil( $C_1-C_8$ )silo, por ejemplo, t-butildimetilsilo, etc.; hidroxialquilo  $C_1-C_8$ , por ejemplo, 2-hidroxietilo, 2-hidroxipropilo, etc.; alquil( $C_1-C_8$ )carbonilo, opcionalmente sustituido con un grupo carboxilo, por ejemplo, acetilo, succinilo, etc.; arilcarbonilo, por ejemplo, benzoilo, etc.; cianoalquilo ( $C_1-C_2$ ), por ejemplo, cianometilo, cianoetilo; amino, opcionalmente sustituido; azido;

sulfo; sulfoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>); o por un radical de un sacárido, por ejemplo, glucosilo, manosilo, etc. En otra realización particular, dos o más de los grupos hidroxilo terminales de una CD, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, ó 7 grupos hidroxilo terminales presentes en una β-CD, se modifican por alguno de dichos grupos.

5 Las ciclodextrinas originales (es decir, sin derivatizar), en particular, la β-CD, tienen una solubilidad acuosa limitada en comparación con los sacáridos acíclicos debido, en parte, a los fuertes enlaces entre las moléculas de la ciclodextrina en estado cristalino. Además, la β-CD puede formar enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los grupos hidroxilo secundarios produciendo así entalpías de disolución desfavorables y, por tanto, una baja solubilidad acuosa. La sustitución de cualquiera de los enlaces de hidrógeno por grupos hidrófobos, tales como metoxi- o etoxi-, da como resultado el aumento de la solubilidad acuosa. Por ejemplo, la solubilidad acuosa de la β-CD es del 1,85% (p/v) a temperatura ambiente, pero podría aumentar hasta 150 veces al aumentar el grado de metilación (metil-β-CD). Otro derivado de ciclodextrina particularmente importante es la 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina (OH-β-CD), obtenida tras el tratamiento de la β-CD con óxido de propileno, que tiene una solubilidad acuosa del 60% (p/v). Igualmente, estos derivados pueden mejorar el perfil toxicológico, la capacidad para encapsular moléculas biológicamente activas y modular su perfil de liberación. El principal problema de las ciclodextrinas originales es la nefrotoxicidad tras administrarse por vía parenteral, principalmente para la β-CD, debido a su baja solubilidad acuosa. Por tanto, los derivados más hidrófilos, tales como la OH-β-CD, disminuyen esos problemas de nefrotoxicidad al poder eliminarse más fácilmente. No ocurre lo mismo para los derivados metilados de la β-CD que, a pesar de ser más soluble que la β-CD, no estarían exentos de provocar toxicidad sistémica, debido a su mayor capacidad para interactuar con lípidos endógenos, lo que limita su uso parenteral. Por el contrario, los estudios de toxicidad realizados tras la administración por vía oral muestran que las ciclodextrinas así como sus derivados no son tóxicas por esta vía.

Las ciclodextrinas son macromoléculas solubles en agua que han sido aprobadas para la administración oral, parenteral y tópica de fármacos. Las aplicaciones de las ciclodextrinas en la administración oral de fármacos se deben, principalmente, a la mejora en la biodisponibilidad oral del fármaco, debido al aumento de la solubilidad, aumento de la estabilidad del fármaco en el tracto gastrointestinal y/o en la formulación. Además, para determinados fármacos, resulta interesante el potencial de las ciclodextrinas en la reducción de la irritación local producida por el propio fármaco, el control de la liberación del fármaco a lo largo de todo el tracto gastrointestinal o el enmascaramiento de características organolépticas desagradables, entre otros. Tal es el caso del itraconazol, que se comercializa en los EE.UU. y Europa asociado a la OH-β-CD para su administración oral, reduciéndose de manera importante la irritación provocada en el tracto gastrointestinal cuando se administra de una manera aislada.

Por otro lado, las ciclodextrinas también se utilizan por su capacidad de aumentar la permeabilidad del fármaco a través de la piel y las mucosas, lo que produce una mejor absorción y más uniforme del fármaco. Esto conduce a un aumento de la actividad de fármaco tras su administración, tal como, por ejemplo, el complejo formado entre flutamida y OH-β-CD, que mejora sustancialmente la absorción del fármaco tras su administración por vía oral.

35 En una realización particular, dicho derivado de ciclodextrina es un derivado de alfa-ciclodextrina, o un derivado de beta-ciclodextrina, o un derivado de gamma-ciclodextrina. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de derivados de ciclodextrina que pueden usarse para la puesta en práctica de la presente invención incluyen etil-β-CD, heptakis(2,3,6-tri-O-etil)-β-CD, 2-hidroxiopropil-β-CD, 2-O-2-hidroxiopropil-β-CD, 2-hidroxietyl-β-CD, derivados succinilados de β-CD, derivados succinilados de 2-hidroxi-propil-β-CD, butil-β-CD, heptakis(2,6-di-O-n-butyl)-β-CD, heptakis(2,6-di-O-n-pentil)-β-CD, metil-β-CD, metil-β-CD, carboximetil-β-CD, carboxietyl-β-CD, heptakis(2,6-di-O-metil)-β-CD, heptakis(2,3,6-tri-O-metil)-β-CD, acetil-β-CD, heptakis(3-O-acetil-2,6-di-O-n-pentil)-β-CD, heptakis(3-O-acetil-2,6-di-O-metil)-β-CD, sulfo-β-CD, sulfa-propil-β-CD, n-butyl-β-CD, heptakis(3-O-n-butiril-2,6-di-O-pentil)-β-CD, 2-cianoetil-β-CD, 6-monodesoxi-6-monoazido-β-CD, heptakis(2,3,6-tri-O-bencil)-β-CD, heptakis(2,3,6-tri-O-benzoil)-β-CD, 6-monodesoxi-6-monoamino-β-CD, heptakis(2,6-di-O-n-pentil-3-O-trifluoroacetil)-β-CD, heptakis(2,3,6-tri-O-n-octil)-β-CD, heptakis(2,3-di-O-acetil-6-O-terc-butildimetilsilil)-β-CD, heptakis(6-O-terc-butildimetilsilil)-β-CD, heptakis(6-O-terc-butildimetilsilil-2,3-di-O-metil)-β-CD, heptakis(2,6-di-terc-butildimetilsilil)-β-CD, heptakis(2,3,6-tri-O-trifluoroacetil)-β-CD, heptakis(2,6-di-O-metil-3-O-n-pentil)-β-CD.

La razón en peso entre la ciclodextrina, o derivado de la misma, y el polímero biodegradable PVM/MA puede variar dentro de un amplio intervalo, en una realización particular, dicha razón en peso de ciclodextrina (o derivado de la misma): polímero biodegradable es de 1:1-10, preferentemente de 1:1-5, más preferentemente alrededor de 1:4.

Tal como se ha mencionado previamente, en aplicaciones farmacéuticas, la β-CD y sus derivados son los más utilizados, en particular, la 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina (OH-β-CD) ya que presenta una elevada solubilidad acuosa, una baja toxicidad y una cavidad más hidrófoba que la de la β-CD.

55 En una realización particular, la ciclodextrina presente en las nanopartículas de la invención no tiene ningún grupo hidroxilo sustituido. En una realización específica, dicha ciclodextrina es la beta-ciclodextrina (β-CD), que contiene 7 unidades de α-1,4-glucopiranosas. Aunque la razón en peso de β-CD:polímero biodegradable es de 1:1-10, preferentemente de 1:1-5, razones de 1:4 dan buenos resultados. A modo ilustrativo, aproximadamente 0,25 mg de β-CD/mg polímero biodegradable dan una asociación eficaz. En este caso, la cantidad de β-CD asociada a las

nanopartículas es de aproximadamente 90 microgramos/mg de nanopartícula. Estas nanopartículas se caracterizan por tener, en general, forma esférica y un tamaño cercano a los 150 nm.

En otra realización particular, la ciclodextrina presente en las nanopartículas de la invención es un derivado más hidrófilo de la  $\beta$ -CD, tal como un derivado hidroxilado de la  $\beta$ -CD que comprende uno o más grupos hidroxialquilo (por ejemplo, hidroxipropilo). En una realización particular preferida se utiliza la 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (OH- $\beta$ -CD). La razón en peso de OH- $\beta$ -CD:polímero biodegradable es de 1:1-10, preferentemente de 1:1-5, aunque una razón en peso de 1:4 da buenos resultados. A modo ilustrativo, aproximadamente 0,25 mg de OH- $\beta$ -CD/mg polímero biodegradable dan una asociación eficaz. En este caso, la cantidad de  $\beta$ -CD asociada a las nanopartículas es de aproximadamente 65 microgramos/mg de nanopartícula. Estas nanopartículas se caracterizan por tener, en general, forma esférica y un tamaño cercano a los 150 nm.

En otra realización particular, la ciclodextrina presente en las nanopartículas de la invención es un derivado de una CD que presenta uno o más grupos funcionales terminales diferentes al hidroxilo, por ejemplo, uno o más grupos amino, opcionalmente sustituidos. Los grupos amino, a su vez, pueden estar sustituidos y presentar otros grupos funcionales, por ejemplo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; los ejemplos ilustrativos de dichos grupos amino sustituidos incluyen metilamina, etilamina, dietilamina, etc. En una realización particular preferida, dicho grupo amino es un grupo amino libre, sin sustitución (-NH<sub>2</sub>). En varios ensayos realizados, se ha observado que con dichos grupos, las nanopartículas de la invención administradas por vía oral se acumulan sobre ciertos segmentos del tracto intestinal, lo que permite una administración específica. En una realización específica, el derivado de ciclodextrina presente en las nanopartículas de la invención es la 6-monodesoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina (NH- $\beta$ -CD). La razón en peso de NH- $\beta$ -CD:polímero biodegradable es de 1:1-10, preferentemente de 1:1-5, aunque razones de 1:4 dan buenos resultados. Estas nanopartículas se caracterizan por tener, en general, forma esférica y un tamaño cercano a los 150 nm.

En una realización particular, la ciclodextrina, o derivado de la misma, presente en las nanopartículas de la invención se selecciona del grupo que consiste en  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (OH- $\beta$ -CD), 6-monodesoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina (NH- $\beta$ -CD) y mezclas de las mismas.

Varios ensayos realizados por los inventores han mostrado que las nanopartículas a base de un polímero biodegradable que contienen ciclodextrina permiten la formación de interacciones bioadhesivas directas entre estos vehículos (nanopartículas) y componentes de la superficie del tracto gastrointestinal. Este estrecho contacto es de interés para aumentar la biodisponibilidad de moléculas biológicamente activas cuando se administran a través de cualquier vía que dé acceso a una mucosa (por ejemplo, vía oral, rectal, vaginal, ocular o nasal).

Las nanopartículas a base de un polímero biodegradable (PVM/MA) que contienen ciclodextrina (nanopartículas vacías, es decir, sin la molécula biológicamente activa) pueden obtenerse por un procedimiento basado en el método de desplazamiento del disolvente descrito, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 02/069938. A modo ilustrativo, dichas nanopartículas vacías que comprenden un polímero biodegradable (por ejemplo, PVM/MA) y una ciclodextrina, o un derivado de la misma, pueden obtenerse por dos procedimientos alternativos, específicamente, mediante incubación simultánea de los dos componentes, el polímero biodegradable (por ejemplo, PVM/MA) y ciclodextrina o derivado de la misma (por ejemplo,  $\beta$ -CD, OH- $\beta$ -CD o NH- $\beta$ -CD) en la fase orgánica [alternativa 1], o mediante incubación de las nanopartículas de polímero biodegradable (por ejemplo, PVM/MA) con una disolución acuosa de ciclodextrina, o un derivado de la misma (por ejemplo,  $\beta$ -CD, OH- $\beta$ -CD o NH- $\beta$ -CD) [alternativa 2].

#### Molécula biológicamente activa

Las nanopartículas de la invención comprenden, además del polímero biodegradable y una ciclodextrina o un derivado de la misma, una molécula biológicamente activa.

Las nanopartículas pueden incorporar una o más moléculas biológicamente activas independientemente de las características de solubilidad de las mismas, aunque, dichas nanopartículas han demostrado ser un sistema particularmente útil para la administración de moléculas biológicamente activas hidrófobas.

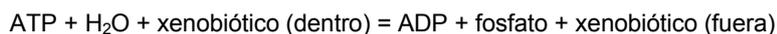
Las nanopartículas permiten modificar la distribución de la molécula biológicamente activa que contienen cuando se administran por una vía que da acceso a cualquier mucosa del organismo (por ejemplo, oral, rectal, nasal, vaginal, ocular, etc.).

La molécula biológicamente activa presente en las nanopartículas de la invención, paclitaxel, es una sustancia que es un sustrato de la glicoproteína-P. De hecho, una importante aplicación de las nanopartículas radica en su capacidad para minimizar el efecto negativo de la glicoproteína-P sobre la absorción a través de mucosas de un determinado fármaco.

Tal como se sabe, la glicoproteína-P (PGY1; enzima EC 3.6.3.44) es una proteína que, en seres humanos, está codificada por el gen *ABCB1*, también denominado gen *MDR1* (*multidrug resistance 1*). La glicoproteína-P actúa como una bomba o transportador transmembrana que transfiere sus sustratos (generalmente fármacos y otros

5 xenobióticos) desde su dominio intracelular a su dominio extracelular. Dependiendo de su ubicación anatómica, la glicoproteína-P realiza su función de 3 formas principales: (1) la glicoproteína-P limita la entrada de la sustancia farmacológica en el organismo después de su administración oral como resultado de su expresión en la membrana luminal de los enterocitos; (2) una vez que el fármaco ha alcanzado la circulación sanguínea, la glicoproteína-P promueve su eliminación en la bilis y en la orina, como resultado de su expresión en la membrana canalicular de los hepatocitos y en la membrana luminal de las células de los túbulos proximales del riñón; y (3) una vez en la circulación sanguínea sistémica, limita la penetración del fármaco en tejidos sensibles.

10 Por tanto, una sustancia sustrato de la glicoproteína-P se refiere a una sustancia, por ejemplo, un xenobiótico, con la afinidad para unirse al dominio intracelular de la glicoproteína-P de manera que, mediante consumo de ATP, puede transportarse al exterior de la célula según la siguiente reacción:



La molécula biológicamente activa presente en las nanopartículas de la invención es paclitaxel.

15 La composición farmacéutica puede comprender nanopartículas que contienen uno o más fármacos diferentes. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos fármacos incluyen agentes pertenecientes a distintos grupos terapéuticos, por ejemplo, agentes anti-tumorales, antagonistas de receptores adrenérgicos  $\beta$ , agentes analgésicos, bloqueantes de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , fármacos cardiotónicos, agentes antivirales, esteroides, inmunosupresores, fármacos antieméticos, antibióticos (por ejemplo, antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antiparasitarios, etc.), agentes antilipídicos, antagonistas de receptores  $\text{H}_1$  de histamina, agentes antiinflamatorios, neuroprotectores, antialérgicos, agentes antiasmáticos, antibióticos, tensioactivos pulmonares, etc.

20 Tal como puede observarse, algunas moléculas biológicamente activas que son un sustrato de la glicoproteína-P tienen naturaleza hidrófoba. Asimismo, el sistema de administración de moléculas biológicamente activas contempla la posibilidad de administrar fármacos de varios grupos terapéuticos.

25 La composición farmacéutica puede comprender nanopartículas de la invención que contienen uno o más antígenos diferentes con fines de vacuna o uno o más alérgenos diferentes con fines inmunoterapéuticos como molécula biológicamente activa.

30 Tal como se utiliza en esta descripción, el término "antígeno" se refiere a cualquier sustancia que pueda reconocerse por el sistema inmunitario de un sujeto y/o que pueda inducir en un sujeto una respuesta inmunitaria humoral o una respuesta inmunitaria celular que conduce a la activación de linfocitos B y/o T cuando se introduce en un sujeto; a modo ilustrativo, dicho término incluye cualquier producto inmunogénico, nativo o recombinante, obtenido de un organismo superior o de un microorganismo, por ejemplo, una bacteria, un virus, un parásito, un protozoo, un hongo, etc., que contiene uno o más determinantes antigénicos, por ejemplo, componentes estructurales de dichos organismos; toxinas, por ejemplo, exotoxinas, etc. Prácticamente cualquier antígeno puede usarse en la elaboración de nanopartículas cargadas con antígeno. A modo ilustrativo, no limitativo, el término "antígeno" incluye:

- 35 - antígenos "microbianos", es decir, antígenos de microorganismos, incluyendo, pero sin limitarse a, virus, bacterias, hongos y parásitos infecciosos; dichos antígenos incluyen el microorganismo intacto así como partes, fragmentos y derivados de los mismos, de origen natural o artificial, así como productos sintéticos o recombinantes que son idénticos o similares a los antígenos naturales de un microorganismo e inducen una respuesta inmunitaria específica para ese microorganismo; en este sentido, un compuesto es similar a un antígeno natural de un microorganismo si induce una respuesta inmunitaria (humoral y/o celular) como la del antígeno natural de ese microorganismo; dichos antígenos los utilizan de forma rutinaria los expertos en la técnica; y
- 40 - antígenos "tumorales", es decir, sustancias, por ejemplo, péptidos, asociadas a un tumor o a un cáncer ("marcador tumoral"), que pueden provocar una respuesta inmunitaria, en particular, cuando se presentan en el contexto de una molécula del CMH, por ejemplo, Her2 (cáncer de mama); GD2 (neuroblastoma); EGF-R (glioblastoma maligno); CEA (cáncer de tiroides medular); CD52 (leucemia); proteína gp100 de melanoma humano; proteína melan-A/MART-1 de melanoma humano; tirosinasa; proteína NA17-A nt; proteína MAGE-3; proteína p53; proteína HPV16E7; fragmentos antigénicos de dichos antígenos; etc.

50 Tal como se utiliza en esta descripción, el término "alérgeno" se refiere a una sustancia a la que un sujeto es sensible y provoca una reacción inmunitaria, por ejemplo, extractos de alérgenos de polen, extractos de alérgenos de insectos, extractos de alérgenos de alimentos o productos alimenticios, componentes presentes en saliva, pinzas o agujones de insectos que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, componentes presentes en plantas que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, etc., por ejemplo, extractos proteicos de polen, tal como polen de gramíneas, extractos alergénicos de *Lolium perenne*, extractos alergénicos de *Olea* (olivo), etc.; extractos proteicos de insectos, tales como de ácaros del polvo, etc.; extractos alergénicos de componentes alimentarios, etc.

55 Prácticamente cualquier alérgeno puede usarse en la elaboración de las nanopartículas cargadas con alérgeno, por ejemplo ovoalbúmina (OVA), una proteína ampliamente utilizada como modelo alergénico experimental.

Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas moléculas biológicamente activas que pueden contener las nanopartículas incluyen antígenos bacterianos: antígenos citoplasmáticos, periplásmicos, de la envuelta celular (por ejemplo, proteínas de membrana interna, proteínas de membrana externa, lipopolisacáridos y complejos mixtos, proteínas asociadas a la pared celular, etc.), etc.; antígenos de estructuras superficiales (por ejemplo, fimbrias, glicocáliz, flagelos, etc.), incluyendo los de patógenos intracelulares, tales como por ejemplo *Brucella* sp., *Salmonella* sp., etc; antígenos tanto solubles como superficiales de microorganismos eucariotas; antígenos virales, por ejemplo, antígenos de la matriz, cápside, envuelta, internos (incluyendo enzimáticos), alérgenos de especies animales (ácaros, etc.), de plantas (gramíneas, etc.), etc.

Las nanopartículas de la invención pueden obtenerse mediante un procedimiento basado en el método de desplazamiento del disolvente descrito, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 02/069938, que comprende (i) la formación de un complejo (ciclodextrina o derivado de la misma)-(molécula biológicamente activa), en adelante complejo [CD:MBA], y (ii) la incorporación de dicho complejo [CD:MBA] en una disolución del polímero biodegradable en un disolvente orgánico antes de la formación de nanopartículas.

Brevemente, la formación de dicho complejo [CD:MBA] comprende la adición de una disolución de la molécula biológicamente activa (MBA) en un disolvente orgánico, tal como un alcohol, por ejemplo, etanol, a una disolución acuosa de la ciclodextrina o derivado de la misma (CD). La mezcla se somete a agitación hasta alcanzar el equilibrio. Posteriormente, se eliminan el agua y el disolvente orgánico (por ejemplo, etanol) por cualquier método convencional apropiado, por ejemplo, bajo evaporación reducida o cualquier otro sistema de eliminación de disolventes.

La razón molar CD:MBA presente en dicho complejo [CD:MBA] puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo, entre otros factores, de la ciclodextrina o derivado de la misma (CD) y de la molécula biológicamente activa (MBA) presentes en dicho complejo; no obstante, en una realización particular, la razón molar CD:MBA presente en dicho complejo [CD:MBA] es de 1:1-4, normalmente 1:1-2. En una realización concreta, cuando la molécula biológicamente activa es paclitaxel, la razón molar CD:MBA en dicho complejo [CD:MBA] es de 1:1.

La incorporación de dicho complejo [CD:MBA] en una disolución del polímero biodegradable en un disolvente orgánico antes de la formación de nanopartículas puede llevarse a cabo mediante la adición de dicho complejo a la disolución de polímero biodegradable y posterior incubación simultánea de ambos componentes, polímero biodegradable (por ejemplo, PVM/MA) y complejo [CD:MBA], en la fase orgánica (por ejemplo, acetona) que comprende el polímero biodegradable (por ejemplo, PVM/MA), durante un periodo de tiempo apropiado, por ejemplo 30 minutos a temperatura ambiente (25°C), bajo agitación, por ejemplo, mediante el uso de un agitador mecánico, magnético o ultrasonidos; operando de esta manera, se obtiene, en general, un alto grado de asociación del complejo [CD:MBA] al polímero biodegradable. Brevemente, esta etapa comprende la disolución y/o dispersión simultánea del polímero biodegradable y el complejo [CD:MBA] en un disolvente orgánico (por ejemplo, acetona). La incubación de la mezcla se realiza bajo agitación a temperatura ambiente durante un determinado periodo de tiempo. Preferentemente, la concentración del polímero biodegradable está comprendida entre el 0,001% y el 10% p/v y la del complejo [CD:MBA] entre el 0,001% y el 5% p/v. Opcionalmente, si se desea, se añade sobre dicha disolución un determinado volumen de un disolvente polar miscible con la disolución de los polímeros (por ejemplo, etanol). También, opcionalmente, si se desea, puede utilizarse un agente reticulante para mejorar la estabilidad de las nanopartículas, tal como se describe en el documento WO 02/069938. Los ejemplos ilustrativos de agentes reticulantes que pueden utilizarse incluyen moléculas diaminadas (por ejemplo, 1,3-diaminopropano, etc.), polisacáridos o sacáridos simples, proteínas y, en general, cualquier molécula que presente grupos funcionales que pueden reaccionar con los grupos presentes en el polímero biodegradable, por ejemplo, con los grupos anhídrido presentes en PVM/MA. No obstante, en general, no es necesario reticular pues esto se produce simultáneamente debido a la presencia de la ciclodextrina o derivado de la misma. En caso de que se deseara reticular, debe añadirse una pequeña cantidad de cualquiera de los productos indicados.

Entonces, para formar las nanopartículas de la invención, se añade sobre la mezcla anterior un volumen similar de un segundo líquido no disolvente, preferentemente una disolución hidroalcohólica. En una realización particular, se utiliza agua de calidad farmacéutica (agua purificada o agua para inyectables (p.i.), según la aplicación). Preferentemente, la razón fase orgánica:disolución hidroalcohólica está incluida dentro del intervalo comprendido entre 1:1 y 1:10 en volumen. Las nanopartículas se forman instantáneamente en el medio, bajo la apariencia de una suspensión lechosa. Los disolventes orgánicos pueden eliminarse por cualquier procedimiento adecuado tal como evaporación a presión reducida, quedando las nanopartículas en una suspensión acuosa estable. Si se desea, las nanopartículas pueden purificarse posiblemente por medios convencionales tales como centrifugación, ultracentrifugación, filtración tangencial o evaporación, incluyendo la utilización de vacío. Finalmente, si se desea, las nanopartículas pueden liofilizarse para su almacenamiento y conservación a largo plazo. Para facilitar la liofilización pueden utilizarse agentes crioprotectores comunes tales como sacarosa, lactosa o manitol, preferentemente en una concentración comprendida entre el 0,1 y el 10% en peso.

Alternativamente, las nanopartículas de la invención, a base de un polímero biodegradable, pueden obtenerse mediante un procedimiento que comprende la incubación de las nanopartículas de polímero biodegradable (PVM/MA) con una disolución acuosa que comprende el complejo [CD:MBA]. Esta alternativa comprende, brevemente, la disolución del polímero biodegradable en un disolvente orgánico, tal como acetona. Posteriormente,

sobre esa disolución, se añade un determinado volumen de disolución hidroalcohólica, tal como etanol, y, finalmente, un volumen similar de agua. Las nanopartículas se forman instantáneamente en el medio bajo la apariencia de una suspensión lechosa. Los disolventes orgánicos se eliminan de forma similar a como se ha descrito en el procedimiento anterior, por ejemplo, por evaporación a presión reducida, quedando las nanopartículas en una suspensión acuosa estable. Las nanopartículas de polímero biodegradable se incuban entonces en una disolución acuosa que comprende el complejo [CD:MBA] previamente obtenido. La incubación de las nanopartículas de polímero biodegradable con el complejo [CD:MBA] puede realizarse bajo agitación (por ejemplo, mediante el empleo de un agitador mecánico, magnético o de ultrasonidos) durante un periodo determinado de tiempo a una temperatura apropiada en condiciones similares a las mencionadas en relación con el procedimiento anterior (por ejemplo, durante un periodo de tiempo comprendido, en general, entre 10 y 60 minutos, a una temperatura comprendida entre 20°C y 30°C). Posteriormente, las nanopartículas se purifican por métodos convencionales, por ejemplo, centrifugación, y, finalmente, se liofilizan, si se desea, siguiendo los mismos procedimientos descritos anteriormente.

La razón ponderada MBA:polímero biodegradable presente en las nanopartículas de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo, entre otros factores, del polímero biodegradable (PVM/MA) y de la molécula biológicamente activa (MBA) presentes en dichas nanopartículas; no obstante, en una realización particular, la razón en peso MBA:polímero biodegradable presente en dichas nanopartículas de la invención es 1:4-20, preferentemente, 1:10.

La razón complejo [CD-MBA]:polímero biodegradable presente en las nanopartículas de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo, entre otros factores, del polímero biodegradable (PVM/MA), de la ciclodextrina o derivado de la misma y de la molécula biológicamente activa (MBA) presentes en dichas nanopartículas; no obstante, en una realización particular, la razón en peso complejo [CD-MBA]:polímero biodegradable presente en dichas nanopartículas de la invención es 1:1-20, ventajosamente 1:2-20, preferentemente, 3:10 (aproximadamente 1:3,3), en peso.

El polímero biodegradable es PVM/MA.

La molécula biológicamente activa es paclitaxel.

En una realización particular, el derivado de ciclodextrina es  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (OH- $\beta$ -CD) o 6-monodesoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina (NH- $\beta$ -CD).

En otra realización particular, la razón molar (ciclodextrina o derivado de la misma):paclitaxel es de 1:1.

En una realización específica, el complejo [CD:MBA] es un complejo  $\beta$ -CD:paclitaxel, en una razón molar de 1:1, y la razón en peso paclitaxel:polímero biodegradable (PVM/MA) es de 1:4-20, aunque razones próximas a 1:10 dan buenos resultados. A modo ilustrativo, aproximadamente 0,25 mg de paclitaxel en el complejo  $\beta$ -CD:paclitaxel, en una razón molar de 1:1, por mg de polímero dan una asociación eficaz. En este caso la cantidad de fármaco asociada a las nanopartículas es de aproximadamente 40 microgramos de paclitaxel/mg de nanopartícula. Estas nanopartículas se caracterizan por tener forma esférica y un tamaño cercano a los 300 nm.

En otra realización concreta, el complejo [CD:MBA] es un complejo OH- $\beta$ -CD, en una razón molar de 1:1 y la razón en peso paclitaxel:polímero biodegradable (PVM/MA) es de 1:4-20, aunque razones próximas a 1:10 dan buenos resultados. A modo ilustrativo, aproximadamente 0,25 mg de paclitaxel en el complejo OH- $\beta$ -CD:paclitaxel, en una razón molar de 1:1, por mg de polímero dan una asociación eficaz. En este caso la cantidad de fármaco asociada a las nanopartículas es de aproximadamente 170 microgramos de paclitaxel/mg de nanopartícula. Estas nanopartículas se caracterizan por tener forma esférica y un tamaño cercano a los 300 nm.

En otra realización concreta, el complejo [CD:MBA] es un complejo NH- $\beta$ -CD, en una razón molar de 1:1 y la razón en peso paclitaxel:polímero biodegradable (PVM/MA) es de 1:4-20, aunque razones próximas a 1:10 dan buenos resultados. A modo ilustrativo, aproximadamente 0,25 mg de paclitaxel en el complejo OH- $\beta$ -CD:paclitaxel, en una razón molar de 1:1, por mg de polímero dan una asociación eficaz. En este caso la cantidad de fármaco asociada a las nanopartículas es de aproximadamente 100 microgramos de paclitaxel/mg de nanopartícula. Estas nanopartículas se caracterizan por tener forma esférica y un tamaño cercano a los 300 nm.

En una realización particular, cuando se administra por vía oral una dosis de 10 mg/kg de paclitaxel formulado en nanopartículas con  $\beta$ -CD, se obtienen niveles plasmáticos constantes y sostenidos durante, al menos, 24 horas, tras alcanzar la concentración plasmática máxima (C<sub>max</sub>) en un tiempo de aproximadamente 5 horas. La concentración plasmática máxima (C<sub>max</sub>) es similar a la obtenida tras la administración intravenosa de la formulación comercial. El área bajo la curva plasmática (AUC) de paclitaxel obtenida por esta formulación es, aproximadamente, 5 veces superior a la obtenida mediante la administración intravenosa del medicamento comercial administrado a la misma dosis. Esta formulación se caracteriza por ofrecer un tiempo medio de residencia (MRT) del fármaco en el organismo aproximadamente 4 veces superior al que se obtiene tras la administración intravenosa de la formulación comercial.

En otra realización particular, cuando se administra por vía oral una dosis de 10 mg/kg de paclitaxel formulado en

nanopartículas con OH- $\beta$ -CD, se obtienen niveles plasmáticos constantes y sostenidos durante, al menos, 24 horas, tras alcanzar la concentración plasmática máxima (C<sub>max</sub>) en un tiempo de aproximadamente 6 horas. La concentración plasmática máxima es 2 veces superior a la obtenida tras administración intravenosa de la formulación comercial. El área bajo la curva plasmática (AUC) de paclitaxel obtenida por esta formulación es aproximadamente 5 veces superior a la obtenida mediante la administración intravenosa del medicamento comercial administrado a la misma dosis. Esta formulación se caracteriza por ofrecer un tiempo medio de residencia (MRT) del fármaco en el organismo aproximadamente 3,5 veces superior al que se obtiene tras la administración intravenosa de la formulación comercial.

En otra realización particular, cuando se administra por vía oral una dosis de 10 mg/kg de paclitaxel formulado en nanopartículas con NH- $\beta$ -CD, se obtienen niveles plasmáticos constantes y sostenidos durante, al menos, 24 horas, tras alcanzar la concentración plasmática máxima (C<sub>max</sub>) en un tiempo de aproximadamente 4,7 horas. La concentración plasmática máxima es aproximadamente la mitad de la obtenida tras la administración intravenosa de la formulación comercial. El área bajo la curva plasmática (AUC) de paclitaxel obtenida por esta formulación es aproximadamente similar a la obtenida mediante la administración intravenosa del medicamento comercial administrado a la misma dosis. Esta formulación se caracteriza por ofrecer un tiempo medio de residencia (MRT) del fármaco en el organismo aproximadamente 3 veces superior al que se obtiene tras la administración intravenosa de la formulación comercial.

#### Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende, al menos, una nanopartícula de la invención, y un excipiente, vehículo o adyuvante, farmacéuticamente aceptable, tal como se define mediante las reivindicaciones.

En general, dicha molécula biológicamente activa formará un complejo con la ciclodextrina o derivado de la misma y dicho complejo estará principalmente en el interior de la nanopartícula de la invención; no obstante, podría suceder que una proporción relativa de dicho complejo que contiene la molécula biológicamente activa estuviera también unida a la superficie de la nanopartícula si bien la mayor parte del mismo estará en el interior (por ejemplo, encapsulado) de las nanopartículas de la invención.

Las nanopartículas pueden utilizarse para modificar la distribución de la molécula biológicamente activa asociada cuando se administran por una vía que da acceso a alguna mucosa del organismo (incluyendo la vía oral, rectal, nasal, vaginal u ocular). Adicionalmente, también pueden administrarse por vía parenteral.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición líquida (suspensión o dispersión de las nanopartículas) para administración oral, bucal, sublingual, tópica, ocular, nasal, vaginal o parenteral; cualquier composición en forma de gel, pomada, crema o bálsamo para su administración tópica, ocular, nasal o vaginal; o cualquier composición sólida (comprimidos, cápsulas) para su administración oral. En una realización particular, la composición farmacéutica se administra por vía oral. En otra realización particular, dicha composición farmacéutica se administra por vía parenteral.

Las composiciones farmacéuticas descritas comprenderán los excipientes adecuados para cada formulación. Por ejemplo, en el caso de formulaciones orales en forma de comprimidos o cápsulas se incluirán si es necesario agentes aglutinantes, disgregantes, lubricantes, agentes de carga, recubrimiento entérico, etc. Las formulaciones sólidas orales se preparan convencionalmente por mezclado, granulación en seco o en húmedo e incorporando las nanopartículas de la invención. Las composiciones farmacéuticas también pueden adaptarse para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, disoluciones, suspensiones o productos liofilizados estériles, en forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma de dosificación farmacéutica seleccionada. Una revisión de las distintas formas de dosificación farmacéuticas de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10ª edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

La proporción de paclitaxel incorporada en la nanopartícula de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, puede ser de hasta un 25% en peso respecto al peso total de las nanopartículas. No obstante, la proporción adecuada dependerá en cada caso de la molécula biológicamente activa incorporada.

La dosis de nanopartículas de la invención que va a administrarse puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal, preferentemente, entre 0,1 y 2 mg por kg de peso corporal.

La invención se describe a continuación mediante varios ejemplos que no son limitativos de la invención, sino ilustrativos.

#### **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos describen la producción y caracterización de nanopartículas a base de un polímero

biodegradable (PVM/MA) que incorporan una ciclodextrina (ejemplos 1-5) y de nanopartículas a base de un polímero biodegradable (PVM/MA) que incorporan una ciclodextrina y paclitaxel (ejemplos 6 y 7) que está asociado a la ciclodextrina y/o al polímero biodegradable (PVM/MA) formando la matriz de dichas nanopartículas. Dichos ejemplos ponen de manifiesto la capacidad de dichas nanopartículas de desarrollar interacciones bioadhesivas con la mucosa y de promover la absorción oral de paclitaxel. Tal como puede apreciarse en dichos ejemplos, la incorporación de paclitaxel en dichas nanopartículas a base de PVM/MA que incorporan una ciclodextrina, en particular, 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina, permite obtener niveles plasmáticos constantes y sostenidos de dicho fármaco durante, al menos, 24 horas.

A continuación se describen los métodos generales utilizados para la producción y caracterización de dichas nanopartículas.

#### A. Producción de nanopartículas que contienen ciclodextrinas y, opcionalmente, una molécula biológicamente activa

El procedimiento para la producción de nanopartículas a base de un polímero biodegradable (PVM/MA) que incorporan una ciclodextrina y, opcionalmente, una molécula biológicamente activa, es una modificación de un procedimiento general descrito anteriormente y basado en la desolvatación controlada del polímero [Arbos *et al.*, J. Control. Release, 83 (2002) 321-330]. Para ello, un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) y una determinada cantidad de ciclodextrina, o, alternativamente, de un complejo ciclodextrina:molécula biológicamente activa, obtenido por métodos convencionales (por ejemplo, Hamada *et al.*, J Biosci Bioeng 102(4):369-71, 2006), en acetona bajo agitación magnética. Tras la incubación, se añade sobre esta fase y bajo agitación magnética un disolvente orgánico miscible (etanol) y un volumen similar de agua desionizada, dando lugar a la formación de las nanopartículas bajo apariencia de una suspensión lechosa. A continuación, se retiran los disolventes orgánicos (etanol y acetona) mediante evaporación a presión reducida, quedando las partículas en una suspensión acuosa estable. Opcionalmente, las nanopartículas formadas pueden recubrirse con una molécula biológicamente activa hidrosoluble o con un ligando que puede conferir a la nanopartícula resultante propiedades de direccionamiento específicas. Tras permitir la homogeneización de la suspensión de nanopartículas, se evapora a presión reducida, por ejemplo, mediante el empleo de un rotavapor, tal como un rotavapor Büchi R-144 (Suiza) hasta eliminar ambos disolventes orgánicos. Posteriormente, la suspensión se somete a purificación por ultracentrifugación (Sigma 3k30, rotor n.º-12150, Alemania) o mediante filtración tangencial y las nanopartículas pueden congelarse posiblemente a -80°C para su posterior liofilización y conservación a largo plazo (Virtis Genesis, Nueva York, EE.UU.).

#### B. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

La caracterización de las nanopartículas ha conllevado varios estudios, que se describen a continuación. Entre los estudios fisicoquímicos se determinaron el tamaño de partícula y la carga superficial de las nanopartículas, ésta última mediante la medición del potencial zeta. Ambos parámetros se obtuvieron por espectroscopía de correlación fotónica, utilizando un instrumento Zetasizer nano Z-S (Malvern Instruments/Optilas, España).

El rendimiento del procedimiento se calculó mediante dos métodos. En el primero método, se calculó el rendimiento de forma gravimétrica, utilizando el peso de las muestras liofilizadas sin agente crioprotector, según la ecuación 1:

$$\text{Rendimiento} = (\text{Peso del liofilizado} / \text{Peso inicial}) \times 100 \quad [\text{Ecuación 1}]$$

donde

el peso inicial es el peso del polímero biodegradable (por ejemplo, PVM/MA) y de la ciclodextrina añadida a las formulaciones; y

el peso del liofilizado es el peso de las formulaciones tras el procedimiento de liofilización.

El segundo método se basó en la cuantificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector de tipo ELSD ("evaporative light - scattering detection", detección por dispersión de luz evaporativa) (Agueros *et al.*, J. Pharm. and Biomed. Anal., 39 (2005) 495-502) mediante el método descrito a continuación que permite la cuantificación de las ciclodextrinas y del copolímero de PVM/MA. El rendimiento, en este caso, se calculó según la ecuación 2:

$$\text{Rendimiento} = (Q_{\text{inicial}} - Q_{\text{PVM/MA}}) \times 100 \quad [\text{Ecuación 2}]$$

donde

$Q_{\text{inicial}}$  es la cantidad inicial de PVM/MA añadida; y

$Q_{\text{PVM/MA}}$  es la cantidad de PVM/MA determinada en los sobrenadantes.

La morfología de las nanopartículas se observó por microscopía electrónica de barrido (Zeiss, DSM 940A Alemania). Para ello, las nanopartículas liofilizadas se cubrieron con una capa de oro molecular de unos 9 nm (equipo Emitech K550, Sputter-Coater, Reino Unido) y las fotografías se realizaron con un microscopio Zeiss DMS 940 A (Estados

Unidos).

Para confirmar la presencia de ciclodextrinas asociadas a las nanopartículas (método de cuantificación descrito a continuación), se procedió al análisis elemental de las diferentes formulaciones de nanopartículas, utilizando un analizador elemental modelo LECO CHN-900 (LECO Corporation, Estados Unidos).

#### 5 Cuantificación de la cantidad de ciclodextrina asociada a las nanopartículas

Para determinar la cantidad de ciclodextrina no aminada [por ejemplo,  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) y 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (OH- $\beta$ -CD)] asociada a las nanopartículas, se utilizó un método de HPLC acoplado a un detector de tipo ELSD. El análisis se realizó en un cromatógrafo modelo 1100 series LC (Agilent, Waldbornn, Alemania) y los datos se analizaron en un ordenador Hewlett-Packard mediante el programa Chem-Station G2171 (Agueros *et al.*, J. Pharm. and Biomed. Anal., 39 (2005) 495-502).

Para el análisis de las muestras, los sobrenadantes obtenidos tras el procedimiento de purificación de las nanopartículas se diluyeron hasta 10 ml con agua purificada. Tras la adición del patrón interno (PEG 6000), se tomaron, como muestra, alícuotas de 1 ml de sobrenadante. Las muestras se analizaron utilizando una columna Zorbax Eclipse XDB-Phenyl (Agilent 150 mm x 2,1 mm) y una mezcla de agua/acetonitrilo en gradiente (véase la tabla 1) como fase móvil a un flujo 0,25 ml/min.

Tabla 1

Condiciones de gradiente para la fase móvil (A: acetonitrilo; B: agua)

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	0	100
2	0	100
9	60	40
11	71	29
12	0	100

Las condiciones del detector (ELSD) se optimizaron hasta conseguir la máxima sensibilidad según el gradiente utilizado en la fase móvil (temperatura de nebulizador: 115°C; flujo de nitrógeno: 3,2 ml/min). La separación cromatográfica de las diferentes ciclodextrinas, del PVM/MA y del patrón interno (PEG 6000) se llevó a cabo en menos de 15 minutos. Los tiempos de retención fueron de:

1,08  $\pm$  0,05 minutos para el PVM/MA;

4,58  $\pm$  0,07 minutos para la  $\beta$ -CD;

10,27  $\pm$  0,06 para la OH- $\beta$ -CD; y

25 13,60  $\pm$  0,04 minutos para el patrón interno.

El límite de cuantificación fue de 0,2 mg/ml para las ciclodextrinas y de 0,05 mg/ml para el polímero (PVM/MA). La precisión no superó el límite del 7%.

En el caso de la cuantificación de ciclodextrina aminada [por ejemplo, 6-monodesoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina (NH- $\beta$ -CD)] asociada a las nanopartículas se utilizó una variante del método descrito anteriormente para evitar el solapamiento de los picos de la ciclodextrina y el polímero. Por tanto, las muestras se analizaron utilizando una columna NH<sub>2</sub>-Zorbax (Agilent 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m), calentada hasta 40°C y una mezcla de metanol/agua (80/20 v/v) como fase móvil a un flujo de 1 ml/min. Las condiciones del detector (ELSD) fueron las siguientes: temperatura de nebulizador: 71°C y flujo de nitrógeno: 1,9 ml/min. La separación cromatográfica de la 6-monodesoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina se llevó a cabo en menos de 7 minutos. El tiempo de retención fue de 3,8  $\pm$  0,07 minutos.

35 Finalmente, la cantidad de ciclodextrina (CD) asociada a las nanopartículas se calculó como la diferencia entre la cantidad de CD añadida inicialmente y la cantidad de CD cuantificada en los sobrenadantes.

#### Cuantificación de RBITC

La cantidad de isotiocianato de rodamina B (RBITC) incorporada en las nanopartículas se determinó por colorimetría a una longitud de onda de 540 nm (Labsystems iEMS Reader MF, Finlandia). Para esta cuantificación, se utilizaron curvas de calibración de RBITC en NaOH 0,1 N en un intervalo de 5 - 50  $\mu$ g/ml;  $r = 0,999$ .

La cantidad de RBITC se estimó como la diferencia entre la cantidad inicial añadida y la cantidad encontrada después de la hidrólisis total de una determinada cantidad de nanopartículas en NaOH 0,1 N (24 h, 37°C).

Liberación de RBITC

La cinética de liberación de RBITC desde las nanopartículas se realizó en tubos de diálisis Vivaspin® de MWCO de 100.000 (VIVASPIN, Hannover, Alemania). Para ello, se dispersaron 10 mg de nanopartículas en 1 ml de medio gástrico simulado (0-1 h) o medio intestinal simulado (de 1 a 24 h) (USP XXIII) a  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . A determinados tiempos, las suspensiones de nanopartículas se centrifugaron (5.000 x g, 15 min) y la cantidad de RBITC en los filtrados se cuantificó por colorimetría ( $\lambda=540\text{ nm}$ ).

Cuantificación de paclitaxel

La cantidad de paclitaxel encapsulado en las nanopartículas se determinó por HPLC. El análisis se llevo a cabo en un cromatógrafo modelo 1100 series LC (Agilent, Waldbornn, Alemania) acoplado a un sistema de detección UV de red de diodos. Los datos se analizaron en un ordenador Hewlett-Packard mediante el programa Chem-Station G2171. Para la separación del paclitaxel se utilizó una columna de fase inversa Phenomenex Gemini C18 (150 mm x 3 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) calentada hasta  $30^\circ\text{C}$ . La fase móvil estaba formada por una mezcla de disolución reguladora de fosfato (pH = 2; 0,01 M) y acetonitrilo (en una razón 50/50 en volumen), y se bombeó a un flujo de 0,5 ml/min. La detección se realizó a 228 nm.

Para el análisis de muestras recientes, se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión acuosa de nanopartículas y se rompieron con 100  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo. Los disolventes se evaporaron (centrífuga-evaporadora) y la muestra se reconstituyó en la fase móvil utilizada. Se inyectaron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  en la columna de HPLC para su análisis.

C. Estudios de bioadhesión

Los estudios de bioadhesión se llevaron a cabo utilizando el protocolo descrito previamente [Arbos *et al.*, Int. J. Pharm., 242 (2002) 129-136], de acuerdo con las normas del Comité Ético de la Universidad de Navarra y con la legislación europea sobre animales de experimentación (86/609/EU).

Para ello, ratas Wistar macho, con un peso promedio de 225 g (Harlan, España), se mantuvieron en condiciones normales sin comida ni agua. A los animales se les administró por vía oral 1 ml de suspensión acuosa que contenía 10 mg de nanopartículas marcadas con RBITC. Los animales se sacrificaron a diferentes tiempos (0,5, 1, 3 y 8 horas) mediante dislocación cervical. La cavidad abdominal se abrió y se retiró el tracto gastrointestinal, que se dividió en seis regiones anatómicas: estómago (Sto), intestino delgado (I1, I2, I3 y I4) y ciego (Ce). Cada segmento de la mucosa se abrió longitudinalmente y enjuagó con PBS (pH 7,4). A su vez, cada una de estas partes se cortó en cinco porciones similares y se digirió el tejido con 1 ml de NaOH 3 M durante 24 horas. Para extraer la rodamina se usaron 2 ml de metanol, se agitó durante 1 minuto con el vórtex y después se centrifugó a 2.000 x g durante 10 minutos (centrífuga 5804R, Rotor A-4-44, Alemania). Alícuotas de 1 ml de los sobrenadantes obtenidos se diluyeron con agua (3 ml) y se analizaron por espectrofluorimetría a  $\lambda_{\text{ex}} 540\text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} 580\text{ nm}$  (GENios, Austria) para estimar la fracción de nanopartículas adheridas a la mucosa. Las líneas de calibración se prepararon mediante adición de disoluciones de RBITC en NaOH 3 M (0,5-10  $\mu\text{g/ml}$ ) a segmentos de tejido control, que se sometieron a las mismas etapas de extracción ( $r>0,996$ ).

Con el fin de comparar las diferentes formulaciones, se estudiaron las curvas y cinéticas de bioadhesión. Para ello, se representó gráficamente la fracción de nanopartículas adherida frente al tiempo obteniendo así las curvas de bioadhesión. Basándose en estas últimas, y utilizando la aplicación informática WinNonlin 1.5 (Pharsight Corporation, EE.UU.), se determinaron los siguientes parámetros cinéticos de bioadhesión:  $Q_{\text{max}}$ ,  $\text{AUC}_{\text{adh}}$ ,  $T_{\text{max}}$ ,  $\text{MRT}_{\text{adh}}$  y  $K_{\text{adh}}$  (Arbos *et al.*, J. Control. Release, 89 (2003) 19-30).  $Q_{\text{max}}$  (mg) es la capacidad inicial máxima de nanopartículas adheridas a la mucosa gastrointestinal y está relacionada con su capacidad de desarrollar interacciones bioadhesivas.  $\text{AUC}_{\text{adh}}$  (mg.h), es el área bajo la curva de la fracción de nanopartículas adherida, y representa la intensidad de bioadhesión.  $\text{MRT}_{\text{adh}}$  (h), es el tiempo medio estimado que las formulaciones permanecen adheridas a la mucosa.  $K_{\text{adh}}$  se define como velocidad de eliminación de la fracción adherida en la mucosa. Todos estos parámetros se estimaron entre 0 y 8 horas. Los cálculos se realizaron utilizando el programa WinNonlin 1.5 (Pharsight Corporation, EE.UU.).

D. Visualización de las nanopartículas adheridas a la mucosa

La visualización de las nanopartículas que contienen ciclodextrinas y, opcionalmente, una molécula biológicamente activa, en la mucosa gastrointestinal se observó por microscopía de fluorescencia. Para ello, se utilizaron las formulaciones que contenían RBITC. Dichas formulaciones (10 mg de nanopartículas) se administraron por vía oral a los animales de laboratorio (ratas Wistar macho) que, dos horas después, se sacrificaron. Tras el sacrificio, se extrajo el tracto gastrointestinal, recogiendo distintas porciones del intestino delgado que se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (pH=7,4; 0,15 M), tal como se ha descrito anteriormente para los estudios de bioadhesión. Las diferentes secciones intestinales se trataron con O.C.T.<sup>TM</sup> (Sakura, Países Bajos) y se congelaron en nitrógeno líquido. Posteriormente se cortaron las muestras de tejido en secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosor en un criostato (2800 Frigocut E, Reichert-Jung, Alemania), y se fijaron a soportes para su visualización por microscopía de fluorescencia.

### E. Estudios farmacocinéticos

5 Los estudios farmacocinéticos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas del Comité Ético de la Universidad de Navarra así como de la legislación europea sobre animales de experimentación (86/609/EU). Para ello, ratas Wistar macho con un peso promedio de 225 g (Harlan, España) se aislaron en jaulas metabólicas 12 horas antes de la administración de las formulaciones, sin acceso a alimento, pero permitiéndoles libre acceso a agua potable.

Los animales se dividieron en 8 grupos de tratamiento (6 animales por grupo) y se trataron con dosis individuales de 10 mg/kg (2,25 mg) de paclitaxel incorporado en cualquiera de las siguientes formulaciones:

- (i) disolución i.v. de Taxol<sup>®</sup> (Bristol-Myers Squibb, Madrid, España);
- (ii) disolución oral de Taxol<sup>®</sup>;
- 10 (iii) complejo paclitaxel (PTX)-2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (OH- $\beta$ -CD) [PTX-OH- $\beta$ -CD];
- (iv) complejo paclitaxel (PTX)- $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) [PTX- $\beta$ -CD];
- (v) complejo paclitaxel (PTX)-6-monodesoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina (NH- $\beta$ -CD) [PTX-NH- $\beta$ -CD];
- (vi) complejo paclitaxel (PTX)-2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (OH- $\beta$ -CD)-nanopartícula a base de PVM/MA (NP) [PTX-OH- $\beta$ -CD-NP];
- 15 (vii) complejo paclitaxel (PTX)- $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD)-nanopartícula a base de PVM/MA (NP) [PTX- $\beta$ -CD-NP]; y
- (viii) complejo paclitaxel (PTX)-6-monodesoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina-nanopartícula a base de PVM/MA (NP) [PTX-NH- $\beta$ -CD-NP].

20 A los animales se les administró 1 ml de las distintas formulaciones, disueltas o dispersas en agua, excepto en el caso de la disolución i.v. (formulación comercial), que se administró en la vena de la cola (0,3 ml).

25 Tras la administración se extrajo, a diferentes tiempos, un volumen de sangre de aproximadamente 300  $\mu$ l, utilizando ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) como anticoagulante y recuperando la volemia del animal (rata) con un volumen equivalente de solución salina fisiológica mediante una vía intraperitoneal (i.p.). La sangre se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante (plasma) se congeló a una temperatura de -80°C. El estudio se realizó de acuerdo con los principios recogidos en las guías internacionales de experimentación animal (WHO Chronicle, 39 (2): 51 – 56, 1985; A CIOMS Ethical Code for Animal Experimentation) mediante el protocolo aprobado por el Comité Ético de experimentación animal de la Universidad de Navarra.

#### Pretratamiento de las muestras

30 La extracción del paclitaxel a partir de plasma se realizó mediante un procedimiento de extracción líquido-líquido, utilizando t-butil metil éter como disolvente de extracción. Para ello, se tomaron alícuotas de plasma (0,1 ml), se ajustaron a un volumen de 1 ml con agua y se les añadió 0,2  $\mu$ g de docetaxel como patrón interno. A continuación, se añadieron 4 ml de ter-butilmetiléter y se agitó durante 1 minuto. Después, se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante (fase orgánica) que se evaporó en una centrifuga evaporadora (Savant, Barcelona, España). El extracto así obtenido se reconstituyó en 200  $\mu$ l de una mezcla (50/50 v/v) de acetonitrilo y disolución reguladora de fosfato (pH=2; 0,01 M) mediante agitación con vórtex durante 1 minuto. La disolución resultante fue transferida a un vial de inyección.

#### Método analítico: HPLC

40 La cuantificación del paclitaxel se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección ultravioleta-visible. Como patrón interno se usó docetaxel. El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo modelo 1100 series LC (Agilent, Waldbornn, Alemania). Los datos se analizaron en un ordenador Hewlett-Packard mediante el programa Chem-Station G2171. Para la separación del paclitaxel se utilizó una columna de fase inversa Gemini C18 (Phenomenex) 150 mm x 3 mm; 5  $\mu$ m, calentada hasta 30°C. La fase móvil estaba formada por una mezcla de disolución reguladora de fosfato (pH=2; 0,01 M) y acetonitrilo (en una razón 50/50 en volumen), y se dirigió a través de la columna a un flujo de 0,5 ml/min. La detección se realizó a 228 nm.

45 El método analítico utilizado se validó, verificándose la relación lineal entre la respuesta del detector y las concentraciones de paclitaxel en plasma a lo largo del intervalo de concentraciones comprendido entre 40 y 3.200 ng/ml.

#### Análisis farmacocinético

50 El análisis farmacocinético de los datos de concentraciones plasmáticas a lo largo del tiempo obtenidos tras la administración de paclitaxel se realizó utilizando el procedimiento de ajuste no compartimental del programa de

ajuste farmacocinético WinNonlin 1.5 (Pharsight Corporation, Mountain View, EE.UU.).

Los parámetros farmacocinéticos calculados fueron los siguientes: la concentración máxima ( $C_{max}$ ); el tiempo en el cual se alcanza la  $C_{max}$  ( $t_{max}$ ); el área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC<sub>0-inf</sub>); el tiempo medio de residencia (MRT) y la semivida biológica en la fase de eliminación terminal ( $t_{1/2z}$ ), aclaramiento (Cl) y el volumen de distribución en estado estacionario.

El tiempo medio de residencia (MRT) se calculó mediante la razón entre el valor de AUMC (área bajo la curva en el primer momento de la concentración plasmática) y el de AUC. El aclaramiento (Cl) se calculó como dosis x biodisponibilidad / AUC, y el volumen de distribución en estado estacionario ( $V_{ss}$ ) se calculó como la razón entre el aclaramiento y la constante de eliminación terminal (k), calculada como 1/MRT.

#### F. Análisis estadístico

Para el estudio de bioadhesión y farmacocinética, las formulaciones se analizaron utilizando la prueba no paramétrica "Mann-Whitney". Valores de  $P < 0,05$  se consideraron significativos. Todos los cálculos se hicieron con el programa de software estadístico SPSS® (SPSS® 10, Microsoft, Estados Unidos).

##### Ejemplo 1

#### Optimización del procedimiento de asociación entre un polímero biodegradable (PVM/MA) y una ciclodextrina para obtener nanopartículas

Las nanopartículas se prepararon por desolvatación controlada tras la modificación de un procedimiento descrito anteriormente [Arbos *et al.*, J. Control. Release, 83 (2002) 321-330]. Para ello, el copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) y una determinada cantidad de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (OH- $\beta$ -CD) o 6-monodesoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina (NH- $\beta$ -CD) se incubaron en acetona bajo agitación magnética. Tras la incubación, se añadieron sobre esta fase y bajo agitación magnética un disolvente orgánico miscible (etanol) y un volumen similar de agua desionizada, dando lugar a la formación de las nanopartículas bajo apariencia de una suspensión lechosa. Tras permitir la homogeneización de la suspensión de nanopartículas, se evaporó a presión reducida (rotavapor Büchi R-144, Suiza) hasta eliminar ambos disolventes orgánicos. Posteriormente, la suspensión se purificó por ultracentrifugación (Sigma 3k30, rotor n.º-12150, Alemania). Una parte de las nanopartículas obtenidas se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior liofilización y conservación a largo plazo (Virtis Genesis, Nueva York, EE.UU.).

La figura 1 muestra la cantidad de ciclodextrina asociada a las nanopartículas en función del tiempo de incubación con el polímero biodegradable (PVM/MA) ,mientras se preparaban las nanopartículas. En todos los casos, se observó un tiempo de incubación óptimo entre la CD y el polímero. Este tiempo de incubación fue de 30 minutos. Por último, es de destacar que la  $\beta$ -CD se asocia más eficazmente a las nanopartículas de PVM/MA que su derivado hidroxilado (OH- $\beta$ -CD) o aminado (NH- $\beta$ -CD).

En función de los resultados obtenidos, para estudios posteriores se seleccionaron las siguientes condiciones experimentales:

- relación ciclodextrina:copolímero de PVM/MA (1:4); y
- tiempo de incubación 30 minutos.

##### Ejemplo 2

#### Producción de nanopartículas que contienen ciclodextrinas

##### 2.1 Producción de nanopartículas que contienen ciclodextrinas

Las nanopartículas se prepararon por desolvatación controlada tras la modificación de un procedimiento descrito anteriormente [Arbos *et al.*, J. Control. Release, 83 (2002) 321-330]. Para ello, se dispersaron 25 mg de  $\beta$ -CD, OH- $\beta$ -CD o NH- $\beta$ -CD en 2 ml de acetona con la ayuda de ultrasonidos (Microson™ o en baño de ultrasonidos durante 1 minuto bajo enfriamiento). Esta suspensión se añadió a una disolución de 100 mg del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) [Gantrez® AN 119] en 3 ml de acetona y se permitió incubar la mezcla durante 30 minutos. Posteriormente, sobre esta fase y bajo agitación magnética se añadieron 10 ml de etanol y 10 ml de agua desionizada. Se permitió la homogeneización de la mezcla resultante durante 5 minutos. Entonces se evaporó la suspensión de nanopartículas a presión reducida (Büchi R-144, Suiza) hasta eliminar ambos disolventes orgánicos y el volumen final se ajustó con agua a 10 ml. Posteriormente, la suspensión se sometió a purificación por ultracentrifugación (20 minutos a  $27.000 \times g$ ) (Sigma 3k30, rotor n.º-12150, Alemania). Los sobrenadantes se eliminaron y el residuo se resuspendió en agua o en una disolución acuosa de sacarosa al 5%. Posiblemente, una parte de las nanopartículas obtenidas se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior liofilización y conservación a largo plazo (Virtis Genesis, Nueva York, EE.UU.).

## 2.2 Caracterización físico-química de las distintas nanopartículas obtenidas a base de PVM/MA que contienen ciclodextrinas

La determinación de las características físicoquímicas permitió verificar cómo, independientemente de la CD utilizada, las nanopartículas tienen tamaños y cargas de superficie similares. Además, esta carga era similar a la de las nanopartículas no tratadas, con lo que puede estimarse que la mayor parte de la CD se ubica dentro de las nanopartículas y no adsorbida sobre su superficie. La tabla 2 resume las características físicoquímicas principales de las nanopartículas analizadas.

Tabla 2

Características físicoquímicas de las diferentes formulaciones de nanopartículas a base de PVM/MA que contienen ciclodextrinas

Formulación	Tamaño (nm)	Potencial zeta (mV)	Rendimiento (%)	CD asociada ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Eficacia de asociación (%)
NP	179 $\pm$ 2	-48,1 $\pm$ 0,8	91,3 $\pm$ 3,1	-	-
$\beta$ -CD – NP	144 $\pm$ 6	-51,1 $\pm$ 8,8	94,4 $\pm$ 5,3	88,4 $\pm$ 9,9	30,2 $\pm$ 7,8
OH-CD – NP	140 $\pm$ 7	-52,1 $\pm$ 3,7	91,1 $\pm$ 4,1	68,4 $\pm$ 4,3	22,8 $\pm$ 4,7
NH-CD – NP	151 $\pm$ 7	-49,3 $\pm$ 2,4	86,2 $\pm$ 3,9	71,2 $\pm$ 8,4	25,4 $\pm$ 5,4

Los datos muestran la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) (n=12). Condiciones experimentales: PVM/MA: 100 mg; ciclodextrina: 25 mg; tiempo de incubación: 30 min. Los datos muestran la media  $\pm$  DE (n=12). NP: nanopartículas a base de PVM/MA sin ciclodextrina.

Tal como puede observarse en la tabla 2, independientemente de la ciclodextrina utilizada, las nanopartículas tienen tamaños y cargas de superficie similares. Además, esta carga era similar a la de las partículas no tratadas, con lo que puede estimarse que la mayor parte de la ciclodextrina se ubica en el interior de las nanopartículas y no adsorbida sobre su superficie. La asociación entre las ciclodextrinas y las nanopartículas a base de PVM/MA permite obtener nanopartículas con un tamaño más pequeño que las convencionales (NP). Tal como se muestra en la tabla 2, las nanopartículas a base de PVM/MA que contienen ciclodextrinas muestran un tamaño cercano a los 150 nm. Esta disminución en el tamaño podría estar asociada al alto rendimiento del procedimiento de fabricación de las nanopartículas. Estos rendimientos se obtuvieron mediante la determinación de su peso al final del procedimiento y tras su liofilización. Los rendimientos de fabricación se expresan en porcentaje, calculado respecto a la masa inicial del copolímero de PVM/MA y la ciclodextrina.

La cantidad de ciclodextrina asociada a las nanopartículas varía en función del tipo de oligosacárido utilizado, siendo de alrededor de 90  $\mu\text{g}/\text{mg}$  para la  $\beta$ -CD y de 70  $\mu\text{g}/\text{mg}$  para la OH- $\beta$ -CD y la NH- $\beta$ -CD. La confirmación de la presencia de CD asociada a las nanopartículas a base de PVM/MA se realizó tras el análisis elemental de las diferentes formulaciones. Los resultados obtenidos (tabla 3) confirmaron la presencia de CD debido a un aumento importante en la proporción de oxígeno en las formulaciones que tienen la CD asociada, así como una disminución del porcentaje de carbono, en comparación con las nanopartículas control (NP).

Tabla 3

Resultados del análisis elemental de las formulaciones control (NP) y de las formulaciones de nanopartículas a base de PVM/MA asociadas a CD

Formulación	C (%)	H (%)	O (%)	N (%)
NP	52,52	5,09	42,46	-0,07
$\beta$ -CD-NP	42,37	5,94	51,61	0,08
OH- $\beta$ -CD-NP	41,27	5,92	52,84	-0,04
NH- $\beta$ -CD-NP	43,12	5,78	51,17	-0,07

NP: Nanopartículas control a base de PVM/MA sin CD (vacías);  $\beta$ -CD-NP: Nanopartículas a base de PVM/MA con  $\beta$ -CD; OH- $\beta$ -CD-NP: Nanopartículas a base de PVM/MA con OH- $\beta$ -CD; NH- $\beta$ -CD-NP: Nanopartículas a base de PVM/MA con NH- $\beta$ -CD.

La morfología de las nanopartículas se observó por microscopía electrónica de barrido (Zeiss, Alemania), tras la cual se observó la típica forma esférica de las nanopartículas, homogéneas y de un tamaño comprendido entre 80 y 200 nm. La figura 2 muestra los resultados de someter una muestra liofilizada de nanopartículas a base de PVM/MA

con  $\beta$ -CD ( $\beta$ -CD-NP) a microscopía electrónica de barrido.

EJEMPLO 3 (no según la invención)

#### Producción de nanopartículas que contienen ciclodextrinas y RBITC

5 Las nanopartículas se prepararon por desolvatación controlada tras la modificación de un procedimiento descrito anteriormente [Arbos *et al.*, J. Control. Release, 83 (2002) 321-330]. Para ello, se dispersaron 25 mg de  $\beta$ -CD, OH- $\beta$ -CD o NH- $\beta$ -CD en 2 ml de acetona con ayuda de ultrasonidos (Microson™ o en un baño de ultrasonidos durante 1 minuto bajo enfriamiento). Esta suspensión se añadió a una disolución de 100 mg del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) [Gantrez® AN 119] en 3 ml de acetona y se permitió incubar la mezcla durante 30 minutos. Posteriormente, sobre esta fase y bajo agitación magnética se añadieron 10 ml de etanol y 10 ml de agua desionizada. Se permitió la homogeneización de la mezcla resultante durante 5 minutos. Entonces se evaporó la suspensión de nanopartículas a presión reducida (Büchi R-144, Suiza) hasta eliminar ambos disolventes orgánicos y el volumen final se ajustó con agua a 10 ml. Entonces se añadió a las nanopartículas una disolución acuosa de isotiocianato de rodamina B (RBITC) y se permitió incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente y con agitación magnética. Posteriormente, la suspensión se sometió a purificación por ultracentrifugación (20 minutos a 27.000 x g) (Sigma 3k30, rotor n.º-12150, Alemania). Los sobrenadantes se eliminaron y el residuo se resuspendió en agua o en una disolución acuosa de sacarosa al 5%. Posiblemente, una parte de las nanopartículas obtenidas se congelaron a -80°C para su posterior liofilización y conservación a largo plazo (Virtis Genesis, Nueva York, EE.UU.).

La cantidad de RBITC se estimó como la diferencia entre la cantidad inicial añadida y la cantidad encontrada después de la hidrólisis total de una determinada cantidad de nanopartículas en NaOH 0,1 N (24 h, 37°C). La tabla 4 muestra los valores de RBITC ( $\mu$ g de RBITC/mg de nanopartícula) para las diferentes formulaciones sometidas a ensayo.

Tabla 4

RBITC ( $\mu$ g/mg) asociado a las nanopartículas

Formulación	Tamaño (nm)	RBITC ( $\mu$ g/mg)
NP	179 $\pm$ 2	10,9 $\pm$ 0,3
$\beta$ -CD-NP	144 $\pm$ 6	13,3 $\pm$ 2,1
OH- $\beta$ -CD-NP	140 $\pm$ 7	12,4 $\pm$ 1,3
NH- $\beta$ -CD-NP	151 $\pm$ 7	11,8 $\pm$ 0,7

25 Los datos muestran la media  $\pm$  DE (n=8). Condiciones experimentales: PVM/MA: 100 mg; ciclodextrina: 25 mg; tiempo de incubación: 30 min. NP: Nanopartículas control a base de PVM/MA sin CD (vacías).  $\beta$ -CD-NP: Nanopartículas a base de PVM/MA con  $\beta$ -CD. OH- $\beta$ -CD-NP: Nanopartículas a base de PVM/MA con OH- $\beta$ -CD. NH- $\beta$ -CD-NP: Nanopartículas a base de PVM/MA con NH- $\beta$ -CD.

30 La figura 3 muestra la cinética de liberación de RBITC desde las nanopartículas en medio gástrico simulado (0-1 h) y en medio intestinal simulado (de 1 a 24 h) a 37 $\pm$ 1°C. En todos los casos, se verificó que el porcentaje de RBITC liberado tras 24 horas de incubación era siempre inferior al 10% de la cantidad asociada a las nanopartículas. Por tanto, puede asumirse que los resultados obtenidos en estudios de bioadhesión posteriores así como en la microscopía de fluorescencia, la intensidad de fluorescencia corresponde al RBITC asociado a las nanopartículas.

#### Ejemplo 4

35 Evaluación de las características bioadhesivas de las nanopartículas que contienen ciclodextrinas en el tracto gastrointestinal de ratas

La figura 4 muestra el perfil de bioadhesión de las formulaciones sometidas a ensayo, representando la fracción de nanopartículas adheridas en los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal (estómago; intestino delgado: I1-I4; ciego) tras 30 minutos, 1 h, 3 h y 8 h tras la administración oral, de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. Tal como puede observarse en dicha figura, las nanopartículas asociadas a ciclodextrinas mostraron un perfil de bioadhesión diferente al de las nanopartículas control. En trabajos recientes, el potencial bioadhesivo del copolímero de PVM/MA demostró ser mucho mayor cuando se incorpora en las nanopartículas que cuando se administró en forma de una disolución acuosa simple (Arbos *et al.*, J. Control. Release, 89 (2003) 19-30). Este hecho concuerda con trabajos previos que sugerían que la forma de la nanopartícula facilitaría tanto el contacto inicial como las interacciones adhesivas con los componentes de la mucosa.

45 Pasados treinta minutos de la administración, todas las formulaciones sometidas a ensayo mostraron un máximo de bioadhesión en el estómago y en el yeyuno (porción I2 en la figura 4). En cualquier caso, parece observarse una mayor interacción con las nanopartículas asociadas a la OH- $\beta$ -CD. Por tanto, 30 minutos después de la

administración, puede decirse que alrededor del 12-20% de la dosis administrada de las formulaciones se adhiere al estómago y aproximadamente entre el 14-22% en el intestino delgado. Dichos valores son significativamente diferentes a los encontrados para las nanopartículas convencionales (a base de PVM/MA) sin CD, en las que menos del 10% y no más del 12% de la dosis administrada se adhiere al estómago e intestino delgado, respectivamente.

- 5 Una hora tras la administración, puede observarse cómo la fracción de nanopartículas con ciclodextrinas adheridas a la mucosa gastrointestinal disminuye y se desplaza a porciones distales del tracto. En cualquier caso, puede observarse que dicha distribución es homogénea y ninguna formulación muestra especificidad por ninguna región del tracto gastrointestinal.

10 Con el fin de comparar el potencial adhesivo de las diferentes formulaciones, se estudiaron las curvas y cinéticas de bioadhesión. Para ello, se representó gráficamente la fracción de nanopartículas adheridas frente al tiempo obteniendo así las curvas de bioadhesión. Esas curvas se muestran en la figura 5. Basándose en estas últimas, y utilizando la aplicación informática WinNonlin 1.5 (Pharsight Corporation, EE.UU.), se determinaron los siguientes parámetros cinéticos de bioadhesión:  $Q_{max}$ ,  $AUC_{adh}$ ,  $T_{max}$ ,  $MRT_{adh}$  y  $K_{adh}$  (Arbos *et al.*, J. Control. Release, 89 (2003) 19-30). La tabla 5 muestra estos parámetros.

15 Tabla 5

Parámetros de bioadhesión para las distintas formulaciones de nanopartículas

	$Q_{max}$ (mg)	$AUC_{adh}$ (mg.h)	$K_{adh}$ ( $h^{-1}$ )	MRT (h)
OH- $\beta$ -CD-NP	$3,5 \pm 0,5^{**}$	$18,16 \pm 4,47^*$	$0,098 \pm 0,084^{**}$	$3,4 \pm 0,41^*$
$\beta$ -CD-NP	$2,3 \pm 0,3$	$13,86 \pm 1,03$	$0,077 \pm 0,029^{**}$	$3,5 \pm 0,10^*$
NP	$2,1 \pm 0,2$	$10,49 \pm 2,10$	$0,292 \pm 0,03$	$2,7 \pm 0,23$

20 Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE (n =3). \*  $p < 0,05$  OH- $\beta$ -CD-NP y  $\beta$ -CD-NP frente a NP. \*\*  $p < 0,01$  OH- $\beta$ -CD-NP y  $\beta$ -CD-NP frente a NP.  $Q_{max}$  (mg): cantidad máxima de nanopartículas adheridas a la mucosa.  $AUC_{adh}$  (mg.h): área bajo la curva de bioadhesión.  $K_{adh}$  ( $h^{-1}$ ): velocidad de eliminación de la fracción adherida.  $MRT_{adh}$  (h): tiempo medio de residencia de la fracción de nanopartículas adheridas. OH- $\beta$ -CD-NP: Nanopartículas a base de PVM/MA con OH- $\beta$ -CD.  $\beta$ -CD-NP: Nanopartículas a base de PVM/MA con  $\beta$ -CD. NP: Nanopartículas control a base de PVM/MA sin CD (vacías).

25 Tal como puede observarse, las nanopartículas asociadas a OH- $\beta$ -CD se caracterizan por una  $AUC_{adh}$  (un parámetro que mide la intensidad de las interacciones bioadhesivas) que es 1,5 veces superior a la observada para las nanopartículas control (NP). Igualmente, la fracción adherida de las formulaciones asociadas a ciclodextrinas mostraban una velocidad de eliminación ( $K_{adh}$ ) significativamente menor que la de las NP control ( $p < 0,01$ ) y un tiempo medio de residencia ( $MRT_{adh}$ ) de aproximadamente 3,5 horas. Estos resultados permiten suponer que la presencia de ciclodextrinas (principalmente OH-CD) puede facilitar la interacción con la mucosa gastrointestinal y desarrollar interacciones adhesivas con componentes de la mucosa más fuertes que las NP.

30 Ejemplo 5

Visualización de las nanopartículas que contienen ciclodextrinas en la mucosa gastrointestinal

35 La visualización de la distribución de las nanopartículas asociadas a ciclodextrinas en la mucosa gastrointestinal se observó por microscopía de fluorescencia. Para ello, las diferentes formulaciones marcadas con RBITC se administraron a animales de laboratorio. Dos horas después de su administración, los animales se sacrificaron y se examinaron diversas porciones del intestino delgado. La figura 6 muestra algunas fotografías que permiten observar la distribución de las nanopartículas en muestras de íleon.

40 En concordancia con los estudios de bioadhesión *in vivo*, las nanopartículas asociadas a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina tienen una mayor capacidad para establecer interacciones bioadhesivas con la mucosa que las nanopartículas control. Las nanopartículas convencionales no pudieron alcanzar los enterocitos a pesar de su capacidad para penetrar en la capa de moco que reviste la mucosa. Por el contrario, las nanopartículas asociadas a ciclodextrina se adhirieron significativamente en los enterocitos del intestino.

Ejemplo 6

Nanopartículas con ciclodextrinas que comprenden paclitaxel

45 El procedimiento para la fabricación de nanopartículas que contienen ciclodextrinas con paclitaxel se divide en dos etapas diferentes:

- 1) Producción del complejo paclitaxel-ciclodextrina, que incluye tanto la formación como la purificación del complejo formado; y

## 2) Producción de nanopartículas que contienen el complejo paclitaxel-ciclodextrina.

Producción del complejo paclitaxel-ciclodextrina

Para este fin, se preparó una disolución acuosa de ciclodextrina ( $\beta$ -CD, OH- $\beta$ -CD o NH- $\beta$ -CD) que se añadió sobre una disolución en etanol del fármaco paclitaxel (PTX) en una razón 80:20 (v:v), y con una razón molar fármaco:ciclodextrina (1:1). La mezcla se mantuvo en agitación magnética (300 rpm), en la oscuridad y a temperatura ambiente hasta alcanzar el equilibrio (al menos, 72 horas). Entonces se eliminó el etanol bajo evaporación a presión reducida y se filtró la suspensión (0,45  $\mu$ m) para eliminar los cristales de fármaco no disueltos. Finalmente, se eliminó completamente el agua de la disolución acuosa final por evaporación a presión reducida quedando el complejo paclitaxel-ciclodextrina bajo la apariencia de un polvo blanco.

10 Producción de nanopartículas que comprenden el complejo paclitaxel-ciclodextrina

Las nanopartículas se obtuvieron por desolvatación controlada tras la modificación de un procedimiento descrito anteriormente (Arbos *et al.*, 2002, citado anteriormente). Para ello, se dispersó una determinada cantidad del complejo formado anteriormente entre el paclitaxel y la ciclodextrina ( $\beta$ -CD, OH- $\beta$ -CD o NH- $\beta$ -CD) en 2 ml de acetona. Esta suspensión se añadió a una disolución de 100 mg del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) [Gantrez® AN 119] en 3 ml de acetona y se permitió incubar la mezcla durante 30 minutos. Posteriormente, sobre esta fase y bajo agitación magnética se añadieron 10 ml de etanol y 10 ml de agua desionizada. Se permitió la homogeneización de la mezcla resultante durante 5 minutos. Entonces se evaporó la suspensión de nanopartículas a presión reducida (Büchi R-144, Suiza) hasta eliminar ambos disolventes orgánicos y el volumen final se ajustó con agua a 10 ml. Posteriormente, la suspensión se sometió a purificación por ultracentrifugación (20 minutos a 27.000 x g) (Sigma 3k30, rotor n.º-12150, Alemania). Los sobrenadantes se eliminaron y el residuo se resuspendió en agua o en una disolución acuosa de sacarosa al 5%. Parte de las nanopartículas obtenidas se congelaron a -80°C para su posterior liofilización y conservación a largo plazo (Virtis Genesis, Nueva York, EE.UU.).

Optimización del procedimiento de encapsulación del complejo paclitaxel-ciclodextrina en las nanopartículas

La figura 7 muestra la evolución del contenido en PTX en las nanopartículas que contienen ciclodextrinas y PTX, en función de la cantidad y el tipo de ciclodextrina utilizada. En primer lugar, merece la pena destacar que el PTX por sí solo, es decir, sin formar un complejo con las CD, no puede incluirse en las nanopartículas, al eliminarse en el proceso de purificación de las nanopartículas por filtración. Por tanto es necesario la formación del complejo paclitaxel-ciclodextrina (PTX-CD). Para las diferentes ciclodextrinas utilizadas se observó cómo las mejores eficacias de encapsulación se obtuvieron cuando el PTX forma complejo con la OH- $\beta$ -CD, seguido de la NH- $\beta$ -CD y de la  $\beta$ -CD sin sustitución.

Asimismo se sometieron a ensayo también diferentes cantidades de PTX (5, 7,5, 10 y 25 mg), siempre guardando la razón molar 1:1 con la ciclodextrina correspondiente, y se observó cómo para cantidades superiores a 10 mg de PTX [PTX:PVM/MA (1:10)], no se obtuvieron mayores cantidades de fármaco encapsulado y, por consiguiente, se observó una disminución en la eficacia de encapsulación del complejo PTX-CD en las NP. Tras estos ensayos, se determinó que, en las condiciones sometidas a ensayo, la cantidad óptima de PTX que va a incluirse en las diferentes formulaciones era de 10 mg, obteniéndose así los mejores rendimientos. La tabla 7 muestra la cantidad de PTX encapsulado cuando se añadieron inicialmente 10 mg en función de las diferentes ciclodextrinas utilizadas para formar el complejo.

## 40 Tabla 7

Cantidad de PTX asociado a diferentes formulaciones de nanopartículas en función del tipo de ciclodextrina utilizada (cantidad inicial de paclitaxel añadida: 10 mg)

Formulación	Tamaño (nm)	PTX ( $\mu$ g/mg)
PTX-NP	204 $\pm$ 4	0,29 $\pm$ 0,13
PTX- $\beta$ -CD-NP	298 $\pm$ 6	40,5 $\pm$ 5,12
PTX-OH- $\beta$ -CD-NP	307 $\pm$ 7	171,01 $\pm$ 13,41
PTX-NH- $\beta$ -CD-NP	310 $\pm$ 6	99,26 $\pm$ 10,13

Los resultados muestran la media  $\pm$  desviación estándar (n = 6). PTX-NP: nanopartículas convencionales de PVM/MA con paclitaxel; PTX- $\beta$ -CD-NP: nanopartículas de PVM/MA y  $\beta$ -CD con paclitaxel; PTX-OH- $\beta$ -CD-NP: nanopartículas de PVM/MA y OH- $\beta$ -CD con paclitaxel; y PTX-NH- $\beta$ -CD-NP: nanopartículas de PVM/MA y NH- $\beta$ -CD con paclitaxel.

Ejemplo 7Estudio farmacocinético tras la administración oral de distintas formulaciones de paclitaxel

El paclitaxel es un fármaco que se caracteriza por tener un perfil farmacocinético dependiente de la dosis. Por tanto, fue necesario previamente determinar el perfil farmacocinético tras administrar por vía intravenosa u oral la formulación comercial de paclitaxel a la dosis seleccionada para su formulación en nanopartículas (10 mg/kg).

- 5 Los estudios farmacocinéticos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas del Comité Ético de la Universidad de Navarra así como de la legislación Europea sobre animales de experimentación (86/609/EU). Para ello, ratas Wistar macho con un peso promedio 225 g (Harlan, España) se aislaron en jaulas metabólicas 12 horas antes de la administración de las formulaciones, sin acceso a alimento, pero permitiéndoles libre acceso a agua potable.

Tabla 8

- 10 Características físicoquímicas de las diferentes formulaciones con complejo paclitaxel-ciclodextrina utilizadas en los estudios farmacocinéticos

Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Rendimiento (%)	PTX ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
PTX-NP	204 $\pm$ 4	0,07	-38,3 $\pm$ 2,1	51,2 $\pm$ 6,6	0,29 $\pm$ 0,13
PTX- $\beta$ -CD-NP	298 $\pm$ 6	0,21	-39,3 $\pm$ 5,2	63,3 $\pm$ 2,9	40,5 $\pm$ 5,12
PTX-OH- $\beta$ -CD-NP	307 $\pm$ 7	0,24	-42,1 $\pm$ 1,4	68,6 $\pm$ 4,4	171,01 $\pm$ 13,41
PTX-NH- $\beta$ -CD-NP	310 $\pm$ 6	0,18	-34,5 $\pm$ 3,9	59,5 $\pm$ 4,6	99,26 $\pm$ 10,13

Los resultados muestran la media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 8$ ). PTX-NP: nanopartículas convencionales de PVM/MA con paclitaxel; PTX- $\beta$ -CD-NP: nanopartículas de PVM/MA y  $\beta$ -CD con paclitaxel; PTX-OH- $\beta$ -CD-NP: nanopartículas de PVM/MA y OH- $\beta$ -CD con paclitaxel; y PTX-NH- $\beta$ -CD-NP: nanopartículas de PVM/MA y NH- $\beta$ -CD con paclitaxel.

- 15 La tabla 8 resume las características físicoquímicas principales de las nanopartículas sometidas a ensayo en el estudio farmacocinético. Las nanopartículas control (PTX-NP) muestran un tamaño cercano a los 200 nm con una carga superficial negativa de -38 mV. Además, las nanopartículas que contienen el complejo PTX-CD encapsulado son significativamente mayores (cercasas a los 300 nm) y muestran un potencial zeta similar en todos los casos. Por último, es de destacar que la presencia del complejo PTX-CD no ejerce ningún efecto sobre el rendimiento de fabricación de las nanopartículas que varía entre el 50-60%.

- 20 El estudio farmacocinético se dividió en tres fases. En el primer estudio se administraron 10 mg/kg de la formulación comercial de paclitaxel (Taxol®) por vía intravenosa (i.v.) y oral a dos grupos de ratas Wistar macho ( $n = 6$ ). El segundo estudio consistió en administrar por vía oral disoluciones de paclitaxel (10 mg/kg) con (i)  $\beta$ -CD, (ii) OH- $\beta$ -CD o (iii) NH- $\beta$ -CD, a grupos de ratas formados por 6 animales. Finalmente, para el estudio farmacocinético de las diferentes formulaciones, se administraron por vía oral a distintos grupos de animales las diferentes formulaciones de nanopartículas (i) PTX-OH- $\beta$ -CD-NP, (ii) PTX- $\beta$ -CD-NP, (iii) PTX-NH- $\beta$ -CD-NP o (iv) PTX-NP a los animales. La dosis de paclitaxel seleccionada fue de 10 mg/kg.

- 30 Tras la administración se extrajo a diferentes tiempos (0,10, 30, 60, 90, 180, 360, 480 minutos, 24 y 30 horas) un volumen de sangre de aproximadamente 300  $\mu\text{l}$ , utilizando EDTA como anticoagulante y recuperando la volemia del animal (rata) con un volumen equivalente de solución salina fisiológica por una vía intraperitoneal (i.p.). El análisis farmacocinético de los resultados obtenidos tras la administración de paclitaxel se realizó utilizando el procedimiento de ajuste no compartimental del programa de ajuste farmacocinético WinNonlin 1.5 (Pharsight Corporation, Mountain View, Estados Unidos).

- 35 Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8. Tal como puede observarse, la administración i.v. de la formulación convencional (taxol comercial) muestra un pico de concentración de paclitaxel en plasma en la primera toma de muestra, seguido de una disminución bifásica a lo largo del tiempo. Dicho perfil es similar al descrito por otros autores (Yeh *et al.*, Pharm Res 22(6): 867-74, 2005). Cuando dicha formulación comercial se administró por vía oral (figura 8B), los niveles plasmáticos de paclitaxel fueron nulos. Se obtuvieron resultados similares al administrar los complejos PTX:CD, ninguno de los cuales permitió detectar o cuantificar niveles significativos de paclitaxel a lo largo del tiempo. Por el contrario, al administrar por vía oral las formulaciones de paclitaxel en nanopartículas que contenían ciclodextrinas y paclitaxel, pudo comprobarse que estas formulaciones daban lugar a niveles plasmáticos sostenidos a lo largo del tiempo durante, al menos, 24 horas. En el periodo de tiempo comprendido desde las 4 horas hasta las 24 horas tras la administración de dichas nanopartículas, pudo observarse para las tres formulaciones un meseta de concentración plasmática típica de las formulaciones que liberan el fármaco con cinéticas de orden 0. En cualquier caso, las formulaciones de PTX- $\beta$ -CD-NP y PTX-OH- $\beta$ -CD-NP permiten obtener niveles plasmáticos considerablemente superiores (3-4 veces) a los obtenidos con la formulación de PTX-NH- $\beta$ -CD-NP. También es interesante resaltar que la administración de paclitaxel en nanopartículas convencionales no permitió la absorción del fármaco.

La tabla 9 muestra los valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras realizar un análisis no

compartimental de los datos experimentales obtenidos tras administrar las distintas formulaciones de paclitaxel en nanopartículas. Tal como puede observarse en dicha tabla, el valor de AUC y MRT experimenta variaciones significativas en función del tipo de ciclodextrina usada en la formulación. En el caso de las formulaciones orales de PTX-OH-β-CD-NP y PTX-β-CD-NP, se obtuvieron valores de AUC similares. En ambas formulaciones orales (PTX-OH-β-CD-NP y PTX-β-CD-NP) la concentración máxima alcanzada es significativamente mayor que la alcanzada en el resto de las formulaciones en un periodo de tiempo de 6 y 5 horas, respectivamente. El tiempo medio de residencia (MRT) del fármaco en el organismo fue similar para las tres formulaciones con ciclodextrinas. Estos valores fueron entre 3 y 5 veces superiores a los alcanzados tras administrar por vía oral la formulación comercial (Taxol®).

- 5
- 10 Del mismo modo, la semivida de eliminación del fármaco en la fase terminal ( $T_{1/2z}$ ) fue similar para las formulaciones de nanopartículas que contenían ciclodextrina y paclitaxel, y, en cualquier caso, inferior a la obtenida para la formulación comercial administrada por vía intravenosa (Taxol®).

Tabla 9

Parámetros farmacocinéticos de las diferentes formulaciones sometidas a ensayo

Formulación	Vía de Admon.	AUC (ng h/ml)	C <sub>max</sub> (ng)	T <sub>max</sub> (h)	MRT (h)	T <sub>1/2z</sub> (h <sup>-1</sup> )	Cl/F (l/h)	Vss/F (L)
Taxol®	i.v.	11.126	2.541	0,22	3,00	3,71	0,23	0,68
Taxol®	Oral	0	0	0	0	0	0	0
PTX-OH-β-CD-NP	Oral	67.127*	5.679	6,17	11,09*	1,32	0,05	0,51
PTX-β-CD-NP	Oral	65.965*	3.171	4,90	13,72*	1,48	0,04	0,59
PTX-NH-β-CD-NP	Oral	14.612	1.470	4,66	9,97*	0,89	0,20	1,75
PTX-NP	Oral	0	0	0	0	0	0	0
Complejo PTX-OH-β-CD	Oral	0	0	0	0	0	0	0
Complejo PTX-β-CD	Oral	0	0	0	0	0	0	0
Complejo PTX-NH-β-CD	Oral	0	0	0	0	0	0	0

- 15 \*  $p < 0,05$  PTX-OH β-CD-NP, PTX-β-CD-NP y PTX-NH β-CD-NP frente a formulación comercial (Taxol®). Prueba de la U de Mann Whitney.

AUC<sub>0-inf</sub> : área bajo la curva de niveles plasmáticos; C<sub>max</sub>: concentración máxima; T<sub>max</sub>: tiempo en el cual se alcanza la C<sub>max</sub>; MRT: tiempo medio de residencia; T<sub>1/2z</sub>: semivida biológica en la fase de eliminación terminal

- 20 Cl/F: aclaramiento (Cl=Dosis x Biodisponibilidad/AUC); Vss: volumen de distribución en estado estacionario (Vss=Dosis x AUMC/AUC<sup>2</sup>). Los valores de aclaramiento y volumen de distribución están normalizados frente al valor de la biodisponibilidad oral de cada formulación

PTX-OH-β-CD-NP: nanopartículas de PVM/MA y OH-β-CD con paclitaxel; PTX-β-CD-NP: nanopartículas de PVM/MA y β-CD con paclitaxel; PTX-NH-β-CD-NP: nanopartículas de PVM/MA y NH-β-CD con paclitaxel; y PTX-NP: nanopartículas convencionales de PVM/MA con paclitaxel.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Nanopartícula que comprende un polímero biodegradable, una ciclodextrina o un derivado de la misma, y una molécula biológicamente activa, en la que
- 5 - dicho polímero biodegradable es un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA),
- dicho derivado de ciclodextrina es una ciclodextrina que tiene al menos un grupo hidroxilo terminal modificado, y
- dicha molécula biológicamente activa es paclitaxel.
2. Nanopartícula según la reivindicación 1, en la que dicha ciclodextrina, o derivado de la misma, se selecciona del grupo que consiste en  $\beta$ -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina, 6-monodesoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina y mezclas de las mismas.
- 10 3. Composición farmacéutica que comprende al menos una nanopartícula que comprende un polímero biodegradable, una ciclodextrina o un derivado de la misma, y una molécula biológicamente activa, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, y un excipiente, vehículo o adjuvante farmacéuticamente aceptable, en la que
- 15 - dicho polímero biodegradable es un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA),
- dicho derivado de ciclodextrina es una ciclodextrina que tiene al menos un grupo hidroxilo terminal modificado, y
- dicha molécula biológicamente activa es paclitaxel.
- 20 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, en la que dicha ciclodextrina, o derivado de la misma, se selecciona de  $\beta$ -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina, 6-monodesoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina y mezclas de las mismas.
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, en la que dicha nanopartícula comprende:
- |   |                             |
|---|-----------------------------|
| Componente  | % en peso respecto al total |
| Copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) | 75,00 - 95,00%              |
| 25 $\beta$ -ciclodextrina                                   | 10,00 - 24,99%              |
| Paclitaxel  | 0,01 - 15,00%               |
| o, alternativamente,  |                             |
| Componente  | % en peso respecto al total |
| Copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) | 70,00 - 95,00%              |
| 30 2-Hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina                 | 5,00 - 24,99%               |
| Paclitaxel  | 0,01 - 20,00%               |
| o, alternativamente,  |                             |
| Componente  | % en peso respecto al total |
| Copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA) | 75,00 - 95,00%              |
| 35 6-monodesoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina         | 5,00 - 24,99%               |
| Paclitaxel  | 0,01 - 20,00%.              |
6. Procedimiento para la producción de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 que comprende la etapa de incubar simultáneamente dicho polímero biodegradable y un complejo (ciclodextrina o derivado de la misma):(molécula biológicamente activa) (complejo [CD:MBA]), en un disolvente orgánico,
- 40 antes de proceder a la desolvatación de dicho polímero biodegradable con una disolución hidroalcohólica; o, alternativamente, la etapa de incubar nanopartículas de dicho polímero biodegradable con una disolución acuosa que comprende dicho complejo [CD:MBA], en el que
- dicho polímero biodegradable es un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (PVM/MA),

- dicho derivado de ciclodextrina es una ciclodextrina que tiene al menos un grupo hidroxilo terminal modificado, y
- dicha molécula biológicamente activa es paclitaxel.

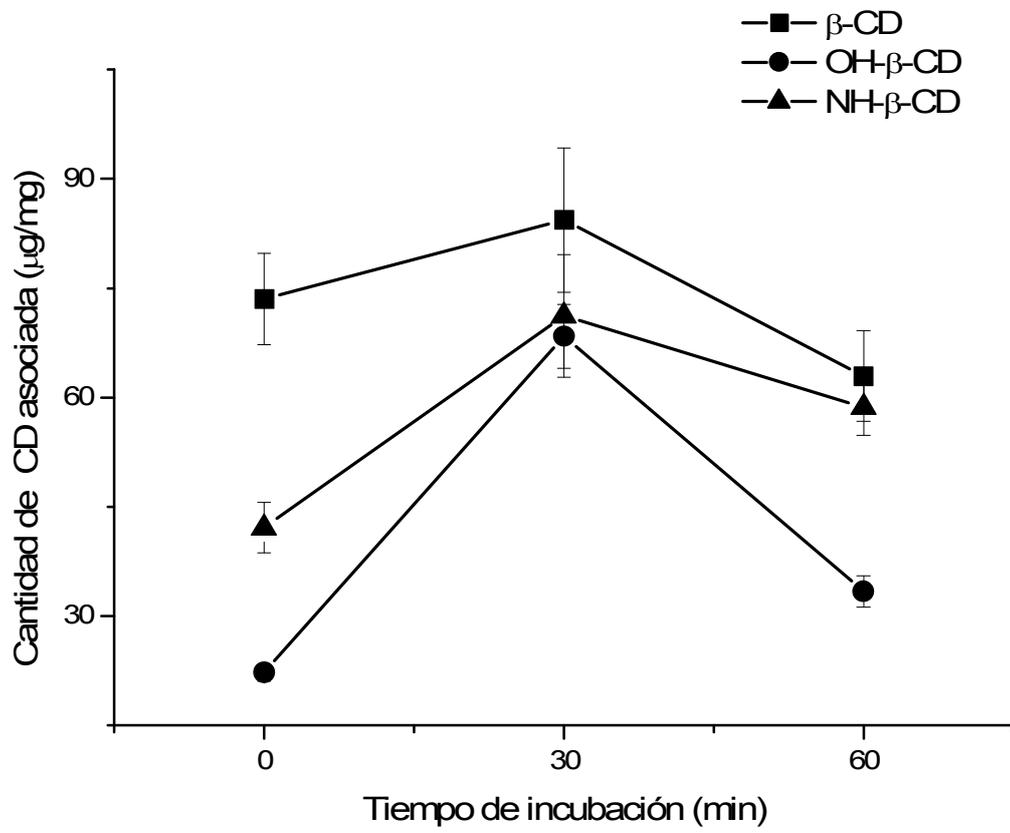


Figura 1

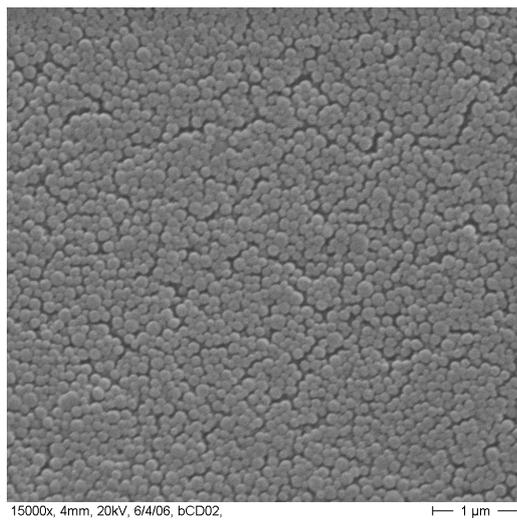


Figura 2

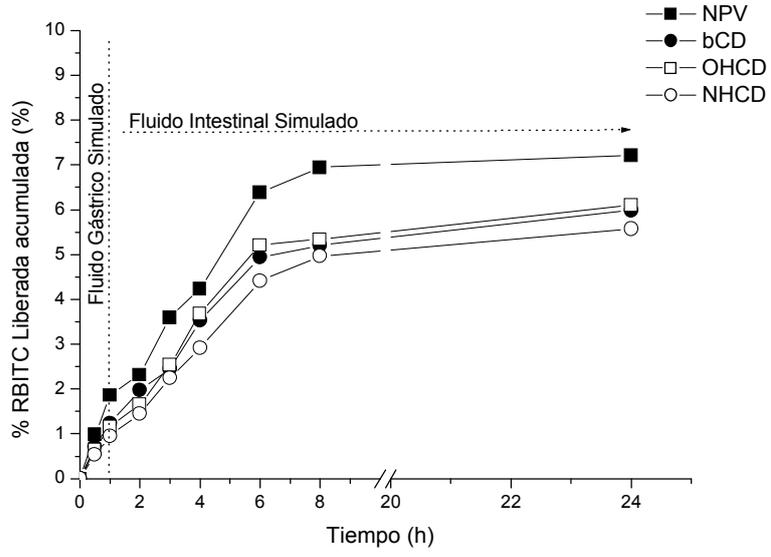


Figura 3

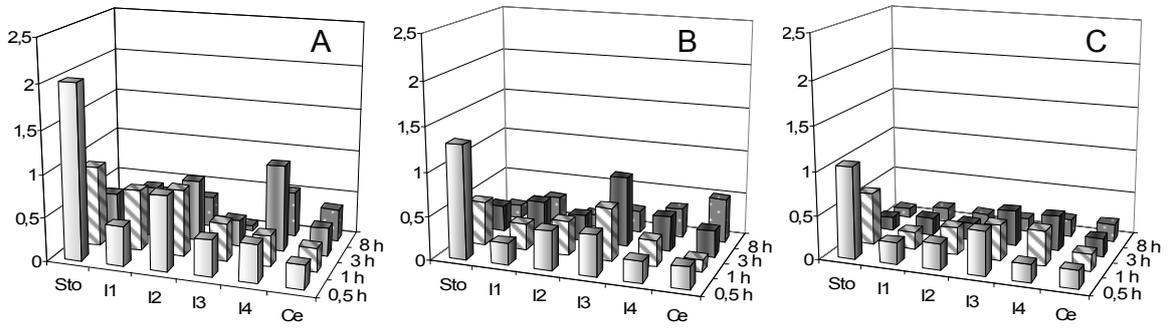


Figura 4

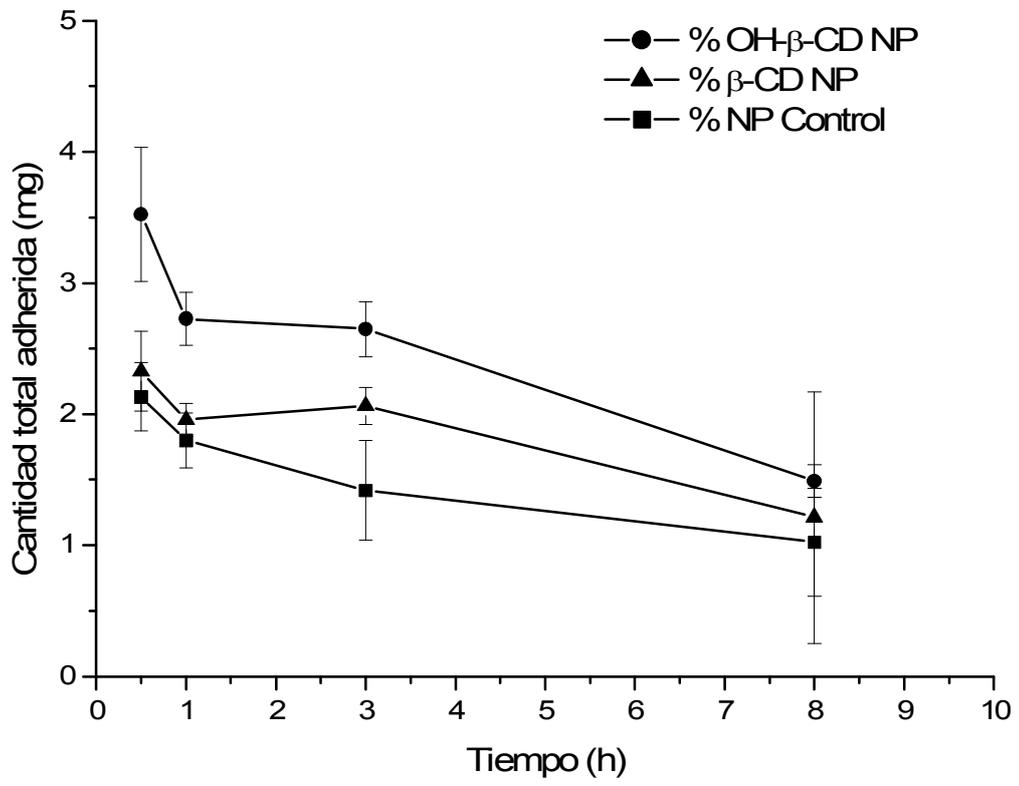


Figura 5

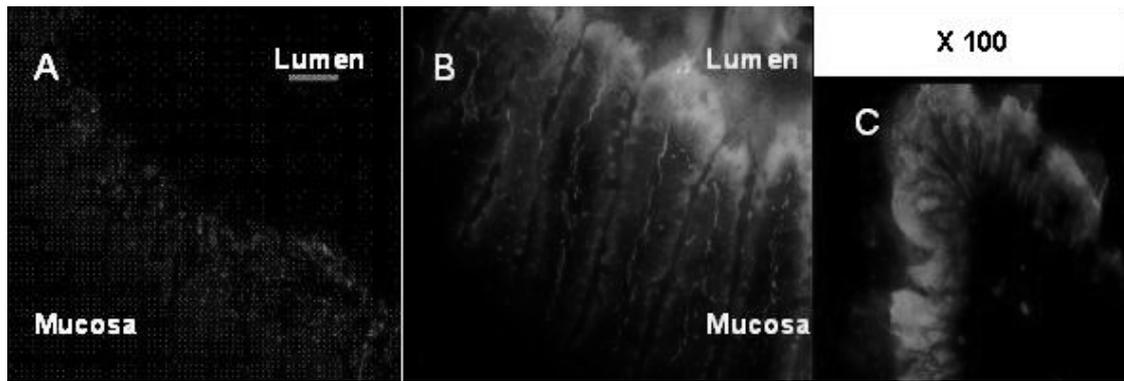


Figura 6

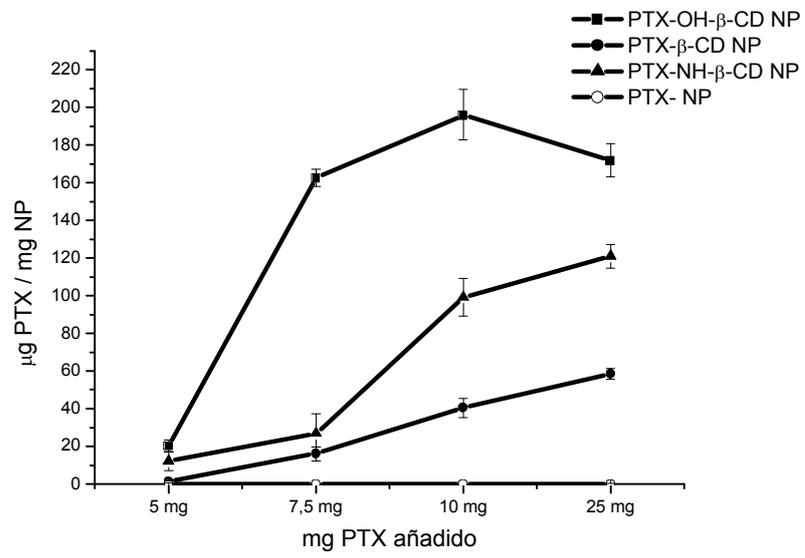
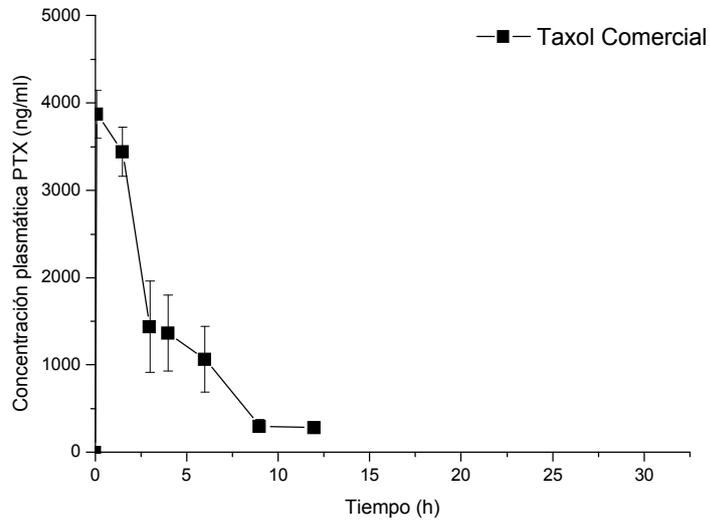


Figura 7

**A**



**Figura 8A**

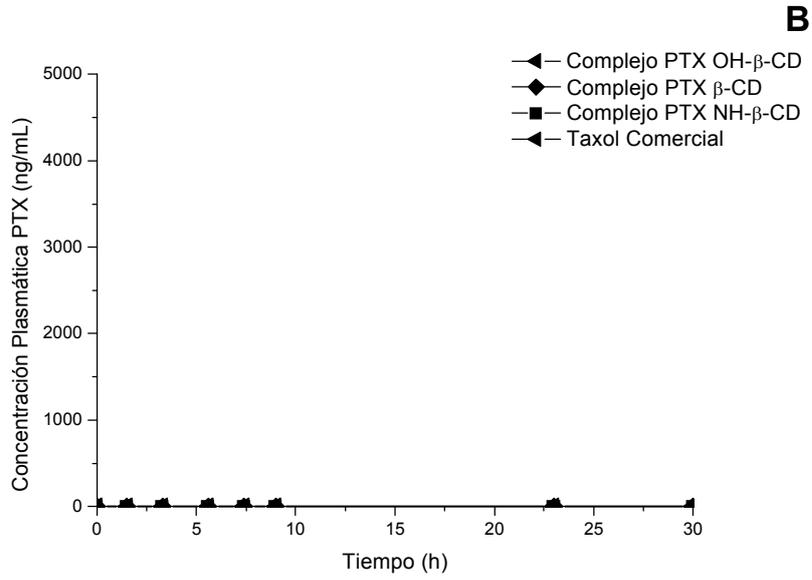


Figura 8B

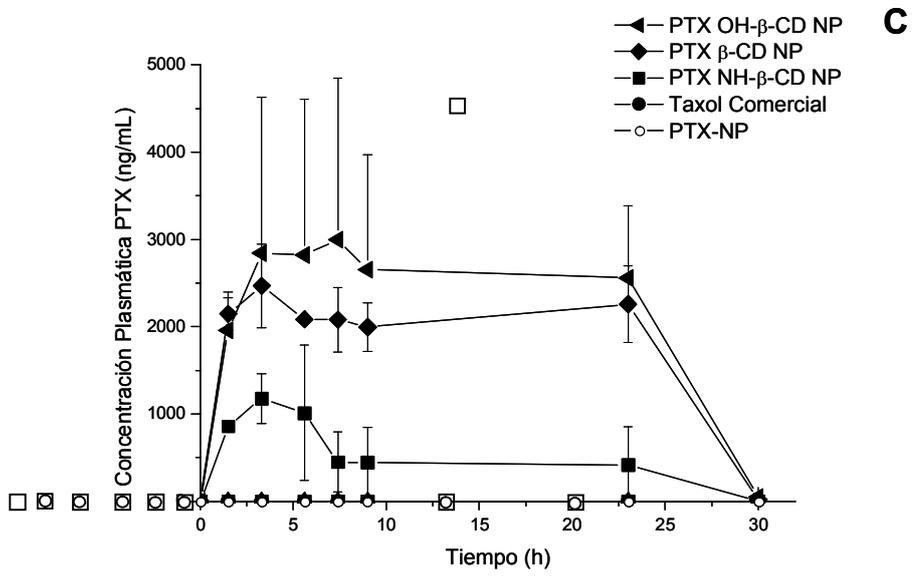


Figura 8C