

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 743**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 31/4375** (2006.01)

**A61K 31/573** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2013 PCT/EP2013/000396**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013 WO13127490**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2013 E 13703735 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2819659**

54 Título: **Procedimiento para la fabricación de nanopartículas cargadas con principio activo**

30 Prioridad:

**29.02.2012 DE 102012004099**

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

**11.10.2018**

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)  
Frankfurter Strasse 250  
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**WEIGANDT, MARKUS;  
VOSS, SENTA;  
MILLER, TOBIAS y  
GOEPFERICH, ACHIM**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 685 743 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

Procedimiento para la fabricación de nanopartículas cargadas con principio activo

La presente invención se refiere a un procedimiento novedoso para la fabricación de nanopartículas cargada con principio/s activo/s así como su uso como medicamento.

5 Las nanopartículas son una fórmula innovadora para la liberación controlada de principios activos farmacéuticos. En particular, las nanopartículas a base de polímeros encontraron en las últimas décadas gran interés. En estos sistemas se incorpora/n el/los principio/s activo/s en una matriz de polímero y es/son liberado/s de manera controlada dependiendo de la naturaleza de la matriz. Son ventajas esenciales de tales sistemas: 1) elevación de la solubilidad de principios activos hidrófobos, 2) reducción de los efectos secundarios no deseados por liberación específica al objetivo, 3) control de la farmacocinética del principio activo mediante el soporte del principio activo así como 4) impedimento de la degradación prematura de los principios activos después de la inyección.

10 Por la fracción de polímeros en las nanopartículas se aumenta, respecto a la administración exclusiva del principio activo, la cantidad total necesaria para su administración terapéutica. Por ello son deseables nanopartículas con una carga de principio activo tan alta como sea posible, es decir una relación tan alta como sea posible de principio activo frente a la sustancia auxiliar.

15 Las sustancias auxiliares para los medicamentos tienen que satisfacer elevados requerimientos respecto a su inocuidad y calidad fisiológica, deben probarse en ensayos sofisticados frente a las autoridades regulatorias responsables. Como sustancias auxiliares para el desarrollo de nanopartículas se usaron y se usan por ello de manera preferida aquellas sustancias auxiliares que ya están aprobadas para el uso como medicamentos. Son ejemplos de tales sustancias auxiliares establecidas que entran en consideración para nanopartículas, poli-ácido láctico, poli-ácido láctico-co-glicólico o policaprolactona.

20 De manera desventajosa, las sustancias auxiliares aprobadas no muestran sin embargo una compatibilidad pronunciada con el principio activo y conducen por ello a sistemas que pueden llevar sólo una baja carga.

25 Una ruta para el mejoramiento de la compatibilidad de sustancia auxiliar-principio activo es el uso de polímeros de nuevo tipo. Debido a los elevados requerimientos ya mencionados sobre tales sustancias auxiliares, el desarrollo de nanopartículas con tales sustancias auxiliares (aún no aprobadas), está asociado con un elevado esfuerzo en tiempo y costos. Debe añadirse además que las sustancias auxiliares de nuevo tipo tampoco están disponibles en la calidad requerida para medicamentos (calidad GMP).

30 Pueden fabricarse nanopartículas sobre base de polímeros, con diferentes procedimientos. Los procedimientos de fabricación son:

#### 1. Métodos de evaporación de solvente

a. Procedimientos de solvente/no solvente (también conocidos como procedimientos de emulsión aceite en agua).

35 El polímero y principio activo son disueltos en un solvente orgánico no miscible con agua, en particular diclorometano, y son introducidos en una fase acuosa mediante movimiento/agitación constante. A partir de la emulsión que surge con ello, a continuación se elimina el solvente orgánico sea bajo vacío o a presión normal (véase por ejemplo V.P.Sant, D.Smith, y J.C.Leroux. Enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs by poly(ethylene glycol)-block-poly(alkil acrylate-co-methacrylic acid) self-assemblies. J Control Release. 104:289-300 (2005)). Durante este proceso surgen las nanopartículas cargadas.

b. Procedimiento de emulsión múltiple (procesamiento agua en aceite en agua)

40 Las técnicas de emulsión agua en aceite en agua son adecuadas de manera particular para la fabricación de nanopartículas con principios activos más bien hidrofílicos y por ello solubles en agua. Al respecto, el polímero es disuelto en un solvente no miscible en agua (por ejemplo diclorometano) y combinado con una fase acuosa, que contiene el principio activo disuelto. Las fases combinadas son homogeneizadas (por ejemplo mediante agitación o tratamiento con ultrasonido), en lo cual se obtiene una emulsión agua en aceite. Entonces la emulsión agua en aceite es inyectada en una fase acuosa, que contiene como estabilizante un emulsificante adicional. Como siguiente última etapa se eliminan nuevamente el solvente bajo vacío o a presión normal (K.Avgoustakis, A.Beletsi, Z.Panagi, P.Klepetsanis, A.G.Karydas, y D.S.Ithakissios. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties; J Control Release. 79:123-135 (2002); C.X.Song, V.Labhasetwar, H.Murphy, X.Qu, W.R.Humphrey, R.J.Shebuski, y R.J.Levy. Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. Journal of Controlled Release. 43:197-212 (1997)).

## c. Evaporación de co-solvente

En el método, se mezclan principio activo y polímero en un solvente orgánico y se inyectan en la fase acuosa. El solvente orgánico es eliminado al vacío o a presión normal. A diferencia del método de emulsión, el solvente usado aquí es completamente miscible en agua, de modo que no surgen emulsiones.

## 5 2. Diálisis

## a. Diálisis directa

En el procedimiento se disuelven el principio activo así como el polímero, en un solvente orgánico miscible con agua y se aplican en un dispositivo para diálisis. La diálisis puede ocurrir contra agua o un amortiguador. La fabricación de las nanopartículas ocurre mediante intercambio lento constante del solvente que sigue al gradiente de concentración de las fases interna y externa. Sigue siendo notable que las membranas de diálisis usadas son concretamente permeables para moléculas pequeñas (principio activo), pero el polímero permanece en la fase interior debido al tamaño de fusión (H.J. Jeon, J.I. Jeong, M.K. Jang, Y.H. Park, y J.W. Nah. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. International Journal of Pharmaceutics. 207:99-108 (2000)).

## 15 3. Métodos de hidratación en película

Este procedimiento es un estándar para la fabricación de formulaciones liposomales. Al respecto, se disuelve el lípido o polímero en un solvente orgánico y se evapora al vacío. A continuación se reconstituye la película que se forma en el aparato de vidrio en amortiguador, solución de principio activo o agua. Es una desventaja que la película de polímero-principio activo resultante no puede dispersarse nuevamente o puede hacerse sólo parcialmente (A. Richter, C. Olbrich, M. Krause, J. Hoffmann, y T. Kissel. Polymeric micelles for parenteral delivery of Sagopilone: physicochemical characterization, novel formulation approaches and their toxicity assessment in vitro as well as in vivo. Eur J Pharm Biopharm. 75:80-89 (2010)). Sin embargo, si se alcanza la nueva dispersión de la película, al procedimiento después de la fabricación de la partícula cruda sigue usualmente una etapa de clasificación de tamaño (extrusión de membrana, tratamiento con ultrasonido) (E. Blanco, E.A. Bey, Y. Dong, B.D. Weinberg, D.M. Sutton, D.A. Boothman, y J. Gao. Beta-lapachone-containing PEG-PLA polymer micelles as novel nanotherapeutics against NQO1-overexpressing tumor cells. J Control Release. 122:365-374 (2007); Richter et al. como se citó anteriormente).

Un trabajo de resumen sobre la formación y clasificación de estructuras anfílicas de nanopartículas de copolímeros de bloque, menciona procedimientos para la fabricación de nanoesferas como eliminación de solvente (desplazamiento de solvente) y nanoprecipitación, sin ocuparse de sus detalles (K. Lechtford et al. A review about formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. Eur J Pharm Biopharm 65 (2007) 259-269).

Lamprecht A. et al. describen una diálisis de nanopartículas contra agua pura, para eliminar sustancias auxiliares y principios activos no encapsulados (Alf Lamprecht A. et al. Design of rolipram-loaded nanoparticles: comparison of two preparation methods. J Contr Release 71 (2001) 297-306) K. Elkharraz E. et al describen la fabricación de micropartículas de PLGA libres de principio activo y cargadas con Paclitaxel, con un método de extracción/evaporación de solvente aceite en agua (O/W) (Paclitaxel-loaded microparticles and implants for the treatment of brain cancer: Preparation and physicochemical characterization. Int J Pharm 314 (2006) 127-136).

La fabricación de nanopartículas con polímeros probados por medio del procedimiento descrito anteriormente conduce frecuentemente a una carga de principio activo insuficiente para su aplicación terapéutica. Fue deseable la preparación de un procedimiento para la fabricación de nanopartículas, que con sustancias auxiliares convencionales, a pesar de los problemas de compatibilidad sustancia auxiliar-principio activo indicados aquí, permite la fabricación de nanopartículas con elevada carga de principio activo.

Debido a la incorporación del principio activo en el polímero, los procedimientos conocidos conducen también a nanopartículas, a partir de las cuales se libera el principio activo justo con un cierto retardo temporal (*lag time*). Esto tiene como consecuencia que después de la administración de las nanopartículas, se alcanza un nivel terapéutico de principio activo con un retardo temporal, de modo que para alcanzar un inicio rápido de acción, es necesaria la administración adicional del principio activo en una forma rápidamente disponible. Por ello, fueron deseables además nanopartículas, que después de la administración liberen directamente una cantidad de principio activo, de modo que el principio activo esté a disposición en cantidad terapéutica, ya antes de la liberación retardada de principio activo desde los polímeros.

Por ello, fue objetivo de la presente invención poner a disposición un procedimiento para la fabricación de nanopartículas, que no esté afectado con las desventajas listadas previamente del procedimiento de fabricación en cuestión. En particular, el procedimiento debería hacer posible la preparación de nanopartículas que exhiban cargas

más altas de principio activo, comparado con procedimientos convencionales y nanopartículas fabricadas con polímeros convencionales. Además, las nanopartículas fabricadas deberían, ya directamente después de su administración, liberar una dosificación inicial de principio activo y así conducir a un inicio de acción rápido.

5 Estos objetivos pudieron ser logrados con un procedimiento para la fabricación de nanopartículas, que comprende las siguientes etapas: (a) disolución de por lo menos un principio activo y por lo menos un polímero en un solvente orgánico, (b) mezcla de la solución fabricada en la etapa (a) con una fase acuosa, (c) evaporación del solvente orgánico, (d) purificación de las nanopartículas cargadas con principio activo obtenidas en la etapa (c), mediante diálisis frente a la solución acuosa de diálisis que contiene el mismo principio activo. Por ello, es objetivo de la invención un procedimiento para la fabricación de nanopartículas, que comprende las etapas (a) disolución de por lo menos un principio activo y por lo menos un polímero en un solvente orgánico, (b) mezcla de la solución fabricada en la etapa (a) con una fase acuosa, (c) evaporación del solvente orgánico, (d) purificación de las nanopartículas cargadas con principio activo obtenidas en la etapa (c), mediante diálisis frente a la solución acuosa de diálisis que contiene el mismo principio activo.

10 La solución que surge por disolución del principio activo y del polímero en un solvente orgánico de acuerdo con la etapa (a), es denominada antes y a continuación también como fase orgánica.

15 Como fase acuosa puede usarse agua, en la cual se disuelven sustancias solubles en agua, en particular sales, como por ejemplo sales amortiguadoras, ácidos o bases. La mezcla de la solución fabricada de acuerdo con la etapa (a) con la fase acuosa, puede ocurrir mediante adición de la solución fabricada de acuerdo con la etapa (a) a la fase acuosa o la adición de fase acuosa a la solución fabricada de acuerdo con la etapa (a). Preferiblemente, la adición de la una solución a la otra ocurre mediante agitación o sacudimiento constante y dado el caso mediante uso de ultrasonido. De modo conveniente, en la mezcla se añade la fase con menor volumen a la fase con mayor volumen, pero también es posible el procedimiento inverso.

20 La fase acuosa consiste en un solvente acuoso. En el sentido de la invención, un "solvente acuoso" es agua, que puede contener las sustancias disueltas aquí, en particular, electrolitos, como por ejemplo sales, ácidos o bases.

25 La eliminación del solvente orgánico puede ocurrir mediante vaporización (evaporación) bajo condiciones normales, es decir a temperatura ambiente y presión normal y puede ser acelerada mediante elevación de la temperatura y/o reducción de la presión, es decir mediante disminución de la presión hasta un valor por debajo de la presión del aire. Preferiblemente, la evaporación ocurre a temperatura elevada, de modo particular preferiblemente a 30 a 60°C y/o presión reducida, preferiblemente a  $10^{-4}$  a 80 mbar. De modo conveniente, la evaporación puede ocurrir por ejemplo con un evaporador rotativo.

30 La diálisis puede ocurrir con los dispositivos de diálisis corrientes, conocidos por los expertos, por ejemplo con una manguera de diálisis común en el laboratorio. De modo conveniente, se elige el tamaño de poro de la membrana de diálisis, de modo que el solvente orgánico y el principio activo pueden pasar libremente la membrana de diálisis, sin embargo el polímero no. La masa superior de exclusión (peso molecular de corte (MWCO)) de una membrana de diálisis adecuada está por ello preferiblemente por encima de la masa molecular del principio activo y del solvente, pero por debajo de la masa molecular de la molécula de polímero más pequeña presente en el polímero. Por ejemplo, para una masa molecular inferior del polímero de 15 kDa y una masa molar del principio activo de por ejemplo 300 Da, puede usarse una membrana de diálisis con un MWCO inferior a 5 kDa y superior a 1.5 kDa. En este ejemplo, son comunes y comercialmente disponibles membranas de diálisis con un MWCO de 3.5 kDa o 5 kDa.

35 Si la solución de diálisis no contiene un principio activo, debido a la diferencia de concentración entre el lado que contiene nanopartículas y el lado que contiene solución de diálisis, mediante la diálisis ocurre una disminución del principio activo del lado que contiene nanopartículas. Como consecuencia de la pérdida de principio activo en el solvente que rodea la nanopartícula, se tiene como resultado una fuerte caída de la concentración de principio activo de las nanopartículas respecto a este solvente, teniendo como consecuencia que el principio activo puede salir de las nanopartículas y entonces debido al gradiente de concentración pasar a la solución de diálisis y ser evacuado. Mediante el uso de acuerdo con la invención de solución de diálisis en la cual está disuelto el principio activo, se reduce por lo menos esta caída de concentración y con ello se contrarresta la pérdida de principio activo de las nanopartículas. El principio activo puede estar presente en la solución de diálisis en todas las concentraciones hasta su máxima solubilidad (solubilidad de saturación) en la solución de diálisis, preferiblemente la solución de diálisis está saturada con principio activo.

40 Si la solución de diálisis no contiene un principio activo, debido a la diferencia de concentración entre el lado que contiene nanopartículas y el lado que contiene solución de diálisis, mediante la diálisis ocurre una disminución del principio activo del lado que contiene nanopartículas. Como consecuencia de la pérdida de principio activo en el solvente que rodea la nanopartícula, se tiene como resultado una fuerte caída de la concentración de principio activo de las nanopartículas respecto a este solvente, teniendo como consecuencia que el principio activo puede salir de las nanopartículas y entonces debido al gradiente de concentración pasar a la solución de diálisis y ser evacuado. Mediante el uso de acuerdo con la invención de solución de diálisis en la cual está disuelto el principio activo, se reduce por lo menos esta caída de concentración y con ello se contrarresta la pérdida de principio activo de las nanopartículas. El principio activo puede estar presente en la solución de diálisis en todas las concentraciones hasta su máxima solubilidad (solubilidad de saturación) en la solución de diálisis, preferiblemente la solución de diálisis está saturada con principio activo.

45 La carga de principio activo de las nanopartículas puede ser reducida también mediante difusión y adhesión a las membranas usadas. Por ello, según una forma preferida de realización, la membrana de diálisis es puesta en contacto antes de la ejecución de la diálisis, con solución de diálisis que contiene principio activo, preferiblemente con una solución saturada con principio activo, de modo que la membrana se enriquece con principio activo, de manera correspondiente a la concentración de principio activo presente en la solución de diálisis. De acuerdo con

una forma de realización preferida de modo particular de la invención, la diálisis es ejecutada contra solución de diálisis saturada con principio activo y con una membrana de diálisis saturada con principio activo.

5 Como consecuencia del principio activo presente en la solución de diálisis, las nanopartículas fabricadas de acuerdo con el presente procedimiento exhiben además una cantidad de principio activo, que está adsorbida en las nanopartículas. Esta fracción de principio activo está disponible de manera ventajosa directamente para administración como dosificación inicial a los pacientes.

10 De acuerdo con una forma de realización ventajosa de la invención, la solución de diálisis contiene, aparte del principio activo, también sustancias disueltas, en particular electrolitos, de modo particular preferiblemente amortiguadores y/o sales, que también deberían estar presentes en la formulación provista para la administración de las nanopartículas. Debido al intercambio de líquidos que es consecuencia de la diálisis, de manera ventajosa y simple por esta ruta pueden obtenerse nanopartículas, que ya están presentes en un solvente adecuado para la administración a los pacientes. Con ello, antes de la administración a los pacientes debe asegurarse la ausencia de gérmenes, lo cual puede ocurrir por ejemplo y de manera sencilla por medio de filtración estéril. De modo alternativo puede también trabajarse la totalidad del procedimiento de fabricación bajo condiciones asépticas, de modo que no es necesaria una esterilización posterior.

15 Después de la diálisis, las nanopartículas están presentes en el solvente acuoso. Si, como se describió previamente, las nanopartículas son obtenidas en un solvente adecuado para la administración a los pacientes, como dosificación inicial para administración a los pacientes, aparte de principio activo adsorbido a las nanopartículas, está disponible también principio activo disuelto en el solvente.

20 Si el solvente acuoso es retirado de las nanopartículas, por ejemplo para la estabilización, lo cual puede ocurrir por ejemplo preferiblemente mediante liofilización o también mediante secado por atomización, durante el retiro del agua, el principio activo disuelto en el solvente precipita por lo menos parcialmente sobre las nanopartículas, de modo que está disponible como dosificación inicial así mismo para administración a los pacientes.

25 En el procedimiento de acuerdo con la invención se usan preferiblemente principios activos con una baja solubilidad de saturación en agua, preferiblemente con una solubilidad de saturación  $< 200 \mu\text{g/ml}$ , de modo particular preferiblemente con una solubilidad de saturación  $< 100 \mu\text{g/ml}$ , (medida en cada caso a  $25^\circ\text{C}$ ). Por ello, es objetivo de la invención también un procedimiento que se caracteriza porque el principio activo exhibe en agua una solubilidad de saturación  $< 200 \mu\text{g/ml}$ , preferiblemente una solubilidad de saturación  $< 100 \mu\text{g/ml}$ , medidas en cada caso a  $25^\circ\text{C}$ .

30 Como principios activos preferidos de modo particular, los principios activos se eligen de entre el grupo consistente en quimioterapéuticos, en particular taxol, camptotecina, complejos de platino o compuestos Lost de N, antiinflamatorios, como por ejemplo glucocorticoides, en particular dexametasona, mometasona, beclometasona o prednisolona, antiinfecciosos, como por ejemplo terapéuticos para VIH, en particular ritonavir, así como antimicóticos, en particular cetoconazol, itraconazol, griseofulvin, reductores de lípidos, como por ejemplo fenofibrat, antioxidantes y vitaminas, como por ejemplo tocoferol, ácido retinoico, colestalciferol, antibióticos, como por ejemplo vancomicina o teicomicina, adicionalmente colesterol así como ácidos grasos. Por ello es objetivo de la invención además un procedimiento que se caracteriza porque como principio activo se usa un principio activo que es elegido de entre el grupo consistente en quimioterapéuticos, en particular taxol, camptotecina, complejos de platino o compuestos Lost de N, antiinflamatorios, como por ejemplo glucocorticoides, en particular dexametasona, mometasona, beclometasona o prednisolona, antiinfecciosos, como por ejemplo terapéuticos para VIH, en particular ritonavir, así como antimicóticos, en particular cetoconazol, itraconazol, griseofulvin, reductores de lípidos, como por ejemplo fenofibrat, antioxidantes y vitaminas, como por ejemplo tocoferol, ácido retinoico, colestalciferol, antibióticos, como por ejemplo vancomicina o teicomicina, adicionalmente colesterol así como ácidos grasos.

45 De acuerdo con una forma preferida de realización de la invención, en el procedimiento se usa como polímero un polímero anfífilico. Por ello, es objetivo de la invención también el procedimiento de acuerdo con la invención que se caracteriza porque como polímero se usa un polímero anfífilico. Los polímeros anfífilicos están constituidos por una parte hidrofílica ("amante del agua") y una parte hidrófoba ("que tiene fobia al agua"). Debido a esta estructura, en mezclas heterogéneas de agua y solventes no miscibles con agua, en particular solventes orgánicos, como por ejemplo diclorometano, los polímeros anfífilicos se acumulan preferiblemente en las interfases entre la fase orgánica y la fase acuosa.

50 De acuerdo con una forma de realización particularmente ventajosa de la invención, como polímeros anfífilicos se usan copolímeros de bloque. Por ello, es objetivo de la invención también un procedimiento que se caracteriza porque como polímero, se usa un copolímero de bloque. Los copolímeros de bloque consisten en uno o varios, también diferentes bloques de un componente a) hidrofílico y un componente b) hidrófobo, en el que los bloques individuales pueden contener monómeros iguales con la misma o diferente longitud de cadena, o diferentes monómeros. Los componentes a) y b) pueden ser simultáneamente o independientemente uno de otro, lineales o

ramificados, en forma de peine o estrella. El componente b) puede ser también un polímero entrecruzado.

Como componentes b) hidrófobos particularmente adecuados están polímeros biodegradables como por ejemplo poliéster, poli- $\epsilon$ -caprolactona, poli- $\alpha$ -hidroxiéster, poli- $\beta$ -hidroxiéster, polianhídrido, poliamida, polifosfatos, polidioxanona, ácido polimálico, ácido poltartárico, polioctoéster, policarbonato, polisacárido, péptido y proteína.

- 5 Como componente a) hidrofílico, está constituido por elementos por lo menos bifuncionales y preferiblemente solubles en agua, son ejemplos de polímeros adecuados los polietilenglicoles, poliacrilamidas, polivinilalcohol, polisacáridos (por ejemplo celulosas y almidones modificados), alginatos, péptidos y proteínas.

Los copolímeros de bloque utilizables de acuerdo con la invención pueden contener como componente hidrofílico por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol, poliacrilamida, polivinilalcohol, polisacárido o un  
10 copolímero de ellos, preferiblemente copolímeros de bloque de polietilenglicol/polipropilenglicol, copolímeros de bloque de polietilenglicol/polipropilenglicol/polietilenglicol, y como componente hidrófobo poli-ácido láctico, ácido poliglicólico, poli-ácido hidroxibutírico, poli-ácido hidroxivaleriánico, o un copolímero de ellos, preferiblemente poli-ácido láctico-co-glicólico, además ácidos poliacrílicos, en particular ácido hidroxipropilacrilico o ácido hidroxipropilmetilacrilico, polisiloxano, en particular copolímero con ácido acrílico, poliestireno o un copolímero de  
15 ellos, en particular con poli-ácido láctico y ácido poliglicólico. por ello, es objetivo de la invención también un procedimiento que se caracteriza porque el copolímero de bloque contiene como componente hidrofílico polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol, poliacrilamida, polivinilalcohol, polisacárido o un copolímero de ellos, preferiblemente copolímero de polietilenglicol/polipropilenglicol, copolímero de polietilenglicol/polipropilenglicol/polietilenglicol, y como componente hidrófobo poli-ácido láctico, ácido poliglicólico,  
20 poli-ácido hidroxibutírico, poli-ácido hidroxivaleriánico, o un copolímero de ellos, preferiblemente ácido poli láctico-co-glicólico, además ácido poliacrílico, en particular ácido hidroxipropilacrilico o ácido hidroxipropilmetilacrilico, polisiloxano, en particular copolímeros con ácido acrílico, poliestireno o un copolímero de ellos, en particular con poli-ácido láctico y ácido poliglicólico.

De acuerdo con una formación ventajosa de la invención, como copolímeros de bloque se usan polietilenglicol-poli-ácido láctico, polietilenglicol-ácido poliglicólico, polietilenglicol-poli-ácido láctico-co-glicólico, polietilenglicol-poli-ácido hidroxivaleriánico, polietilenglicol-polisiloxano, polietilenglicol-polisiloxano-co-ácido acrílico, polietilenglicol-ácido polimetilmetacrilico, polietilenglicol-polimetil-ácido etacrilico, polietilenglicol-ácido poliisoprilacrilico, polietilenglicol-poliestireno. Por ello, es objetivo de la invención también un procedimiento que se caracteriza porque  
25 como copolímeros de bloque se usan polietilenglicol-poli-ácido láctico, polietilenglicol-ácido poliglicólico, polietilenglicol-poli-ácido láctico-co-glicólico, polietilenglicol-poli-ácido hidroxivaleriánico, polietilenglicol-polisiloxano, polietilenglicol-polisiloxano-co-ácido acrílico, polietilenglicol-ácido polimetilmetacrilico, polietilenglicol-ácido polimetil etacrilico, polietilenglicol-ácido poliisoprilacrilico, polietilenglicol-poliestireno.

De acuerdo con otra forma ventajosa de realización, en el procedimiento de acuerdo con la invención se usa como orgánico solvente un solvente, que es al menos parcialmente miscible con agua, preferiblemente es completamente  
35 miscible con agua. Por ello, es objetivo de la invención también un procedimiento que se caracteriza porque como solvente orgánico se usa un solvente que es al menos parcialmente miscible con agua, preferiblemente completamente miscible con agua.

En el sentido de la invención, un solvente al menos parcialmente miscible con agua es un solvente, que a temperatura ambiente (25 °C) puede mezclarse con agua en una relación de volumen de por lo menos 40/60 v/v  
40 (solvente orgánico/agua), para obtener una fase homogénea única. Si se supera la fracción máxima que puede mezclarse con agua para obtener una fase homogénea, ocurre una separación de fases entre la primera fase que contiene de modo homogéneo la fase orgánica y agua y una segunda fase que consiste en agua. Un solvente orgánico totalmente miscible con agua es un solvente orgánico que a temperatura ambiente (25 °C) puede mezclarse con agua en toda relación de volumen, para obtener una fase homogénea, única.

45 Los solventes orgánicos utilizables en el procedimiento de acuerdo con la invención son alcoholes lineales o ramificados, preferiblemente metanol, etanol, isopropanol, n-butanol o tert.-butanol, acetona, dimetilformamida, tetrahidrofurano o dimetilsulfóxido. Por ello, es objetivo de la invención también un procedimiento que se caracteriza porque como solvente orgánico se usan alcoholes lineales o ramificados, preferiblemente metanol, etanol, isopropanol, n-butanol o tert.-butanol, acetona, dimetilformamida, tetrahidrofurano o dimetilsulfóxido.

50 Para elevar su solubilidad, los principios activos que son ácidos o bases pueden ser usados de acuerdo con la invención preferiblemente en cada caso de modo complementario con una base o un ácido. Si el principio activo es un ácido entonces se le añade una base, si es una base ocurre la adición de un ácido. El ácido o la base pueden ser añadidos en el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en la etapa (a) o en la etapa (b). Por ello es objetivo de la invención también una forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, que se  
55 caracteriza porque en la etapa (a) de acuerdo con la reivindicación 1, en el solvente orgánico, aparte del polímero y principio activo está disuelto un ácido o una base y/o porque en el solvente acuoso de acuerdo con la etapa (b) de

la reivindicación 1 está disuelto un ácido o una base.

Son ácidos adecuados los ácidos orgánicos, preferiblemente ácido fórmico, ácido acético o ácido trifluoroacético, o ácidos inorgánicos, preferiblemente ácido clorhídrico, ácido nítrico o ácido sulfúrico, son bases adecuadas las bases orgánicas, preferiblemente dimetilamina o trimetilamina o bases inorgánicas, preferiblemente hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoníaco. Por ello, es objetivo de la invención también un procedimiento que se caracteriza porque el ácido es un ácido orgánico, preferiblemente ácido fórmico, ácido acético o ácido trifluoroacético, o un ácido inorgánico, preferiblemente ácido clorhídrico, ácido nítrico o ácido sulfúrico, y la base es una base orgánica, preferiblemente dimetilamina o trimetilamina o una base inorgánica, preferiblemente hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoníaco.

De acuerdo con una forma ventajosa de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, el solvente orgánico usado para la disolución de principio activo y polímero es elegido como se describe a continuación. Para ello, a una elección de solvente al menos parcialmente miscible con agua se añade y disuelve en cada caso una cantidad definida del principio activo que debiera ser incorporado en la formulación. De acuerdo con una forma conveniente de realización de la invención, la elección contiene como solvente por ejemplo alcoholes (metanol, etanol, isopropanol, 1-propanol, tert-butanol), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dioxano, tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo (ACN) y acetona. Si el principio activo es un ácido o una base, estos son añadidos preferiblemente de acuerdo con la forma de operar descrita previamente, en cada caso a un ácido o una base.

Para la disolución se disuelven en cada caso cantidades iguales de principio activo en respectivas cantidades iguales de solvente orgánico. La cantidad de principio activo y solvente orgánico que son usados en cada caso es variable, pero es crucial que la relación de principio activo a solvente sea en cada caso igual. Para la reacción práctica ha probado ser conveniente disolver en cada caso 1 mg de principio activo en 100 µl de solvente orgánico.

Si el principio activo no es soluble en un solvente orgánico, este solvente es poco adecuado para la fabricación de nanopartículas. Si se tiene como resultado una solución clara, se añaden y en cada caso se mezclan en etapas, cantidades iguales definidas en cada caso de solvente acuoso hasta que después de la adición y mezcla sea perceptible ópticamente una precipitación del principio activo (solubilidad óptica). La evaluación de la solubilidad óptica ocurre visualmente en un recipiente adecuado, preferiblemente en tubo de vidrio con diámetro pequeño, como son comunes por ejemplo en la cromatografía de gases (diámetro de 0,5 cm, 3 cm de altura) a la luz fría, que preferiblemente irradia desde arriba, contra una superficie oscura, preferiblemente contra una superficie negra, como base. En la figura 1 se presenta una representación esquemática de la forma de operar.

De acuerdo con una forma preferida de realización de la invención, como solvente acuoso se usa un solvente acuoso de la misma composición que el solvente acuoso que encuentra aplicación en el procedimiento de acuerdo con la etapa (b) según la reivindicación 1

El solvente orgánico, del cual es miscible la máxima cantidad en solvente acuoso sin que el principio activo precipite desde la solución, es particularmente adecuado para el uso en el procedimiento de acuerdo con la invención. Por ello, es objetivo de la presente invención también una forma de realización del procedimiento, que se caracteriza porque en la fabricación de las nanopartículas de acuerdo con la etapa (a) de la reivindicación 1, como solvente orgánico se usa el solvente orgánico en el cual en la fabricación de una solución que contiene el principio activo en cantidades definidas, en comparación con soluciones que contienen este principio activo en iguales cantidades en cada caso en otros solventes orgánicos, por adición y mezcla sucesiva de solvente acuoso es miscible la máxima cantidad de solvente acuoso, sin que precipite el principio activo desde la solución.

Mediante uso de un solvente orgánico, en el cual por adición y mezcla sucesiva de solvente acuoso es miscible la máxima cantidad de solvente acuoso, puede asegurarse que por la evaporación del solvente orgánico de acuerdo con la etapa (c) de la reivindicación 1, en comparación con el uso de otros solventes, el principio activo y polímero permanecen en solución por más tiempo.

La evaporación del solvente orgánico de acuerdo con la etapa (c) según la reivindicación 1 desde la mezcla de solventes fabricada de acuerdo con la reivindicación (b), como consecuencia de la disminución de la cantidad de solvente orgánico en la mezcla de solventes, conduce a una reducción continua de la solubilidad de principio activo y polímero en la mezcla de solventes. Si para un solvente orgánico en mezcla con el solvente acuoso, por la evaporación aparece como resultado ya para una baja reducción de su cantidad en la mezcla de solventes, una muy baja solubilidad para el principio activo, precipita el principio activo ya en un momento en el cual el polímero aún está completamente o ampliamente disuelto y aún no se forman nanopartículas. Si precipita el principio activo antes de la formación de la nanopartícula, ella puede ya no estar atrapada en el polímero, de modo que en el curso de la evaporación posterior se obtienen nanopartículas, en las cuales está atrapado poco o en general nada de principio activo.

Con uso de un solvente orgánico, en el cual por adición y mezcla sucesiva de solvente acuoso es miscible la máxima cantidad de solvente acuoso, puede prolongarse el periodo de tiempo en el cual el principio activo permanece en solución durante la evaporación, y evitarse la precipitación prematura indeseada de principio activo. Mediante el espacio prolongado de tiempo en el cual el principio activo está presente en solución durante la evaporación, se forman preferiblemente primero las nanopartículas, que incluyen simultáneamente una parte del principio activo. Con el avance de la evaporación ya no es suficiente la reducción en la cantidad de solvente orgánico en la mezcla, para mantener en solución el principio activo mediante el efecto de cosolvente. Finalmente, se distribuye el principio activo no encapsulado en este proceso, en el núcleo hidrófobo de la nanopartícula.

5

De acuerdo con una forma conveniente de realización de la presente invención, se determina el solvente orgánico de acuerdo con el siguiente procedimiento:

10

(a) preparación de soluciones del principio activo con en cada caso la misma cantidad de principio activo en diferentes solventes orgánicos,

(b) adición de una cantidad en cada caso igual de solución acuosa a cada una de las soluciones preparadas en la etapa (a),

15

(c) revisión de si el principio activo está presente disuelto completamente en cada caso en las soluciones de la etapa (b),

(d) ejecución repetida de las etapas (b) y (c) con las soluciones en las cuales el principio activo de acuerdo con la etapa (c) está completamente disuelto, hasta que el principio activo de acuerdo con la etapa (c) ya no está completamente disuelto,

20

(e) identificación del solvente orgánico, en el cual la máxima cantidad de solución acuosa de acuerdo con (d) es miscible de modo acumulado antes de que el principio activo ya no esté completamente disuelto.

Por ello, es objetivo de la invención también una forma de realización del procedimiento, que se caracteriza porque el solvente orgánico es determinado de acuerdo con el siguiente procedimiento:

25

(a) preparación de soluciones del principio activo con en cada caso la misma cantidad de principio activo en diferentes solventes orgánicos,

(b) adición de una cantidad en cada caso igual de solución acuosa a cada una de las soluciones preparadas en la etapa (a),

(c) revisión de si el principio activo está presente disuelto completamente en cada caso en las soluciones de la etapa (b),

30

(d) ejecución repetida de las etapas (b) y (c) con las soluciones en las cuales el principio activo de acuerdo con la etapa (c) está completamente disuelto, hasta que el principio activo de acuerdo con la etapa (c) ya no está completamente disuelto,

(e) identificación del solvente orgánico, en el cual la máxima cantidad de solución acuosa de acuerdo con (d) es miscible de modo acumulado antes de que el principio activo ya no esté completamente disuelto.

35

De acuerdo con una forma de realización conveniente de la invención, el procedimiento para la determinación del solvente orgánico es ejecutado con los solventes orgánicos metanol, etanol, isopropanol, n-butanol, tert.-butanol, acetona, dimetilformamida, tetrahidrofurano y dimetilsulfóxido. Por ello, es objetivo de la invención también una forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, caracterizado porque como solvente orgánico se usa metanol, etanol, isopropanol, n-butanol, tert.-butanol, acetona, dimetilformamida, tetrahidrofurano y dimetilsulfóxido.

40

Si en la etapa (b) de acuerdo con la reivindicación 1 (mezcla de las fases orgánica y acuosa) se usa una cantidad muy alta de fase acuosa, debido a la reducción acompañante de la solubilidad de principio activo y polímero, puede ocurrir una precipitación del principio activo, el cual entonces ya no está disponible para la incorporación en la nanopartícula. De acuerdo con una formación ventajosa de la invención, por ello se elige la cantidad de fase acuosa de modo que después de la mezcla de las fases orgánica y acuosa de acuerdo con la etapa (b) de la reivindicación 1, la fase acuosa está presente en relación con la fase orgánica en una cantidad que está por debajo de la cantidad máxima que es miscible con la fase orgánica, sin que el principio activo ya no esté completamente disuelto. Por ello, es objetivo de la invención también una forma de realización del procedimiento caracterizada porque se elige la cantidad de fase acuosa de modo que después de la mezcla de las fases orgánicas y acuosa de acuerdo con la etapa (b) de la reivindicación 1, la fase acuosa está presente en relación con la fase orgánica en una cantidad que está por debajo de la cantidad máxima que es miscible con la fase orgánica, sin que el principio activo ya no esté

50

completamente disuelto.

Para asegurar que el principio activo está completamente disuelto antes del inicio de la evaporación, es razonable elegir en el procedimiento la cantidad de fase acuosa en relación a la fase orgánica, de modo que esté claramente por debajo de la cantidad máxima que es miscible con la fase orgánica, sin que el principio activo ya no esté completamente resuelto. Si por ejemplo una mezcla de fase orgánica y fase acuosa desde una relación de volumen 3:2 v/v conduce a precipitación de principio activo, pueden usarse la fase orgánica y acuosa en la evaporación de agente de codisolución por ejemplo en una relación de volumen de 4:1 v/v, de modo que se asegure que ambos componentes están completamente disueltos.

Se prefiere que la determinación de la cantidad máxima de fase acuosa que es miscible con la fase orgánica, ocurra de acuerdo con las etapas (a) a (d) del procedimiento descrito en la página 17, para la determinación del solvente orgánico. Por ello, es objetivo de la invención también una forma de realización que se caracteriza porque la determinación de la cantidad máxima de fase acuosa miscible en la fase orgánica ocurre de acuerdo con las etapas (a) a (d) del procedimiento descrito en la página 17 para la determinación del solvente orgánico.

La ejecución del procedimiento de acuerdo con la invención conduce de manera ventajosa a nanopartículas con aumento en la carga de principio activo y liberación bifásica de principio activo, en la que después de la administración ocurre primero una liberación rápida de principio activo (dosificación inicial), que es seguida por una liberación duradera de principio activo durante un tiempo prolongado. Por ello, son objetivo de la invención también nanopartículas, que se caracterizan porque fueron fabricadas siguiendo el procedimiento de acuerdo con la invención.

Los ejemplos aclaran la invención, sin estar limitados por ella.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Para experimentos de carga se usaron los principios activos dexametasona y 5-[2-(2-fluoro-fenil)-[1,8]naftiridin-4-il]-[2,6]naftiridin-1-ilamina (denominada a continuación también principio activo B). Para la elección del solvente se disolvieron los principios activos en cada caso con una concentración de 1 mg/100 µL en los siguientes solventes: tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo (ACN), acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), metanol, etanol. A cada solución orgánica de principio activo B se agregó adicionalmente 0.1% de ácido trifluoroacético (v/v), para ajustar un "valor de pH" aparente. A las soluciones se añadieron en cada caso sucesivamente 10 µL de agua y se mezcló, hasta que el principio activo comenzó a precipitar (solubilidad óptica). La ilustración 2 muestra la solubilidad óptica de dexametasona, la ilustración 3 la solubilidad óptica de principio activo B.

Para dexametasona, debido a su elevada solubilidad óptica en tetrahidrofurano, se eligió este solvente como solvente orgánico para la fabricación de las nanopartículas. Como relación inicial se fijó 4:1 v/v (THF: agua).

Para el principio activo B, debido a su elevada solubilidad óptica en este solvente, se eligió como solvente orgánico para la fabricación de las nanopartículas. Como relación inicial se fijó 5:1 v/v (ACN:agua).

### Ejemplo 2

Para la fabricación y carga de nanopartículas se usaron los siguientes polímeros: PEG-PDLLA [5-b-23], PEG-PCL [5-b-32.5], PEG-PVPy [5-b-20] de Polymersource Inc., Montreal, Canadá. Además se usó PEG-PLGA [5-b-28] (Resomer RGP 50155 d) de Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemania. Todos los polímeros tenían calidad de investigación.

Para poder comparar mutuamente los otros procedimientos de fabricación con la evaporación de co-solvente así como así como el encapsulamiento en diferentes polímeros, se fabricaron las nanopartículas como sigue y se cargaron con dexametasona:

Diálisis directa de acetona:

Se disolvieron 10 mg o 20 mg de copolímero de bloque así como 1 mg o 2 mg de dexametasona en 1 mL de acetona. Se empacó esta solución en una manguera de diálisis (MWCO 6-8 kDa, Spectrumlabs Inc., Breda, Países Bajos) y se cerró. Se condujo la diálisis durante 24 h contra 5 L de agua; se cambió el agua una vez después de 4 h. A continuación, se retiró de la manguera de diálisis la formulación formada, se añadió a un filtro de 0.2 µm y se ajustó a un volumen de 2 mL.

Emulsión aceite en agua:

Primero se fabricaron micelas moldeadas previamente, como se describe bajo 2.a."Diálisis directa", sin principio

activo. Para la carga con principio activo se disolvieron 2 mg de dexametasona en 1 mL de diclorometano (VWR, Darmstadt, Alemania). Se inyectó esta solución orgánica bajo agitación permanente en 5 mL de la fase acuosa micelar. Surgió una emulsión aceite en agua, que se agitó adicionalmente durante la noche a temperatura ambiente. A continuación ocurrió la etapa de filtración a través de un filtro de 0.2 µm y el ajuste de volumen a 5 mL.

5 Evaporación de cosolvente con subsiguiente diálisis:

Se disolvieron 10 mg de copolímero de bloque y 2 mg de dexametasona en 6 mL de THF. A esta solución se añadieron 2 mL de agua. Se evaporó esta solución en un matraz redondo a una temperatura 25°C y una presión de 30 mbar durante 10 min. Se añadió la formulación obtenida a una manguera de diálisis Float-A-Lyzer G2 (MWCO 8-10 kDa, Spectrumlabs Inc., Berda, Países Bajos), que en el caso de la diálisis subsiguiente había sido equilibrada previamente contra solución saturada en agua saturada con dexametasona. Se realizó entonces diálisis de la formulación, contra 5 L de agua o agua saturada con dexametasona, por 24 h. Finalmente se añadió la formulación a través de un filtro de 0.2 µm y se ajustó el volumen a 2 mL.

Las nanopartículas fabricadas según los diferentes procedimientos fueron caracterizadas respecto a su carga de principio activo y tamaños de partícula, y sus distribuciones de tamaño.

15 Determinación de la carga de principio activo mediante HPLC

Se disolvieron 100 µL de la formulación micelar resultante, en 900 µL de acetonitrilo. Se sometió esta solución a detección con un sistema HPLC (Merck Hitachi La Chrom Elite) con un detector UV (longitud de onda de detección: 282 nm). La separación ocurrió en una columna Agilent Eclipse Plus C18 (grano de 3.5 µm, longitud 5 cm) a 30°C. Para la separación se usó un método de gradiente. Al respecto, la fase móvil A consistía en 90% de acetonitrilo y 10% de amortiguador de acetato de amonio de pH 4.5 (v/v), la fase móvil B tenía la composición inversa. La concentración de dexametasona en las muestras fue determinada mediante una curva de calibración.

El cálculo de la carga de principio activo ocurrió mediante la siguiente fórmula 1:

$$\text{Carga de principio activo [\%]} = \left[ \frac{\text{Concentración de principio activo [mg/ml]}}{\text{Concentración de polímero [mg/ml]}} \right] \times 100 \% \quad (1)$$

25 Determinación de tamaño de partícula por medio de dispersión dinámica de luz (DLS)

La técnica de DLS determina el radio o diámetro hidrodinámico de partícula. Para ello se diluyen 1:100 (v/v) las muestras con agua y se miden en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) en modo de retrodispersión. Los tamaños de partícula fueron calculados mediante análisis acumulativo. Adicionalmente se calculó el índice de polidispersidad (*Pdl*, *polydispersity index*), que es válido como medida para la dispersión de la distribución de tamaño de partícula. El *Pdl* puede exhibir valores entre 0 y 1, en los que 0 significa monodisperso y 1 (completamente) polidisperso.

En la siguiente tabla 1 se resumen los resultados.

Polímero	Concentración de polímero [%] p/v	Relación inicial principio activo/polímero	Método de fabricación	Solvente y condiciones	Carga de principio activo [%]	Tamaño hidrodinámico de partícula [nm]	PdI
PEG-PDLLA [5-b-23]	0.5	1:5	Evaporación Co-LM	THF, diálisis contra agua	< LOQ	50.41 ± 2.47	0.120 ± 0.047
PEG-PDLLA [5-b-23]	0.5	1:5	Evaporación Co-LM	THF, diálisis contra solución saturada de principio activo	1.56 ± 0.24	61.43 ± 1.39	0.102 ± 0.006
PEG-PLGA [5-b-28]	0.5	1:5	Evaporación Co-LM	THF, diálisis contra agua	< LOQ	62.67 ± 1.60	0.091 ± 0.014
PEG-PLGA [5-b-28]	0.5	1:5	Evaporación Co-LM	THF, diálisis contra solución saturada de principio activo	1.19 ± 0.13	69.18 ± 1.23	0.057 ± 0.026
PEG-PCL [5-b-32.5]	0.5	1:5	Evaporación Co-LM	THF, diálisis contra agua	< LOQ	80.59 ± 2.98	0.093 ± 0.053
PEG-PCL [5-b-32.5]	0.5	1:5	Evaporación Co-LM	THF, diálisis contra solución saturada de principio activo	1.39 ± 0.36	87.69 ± 2.70	0.126 ± 0.034
PEG-PVPy [5-b-20]	0.5	1:5	Evaporación Co-LM	THF, diálisis contra agua	10.74 ± 1.8	33.97 ± 1.50	0.204 ± 0.016
PEG-PVPy [5-b-20]	0.5	1:5	Evaporación Co-LM	THF, diálisis contra solución saturada de principio activo	18.67 ± 0.21	36.73 ± 0.95	0.213 ± 0.006

PEG-PVPy [5-b-20]	1.0	1:5	Evaporación Co-LM	THF, diálisis contra solución saturada de principio activo	19.25 ± 0.54	52.13 ± 1.34	0.258 ± 0.011
PEG-PVPy [5-b-20]	0.5	1:5	Evaporación Co-LM	Acetona, diálisis contra solución saturada de principio activo	12.07 ± 1.21	41.09 ± 2.80	0.136 ± 0.011
PEG-PVPy [5-b-20]	1.0	1:5	Evaporación Co-LM	Acetona, diálisis contra solución saturada de principio activo	10.84 ± 2.64	44.73 ± 4.65	0.118 ± 0.011
PEG-PVPy [5-b-20]	0.5	1:10	Diálisis directa	Acetona	1.71 ± 0.15	56.42 ± 7.29	0.178 ± 0.056
PEG-PVPy [5-b-20]	1.0	1:5	Diálisis directa	Acetona	0.62 ± 0.60	66.91 ± 2.29	0.162 ± 0.011
PEG-PVPy [5-b-20]	0.5	1:10	Emulsión aceite en agua	Diclorometano, partícula prefabricada desde acetona	8.74 ± 0.03	52.42 ± 2.00	0.150 ± 0.012
PEG-PVPy [5-b-20]	1.0	1:10	Emulsión aceite en agua	Diclorometano, partícula prefabricada desde acetona	7.81 ± 0.18	68.92 ± 3.53	0.185 ± 0.036
PEG-PVPy [5-b-20]	0.5	2:5	Emulsión aceite en agua	Diclorometano, partícula prefabricada desde acetona	13.50 ± 5.05	52.19 ± 0.67	0.186 ± 0.022

Tabla 1, en la que PEG-PDLLA significa poli-(ácido D,L láctico) pegilado, PEG-PLGA significa poli-(ácido láctico-co-glicólico) pegilado, PEG-PCL significa poli-(caprolactona) pegilada, PEG-PVPy significa poli-4-(vinilpiridina) pegilada, LOQ significa límite de cuantificación (límite de determinación del método HPLC), evaporación Co-LM significa evaporación de cosolvente y THF significa tetrahidrofurano.

5

### Ejemplo 3

Fabricación y carga de nanopartículas cargadas con principio activo B

La fabricación y carga de las nanopartículas ocurrió de acuerdo con el procedimiento descrito en esta invención,

como combinación entre evaporación de cosolvente y diálisis contra solución saturada de principio activo.

5 Se disolvieron 10 mg de copolímero de bloque y 1 mg de principio activo en 8 mL de acetonitrilo/0.1% de ácido trifluoroacético (v/v) con tratamiento en ultrasonido. Se mezcló la solución obtenida con 2 mL de agua. A continuación se añadió la mezcla a un matraz redondo y se evaporó el solvente orgánico a presión baja (30 mbar) y 25°C (10 min). Las nanopartículas obtenidas fueron añadidas a una manguera de diálisis Float-A-Lyzer G2 (MWCO 8-10 kDa, Spectrumlabs Inc., Berda, Países Bajos) y se realizó diálisis por 24 h contra 5 L de solución de sal corriente amortiguada con fosfato (amortiguador de PBS), saturada con principio activo B, pH 7.4. Para terminar, se colocó la formulación a través de un filtro de 0.2 µm y se ajustó el volumen de la formulación a 2 mL.

Determinación de la carga de principio activo

10 Se disolvieron en 900 µL de acetonitrilo, 100 µL de la formulación obtenida. Esta solución fue sometida a detección con un sistema HPLC (Merck Hitachi La Chrom Elite) mediante un detector UV (longitud de onda de detección: 254 nm). La separación ocurrió en una columna Agilent Eclipse Plus C18 (grano de 3.5 µm, longitud de 5 cm) a 30°C. Para la separación se usó un método de gradiente. Al respecto, la fase móvil A consistía en 90% de acetonitrilo y 10% de agua con 0.1% de ácido trifluoroacético (v/v), la fase móvil B tenía la composición inversa. La concentración de principio activo B en las muestras fue determinada mediante una curva de calibración.

15 El cálculo de la carga de principio activo ocurrió de acuerdo con la fórmula 1. Los tamaños de partícula y distribuciones de tamaño fueron determinados de modo análogo al Ejemplo 2.

Los resultados con la técnica óptima de carga por uso de diferentes copolímeros de bloque, se compilan en la tabla 2.

Polímero	Concentración de polímero [%] p/v	Relación inicial principio activo/polímero	Método de fabricación	Solvente y condiciones	Carga de principio activo [%]	Tamaño hidrodinámico de partícula [nm]	Pdl
PEG-PDLLA [5-b-23]	0.5	1:10	Evaporación Co-LM	ACN/0.1% TFA, diálisis con saturación	< LOQ	n.a.	n.a.
PEG-PLGA [5-b-28]	0.5	1:10	Evaporación Co-LM	ACN/0.1% TFA, diálisis con saturación	25.4	n.a.	n.a.
PEG-PCL [5-b-32.5]	0.5	1:10	Evaporación Co-LM	ACN/0.1% TFA, diálisis con saturación	24.9	n.a.	n.a.
PEG-PVPy [5-b-20]	0.5	1:10	Evaporación Co-LM	ACN/0.1% TFA, diálisis con saturación	40.6	n.a.	n.a.
PEG-PLGA [5-b-28]	5.0	1:10	Evaporación Co-LM	ACN/0.1% TFA, diálisis con saturación	101.90 ± 6.44	122	0,183

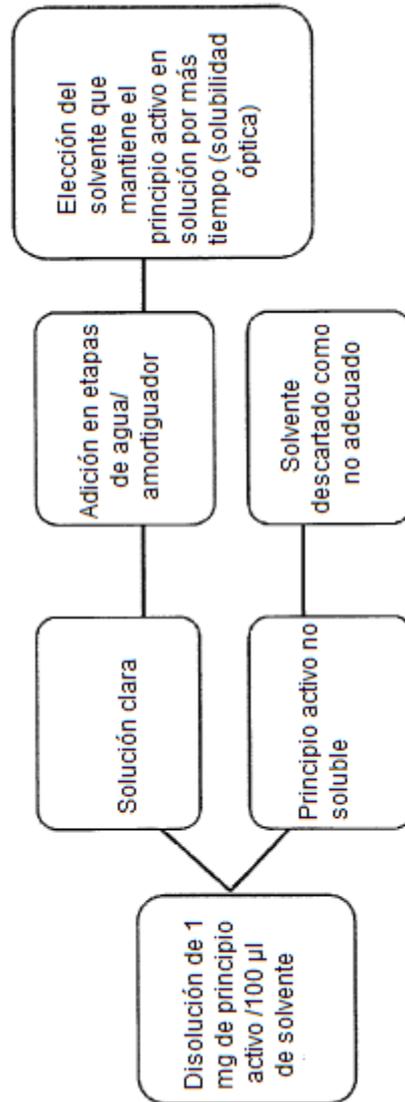
20 Tabla 2, en la que PEG-PDLLA significa poli-(ácido D,L láctico) pegilado, PEG-PLGA significa poli-( ácido láctico-co-glicólico) pegilado, PEG-PCL significa poli-(caprolactona) pegilada, PEG-PVPy significa poli-4-(vinilpiridina) pegilada, LOQ significa límite de cuantificación (límite de determinación del método HPLC), evaporación Co-LM significa evaporación de cosolvente, ACN significa acetonitrilo y TFA significa ácido trifluoroacético.

25

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la fabricación de nanopartículas que comprende las etapas
  - (a) disolución de por lo menos un principio activo y por lo menos un polímero en un solvente orgánico,
  - (b) mezcla de la solución fabricada en la etapa (a) con una fase acuosa,
  - 5 (c) evaporación del solvente orgánico,
  - (d) purificación de las nanopartículas cargadas con principio activo obtenidas en la etapa (c), mediante diálisis contra la solución acuosa de diálisis que contiene el mismo principio activo.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 y/o 2, caracterizado porque el principio activo exhibe una solubilidad de saturación en agua < 200 µg/ml, preferiblemente una solubilidad de saturación <100 µg/ml, medida en cada caso a 25°C.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque como principio activo se usa un principio activo que es elegido de entre el grupo consistente en quimioterapéuticos, en particular taxol, camptotecina, complejos de platino o compuestos Lost de N, antirreumáticos, como por ejemplo glucocorticoides, en particular dexametasona, mometasona, beclometasona o prednisolona, antiinfecciosos, como por ejemplo terapéuticos para VIH, en particular ritonavir, así como antimicóticos, en particular cetoconazol, itraconazol, griseofulvin, reductores de lípidos, como por ejemplo fenofibrat, antioxidantes y vitaminas, como por ejemplo tocoferol, ácido retinoico, colecalciferol, antibióticos, como por ejemplo vancomicina o teicomicina, adicionalmente colesterol así como ácidos grasos.
4. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque como polímero se usa un polímero anfifílico.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque como polímero se usa un copolímero de bloque.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 y/o 5, caracterizado porque el copolímero de bloque contiene como componente hidrofílico polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol, poliácridamida, polivinilalcohol, polisacárido o un copolímero de ellos, preferiblemente copolímero de polietilenglicol/polipropilenglicol, copolímero de polietilenglicol/polipropilenglicol/polietilenglicol, y como componente hidrófobo poli-ácido láctico, ácido poliglicólico, poli-ácido hidroxibutírico, poli-ácido hidroxivaleriánico, o un copolímero de ellos, preferiblemente poli ácido láctico-co-glicólico, además ácido poliacrílico, en particular ácido hidroxipropilacrilico o ácido hidroxipropilmetilacrilico, polisiloxano, en particular copolímeros con ácido acrílico, poliestireno o un copolímero de ellos, en particular con poli-ácido láctico y ácido poliglicólico
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque como copolímero de bloque se usa polietilenglicol-poli-ácido láctico, polietilenglicol-ácido poliglicólico, polietilenglicol-poli-ácido láctico-co-ácido glicólico, polietilenglicol-poli-ácido hidroxivaleriánico, polietilenglicol-polisiloxano, polietilenglicol-polisiloxano-co-acrílico, polietilenglicol-polimetilmetacrílico, polietilenglicol-polimetil-etacrílico, polietilenglicol-poliisoprilacrílico, polietilenglicol-poliestireno.
8. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque como solvente orgánico se usa un solvente que es al menos parcialmente miscible con agua, preferiblemente es completamente miscible con agua.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque como solvente orgánico se usan alcoholes lineales o ramificados, preferiblemente metanol, etanol, isopropanol, n-butanol o tert.-butanol, acetona, dimetilformamida, tetrahydrofurano o dimetilsulfóxido.
10. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque en la etapa (a) de acuerdo con la reivindicación 1, en el solvente orgánico aparte de polímero y principio activo, se disuelven un ácido o una base y/o porque en el solvente acuoso de acuerdo con la etapa (b) de la reivindicación 1 se disuelve un ácido o una base.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque el ácido es un ácido orgánico, preferiblemente ácido fórmico, ácido acético o ácido trifluoroacético, o un ácido inorgánico, preferiblemente ácido clorhídrico, ácido nítrico o ácido sulfúrico, y la base es una base orgánica, preferiblemente dimetilamina o trimetilamina o una base inorgánica, preferiblemente hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoníaco.
12. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque para la

- 5 fabricación de las nanopartículas de acuerdo con la etapa (a) de la reivindicación 1, como solvente orgánico se usa el solvente orgánico que en la fabricación de una solución que contiene en cantidades definidas el principio activo, en comparación con soluciones en otros solventes orgánicos que contienen en cada caso la misma cantidad de este principio activo, por sucesiva adición y mezcla de solvente acuoso, es miscible con la máxima cantidad de solvente acuoso, sin que aquel precipite desde la solución.
13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque el solvente orgánico es determinado de acuerdo con el siguiente procedimiento:
- (a) preparación de soluciones del principio activo con en cada caso la misma cantidad de principio activo en diferentes solventes orgánicos,
- 10 (b) adición de una cantidad en cada caso igual de solución acuosa a cada una de las soluciones preparadas en la etapa (a),
- (c) revisión de si el principio activo está presente disuelto completamente en cada caso en las soluciones de la etapa (b),
- 15 (d) ejecución repetida de las etapas (b) y (c) con las soluciones en las cuales el principio activo de acuerdo con la etapa (c) está completamente disuelto, hasta que el principio activo de acuerdo con la etapa (c) ya no está completamente disuelto,
- (e) identificación del solvente orgánico, en el cual la máxima cantidad de solución acuosa de acuerdo con la etapa (d) es miscible de modo acumulado antes de que el principio activo ya no esté completamente disuelto.
- 20 14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12 y/o 13, caracterizado porque como solvente orgánico se usa metanol, etanol, isopropanol, n-butanol, tert.-butanol, acetona, dimetilformamida, tetrahidrofurano y dimetilsulfóxido.
15. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque la cantidad de fase acuosa es elegida de modo que después de mezclar las fases orgánica y acuosa según la etapa (b), la fase acuosa está presente en relación con la fase orgánica en una cantidad que está por debajo de la cantidad, que es la máxima miscible con la fase orgánica, sin que el principio activo ya no esté completamente disuelto.
- 25 16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque la determinación de la cantidad máxima miscible de la fase acuosa en la fase orgánica, ocurre de acuerdo con las etapas (a) a (d) de la reivindicación 13.



**Ilustración 1**

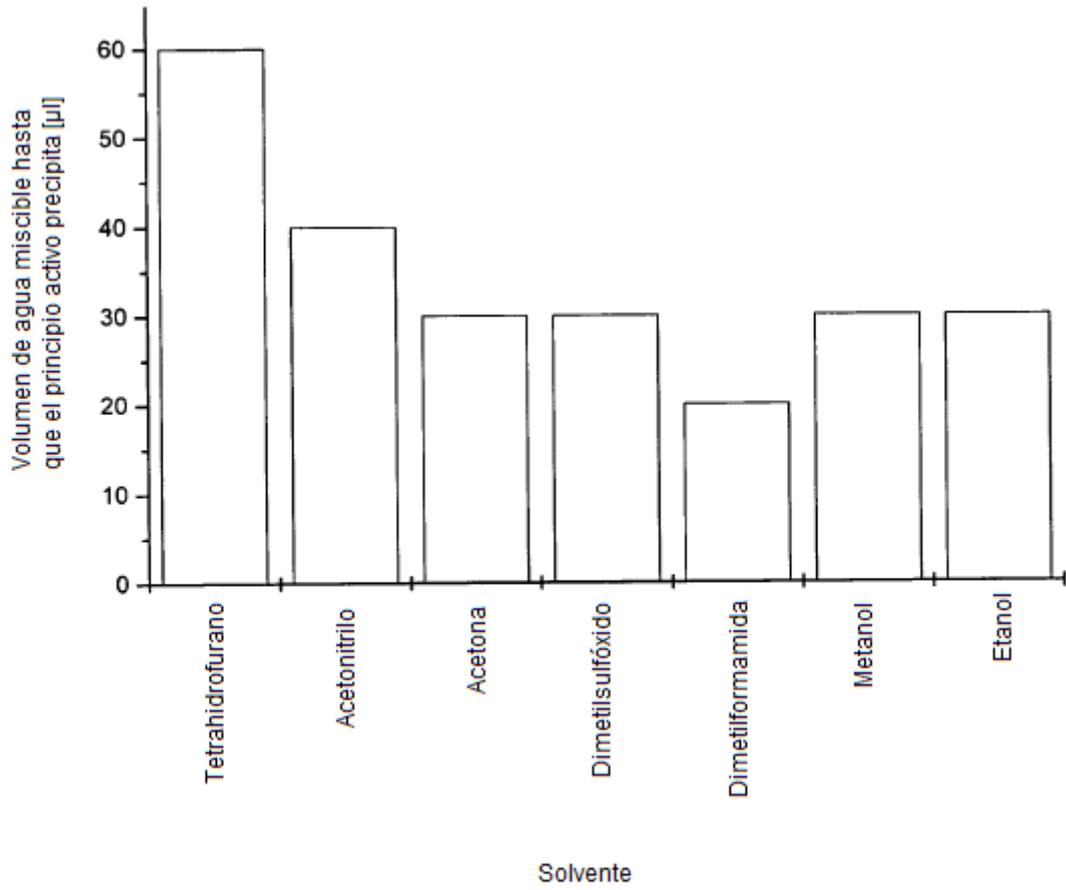


Ilustración 2

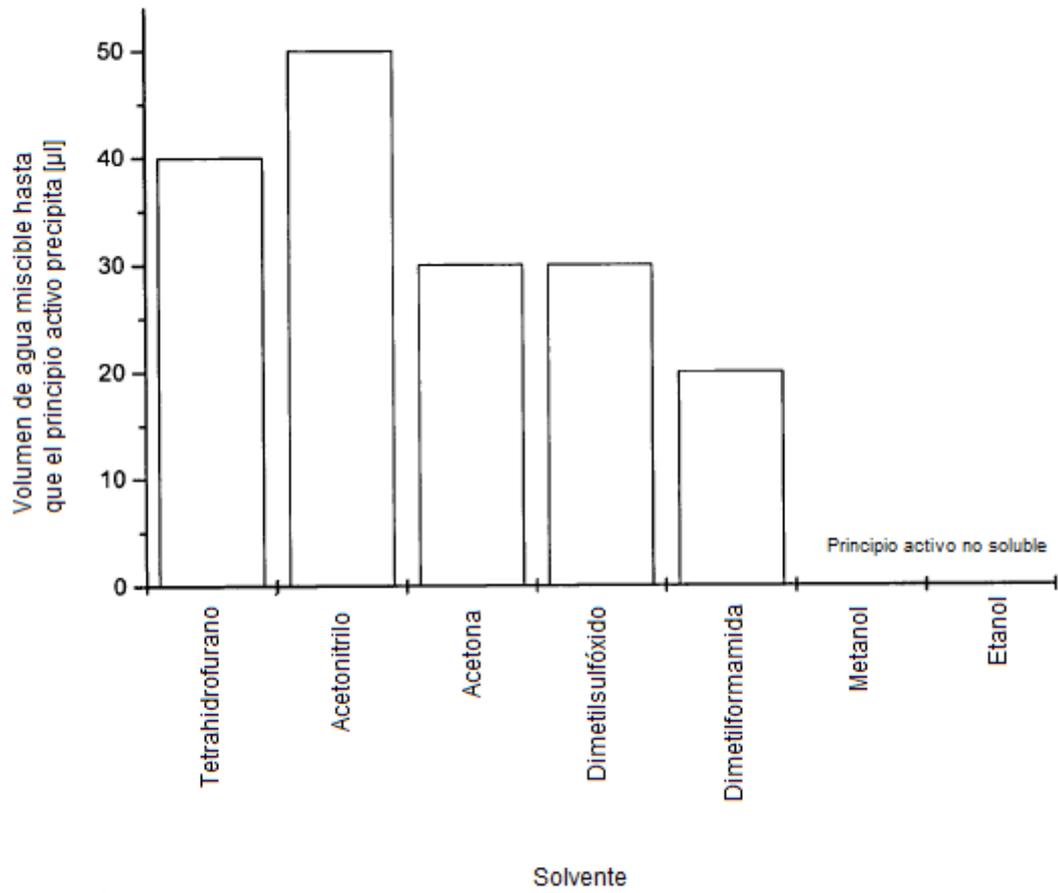


Ilustración 3