

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 898**

51 Int. Cl.:

A61K 47/40	(2006.01)	A61K 47/26	(2006.01)
A61K 47/30	(2006.01)	A61K 47/34	(2007.01)
A61K 47/36	(2006.01)	A61K 31/337	(2006.01)
A61K 47/02	(2006.01)	C08G 63/664	(2006.01)
A61K 31/335	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61K 9/19	(2006.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		
A61K 9/16	(2006.01)		
A61K 9/51	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2010 PCT/US2010/059879**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2011 WO11072218**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010 E 10836748 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2509634**

54 Título: **Formulaciones estables para liofilizar partículas terapéuticas**

30 Prioridad:

11.12.2009 US 285722 P

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

06.08.2019

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**TROIANO, GREG;
ZALE, STEPHEN, E.;
WRIGHT, JAMES;
VAN GEEN UOVEN, TINA y
SONG, YOUNG-HO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 721 898 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

Formulaciones estables para liofilizar partículas terapéuticas

Antecedentes

5 Los sistemas que administran determinados fármacos a un paciente (por ejemplo, dirigidos a un tejido o tipo celular concreto o dirigidos a un tejido enfermo en concreto pero no tejido normal) o que controlan la liberación de fármacos han sido reconocidos desde hace tiempo como beneficiosos.

10 Por ejemplo, la terapéutica que incluye un fármaco activo y que está, por ejemplo, dirigida a un tejido o tipo celular particular o dirigida a un tejido enfermo específico pero no a tejido normal, puede reducir la cantidad de fármaco en los tejidos orgánicos que no necesitan tratamiento. Esto resulta particularmente importante cuando se trata una afección tal como cáncer en la que es deseable que una dosis citotóxica del fármaco se administre en las células cancerosas sin destruir el tejido no canceroso circundante. Adicionalmente, tal terapéutica puede reducir los efectos secundarios indeseables y a veces mortales comunes en la terapia anticáncer. Además, tal terapéutica puede permitir que los fármacos alcancen determinados tejidos que de otro modo serían incapaces de alcanzar.

15 La administración de nanopartículas terapéuticas puede conseguirse mediante inyección por vía parenteral de una suspensión reconstituida de las partículas. La suspensión de nanopartículas original se liofiliza, es decir, se criodeseca, para su almacenamiento antes de la reconstitución. La criodesecación de una suspensión de nanopartículas crea potencialmente un producto para su reconstitución con una mucho mayor estabilidad de almacenamiento que su homólogo de suspensión congelada. Adicionalmente, la criodesecación puede proporcionar un almacenamiento más sencillo que no pueda requerir temperaturas constantes, muy bajas. Sin embargo, la liofilizado reconstituido debe poseer atributos fisicoquímicos y de rendimientos que sean comparables o superiores a la suspensión original. Redispersarse en partículas con el mismo tamaño sin dejar rastro de particulados debido a la microagregación o partículas no dispersadas es el aspecto más complicado de la liofilización de suspensión de nanopartículas.

25 Por consiguiente, existe la necesidad de terapéutica de nanopartículas y procedimientos de fabricación de tales nanopartículas, que sea capaces de administrar niveles terapéuticos de fármaco para tratar enfermedades tales como cáncer y posean capacidad de almacenamiento superiores.

El documento WO-2009/084801 desvela composiciones de micelas de copolímeros en bloques anfífilicos que contienen taxanos.

30 Musumeci y col, J. Nanoscience and Nanotechnology, 2006, 6, 1-8, desvela la preparación y caracterización de formulaciones de nanoesferas que contienen paclitaxel.

Musumeci y col, Int. J. Pharmaceutics, 2006, 325, 172-179, desvela el uso de suspensiones coloidales de nanoesferas como sistemas de liberación sostenida para la administración intravenosa de docetaxel.

35 Avgoustakis, Current Drug Delivery, 2004, 1, 321-333, desvela la preparación, propiedades y aplicaciones potenciales en el descubrimiento de fármacos biocompatibles y biodegradables de partículas de PLA-PEG y PLGA-PEG.

Jeong y col, J. Microencapsulation, 2005, 22(6), 593-601, desvela el uso de crioprotectores para reconstituir nanopartículas libres de tensioactivos de PLGA.

Abdelwahed y col, Adv. Drug Delivery Reviews, 2006, 58, 1688-1713, revisa la criodesecación de nanopartículas.

40 El documento WO-2001/45742 desvela una composición polimérica líquida capaz de formar un implante que contiene sustancia fisiológicamente activa cuando se inyecta en un organismo vivo.

Sumario

En un aspecto, la invención proporciona una composición adecuada para su liofilización que incluye:

nanopartículas;

del 2 % al 15 % en peso de sacarosa; y

45 del 5 % al 20 % en peso de hidroxipropil- β -ciclodextrina;

en la que las nanopartículas comprenden:

del 0,2 al 35 por ciento en peso de un agente terapéutico, siendo dicho agente terapéutico un taxano;

del 10 al 99 por ciento en peso de copolímero de poli(etilen)glicol en bloque de ácido poli(láctico) o copolímero o poli(etilen)glicol en bloque de ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico); y

del 0 al 50 por ciento en peso de ácido poli(láctico o ácido poli(láctico) co-poli(glicólico).

La nanopartícula incluye un agente terapéutico que es un taxano. Taxanos ejemplares incluyen docetaxel y las nanopartículas pueden incluir aproximadamente de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 30 por ciento en peso del agente de taxano.

- 5 Por ejemplo, la porción de ácido poli(láctico) del copolímero puede tener un peso molecular promedio de aproximadamente 16 kDa y la porción de poli(etilenglicol) del copolímero puede tener un peso molecular promedio ponderado de aproximadamente 5 kDa.

10 El número de micropartículas en una suspensión de nanopartículas puede determinarse por medios tales como el USP 32 <788> mediante ensayo de recuento de partículas por oscurecimiento de luz, el USP 32 <788> mediante ensayo de recuento de partículas microscópicas, difracción láser y/o sensor óptico de partícula única.

La composición liofilizada puede tener una concentración de partículas terapéuticas superior a aproximadamente 40 mg/ml. La formulación adecuada para su administración por vía parenteral puede tener menos de aproximadamente 600 partículas que tienen un tamaño superior a 10 micrómetros en una dosis de 10 ml.

15 La etapa de liofilización puede comprender la congelación de la composición a una temperatura superior a aproximadamente -40 °C o una temperatura inferior a -30 °C, por ejemplo, aproximadamente -40 °C a aproximadamente -30 °C, o de aproximadamente -40 °C a aproximadamente -25 °C formando una composición congelada; y secando la composición congelada mediante, por ejemplo, sublimación, para formar la composición liofilizada.

Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 es un diagrama de flujo de un procedimiento de emulsión para formar nanopartículas desveladas.

La Figura 2 es un diagrama de flujo de un procedimiento de emulsión desvelado.

La Figura 3 ilustra el efecto de la concentración de sal y sacarosa en el tamaño de partícula en suspensiones de nanopartículas reconstituidas.

La Figura 4 ilustra los ciclos de temperatura para diversas formulaciones de liofilización.

25 La Figura 5 ilustra los tamaños mediante dispersión de luz dinámica (DLS) de las diversas suspensiones de nanopartículas reconstituidas que se desvelan en el presente documento.

La Figura 6 ilustra los recuentos de particulados de las diversas suspensiones de nanopartículas reconstituidas que se desvelan en el presente documento

La Figura 7 ilustra los ciclos de temperatura para diversas formulaciones de liofilización.

30 La Figura 8 ilustra los tamaños (medido usando DLS) de las diversas suspensiones de nanopartículas reconstituidas que se desvelan en el presente documento.

La Figura 9 ilustra los recuentos de particulados de las diversas suspensiones de nanopartículas reconstituidas que se desvelan en el presente documento.

35 La Figura 10 ilustra los recuentos de particulados de las diversas suspensiones de nanopartículas reconstituidas que se desvelan en el presente documento.

La Figura 11 ilustra los recuentos de particulados de las diversas suspensiones de nanopartículas reconstituidas que se desvelan en el presente documento.

La Figura 12 ilustra la liberación *in vitro* de docetaxel de diversas suspensiones de nanopartículas que se desvelan en el presente documento.

40 La Figura 13 ilustra una medición de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de suspensiones de nanopartículas que tienen 5 % de trehalosa y 10 % de hidroxipropilciclodextrina.

La Figura 14 ilustra las propiedades DSC de suspensiones de nanopartículas que tienen 10 % de trehalosa y 10 % de hidroxipropilciclodextrina.

45 La Figura 15 ilustra las propiedades de DSC de suspensiones de nanopartículas que tienen 20 % de trehalosa y 15 % de hidroxipropilciclodextrina.

La Figura 16 ilustra las propiedades de DSC de suspensiones de nanopartículas que tienen 10 % de sacarosa y 10 % de hidroxipropilciclodextrina.

Descripción detallada

La presente invención se refiere, en general, a composiciones de nanopartículas poliméricas liofilizadas y procedimientos de fabricación y uso de tales composiciones terapéuticas. Tales composiciones pueden reconstituirse a partir de una composición liofilizada y puede incluir agregaciones grandes mínima de nanopartículas y/u otros materiales. Por lo tanto, las composiciones desveladas pueden ser adecuadas para su uso parenteral.

Nanopartículas

En general, las composiciones pueden incluir nanopartículas que incluyen un principio activo. Tal como se desvela en el presente documento, "nanopartícula" se refiere a cualquier partícula que tiene un diámetro inferior a 1000 nm, por ejemplo, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 200 nm. Las nanopartículas terapéuticas desveladas pueden incluir nanopartículas que tienen un diámetro de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 120 nm o aproximadamente 70 nm a aproximadamente 130 nm o aproximadamente 60 nm a aproximadamente 140 nm.

Las nanopartículas desveladas pueden incluir aproximadamente del 0,2 a aproximadamente el 35 por ciento en peso, aproximadamente del 3 a aproximadamente el 40 por ciento en peso, aproximadamente del 5 a aproximadamente el 30 por ciento en peso, del 10 a aproximadamente 30 por ciento en peso, del 15 al 25 por ciento en peso incluso de aproximadamente el 4 a aproximadamente el 25 por ciento en peso de un agente de taxano (por ejemplo, docetaxel).

Las nanopartículas que se desvelan en el presente documento incluyen uno, dos, tres o más polímeros biocompatibles y/o biodegradables.

Nanopartículas terapéuticas ejemplares pueden incluir aproximadamente del 40 a aproximadamente el 90 por ciento en peso de copolímero de poli(etilen)glicol de ácido poli(láctico) o aproximadamente del 40 a aproximadamente el 80 por ciento en peso de copolímero de poli(etilen)glicol de ácido poli(láctico). Tal copolímero de poli(etilen)glicol en bloque de ácido poli(láctico) puede incluir ácido poli(láctico) que tiene un peso molecular promedio en número de aproximadamente 15 a 20 kDa (o por ejemplo, de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 kDa, por ejemplo, aproximadamente 15 a aproximadamente 80 kDa) y poli(etilen)glicol que tiene un peso molecular promedio en número de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 kDa, por ejemplo, de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 kDa. Por ejemplo, una nanopartícula terapéutica desvelada puede incluir de aproximadamente el 70 a aproximadamente el 95 por ciento en peso de PLA-PEG y aproximadamente del 5 a aproximadamente el 25 por ciento en peso de docetaxel. En otro ejemplo, una nanopartícula terapéutica desvelada puede incluir aproximadamente del 30 a aproximadamente el 50 por ciento en peso PLA -PEG, aproximadamente del 30 a aproximadamente el 50 por ciento en peso de PLA o PLGA y aproximadamente del 5 a aproximadamente el 25 por ciento en peso de docetaxel. Tal (ácido (poli)láctico) de PLA puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 kDa. Tal (ácido co-glicólico poli láctico) de PLGA puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 8 a aproximadamente 12 kDa.

En una realización, las nanopartículas terapéuticas desveladas pueden incluir un ligando de direccionamiento, por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular eficaz para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno, tal como cáncer de próstata, en un sujeto que lo necesita. En determinadas realizaciones, el ligando de bajo peso molecular se conjuga con un polímero y la nanopartícula comprende una determinada relación de polímero conjugado a ligando (por ejemplo, PLA-PEG-Ligando) con respecto a polímero no funcionalizado (por ejemplo, PLA-PEG o PLGA-PEG). La nanopartícula puede tener una relación optimizada de estos dos polímeros de modo que una cantidad eficaz de ligando se asocia con la nanopartícula para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno, tal como cáncer.

En algunas realizaciones, las nanopartículas desveladas pueden comprender adicionalmente de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 10 por ciento en peso de PLA-PEG funcionalizado con un ligando de direccionamiento y/o puede incluir de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 10 por ciento en peso de PEG en bloque de ácido co-poli(glicólico) de ácido poli (láctico) funcionalizado con un ligando de direccionamiento. Tal ligando de direccionamiento puede estar, en algunas realizaciones, unido covalentemente al PEG, por ejemplo, unido al PEG mediante un enlazador de alquileo, por ejemplo, PLA-PEH-alquileo-GL2. Por ejemplo, una nanopartícula desvelada puede incluir de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 10 por ciento en moles PLA-PEG-GL2 o ácido poli(láctico)-ácido poli(glicólico-PEG-GL2. Se entiende que la referencia a PLA-PEG-GL2 o PLGA-PEG-GL2 se refiere a restos que pueden incluir un enlazador alquileo (por ejemplo, C₁-C₂₀, por ejemplo, (CH₂)₅) que une el PEG a GL2.

En una realización, una nanopartícula terapéutica puede incluir del 0,2 al 35 por ciento en peso de un agente terapéutico; del 30 al 99 por ciento en peso de copolímero de poli(etilen)glicol de ácido poli(láctico) o copolímero o poli(etilen)glicol de ácido poli(láctico)co(glicólico); del 0 al 50 por ciento en peso de ácido poli(láctico) o ácido poli(láctico) co-poli(glicólico); y del 0,2 al 10 por ciento en peso o del 0,2 al 30 por ciento en moles PLA-PEG-GL2 o ácido poli(láctico)-ácido poli(glicólico-PEG-GL2. Por ejemplo, PLA-PEG-GL2 puede incluir ácido poli(láctico) con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 10.000 Da a aproximadamente 20.000 Da y poli(etilen)glicol con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 8.000.

Polímeros

- Las nanopartículas de la invención comprenden una matriz de polímeros y un agente terapéutico. En algunas realizaciones, un agente terapéutico y/o resto de direccionamiento (es decir, un ligando de PSMA de bajo peso molecular) puede asociarse con al menos parte de la matriz polimérica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un resto de direccionamiento (por ejemplo, ligando) puede asociarse covalentemente con la superficie de una matriz polimérica. En algunas realizaciones, la asociación covalente se media mediante un enlazador. El agente terapéutico puede asociarse con la superficie de, encapsularse dentro, rodearse mediante y/o dispersante por toda la matriz polimérica.
- Se conoce una amplia variedad de polímeros y procedimientos para formar partículas a partir de estos en la técnica de la administración de fármacos. En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a nanopartículas con al menos dos macromoléculas, en la que la primera macromolécula comprende un primer polímero unido a un ligando de bajo peso molecular (por ejemplo, resto de direccionamiento); y comprendiendo la segunda macromolécula un segundo polímero que no está unido a un resto de direccionamiento. La nanopartícula también puede incluir uno o más polímeros no funcionalizados adicionales.
- El término "polímero", como se usa en el presente documento, se le otorga su significado habitual como se usa en la técnica, es decir, una estructura molecular que comprende una o más unidades de repetición (monómeros), conectadas mediante enlaces covalentes. Las unidades de repetición pueden ser todas idénticas o, en algunos casos, puede haber más de un tipo de unidad de repetición presente dentro del polímero. En algunos casos, el polímero se puede administrar biológicamente, es decir, un biopolímero. Ejemplos no limitantes incluyen péptidos o proteínas. En algunos casos, también puede haber presentes restos adicionales en el polímero, por ejemplo, restos biológicos tales como los que se describen a continuación. Si hay presente más de un tipo de unidad de repetición presente dentro del polímero, entonces, el polímero se dice que es un "copolímero". Debe entenderse que en cualquier realización que emplee un polímero, el polímero que se emplea puede ser un copolímero en algunos casos. Las unidades de repetición que forman el copolímero pueden disponerse de cualquier modo. Por ejemplo, las unidades de repetición pueden disponerse en un orden aleatorio, en un orden de alternación o como un copolímero en bloques, es decir, que comprende una o más regiones comprendiendo cada una, una primera unidad de repetición (por ejemplo, un primer bloque) y una o más regiones comprendiendo cada una, una segunda unidad de repetición (por ejemplo, un segundo bloque), etc. Los copolímeros en bloques pueden tener dos (un copolímero dibloque), tres (un copolímero tribloque) o más números de distintos bloques.
- Un copolímero puede comprender un primer polímero y un segundo polímero, que se han conjugado juntos para formar un copolímero en bloques en el que el primer polímero puede ser un primer bloque del copolímero en bloques y el segundo polímero puede ser un segundo bloque del copolímero en bloques. Por supuesto, los expertos en la técnica comprenderán que un copolímero en bloques puede, en algunos casos, contener múltiples bloques de polímero y que un "copolímero en bloques"; como se usa en el presente documento, no está limitado a solo copolímeros en bloques que tienen solo un único primer bloque y un único segundo bloque. Por ejemplo, un copolímero en bloques puede comprender un primer bloque que comprende un primer polímero, un segundo bloque que comprende un segundo polímero y un tercer bloque que comprende un tercer polímero o el primer polímero, etc. En algunos casos, los copolímeros en bloques pueden contener cualquier número de primeros bloques de un primer polímero y segundos bloques de un segundo polímero (y en determinados casos, terceros bloques, cuartos bloques, etc.). Además, debe destacarse que los copolímeros en bloques también se pueden formar, en algunos casos, a partir de otros copolímeros en bloques. Por ejemplo, un primer copolímero en bloques puede conjugarse con otro polímero (que puede ser un homopolímero, un biopolímero, otro copolímero en bloques, etc.), para formar un nuevo copolímero en bloques que contiene múltiples tipos de bloques y/o a otros restos (por ejemplo, a restos no poliméricos).
- Un polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero en bloques) puede ser anfifílico, es decir, que tiene una porción hidrófila y una porción hidrófoba o una porción relativamente hidrófila y una porción relativamente hidrófoba. Un polímero hidrófilo puede ser uno que atrae, en general, agua y un polímero hidrófobo puede ser uno que repele, en general, agua. Un polímero hidrófilo o hidrófobo puede identificarse, por ejemplo, preparando una muestra del polímero y midiendo su ángulo de contacto con agua (normalmente, el polímero tendrá un ángulo de contacto inferior a 60°, mientras que un polímero hidrófobo tendrá un ángulo de contacto de superior a 60°). En algunos casos, la hidrofiliidad de dos o más polímeros se puede medir con respecto a sí, es decir, un primer polímero puede ser más hidrófilo que un segundo polímero. Por ejemplo, el primer polímero puede tener un ángulo de contacto inferior al del segundo polímero.
- Un polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero en bloques) contemplado en el presente documento incluye un polímero biocompatible, es decir, el polímero no induce normalmente una respuesta adversa cuando se inserta o inyecta en un sujeto vivo, por ejemplo, sin inflamación y/o rechazo agudo significativo del polímero por el sistema inmunitario, por ejemplo, mediante una respuesta de linfocitos T. Por consiguiente, las partículas terapéuticas contempladas en el presente documento pueden ser no inmunogénicas. El término no inmunogénico tal como se usa en el presente documento se refiere a un factor de crecimiento endógeno en su estado nativo que normalmente no provoca, o solo niveles mínimos de, anticuerpos en circulación, linfocitos T o células inmunitarias reactivas y que normalmente no provoca en el individuo una respuesta inmunitaria contra sí mismo.

La biocompatibilidad se refiere normalmente al rechazo agudo de material por al menos una porción del sistema inmunitario, es decir, un material no biocompatible implantado en un sujeto provoca una respuesta inmunitaria en el sujeto que puede ser lo suficientemente grave de modo que el rechazo del material por el sistema inmunitario no puede controlarse de forma adecuada y, a menudo, es de un grado tal que el material debe retirarse del sujeto. Un ensayo simple para determinar la biocompatibilidad puede ser exponer un polímero a células *in vitro*; polímeros biocompatibles son polímeros que normalmente no darán como resultado una muerte celular significativa en concentraciones moderadas, por ejemplo, en concentraciones de 50 microgramos/ 10⁶ células. Por ejemplo, un polímero biocompatible puede provocar menos de aproximadamente el 20 % de muerte celular cuando se expone a células tales como fibroblastos o células epiteliales, incluso si se someten a fagocitosis o se absorben, de otro modo, por tales células. Ejemplos no limitantes de polímeros biocompatibles que pueden ser útiles en diversas realizaciones de la presente invención incluyen polidioxanona (PDO), polihidroxialcanoato, polihidroxibutirato, poli(glicerol sebacato), poliglicolida, polilactida, PLGA, policaprolactona o copolímeros o derivados que incluyen estos y/u otros polímeros.

Polímeros biocompatibles pueden ser biodegradables, es decir, el polímero es capaz de degradarse, químicamente y/o biológicamente, dentro de un entorno fisiológico, tal como dentro del organismo. Tal como se usa en el presente documento, polímeros "biodegradables" son aquellos que, cuando se introducen en células, se descomponen por la maquinaria celular (biólogicamente degradables) y/o mediante un procedimiento químico, tal como hidrólisis, (químicamente degradable) en componentes que las células pueden o bien reutilizar o eliminar sin efecto tóxico significativo sobre las células. En una realización, el polímero biodegradable y sus subproductos de degradación pueden ser biocompatibles.

Por ejemplo, un polímero puede ser uno que se hidroliza espontáneamente cuando se expone a agua (por ejemplo, dentro de un sujeto), el polímero puede degradarse cuando se expone a calor (por ejemplo, a temperatura de aproximadamente 37 °C). La degradación de un polímero se puede producir en tasas variantes, dependiendo del polímero o copolímero usado. Por ejemplo, la semivida del polímero (el tiempo en el que el 50 % del polímero puede degradarse en monómeros y/u otros restos no poliméricos) puede ser del orden de días, semanas, meses o años, dependiendo del polímero. Los polímeros pueden degradarse biológicamente, por ejemplo, mediante actividad enzimática o maquinaria celular, en algunos casos, por ejemplo, mediante exposición a lisozima (por ejemplo, que tiene pH relativamente bajo). En algunos casos, los polímeros pueden descomponerse en monómeros y/u otros restos no poliméricos que las células pueden o bien reutilizar o bien eliminar sin efectos tóxicos significativos en las células (por ejemplo, se puede hidrolizar polilactida para formar ácido láctico, se puede hidrolizar poliglicolida para formar ácido glicólico, etc.).

Los polímeros pueden ser poliésteres, incluidos copolímeros que comprenden unidades de ácido láctico y ácido glicólico, tal como poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) y poli(láctido-co-glicólico), colectivamente denominados en el presente documento como "PLGA"; y homopolímeros que comprenden unidades de ácido glicólico, denominadas en el presente documento como "PGA", y unidades de ácido láctico, tales como ácido poli-L-láctico, ácido poli-D-láctico, ácido poli-D,L-láctico, poli-L-láctido, poli-D-láctido y poli-D,L-lactido, colectivamente denominados en el presente documento como "PLA". Polímeros ejemplares incluyen, por ejemplo, polihidroxiácidos; polímeros PEGilados y copolímeros de láctido y glicólido (por ejemplo, PLA PEGilado, PGA PEGilado, PLGA PEGilado y derivados de los mismos. En algunas realizaciones, los poliésteres incluyen, por ejemplo, polianhídridos, poli(orto éster), poli(orto éster) PEGilado, poli(caprolactona), poli(caprolactona) PEGilada, polilisina, polilisina PEGilada, poli(etilenimina), poli(etilenimina) PEGilada, poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster de serina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina), poli[ácido a-(4-aminobutil)-L-glicólico] y derivados de los mismos.

El PLGA es un copolímero biocompatible y biodegradable de ácido láctico y ácido glicólico y se pueden caracterizar diversas formas de PLGA mediante la relación de ácido láctico: ácido glicólico. El ácido láctico puede ser ácido L-láctico, ácido D-láctico o ácido D,L-láctico. La tasa de degradación de PLGA se puede ajustar alternando la relación de ácido láctico-ácido glicólico. En algunas realizaciones, El PLGA a usar de acuerdo con la presente invención puede caracterizarse mediante una relación de ácido láctico:ácido glicólico de aproximadamente 85: 15, aproximadamente 75:25, aproximadamente 60:40, aproximadamente 50:50, aproximadamente 40:60, aproximadamente 25:75 o aproximadamente 15:85. En algunas realizaciones, la relación de monómeros de ácido láctico con respecto a ácido glicólico en el polímero de la partícula (por ejemplo, el copolímero en bloques de PLGA o copolímero en bloques de PLGA-PEG), se puede seleccionar para optimizar diversos parámetros tales como absorción de agua, liberación de agente terapéutico y/o cinética de degradación de polímeros se pueden optimizar.

Los polímeros pueden ser polímeros acrílicos. Los polímeros acrílicos incluyen, por ejemplo, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), copolímero de alquilamina y ácido metacrílico, poli(metacrilato de metilo), poli(acrilamida de poli(ácido metacrílico)), copolímero de metacrilato de aminoalquilo, copolímeros de metacrilato de glicidilo, poli(acrilatos) y combinaciones que comprenden uno o más de los anteriores polímeros. El polímero acrílico puede comprender copolímeros completamente polimerizados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un bajo contenido en grupos de amonio cuaternario.

Los polímeros pueden ser polímeros catiónicos. En general, los polímeros catiónicos son capaces de condensar y/o proteger cadenas negativamente cargadas de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN o derivados de los mismos).

Polímeros que contienen aminas tales como poli(lisina), polietilenimina (PEI) y dendrímeros de poli(amidoamina) se contemplan para su uso, en algunas realizaciones, en una partícula desvelada.

Los polímeros puede ser poliésteres degradables que portan cadenas laterales catiónicas. Ejemplos de estos poliésteres incluyen poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster de serina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina).

- 5 Las partículas desveladas en el presente documento contienen PEG. Un polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero en bloques) que contienen unidades de repetición de poli(etilenglicol) también pueden denominarse como un polímero "PEGilado".

10 Se contempla que PEG puede terminarse e incluir un grupo extremo, por ejemplo, cuando PEG no está conjugado a un ligando. Por ejemplo, PEG puede terminar en un grupo hidroxilo, metoxi u otro grupo alcoxilo, un grupo metilo u otro grupo alquilo, un grupo arilo, un ácido carboxílico, una amina, una amida, un grupo acetilo, un grupo guanidinio o un imidazol. Otros grupos extremo contemplados incluyen restos azida, alquina, maleimida, aldehído, hidrazida, hidroxilamina, alcoxiamina o tiol.

15 Los expertos en la técnica conocerán procedimientos y técnicas para PEGilar un polímero, por ejemplo, mediante el uso de EDC (hidrocloruro de carbodiimida de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo) para hacer reaccionar un polímero con un grupo PEG que termina en una amina, mediante técnicas de polimerización de abertura de anillo (ROMP) o similares

20 En una realización, el peso molecular de los polímeros se puede optimizar para un tratamiento eficaz tal como se desvela en el presente documento. Por ejemplo, el peso molecular de un polímero puede influir en la tasa de degradación de partículas (tal como cuando el peso molecular de un polímero biodegradable puede ajustarse), solubilidad, absorción de agua y cinética de liberación de fármaco. Por ejemplo, el peso molecular del polímero se puede ajustar de modo que la partícula se biodegrada en el sujeto que está siendo tratado dentro de un período de tiempo razonable (que va'ria desde unas pocas horas a 1-2 semanas, 3-4 semanas, 5-6 semanas, 7-8 semanas, etc.). Una partícula desvelada, por ejemplo, comprende un copolímero dibloque de PEG y PL(G)A, en la que, por ejemplo, la porción PEG puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 1.000-20.000, por ejemplo, aproximadamente 2.000-20.000, por ejemplo, aproximadamente de 2 a aproximadamente 10.000 y la porción PL(G)A puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000 o aproximadamente 5.000-100.000, por ejemplo, aproximadamente 20.000-70.000, por ejemplo, aproximadamente 15.000-50.000.

30 En el presente documento se desvela una nanopartícula terapéutica ejemplar que incluye de aproximadamente el 10 a aproximadamente 99 por ciento en peso de copolímero de poli(etilen)glicol de ácido poli(láctico) o copolímero de poli(etilen)glicol de ácido co-poli(glicólico) poli(láctico) o de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 80 por ciento en peso, de aproximadamente el 40 a aproximadamente el 80 por ciento en peso, o de aproximadamente el 30 a aproximadamente el 50 por ciento en peso, o de aproximadamente el 70 a aproximadamente el 90 por ciento en peso de copolímero de poli(etilen)glicol de ácido poli(láctico) o copolímero de poli(etilen)glicol de ácido co-poli(glicólico) poli(láctico). Copolímeros de poli(etilen)glicol de ácido poli(láctico) pueden incluir un peso molecular promedio en número de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 kDa, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 kDa de ácido poli(láctico) y un peso molecular promedio en número de aproximadamente 4 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 10 kDa de poli(etilen)glicol.

40 Las nanopartículas desveladas pueden incluir opcionalmente de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 50 por ciento en peso de ácido poli(láctico) o ácido poli(láctico) co-poli(glicólico) (que no incluye PEG) o puede incluir, opcionalmente, de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 50 por ciento en peso, o de aproximadamente el 10 a aproximadamente 50 por ciento en peso o de aproximadamente del 30 a aproximadamente el 50 por ciento en peso, de ácido poli(láctico) o ácido poli(láctico) co-poli(glicólico). Por ejemplo, el ácido poli(láctico) o poli(láctico)-co-poli(glicólico) puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 kDa o de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 kDa. El PLA ejemplar puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 kDa. El PLGA ejemplar puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 8 a aproximadamente 12 kDa.

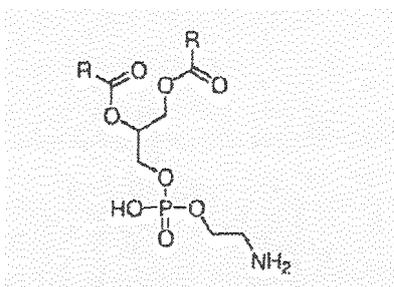
50 En determinadas realizaciones, los polímeros de las nanopartículas pueden conjugarse con un lípido. El polímero puede ser, por ejemplo, un PEG terminado en lípido. Como se describe a continuación, la porción de lípido del polímero se puede usar para el autoensamblaje con otro polímero, facilitando la formación de una nanopartícula. Por ejemplo, un polímero hidrófilo podría conjugarse con un lípido que se autoensamblará con un polímero hidrófobo.

55 En algunas realizaciones, los lípidos son aceites. En general, se puede conjugar cualquier aceite conocido en la técnica con los polímeros usados en la invención. En algunas realizaciones, un aceite puede comprender uno o más grupos de ácidos grasos o sales de los mismos. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede comprender hidrocarburos digeribles, de cadena larga (por ejemplo, C₈-C₅₀), sustituidos o sin sustituir. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser un ácido graso C₁₀-C₂₀ o una sal del mismo. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser un ácido graso C₁₅-C₂₀ o una sal del mismo. En algunas realizaciones, el ácido graso puede ser insaturado. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser

monoinsaturado. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser poliinsaturado. En algunas realizaciones, un enlace doble de un grupo de ácido graso insaturado puede estar en la formación cis. En algunas realizaciones, un enlace doble de un ácido graso insaturado puede estar en la conformación trans.

5 En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, laúrico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico o lignocérico. En algunas realizaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido palmitoleico, oleico, vaccenico, linoleico, alfa-linoleico, gamma-linoleico, araquidonico, gadoleico, araquidonico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico o erucico.

10 En una realización, los restos de direccionamiento de molécula pequeña están unidos, por ejemplo, covalentemente unidos, al componente lípido de la nanopartícula. Por ejemplo, en el presente documento se proporciona una nanopartícula que comprende un agente terapéutico, una matriz polimérica que comprende polímeros funcionalizados y no funcionalizados, un lípido y un ligando de direccionamiento de PSMA de bajo peso molecular, en el que el ligando de direccionamiento está unido, por ejemplo, covalentemente unidos, al componente lípido de la nanopartícula. En una realización, el componente lípido que está unido al resto de direccionamiento de bajo peso molecular es de Fórmula V:



15 y sales del mismo, en la que cada R es, independientemente, alquilo C₁₋₃₀. En una realización de Fórmula V, el lípido puede ser 1,2 distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) y sales de la misma, por ejemplo, la sal de sodio. En otra realización, la invención proporciona una nanopartícula específica a diana que comprende un agente terapéutico, una matriz polimérica, DSPE y un ligando de direccionamiento de PSMA de bajo peso molecular, en el que el ligando está unido, por ejemplo, covalentemente unido, a DSPE. Por ejemplo, la nanopartícula de la invención puede comprender una matriz polimérica que comprende PLGA-DSPE-PEG-Ligando.

20 Una nanopartícula contemplada puede incluir una relación de polímero unido a ligando a un polímero no funcionalizado eficaz para el tratamiento de cáncer de próstata, en el que el polímero hidrófilo, unido a ligando se conjuga con un lípido que se autoensamblará con el polímero hidrófobo, de modo que los polímeros hidrófobos e hidrófilos que constituyen la nanopartícula no se unen covalentemente. "Autoensamblaje" se refiere a un procedimiento de ensamblaje espontáneo de una estructura de orden superior que se basa en la atracción natural de los componentes de la estructura de orden superior (por ejemplo, moléculas) entre sí. Esto se produce normalmente mediante movimientos aleatorios de las moléculas y la formación de uniones basándose en el tamaño, forma, composición o propiedades químicas. Por ejemplo, tal procedimiento comprende proporcionar un primer polímero que se hace reaccionar con un lípido, para formar un conjugado de polímero/lípido. El conjugado de polímero/lípido se hace reaccionar, a continuación con el ligando de bajo peso molecular para preparar un conjugado de polímero/lípido unido a ligando; y mezclar el conjugado de polímero/lípido unido a ligando con un segundo polímero, no funcionalizado y el agente terapéutico; de modo que se forma la nanopartícula. En determinadas realizaciones, el primer polímero es PEG, de modo que se forma un PEG terminado en lípido. En una realización, el lípido es de Fórmula V, por ejemplo, 2 distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) y sales de la misma, por ejemplo, la sal de sodio. El PEG terminado en lípido puede entonces, por ejemplo, mezclarse con PLGA para formar una nanopartícula.

Restos de direccionamiento

40 Se proporcionan en el presente documento nanopartículas que pueden incluir un resto de direccionamiento opcional, es decir, un resto capaz de unirse a, o de otro modo, asociarse con una entidad biológica, por ejemplo, un componente de membrana, un receptor de superficie celular, antígeno de membrana específico de próstata o similares. Un resto de direccionamiento presente sobre la superficie de la partícula puede permitir que la partícula se localice en un sitio de direccionamiento particular, por ejemplo, un tumor, un sitio de enfermedad, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. Como tal, la nanopartícula puede ser "específica de diana". El fármaco u otra carga útil puede entonces, en algunos casos, liberarse desde la partícula y dejarse interactuar localmente con el sitio de direccionamiento particular.

50 En una realización particular, el fármaco u otra carga útil puede liberarse de un modo de liberación controlado desde la partícula y dejarse interactuar localmente con el sitio de direccionamiento particular (por ejemplo, un tumor). El término "liberación controlada" (y variantes de este término) tal como se usa en el presente documento (por ejemplo, en el contexto de "sistema de liberación controlado") se refiere, en general, que engloba la liberación de una

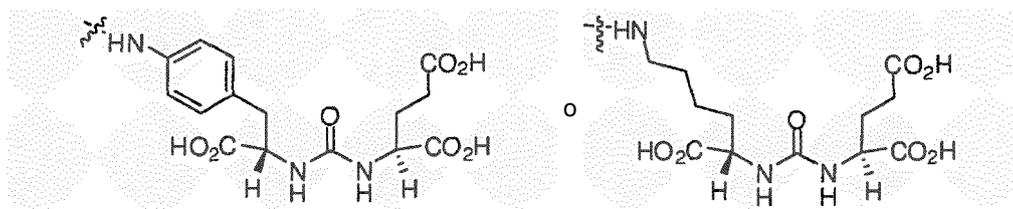
5 sustancia (por ejemplo, un fármaco) en un sitio seleccionado o, de otro modo, controlable en su tasa, intervalo y/o cantidad. Liberación controlada engloba, aunque no necesariamente limitada a, administración sustancialmente continua, administración con pautas (por ejemplo, administración intermitente durante un período de tiempo que se interrumpe por intervalos de tiempo regulares o irregulares) y administración de un embolado de una sustancia selecciona (por ejemplo, como una cantidad predeterminada, discreta si una sustancia durante un período relativamente corto de tiempo (por ejemplo, unos pocos segundos o minutos)).

10 En una realización, una nanopartícula desvelada incluye un resto de direccionamiento que es un ligando de bajo peso molecular, por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular. El término "unir" o "unión", como se usa en el presente documento, se refiere a la interacción entre un par correspondiente de moléculas o porciones de las mismas que muestran afinidad mutua o capacidad de unión, normalmente, debido a unión o interacción específica o no específica, incluidas, aunque no de forma limitativa, interacciones bioquímicas, fisiológicas y/o químicas. "Unión biológica" define un tipo de interacción que se produce entre pares de moléculas que incluyen proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas, carbohidratos, hormonas y similares. El término "pareja de unión" se refiere a una molécula que puede someterse a unión con una molécula particular. "Unión específica" se refiere a moléculas, tales como polinucleótidos, que son capaces de unirse a o reconocer una pareja de unión (o un número limitado de parejas de unión) a un grado sustancialmente superior que a otras entidades biológicas similares. En un conjunto de realizaciones, el resto de direccionamiento tiene una entidad (como se ha medido mediante constante de disociación) inferior a 1 micromol, al menos aproximadamente 10 micromoles o al menos aproximadamente 100 micromoles.

20 Por ejemplo, una porción de direccionamiento puede hacer que las partículas se localicen en un tumor (por ejemplo, un tumor sólido) un sitio de enfermedad, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. dentro del organismo de un sujeto, dependiendo del resto de direccionamiento usado. Por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular se puede localizar en un tumor sólido, por ejemplo, tumores de mama o próstata o células cancerosas. El sujeto puede ser un ser humano o a un animal no humano. Los ejemplos de sujetos incluyen, aunque no de forma limitativa, un mamífero tal como un perro, un gato, un caballo, un burro, un conejo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, una rata, un ratón, un conejillo de indias, un hámster, un primate, un ser humano o similares.

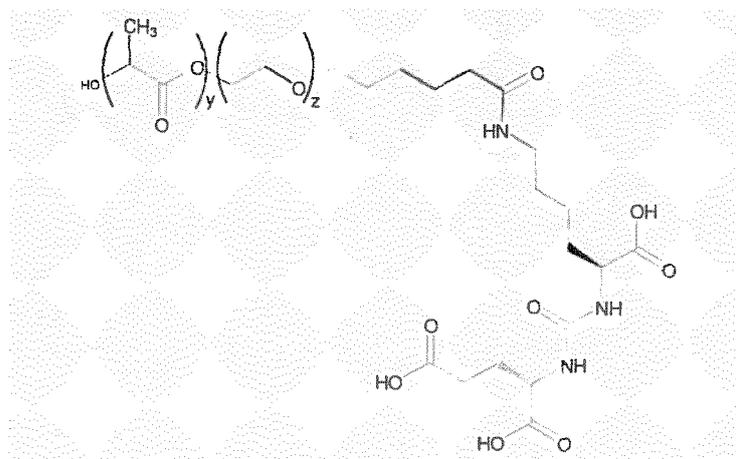
30 Por ejemplo, un resto de direccionamiento puede dirigirse a pequeños tumores cancerosos de próstata, por ejemplo, un resto diana puede ser un inhibidor de la peptidasa de PSMA. Estos restos también se refieren en el presente documento como "Ligandos de PSMA de bajo peso molecular". Cuando se comparan con la expresión en tejidos normales, la expresión de antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) se sobreexpresa al menos 10 veces en próstata maligna con respecto a tejido normal y el nivel de expresión de PSMA se regula positivamente adicionalmente según progresa la enfermedad en fases metastáticas (Silver y col. 1997, Clin. Cancer Res., 3:81).

Por ejemplo, el ligando de PSMA de bajo peso molecular es



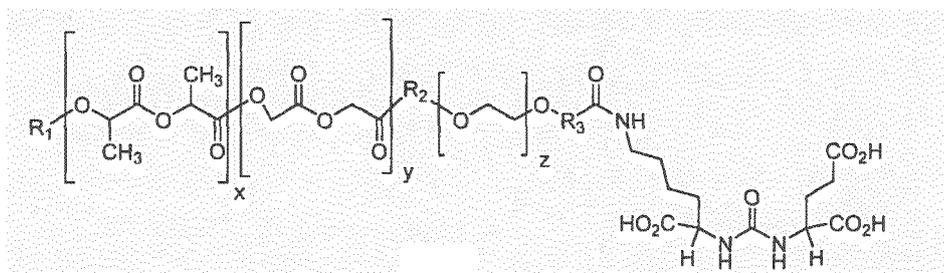
35 y enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereómeros o racematos del mismo. Particularmente, el compuesto de butil-amina tiene la ventaja de facilidad de síntesis, especialmente debido a su falta de anillo de benceno.

Por ejemplo, una nanopartícula desvelada puede incluir un conjugado representado por:

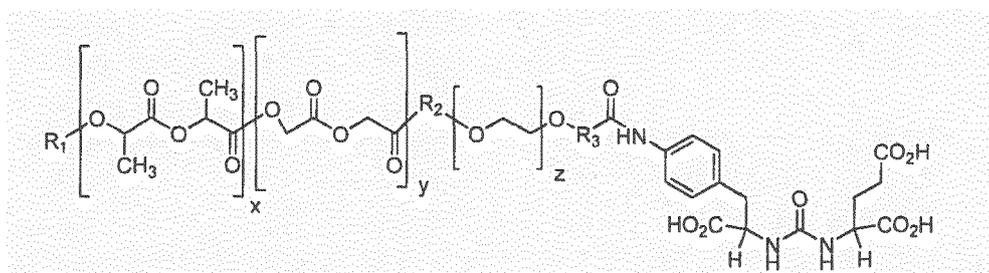


en el que y es aproximadamente 222 y z es aproximadamente 114.

Por ejemplo, una nanopartícula desvelada incluye un compuesto polimérico seleccionado de:



5 y



en el que R₁ se selecciona entre el grupo que consiste en H y un grupo alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido con halógeno;

R₂ es un enlace, un enlace éster o un enlace amida;

10 R₃ es un alquileo C₁-C₁₀ o una unión;

x es de 50 a aproximadamente 1.500, por ejemplo, de aproximadamente 170 a aproximadamente 260;

y es de 0 a aproximadamente 50, por ejemplo y es 0; y

z es de aproximadamente 30 a aproximadamente 456, o de aproximadamente 30 a aproximadamente 200, por ejemplo, z es de aproximadamente 80 a aproximadamente 130.

15 Agentes terapéuticos

El agente activo es un taxano (por ejemplo, paclitaxel o sus derivados tales como DHA-paclitaxel o PG-paclitaxel, o docetaxel).

20 En una realización, el agente terapéutico puede (o no puede) estar conjugado con, por ejemplo, un polímero desvelado que forma parte de una nanopartícula desvelada, por ejemplo, un agente activo puede conjugarse (por ejemplo, covalentemente unido, por ejemplo, directamente o mediante un resto de unión) con PLA o PGLA, o una porción de PLA o PGLA de un copolímero tal como PLA-PEG o PLGA-PEG.

Preparación de nanopartículas

Otro aspecto de la presente divulgación se dirige a sistemas y procedimientos de fabricación de nanopartículas desveladas. En algunas realizaciones, mediante el uso de dos o más polímeros distintos (por ejemplo, copolímeros, por ejemplo, copolímeros en bloque) en distintas relaciones y partículas productoras a partir de los polímeros (por ejemplo, copolímeros, por ejemplo, copolímeros en bloques), se pueden controlar las propiedades de las partículas. Por ejemplo, un polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero en bloques) incluye un ligando de PSMA de bajo peso molecular, mientras que otro polímero (por ejemplo, copolímero, por ejemplo, copolímero en bloques) puede escogerse según su biocompatibilidad y/o estabilidad para controlar la inmunogenicidad de la partícula resultante.

En un conjunto de realizaciones, las partículas se forman proporcionando una solución que comprende uno o más polímeros y poniendo en contacto la solución con un no disolvente de polímero para producir la partícula. La solución puede ser miscible o inmisible con el no disolvente de polímero. Por ejemplo, un líquido miscible en agua tal como acetonitrilo puede contener los polímeros, y se forman partículas según se pone en contacto el acetonitrilo con agua, un disolvente de polímero, por ejemplo, vertiendo el acetonitrilo en el agua a una tasa controlada. El polímero contenido dentro de la solución, cuando se pone en contacto con el no disolvente de polímero, puede entonces precipitarse para formar partículas tales como nanopartículas. Se dice que los dos líquidos son "inmiscibles" o no miscibles, entre sí cuando uno no es soluble con el otro a un nivel de al menos el 10 % en peso a temperatura ambiente y presión. Normalmente, una solución orgánica (por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, tetrahidrofurano, acetona, formamida, dimetilformamida, piridinas, dioxano, dimetilsulfóxido, etc.) y un líquido acuoso (por ejemplo, agua o sales disueltas que contiene agua u otras especies, células o medio biológico, etanol, etc.) son inmiscibles con respecto a entre sí. Por ejemplo, la primera solución puede verse en la segunda solución (a una tasa o velocidad adecuada). En algunos casos, las partículas tales como nanopartículas se pueden formar según la primera solución entra en contacto con el segundo líquido inmisible, por ejemplo, la precipitación del polímero cuando se pone en contacto hace que el polímero forme nanopartículas mientras que la primera solución se vierte en el segundo líquido y, en algunos casos, por ejemplo, cuando se controla cuidadosamente la tasa de introducción y se mantiene a una tasa relativamente lenta, se pueden formar nanopartículas. El control de tal formación de partículas se puede optimizar fácilmente por un experto en la técnica usando solamente experimentación rutinaria.

En otra realización, se proporciona un procedimiento de nanoemulsión, tal como el procedimiento representado en las Figuras 1 y 2. Por ejemplo, un agente terapéutico, un primer polímero (por ejemplo, un copolímero dibloque tal como PLA-PEG o PLGA-PEG, cualquiera de estos estando unido opcionalmente a un ligando, por ejemplo, GL2) y un segundo polímero opcional (por ejemplo, (PL(G)A-PEG o PLA), con una solución orgánica para formar una primera fase orgánica. Tal primera fase puede incluir aproximadamente del 5 al 50 % en peso de sólidos, por ejemplo, de aproximadamente el 5 al 40 % en sólidos o aproximadamente del 10 a aproximadamente el 30 % de sólidos. La primera fase orgánica puede combinarse con una primera combinación acuosa para formar una segunda fase. La solución orgánica puede incluir, por ejemplo, tolueno, metiletil cetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetato de etilo, alcohol de isopropilo, acetato de isopropilo, dimetilformamida, cloruro de metileno, diclorometano, cloroformo, acetona, alcohol de bencilo, Tween 80, Span 80, y similares, y combinaciones de los mismos. En una realización, la fase orgánica puede incluir alcohol de bencilo, acetato de etilo y combinaciones de los mismos. La segunda fase puede ser de entre el 1 y el 50 por ciento en peso, por ejemplo, aproximadamente del 5-40 por ciento en peso, de sólidos. La solución acuosa puede ser agua, opcionalmente en combinación con uno o más de colato de sodio, acetato de etilo, acetato de polivinilo y alcohol de bencilo.

Por ejemplo, la fase aceitosa u orgánica puede usar disolvente que es solamente parcialmente miscible con el no disolvente (agua). Por lo tanto, cuando se mezcla a una relación suficientemente baja y/O cuando se usa agua presaturada con los disolventes orgánicos, la fase aceitosa permanece líquida. La fase aceitosa puede emulsionarse en una solución acuosa y, como gotitas líquidas, cizallarse en las nanopartículas usando, por ejemplo, sistemas de dispersión de alta energía, tales como homogeneizadores o sonicadores. La porción acuosa de la emulsión, de otro modo, conocida como la "fase de agua", puede ser una solución de tensioactivo que consiste en colato de sodio y presaturada con acetato de etilo y alcohol de bencilo.

La emulsión de la segunda fase para formar una fase de emulsión puede realizarse en una o dos etapas de emulsionado. Por ejemplo, una emulsión primaria puede prepararse y, a continuación, emulsionarse para formar una emulsión fina. La emulsión primaria puede formarse, por ejemplo, usando un mezclado simple, un homogeneizador de alta presión, un sonicador de sondas, una barra agitadora o un homogeneizador de rotor y estator. La emulsión primaria puede formarse en una emulsión fina mediante el uso de, por ejemplo, un sonicador de sondas o un homogeneizador de alta presión* por ejemplo, usando 1, 2, 3 o más pases a través de un homogeneizador. Por ejemplo, cuando se usa un homogeneizador de alta presión, la presión puede ser de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 8.000 psi, de aproximadamente 2.000 de aproximadamente 4.000 psi, de 4.000 a aproximadamente 8000 psi o de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 5.000 psi, por ejemplo, aproximadamente 2.000, 2.500, 4.000 o 5.000 psi.

Se puede necesitar o bien la evaporación o dilución por disolvente para completar la extracción del disolvente y solidificar las partículas. Para un mejor control de la cinética de extracción y un procedimiento más escalable, se puede usar una dilución con disolvente mediante inactivación acuosa. Por ejemplo, la emulsión se puede diluir en

agua fría a una concentración suficiente para disolver todo el disolvente orgánico para formar una fase de inactivación. La inactivación se puede llevar a cabo al menos parcialmente a una temperatura de aproximadamente 5 °C o inferior. Por ejemplo, el agua usada en la inactivación puede estar a una temperatura que es inferior a la temperatura ambiente (por ejemplo, de 0 a aproximadamente 10 °C, o de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 °C).

En algunas realizaciones, no todo el agente terapéutico (por ejemplo, docetaxel) se encapsula en las partículas en esta etapa, y se añade un solubilizante de fármacos a la fase inactivada para formar una fase solubilizada. El solubilizante de fármacos puede ser, por ejemplo, Tween 80, Tween 20, polivinil pirrolidona, ciclodextrano, dodecil sulfato de sodio o colato de sodio. Por ejemplo, Se puede añadir Tween 80 a la suspensión de nanopartícula inactivada para solubilizar el fármaco libre y evitar la formación de cristales de fármaco. En algunas realizaciones, una relación de solubilizante de fármaco con respecto a agente terapéutico (por ejemplo, docetaxel) es de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 10:1.

La fase solubilizada puede filtrarse para recuperar las nanopartículas. Por ejemplo, se pueden usar membranas de ultrafiltración para concentrar la suspensión de nanopartículas y eliminar sustancialmente el disolvente orgánico, fármaco libre y otros adyuvantes del procedimiento (tensioactivos). Se puede llevar a cabo la filtración ejemplar usando un sistema de filtración de flujo tangencial. Por ejemplo, mediante el uso de una membrana con un tamaño de poros adecuado para retener nanopartículas mientras permite que pasen los solutos, micelas y disolvente orgánico, las nanopartículas se pueden separar selectivamente. Se pueden usar membranas ejemplares con puntos de corte de peso molecular de aproximadamente 300-500 kDa (~5-25 nm).

La diafiltración se puede llevar a cabo usando un enfoque de volumen constante, lo que significa que el diafiltrado (agua desionizada fría, por ejemplo, de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 °C, o de 0 a aproximadamente 10 °C) se puede añadir a la suspensión alimentada a la misma tasa que se retira el filtrado de la suspensión. En algunas realizaciones, la filtración puede incluir una primera filtración usando una primera temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 °C, o de 0 a aproximadamente 10 °C y una segunda temperatura de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 °C o de 15 a aproximadamente 35 °C. Por ejemplo, la filtración puede incluir el procesamiento de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 diavolumenes a aproximadamente 0 a aproximadamente 5 °C y el procesamiento al menos un diavolumen (por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 3 o aproximadamente 1-2 diavolumenes) a aproximadamente 20 a aproximadamente 30 °C.

Después de purificar y concentrar la suspensión de nanopartículas, las partículas pueden pasarse a través de uno, dos o más filtros de esterilización y/o de profundidad, por ejemplo, usando un prefiltro de profundidad de ~0,2 µm.

En otra realización de preparación de nanopartículas, se forma una fase orgánica compuesta de una mezcla de agente terapéutico, por ejemplo, docetaxel, y polímero (homopolímero, co-polímero y co-polímero con ligando). La fase orgánica se mezcla con una fase acuosa a aproximadamente una relación de 1:5 (fase aceitosa:fase acuosa) en la que la fase acuosa está compuesta de un tensioactivo y algún disolvente disuelto. La emulsión primaria se forma mediante la combinación de las dos fases con simple mezclado o mediante el uso de un homogeneizador de rotor y estator. La emulsión primaria se forma, a continuación en una emulsión fina mediante el uso de un homogeneizador de alta presión. La emulsión fina a continuación, se inactiva mediante adición de agua desionizada con mezclado. La relación de mezcla:emulsión es de aproximadamente 8,5: 1. Cuando se añade una solución de Tween (por ejemplo Tween 80) a la mezcla para conseguir aproximadamente un 2 % de Tween en total. Esto sirve para disolver fármaco libre, no encapsulado. Las nanopartículas se aíslan, a continuación, o bien mediante centrifugación o bien mediante ultrafiltración/diafiltración.

Se apreciará que las cantidades de polímero y agente terapéutico o agente activo que se usan en la preparación de la formulación pueden diferir de una formulación final. Por ejemplo, algún agente activo puede no volverse completamente incorporado en una nanopartícula y tal agente terapéutico libre puede, por ejemplo, extraerse mediante filtración. Por ejemplo, en una realización, se puede usar aproximadamente el 20 por ciento de agente activo (por ejemplo, docetaxel) y aproximadamente 80 por ciento de polímero (por ejemplo, el polímero puede incluir aproximadamente el 2,5 por ciento en moles de PLA-PEG-GL2 y aproximadamente 97,5 por ciento en moles de PLA-PEG) en la preparación de una formulación que resulta en, por ejemplo, una nanopartícula final que comprende aproximadamente el 10 por ciento de agente activo (por ejemplo, docetaxel) y aproximadamente 90 por ciento de polímero en peso (en el que el polímero puede incluir aproximadamente 1,25 por ciento en moles de PLA-PEG-GL2 y aproximadamente 98,75 por ciento en moles de PLA-PEG). Tales procedimientos pueden proporcionar nanopartículas finales adecuadas para su administración a un paciente que incluye de aproximadamente el 2 a aproximadamente el 20 por ciento en peso de agente terapéutico, por ejemplo, aproximadamente 5, aproximadamente 8, aproximadamente 10, aproximadamente 15 por ciento de agente terapéutico en peso.

Composiciones farmacéuticas liofilizadas

Las nanopartículas que se desvelan en el presente documento pueden combinarse con vehículos farmacéuticos aceptables para formar una composición farmacéutica. Como comprenderá un experto en la técnica, los vehículos pueden escogerse basándose en la vía de administración tal como se describe a continuación, la ubicación del problema diana, el fármaco que se está administrando, el transcurso de tiempo de administración del fármaco, etc.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a un paciente mediante cualquier medio conocido en la técnica incluidas vías orales y parenterales. El término "paciente", como se usa en el presente documento, se refiere a seres humanos así como no humanos, incluidas, por ejemplo, mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. Por ejemplo, los no humanos pueden ser mamíferos (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, un primate o un cerdo). En determinadas realizaciones son deseables las vías parenterales puesto que evitan el contacto con enzimas digestivas que se encuentran en el canal alimentario. De acuerdo con tales realizaciones, las composiciones inventivas pueden administrarse mediante inyección (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular, intraperitoneal), rectal, vaginal, tópica (como mediante polvos, cremas, pomadas o gotas) o mediante inhalación (como mediante pulverizadores).

Las nanopartículas pueden administrarse a un sujeto que lo necesita sistémicamente, por ejemplo, vía parenteral o mediante infusión o inyección intravenosa.

De acuerdo con la presente invención, se contempla una composición adecuada para su congelación, incluidas nanopartículas que se desvelan en el presente documento y una solución adecuada para su congelación, es decir, un azúcar (sacarosa) y una solución de ciclodextrina se añade a la suspensión de nanopartículas. El azúcar (sacarosa) puede actuar, por ejemplo, como un crioprotector para evitar que las partículas se agreguen cuando se congelan. Formulaciones contempladas incluyen una pluralidad de nanopartículas desveladas (por ejemplo, nanopartículas que tienen PLA-PEG y un agente activo) y aproximadamente del 2 % a aproximadamente el 15 % en peso (o aproximadamente del 4 % a aproximadamente el 6 % en peso, por ejemplo, aproximadamente el 5 % en peso) de sacarosa y aproximadamente del 5 % en peso a aproximadamente el 20 % (por ejemplo, de aproximadamente el 7 % en peso a aproximadamente el 12 % en peso, por ejemplo, aproximadamente el 10 % en peso) de HPbCD).

La presente divulgación se refiere, en parte, a composiciones farmacéuticas liofilizadas que, cuando se reconstituyen, tienen una cantidad mínima de grandes agregados. Tales grandes agregados pueden tener un tamaño superior a aproximadamente 0,5 μm , superior a aproximadamente 1 μm , o superior a aproximadamente 10 μm y puede ser indeseable en una solución reconstituido. Los tamaños de agregados pueden medirse usando una variedad de técnicas incluidas las que se indican en la Farmacopea de los EE.UU. en 32 <788>, se incorpora en el presente documento por referencia. Los ensayos destacados en USP 32 <788> incluyen un ensayo de recuento de oscurecimiento claro de partículas, ensayo de recuento de partículas microscópicas, difracción láser y sensor óptico de partícula única. En una realización, el tamaño de partícula en una muestra dada se calcula usando difracción láser y/o sensor óptico de partícula única.

El USP 32 <788> mediante ensayo de recuento de partículas por oscurecimiento claro establece directrices para muestrear tamaños de partículas en una suspensión. Para soluciones con menos de o igual a 100 ml, la preparación cumple con el ensayo si el número promedio de partículas presentes no supera los 6.000 por contenedor que son >10 μm y 600 por contenedor que son >25 μm .

Como destaca USP 32 <788>, el ensayo de recuento de partículas microscópicas establece directrices para determinar los recuentos de partículas mediante el uso de un microscopio binocular ajustado a una ampliación de 100 +/- 10 veces que tiene un micrómetro ocular. Un micrómetro ocular es una grátícula de diámetro circular que consiste en un círculo dividido en cuadrantes con círculos de referencia en negro que denotan 10 μm y 25 μm cuando se observa a en una ampliación de 100 veces. Se proporciona una escala lineal por debajo de la grátícula. El número de partículas con referencia a 10 μm y 25 μm se corresponden visualmente. Para soluciones con menos de o igual a 100 ml, la preparación cumple con el ensayo si el número promedio de partículas presentes no supera los 3000 por contenedor que son >10 μm y 300 por contenedor que son >25 μm .

En algunas realizaciones, una muestra acuosa de 10 ml de una composición desvelada después de su reconstitución comprende menos de 600 partículas por ml que tiene un tamaño superior a o igual a 10 micrómetros; y/o inferior a 60 partículas por ml que tienen un tamaño superior a o igual a 25 micrómetros.

Se puede usar dispersión de luz dinámica (DLS) para medir el tamaño de la partícula, pero se basa en el movimiento browniano de modo que la técnica puede que no detecte algunas partículas más grandes. La difracción láser se basa en las diferencias en el índice de refracción entre la partícula y el medio de suspensión. La técnica es capaz de detectar partículas en el intervalo submicrométrico a milimétrico. Se pueden determinar partículas más grandes de cantidades relativamente más pequeñas (por ejemplo, aproximadamente 1-5 % en peso) en suspensiones de nanopartículas. El sensor óptico de partícula única (SPOS) usa oscurecimiento claro de suspensiones de diluidos para recontar las partículas individuales de aproximadamente 0,5 μm . Conociendo la concentración de partículas de la muestra medida, se puede calcular el porcentaje en peso de agregados o la concentración de agregados (partículas/ml).

La formación de agregados puede producirse durante la liofilización debido a la deshidratación de la superficie de las partículas. Esta deshidratación se puede evitar usando lioprotectores, tales como disacáridos, en la suspensión antes de su liofilización. Disacáridos adecuados incluyen sacarosa, lactulosa, lactosa, maltosa, trehalosa o celobiosa y/o mezclas de los mismos. Otros disacáridos contemplados incluyen kojibiosa, nigerosa, isomaltosa, β,β -trehalosa, α,β -trehalosa, soforosa, laminaribiosa, gentiobiosa, turanosa, maltulosa, palatinosa, gentiobiulosa, mannobiasa,

melidiosa, melibiulosa, rutinosa, turinulosa y xilobiosa. La reconstitución muestra distribuciones de tamaño de DLS equivalentes cuando se comparan con la suspensión de partida. Sin embargo, la difracción láser puede detectar partículas de $> 10 \mu\text{m}$ de tamaño en algunas soluciones reconstituidas. Adicionalmente, el SPOS puede también detectar partículas de $>10 \mu\text{m}$ de tamaño a una concentración por encima de la de las directrices de la FDA (10^4 - 10^5 partículas/ml para $> 10 \mu\text{m}$ de partículas).

La presente invención se refiere en parte al uso de una o más sales de haluro iónico como un lioprotector adicionales a sacarosa y ciclodextrina.

Las sales de haluro iónico adecuadas pueden incluir cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de zinc o mezclas de los mismos. Sales de haluro iónico adicionales incluyen cloruro de potasio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, bromuro de sodio, bromuro de calcio, bromuro de zinc, bromuro de potasio, bromuro de magnesio, bromuro de amonio, yodo de sodio, yodo de calcio, yodo de zinc, yodo de potasio, yodo de magnesio o yodo de amonio y/o mezclas de los mismos. En una realización, la composición farmacéutica liofilizada puede comprender aproximadamente de 10 a aproximadamente 100 mM de cloro de sodio. En otra realización, la composición farmacéutica liofilizada puede comprender aproximadamente de 100 a aproximadamente 500 mM de sal de cloro iónico divalente, tal como cloruro de sodio o cloruro de zinc.

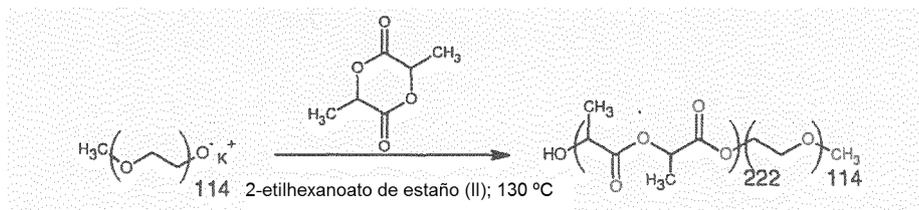
La etapa de liofilización puede comprender la congelación de la composición a una temperatura superior a aproximadamente $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ o, por ejemplo, inferior a $-30 \text{ }^\circ\text{C}$, que forma una composición congelada; y secar la composición congelada para formar la composición liofilizada. La etapa de secado puede producirse a aproximadamente 50 mTorr a una temperatura de aproximadamente -25 a aproximadamente $-34 \text{ }^\circ\text{C}$, o aproximadamente -30 a aproximadamente $-34 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ejemplos

La invención que se está describiendo ahora de un modo general, se comprenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos que se incluyen meramente para fines de ilustración de determinados aspectos y realizaciones de la presente invención y no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1: Preparación de PLA-PEG

La síntesis se consigue mediante polimerización de abertura de anillo de d,l-lactida con un α -hidroxi- ω -metoxipoli(etilenglicol) como el macro-iniciador y funcionó a una temperatura elevada usando 2-etil hexanoato de estaño (II) como catalizador, como se muestra a continuación (PEG Mn \sim 5.000 Da; PLA Mn \sim 16.000 Da; PEG-PLA Mn \sim 21.000 Da).



El polímero se purifica disolviendo el polímero en diclorometano y precipitándolo en una mezcla de hexano y éter de dietilo. El polímero recuperado de esta etapa se seca en un horno.

Ejemplo 2: Preparación de nanopartícula ejemplar - Procedimiento de emulsión

Se forma una fase orgánica compuesta de una mezcla de docetaxel (DTCL) y polímero (homopolímero, copolímero y copolímero con ligando). La fase orgánica se mezcla con una fase acuosa a aproximadamente una relación de 1:2 (fase aceitosa:fase acuosa) en la que la fase acuosa está compuesta de un tensioactivo (0,25 % de colato de sodio) y algún disolvente disuelto (4 % de acetato de etilo, 2 % de alcohol de bencilo). Con el fin de conseguir una alta carga de fármaco, se usa aproximadamente el 30 % de sólidos en la fase orgánica.

La emulsión primaria, gruesa se forma mediante la combinación de las dos fases con simple mezclado o mediante el uso de un homogeneizador de rotor y estator. El rotor/estator proporciona una solución lechosa homogénea, mientras que la barra de agitación produce una emulsión gruesa visiblemente más grande. Se observa que el procedimiento de barra de agitación da como resultado gotitas de fase aceitosa significantes que se adhieren al lado del vaso de alimentación, sugiriendo que mientras que el tamaño de emulsión gruesa no es un parámetro de procedimiento importante con respecto a la calidad, debe hacerse adecuadamente fina para evitar la pérdida de rendimiento separación de fase. Por lo tanto, el rotor estator se usa como el procedimiento estándar de la formación de emulsión gruesa, aunque una mezcladora de alta velocidad puede ser adecuada a una mayor escala.

La emulsión primaria se forma, a continuación en una emulsión fina mediante el uso de un homogeneizador de alta presión. El tamaño de la emulsión gruesa no afecta significativamente el tamaño de partícula después de sucesivos

pases (103) a través del homogeneizador.

Después de 2-3 pases el tamaño de partícula no disminuye significativamente y los pases sucesivos pueden incluso provocar un aumento de tamaño de partícula. La fase orgánica se emulsiona 5:1 O:W con fase acuosa estándar y se realizan múltiples pases por separado, inactivando una pequeña porción de emulsión después de cada pase. La escala indicada representa los sólidos totales de la formulación.

- 5 El efecto de escala en el tamaño de partícula muestra dependencia de escala. La tendencia muestra que en el intervalo de tamaño en volumen de 2-10 g, lotes más grandes producen partículas más pequeñas. Se ha demostrado que esta dependencia de escala se elimina cuando se consideran más grandes de lotes de escala de 10 g. La cantidad de sólidos usados en la fase aceitosa es del 30 %.

- 10 La Tabla A resume los parámetros de procedimiento de emulsificación.

Tabla A

Parámetro	Valor
Formación de emulsión gruesa	Mezcladora de alta cizalla
Presión de alimentación de homogeneizador	2.500 psi por cámara
Cámara(s) de interacción	4x200 µm de cámara Z
Número de pases de homogeneizador	1 pase
Fase acuosa [colato de sodio]	0,25-0,35 %

(continuación)

Parámetro	Valor
relación W:O	2:1
[Sólidos] en fase acuosa	30 %

5 La emulsión fina a continuación, se inactiva mediante adición de agua desionizada a una temperatura dada con mezclado. En la operación de unidad de inactivación, se añade la emulsión a una mezcla acuosa en frío con agitación. Esto sirve para extraer una porción significativa de los disolventes de fase aceitosa, endureciendo eficazmente las nanopartículas para la filtración corriente abajo. Enfriar la mezcla mejora significativamente la encapsulación del fármaco. La relación de mezcla:emulsión es de aproximadamente 5: 1.

10 Se añade una solución del 35 % (% en peso) de Tween 80 a la mezcla para conseguir aproximadamente 4 % de Tween 80 en su conjunto. Después de inactivar la emulsión, se añade una solución de Tween 80 que actúa como solubilizante de fármaco, permitiendo la retirada eficaz de fármaco no encapsulado durante su filtración. La Tabla B indica cada uno de los parámetros del procedimiento de inactivación.

Tabla B: Resumen de parámetros de procedimiento de inactivación.

Parámetro	Valor
Temperatura de inactivación inicial	< 5 °C
Solución [Tween-80]	35 %
relación Tween-80:fármaco	25:1
relación Q:E	10:1
Temp. de mantenimiento/procedimiento de inactivación	≤ 5 °C (con relación Q:E de 5:1 actual, relación Tween-80:fármaco de 25:1)

15 La temperatura debe permanecer lo suficientemente fría con una suspensión suficientemente diluida (concentración suficientemente baja de disolventes) para permanecer por debajo de la T_g de las partículas. Si la relación Q:E no es lo suficientemente alta, entonces, la mayor concentración de disolvente plastifica las partículas y permite la fuga de fármaco. Por el contrario, temperaturas más frías permite la alta encapsulación de fármaco a relaciones de Q:E bajas (a ~3:1), haciendo posible, llevar a cabo el procedimiento más eficazmente.

20 A continuación, las nanopartículas se aíslan a través de un procedimiento de filtración de flujo tangencial para concentrar la suspensión de nanopartículas e intercambio de tampón de disolventes, fármaco libre y solubilizante de fármaco desde la solución de inactivación al agua. Se usa una membrana de celulosa regenerada con unos puntos de corte de peso moleculares (MWCO) de 300.

25 Se lleva a cabo una diafiltración (DF) de volumen constante para retirar los disolventes de inactivación, fármaco libre y Tween 80. Para llevar a cabo una DF de volumen constante, se añade tampón al vaso de retenidos a la misma tasa que se retira el filtrado. Los parámetros del procedimiento para las operaciones de TFF se resumen en la Tabla C. La tasa de flujo cruzado se refiere a la tasa de flujo de solución a través de los canales de alimentación y por toda la membrana. Este flujo proporciona la fuerza para contaminar las moléculas que puedan dañar la membrana y restringir el flujo de filtrado. La presión de la transmembrana es la fuerza que conduce las moléculas permeables a través de la membrana.

30 Tabla C: Parámetros TFF

Parámetro	Valor optimizado
Material de membrana	Celulosa regenerada - Membrana de pantalla gruesa
Punto de corte de peso molecular	300 kDa
Tasa de flujo transversal	3,7-10 L/min/m ²
Presión de transmembrana	~ 5 psid
Concentración de suspensión de nanopartículas para diafiltración	30-50 mg/ml
Número de diavolúmenes	20)
Área de membrana	5 m ² /kg

La suspensión de nanopartículas filtrada se somete a ciclos térmicos, a continuación, a una temperatura elevada durante la evaluación. Una pequeña porción (normalmente del 5-10 %) del fármaco encapsulado se libera desde las

5 nanopartículas muy rápidamente después de su primera exposición a 25 °C. Debido a este fenómeno, los lotes que se mantienen fríos durante la evaluación completa son susceptibles de formación de fármaco libre o cristales de fármaco durante la administración o cualquier porción de almacenamiento no congelado. Exponiendo la suspensión de nanopartículas a temperatura elevada durante la evaluación, este fármaco "ligeramente encapsulado" puede retirarse y mejorar la estabilidad del producto en detrimento de una pequeña gota en el yodado de fármaco. La Tabla D resume dos ejemplos de procedimiento a 25 °C. Otros experimentos han demostrado que el producto es lo suficientemente estable después de ~2-4 diavolumenes para exponerlo a 25 °C sin perder la mayoría del fármaco encapsulado. Se usan 5 diavolumenes como la cantidad para el procedimiento en frío antes del tratamiento a 25 °C.

Tabla D

		Lotes A	Lotes B
Carga de fármaco	Evaluación en frío	11,3 %	9,7 %
	Evaluación a 25 °C ¹	8,7-9,1 %	9,0-9,9 %
Estabilidad ²	Evaluación en frío	< 1 día	< 1 día
	Evaluación a 25 °C ¹	5-7 días	2-7 días
Estallido <i>In vitro</i> ³	Evaluación en frío	~ 10 %	No realizado
	Evaluación a 25 °C ¹	~ 2 %	

¹25 °C se expusieron sublotos de evaluación a 25 °C después de al menos 5 diavolumenes durante diversos períodos de tiempo. Los intervalos se dan a conocer puesto que hubo múltiples sublotos con exposición a 25 °C.
²Los datos de estabilidad representan el tiempo que se podría haber mantenido el producto a 25 °C a 10-50 mg/ml de concentraciones de nanopartículas antes de la formación de cristales que forman la suspensión (visible por microscopía)
³El estallido *in vitro* representa el fármaco liberado en el primer punto de tiempo (esencialmente inmediatamente)

10 Después del procedimiento de filtración, la suspensión de nanopartículas se pasa a través de un filtro de grado de esterilización (0,2 µm de absoluto). Los prefiltros se usan para proteger el filtro de grado de esterilización para usar un tiempo/área de filtración razonable para el procedimiento. Los valores se resumen en la Tabla E.

Tabla E

Parámetro	Valor O	Efecto
Concentración de suspensión de nanopartículas	50 mg/ml	Las pérdidas de rendimiento son superiores a mayor [NP], pero la capacidad de filtración a 50 mg/ml obvia la necesidad de concentrar asépticamente después de la filtración
Tasa de flujo de filtración	~ 1,3 l/min/m ²	La capacidad de filtración disminuye según aumenta la tasa de flujo

15 El prefiltro tiene medio de filtro de profundidad Seitz PDD1 en cartuchos de filtro Pall SUPRAcap or Stax. Se puede usar 0,2 m² de área de superficie de filtración por kg de nanopartículas para filtros de profundidad y 1,3 m² de área de filtración de superficie por kg de nanopartículas para los filtros de grado de esterilización.

Ejemplo de referencia 3: Composición liofilizada con azúcar y sal

20 Como se muestra en la figura 3, las suspensiones de nanopartículas con >40 mg/ml de concentraciones de nanopartículas (con nanopartículas formadas como en el Ejemplo 2, con 16/5 PLA-PEG como el polímero) se liofilizan en presencia de un 10 % de sacarosa y un aditivo: NaCl, CaCl₂ o PBS. Este experimento formula suspensiones de nanopartículas a elevadas (>40 mg/ml) concentraciones de nanopartículas que pueden reconstituirse sin microagregación. Todas las tres formulaciones de CaCl₂ producen tortas reconstituidas con <100 partículas/ml (10 µm+), incluso en los intervalos de concentración media (150 mM) y alta (200 mM) que produjeron un liofilizado que había colapsado.

Concentraciones inferiores de sal se comportan de modo similar como en la ausencia de sal. Concentraciones superiores de sal muestran, en general, concentraciones de partículas mucho superiores.

Ejemplo de referencia 4: Composición liofilizada con azúcar y/o sal y/o ciclodextrina

30 Se liofilizan suspensiones de nanopartículas en presencia de un azúcar (por ejemplo, sacarosa o trehalosa), sal (por ejemplo, NaCl or CaCl₂), y/o ciclodextrina (por ejemplo, hidroxipropil beta ciclodextrina - HPbCD). Por ejemplo, se preparan formulaciones con 250 mM o 500 mM de NaCl o CaCl₂; y/o 15 %, 20 % o 25 % en peso de sacarosa o trehalosa, por ejemplo, 20 % en peso de trehalosa, 500 mM de CaCl₂, 5 % de HPbCd. Formulaciones representativas se muestran en la Tabla F.

- 5 La Tabla F indica partículas recontadas y medidas una a una sobre un gran intervalo de tamaño mediante un AccuSizer y recontados los números de partículas de tamaño más grande para encontrar los agregados que existían en la formulación. La Tabla F muestra el número de partículas después de reconstituir la solución usando agua destilada en tortas liofilizadas. En la Tabla F, las muestras F/T son de congelación y descongelación solo sin secado, mientras que el nivel de vial de 1 a 4 así como el vial alto 1 y 2 eran de muestras liofilizadas. La mayoría de formulaciones excepto CaCl₂ 500 mM con 15 % de Trehalosa mostraron un bajo número de agregados de partículas y se realizaron ensayos posteriores para optimizar las formulaciones.

Tabla F

Formulación	Reconstitución	Número de partícula/ml, (superior a 10 µm)						
		Control F/T	1	2	3	4	Vial alto 1	Vial alto 2
CaCl ₂ +15 % de sacarosa	Buena	282	527	333	940	396	1110	430
CaCl ₂ +15 % de trehalosa	Disuelto inmediatamente	310	17600	548	Rotura de vial	1160000	1190	442
CaCl ₂ +20 % trehalosa +5 %HPbCD	rápido	945	446	670	486	3500	384	71,3
20 % trehalosa + 10 %HPbCD	rápido	392	28300	4210	899	2790	239	75,5

10 Ejemplo de referencia 5: Composición liofilizada con azúcar y/o sal y/o ciclodextrina

- Se liofilizan suspensiones de nanopartículas en presencia de un azúcar (por ejemplo, trehalosa), ciclodextrina (por ejemplo, hidroxipropil beta ciclodextrina - HPbCD), y/o sal (por ejemplo, CaCl₂). El excipiente y nivel para evaluar formulaciones mediante el uso de Diseño de Experimentos (DOE) se enumera a continuación en la Tabla G. Los viales altos se usan para todas las formulaciones con un volumen de carga de 5 ml (n=5-6 viales por formulación). El secado primario se realiza a -37 °C temperatura de estante.

Tabla G

Excipiente	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
HPbCD	5 %	10 %	N/A	N/A
Trehalosa	10 %	20 %	N/A	N/A
CaCl ₂	0 mM	100 mM	250 mM	500 mM

- 20 El aspecto de las formulaciones liofilizadas y sus propiedades de reconstitución se enumeran a continuación en la Tabla H. En todas las formulaciones sometidas a ensayo, el aspecto de las formulaciones está al menos parcialmente fundido.

Tabla H

Formulación	Aspecto post liofilización	Reconstitución
5 % de HPbCD	parcialmente fundido	OK, muy turbio.
10 % de HPbCD	parcialmente fundido	OK
10 % Trehalosa + 10 % de HPbCD	parcialmente fundido	Requiere muchas agitaciones con formación de vórtice
10 % Trehalosa + 5 % de HPbCD	parcialmente fundido	Requiere muchas agitaciones con formación de vórtice
20 % Trehalosa + 10 % de HPbCD	parcialmente fundido	Requiere muchas agitaciones con formación de vórtice
20 % Trehalosa + 5 % de HPbCD	parcialmente fundido	No, permanecen pequeños fragmentos
CaCl ₂ 100 mM+ 10 % Trehalosa + 10 % HPbCD	parcialmente fundido	Requiere muchas agitaciones con formación de vórtice
CaCl ₂ 100 mM+ 10 % Trehalosa + 5 % HPbCD	parcialmente fundido	Requiere muchas agitaciones con formación de vórtice
CaCl ₂ 100 mM+ 20 % Trehalosa + 10 % HPbCD	parcialmente fundido	Requiere toneladas de agitación con formación de vórtice

(continuación)

Formulación	Aspecto post liofilización	Reconstitución
CaCl ₂ 100 mM+ 20 % Trehalosa + 5 % HPbCD	B&E colapsó completamente; A/C/D parcialmente	NO, permanecen grandes fragmentos
CaCl ₂ 250 mM+ 10 % Trehalosa + 10 % HPbCD	parcialmente fundido	Requiere muchas agitaciones con formación de vórtice
CaCl ₂ 250 mM+ 10 % Trehalosa + 5 % HPbCD	Un colapsado; otros parcialmente fundidos	Sí, sin mezclado
CaCl ₂ 250 mM+ 20 % Trehalosa + 10 % HPbCD	parcialmente fundido	Requiere muchas agitaciones con formación de vórtice
CaCl ₂ 250 mM+ 20 % Trehalosa + 5 % HPbCD	parcialmente fundido	Requiere toneladas de agitación con formación de vórtice
CaCl ₂ 500 mM+ 10 % Trehalosa + 10 % HPbCD	parcialmente fundido	Requiere toneladas de agitación con formación de vórtice
CaCl ₂ 500 mM+ 10 % Trehalosa + 5 % HPbCD	Mayoría colapsado	No -necesidad de toneladas de agitación con formación de vórtice Y tiempo
CaCl ₂ 500 mM+ 20 % Trehalosa + 10 % HPbCD	Mayoría colapsado	Requiere toneladas de agitación con formación de vórtice
CaCl ₂ 500 mM+ 20 % Trehalosa + 5 % HPbCD	Mayoría colapsado y parcialmente estallado	Necesidad de toneladas de agitación con formación de vórtice Y tiempo

5 Los datos de los ciclos se muestran en la Figura 4 y muestra los parámetros del procedimiento de liofilización: temperatura de estante, temperatura de producto, presión de cámara y tiempo. Estos parámetros de procedimiento se controlan a partir del momento en el que el producto se coloca en primer lugar sobre los estantes del liofilizador durante la carga hasta que se retira el producto. Las condiciones reflejadas en el diagrama ilustran los parámetros de procedimiento I para una tirada de lio respectiva para evaluar la concentración de PHbCD.

10 Los tamaños de las partículas en las diversas formulaciones se miden mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y se muestran en la Figura 5. En todas las formulaciones sometidas a ensayo, el tamaño de nanopartícula aumentó después de la congelación/descongelación y liofilización en comparación con muestras pre-congeladas.

El número de micropartículas superiores a 10 µm en las diversas formulaciones se mide mediante ensayo de recuento de partículas microscópicas y se muestra en la Figura 6. En general, las formulaciones que comprenden concentraciones superiores de ciclodextrina muestran mejores recuentos de partículas.

Ejemplo 5: Composición liofilizada con azúcar y ciclodextrina

15 Se liofilizan suspensiones de nanopartículas en presencia de un azúcar (por ejemplo, trehalosa) y ciclodextrina (por ejemplo, hidroxipropil beta ciclodextrina - HPbCD). Las formulaciones sometidas a ensayo se enumeran a continuación en la Tabla H. Los viales altos se usan para todas las formulaciones con un volumen de carga de 5 ml (n= 10 viales por formulación).

Tabla H

Excipiente	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
HPbCD	10 %	15 %	20 %	ND
Trehalosa	0 %	5 %	10 %	20 %
Variable	Niveles alternativos		Formulacion(es)	
Tipo de azúcar	Sacarosa		1) 10 % de HPbCD, 10 % de sacarosa 2) 10 % de HPbCD, 5 % de sacarosa	

20 Al aspecto se las formulaciones liofilizadas y sus propiedades de reconstitución se enumeran a continuación en la Tabla I. Concentración aumentada de trehalosa y ciclodextrina parecieron dar como resultado propiedades de reconstitución más pobres. En todas las formulaciones sometidas a ensayo, los tamaños de DLS aumentaron después de la congelación/descongelación pero disminuyeron tras la liofilización.

25

Tabla I

Formulación	Conc. de DXTL	Aspecto post liofilización	Reconstitución
0 % de trehalosa, 10 % de HPbCD	4,803	parcialmente fundido	ok - necesidad de mezclado manual (<1 min)
0 % de trehalosa, 15 % de HPbCD	4,711	parcialmente fundido	ok - necesidad de mezclado manual (<1 min ea) - algunos fragmentos lg para dispersar
0 % de trehalosa, 20 % de HPbCD	4,736	parcialmente fundido	Necesidad de mucho mezclado manual (par de min)
5 % de trehalosa, 10 % de HPbCD	4,328	parcialmente fundido	la mayoría se reconstituyó pero algunos fragmentos sm necesitaron una mezclado adicional
5 % de trehalosa, 15 % de HPbCD	4,674	parcialmente fundido	algunos se reconstituyeron inmediatamente pero más fragmentos que -4 que necesitaban mezclado extra
5 % de trehalosa, 20 % de HPbCD	4,23	parcialmente fundido	la mayoría se reconstituyó pero algunos fragmentos sm necesitaron una mezclado adicional
10 % de trehalosa, 10 % de HPbCD	4,28	parcialmente fundido	mayoría se reconstituyó inmediatamente, un poco de mezclado extra
10 % de trehalosa, 15 % de HPbCD	4,637	parcialmente fundido	mayoría se reconstituyó inmediatamente, un poco de mezclado extra
10 % de trehalosa, 20 % de HPbCD	4,158	parcialmente fundido	algunos se reconstituyeron rápidamente pero tuvieron que hacer un mezclado extra para incluir los fragmentos
20 % de trehalosa, 10 % de HPbCD	3,655	parcialmente fundido	Tenía fragmentos pero se reconstituyó con agitación
20 % de trehalosa, 15 % de HPbCD	3,397	parcialmente fundido	Tenía fragmentos pero se reconstituyó con 1,5 min de agitación
20 % de trehalosa, 20 % de HPbCD	4,392	parcialmente fundido	Tenía fragmentos pero se reconstituyó con 2 min de agitación
5 % de sacarosa, 10 % de HPbCD	4,614	parcialmente fundido	reconstituido ok a los 1/2 min de agitación (probablemente menos)
10 % de sacarosa, 10 % de HPbCD	4,686	parcialmente fundido	reconstituido ok a los 1/2 min de agitación (probablemente menos)

Los datos del ciclo se muestran en la Figura 7. El tamaño de las partículas en las diversas formulaciones liofilizadas se mide mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y se muestra en la Figura 8.

- 5 El número de micropartículas por ml que son superiores a 10 μm en las diversas formulaciones se miden mediante ensayo de recuento de partículas microscópicas como se muestran en la Figura 9. Casi todas las formulaciones sometidas a ensayo se encuentran por debajo del límite de USP 32 <788>. El número de micropartículas que son superiores a 1 μm en las diversas formulaciones se muestra en las Figuras 10 y 11. En la mayoría de formulaciones, el número de micropartículas superior a 1 μm se aumenta en las muestras liofilizadas cuando se comparan con las muestras pre-congeladas o congeladas/descongeladas.

10

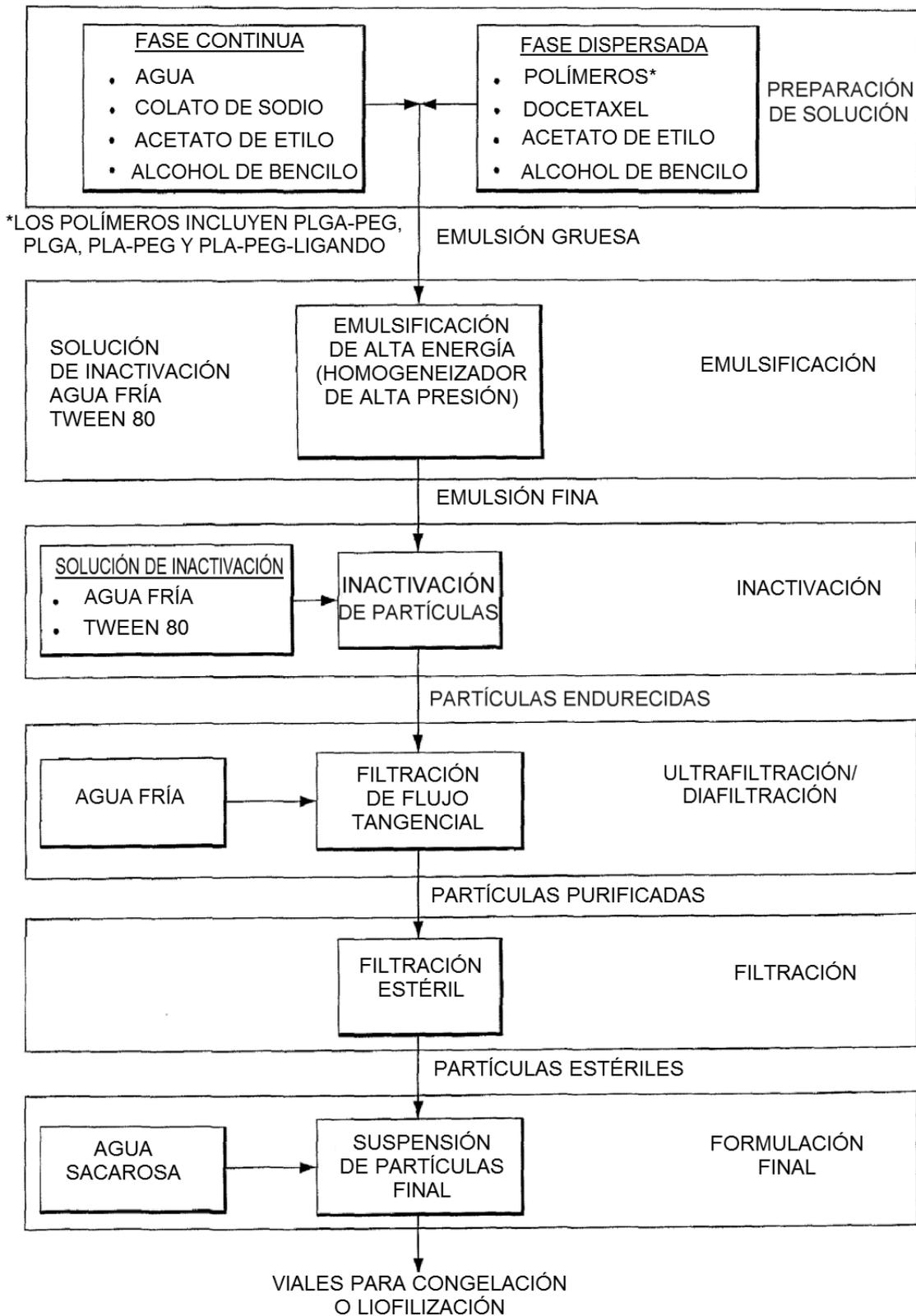
El ensayo de liberación *in vitro* se realiza sobre nanopartículas de docetaxel liofilizadas en presencia de azúcar y ciclodextrina. Los resultados se muestran en la Figura 12.

La calorimetría de barrido diferencial también se realiza sobre diversas formulaciones de nanopartículas como se muestra en las Figuras 13-16.

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición adecuada para su liofilización que incluye:
nanopartículas;
del 2 % al 15 % en peso de sacarosa; y
5 del 5 % al 20 % en peso de hidroxipropil- β -ciclodextrina;
en la que las nanopartículas comprenden:
del 0,2 al 35 por ciento en peso de un agente terapéutico, siendo dicho agente terapéutico un taxano;
del 10 al 99 por ciento en peso de copolímero de poli(etilen)glicol en bloque de ácido poli(láctico) o
10 copolímero o poli(etilen)glicol en bloque de ácido poli(láctico)-co-poli(glicólico); y
del 0 al 50 por ciento en peso de ácido poli(láctico) o ácido poli(láctico) co-poli(glicólico).
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las nanopartículas comprenden del 10 al 30 por ciento en peso del agente terapéutico.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que el taxano es docetaxel.
4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende nanopartículas que tienen PLA-PEG y un
15 agente activo.
5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende del 4 % al 6 % en peso de sacarosa.
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende un 5 % en peso de sacarosa.
7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende del 7 % al 12 % en peso de hidroxipropil- β -
ciclodextrina.
- 20 8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende un 10 % en peso de hidroxipropil- β -
ciclodextrina.
9. Una composición obtenida mediante liofilización de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.



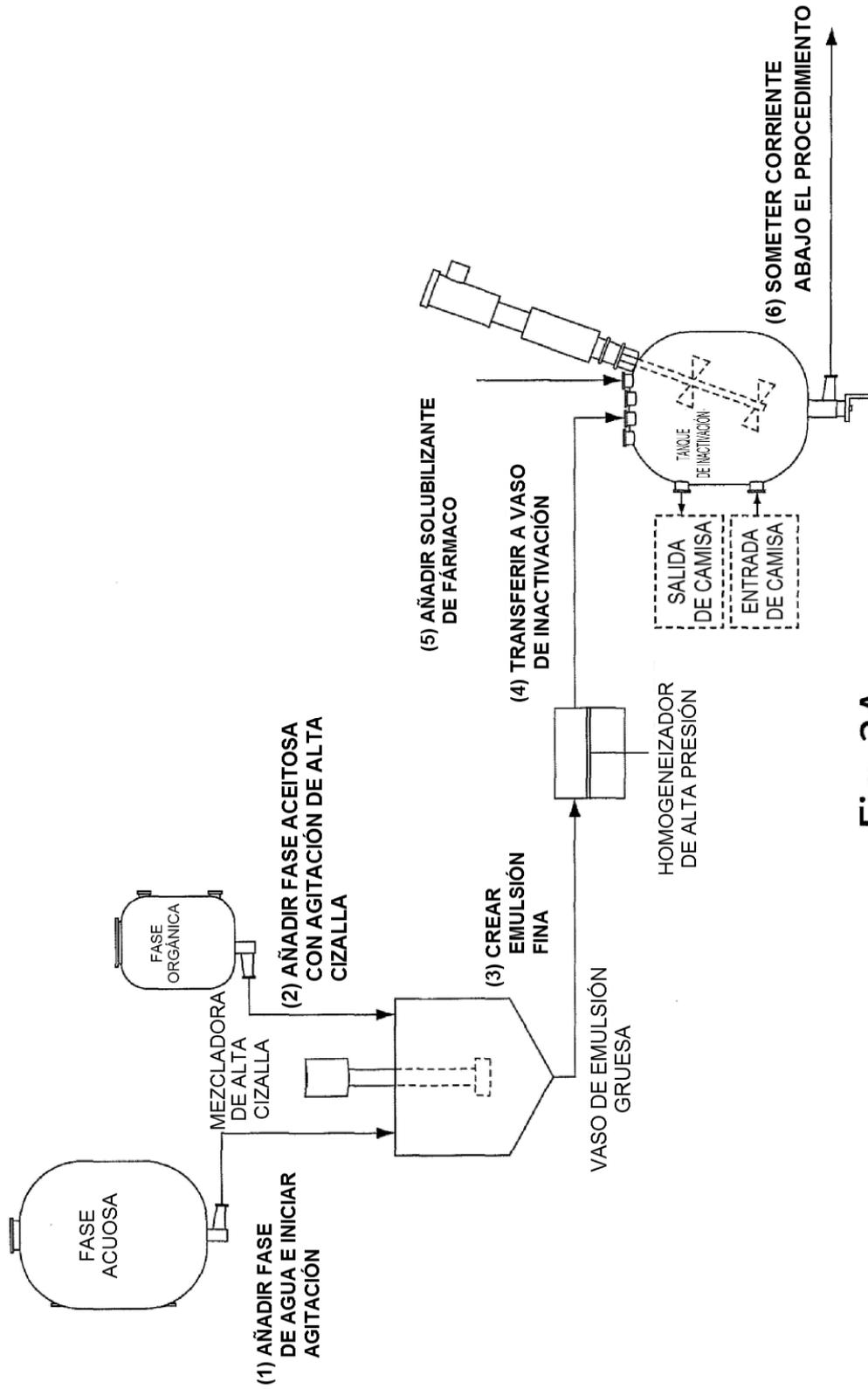


Fig. 2A

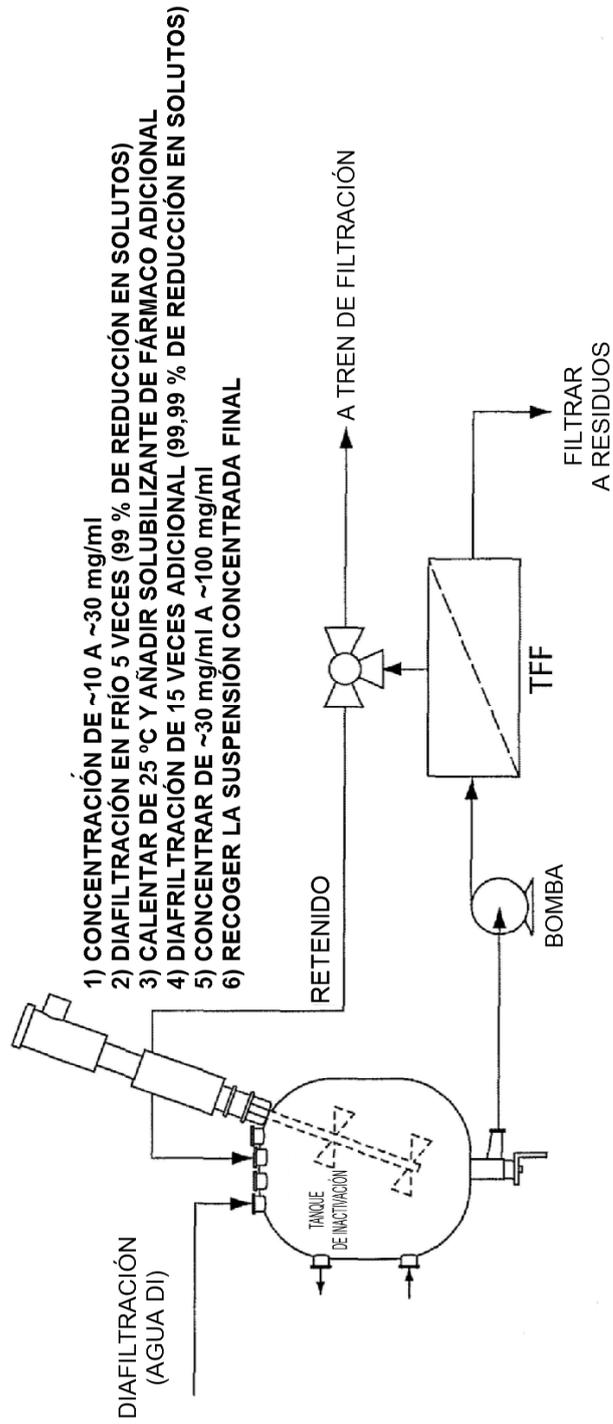


Fig. 2B

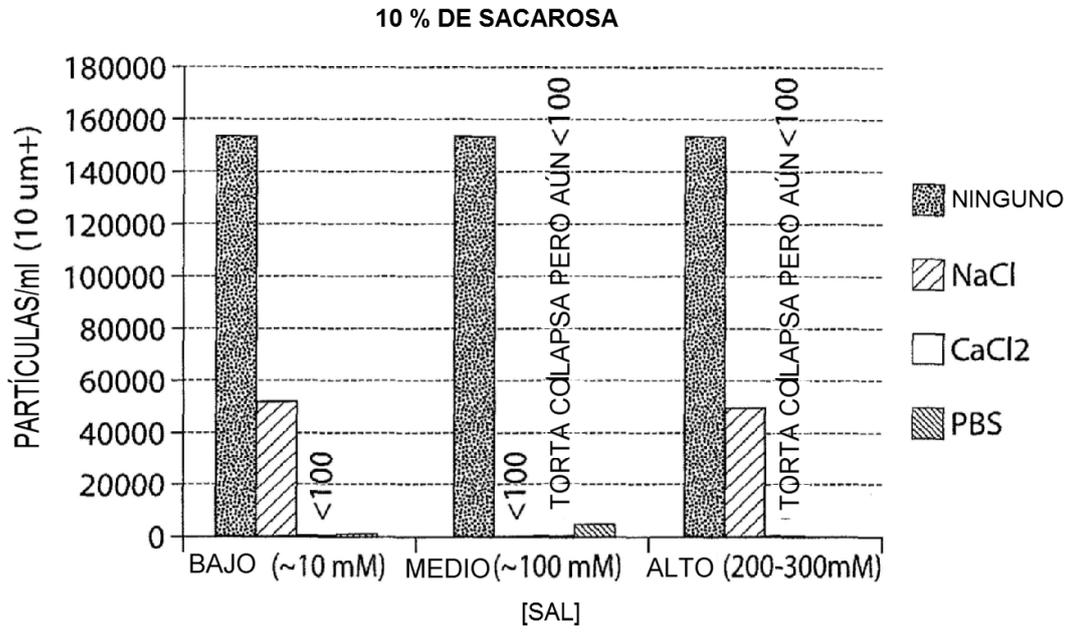


Fig. 3

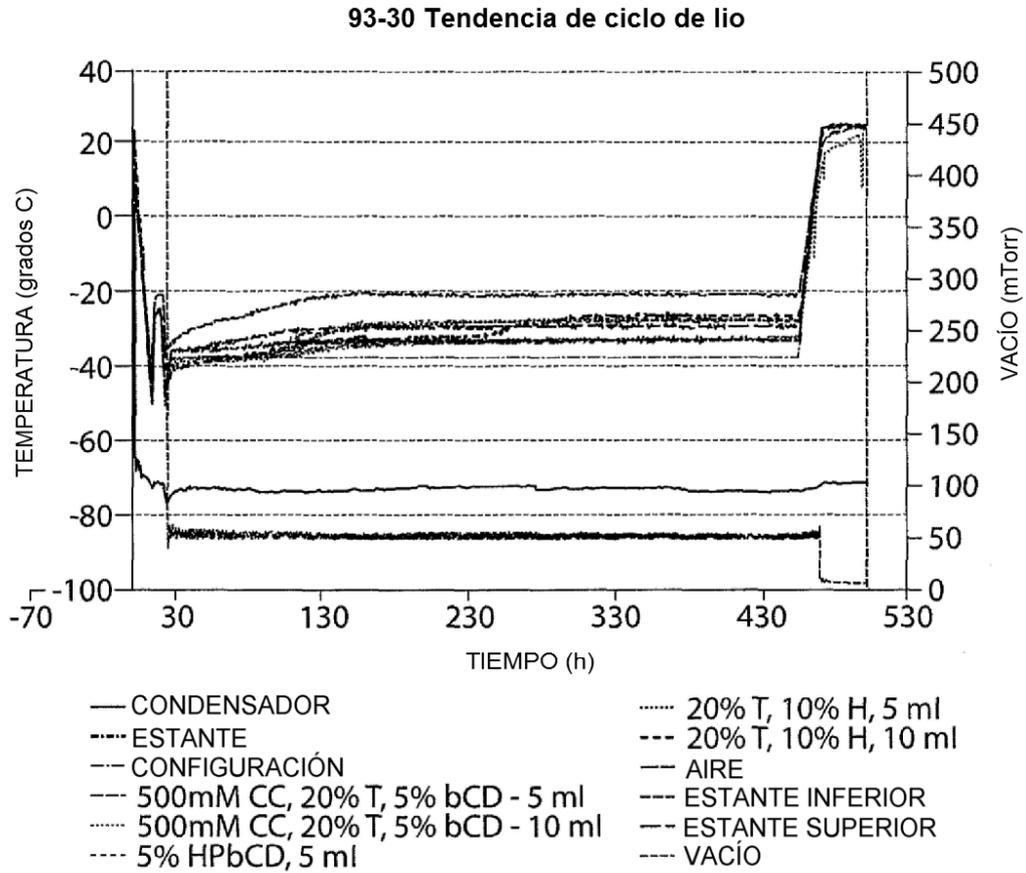


Fig. 4

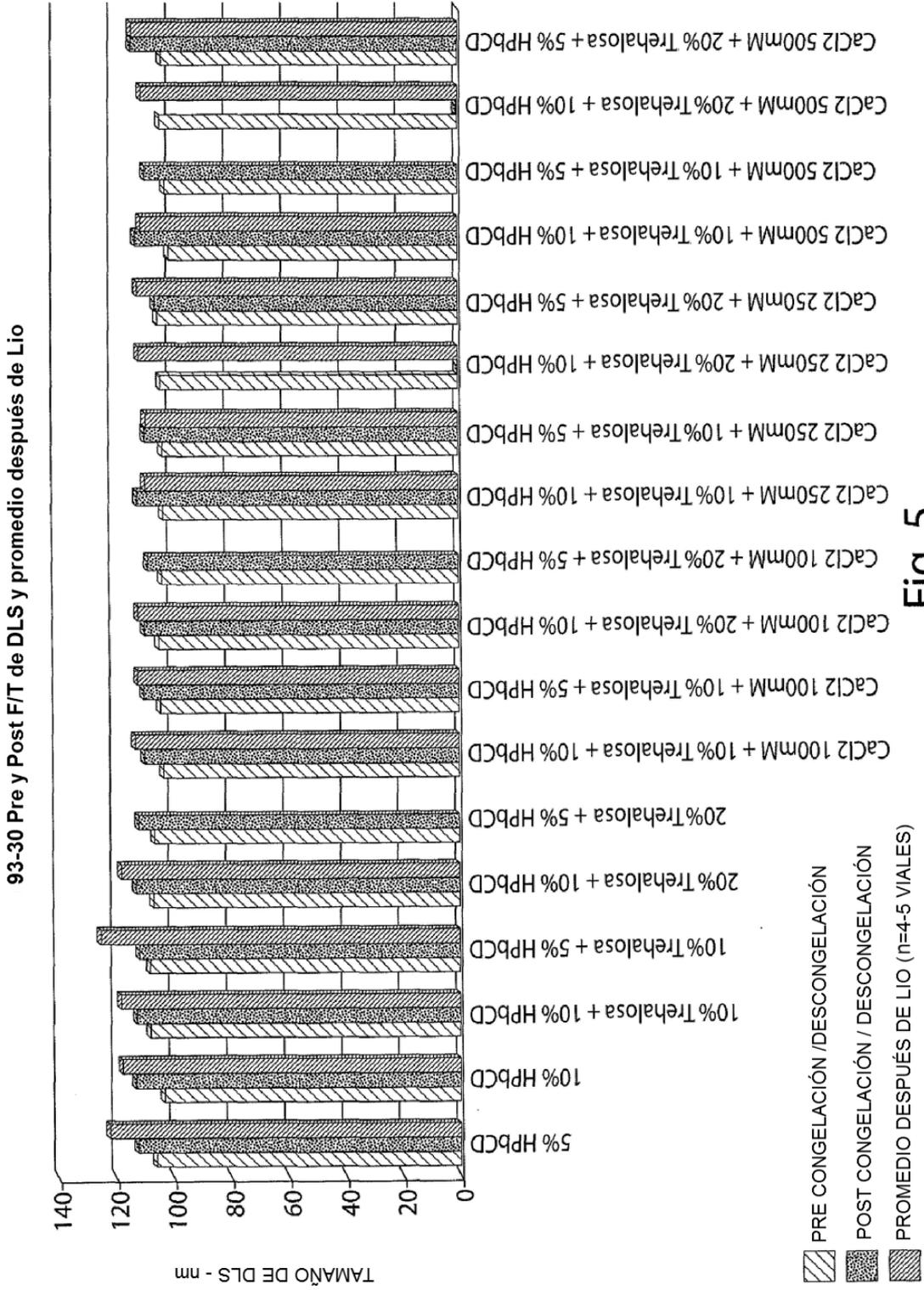


Fig. 5

93-30 Tendencia de ciclo de Lio

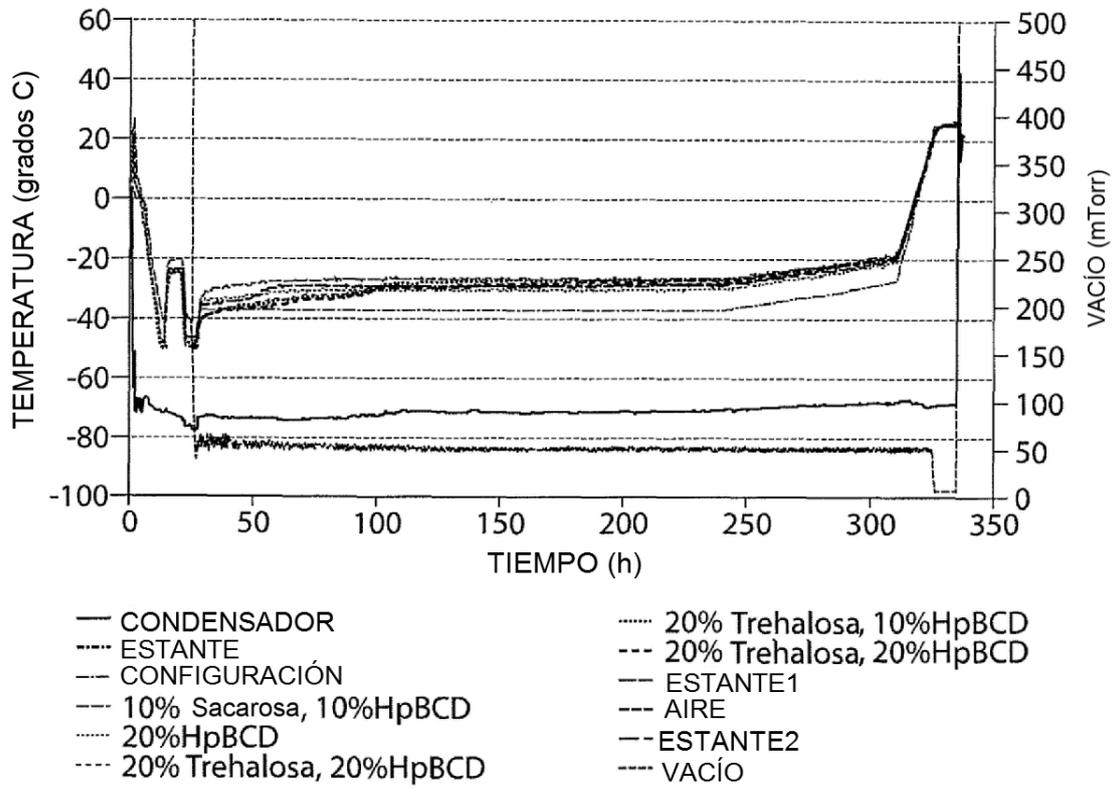


Fig. 7

93-54 Tamaño de partículas de DLS

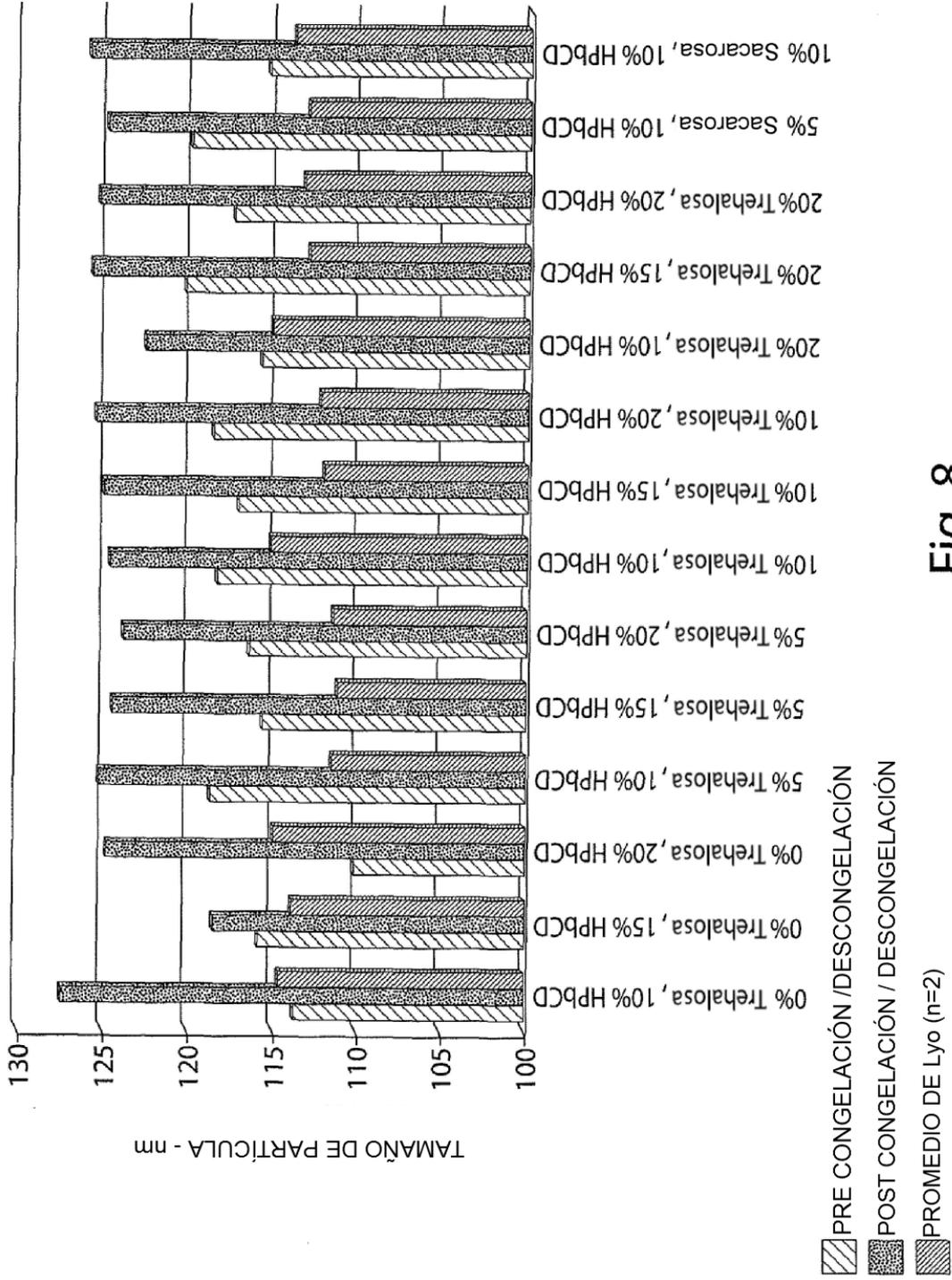


Fig. 8

93-54: > 10 μm de recuento de partículas /ml

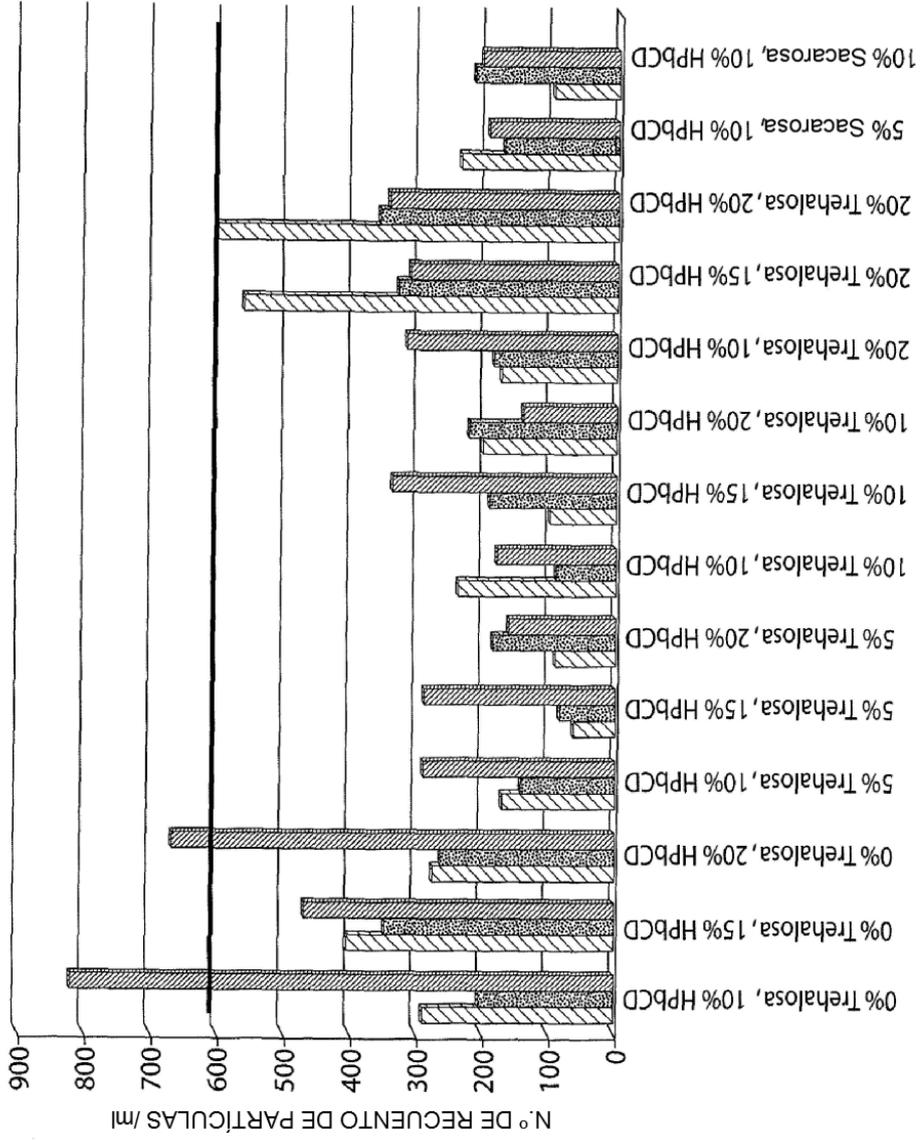
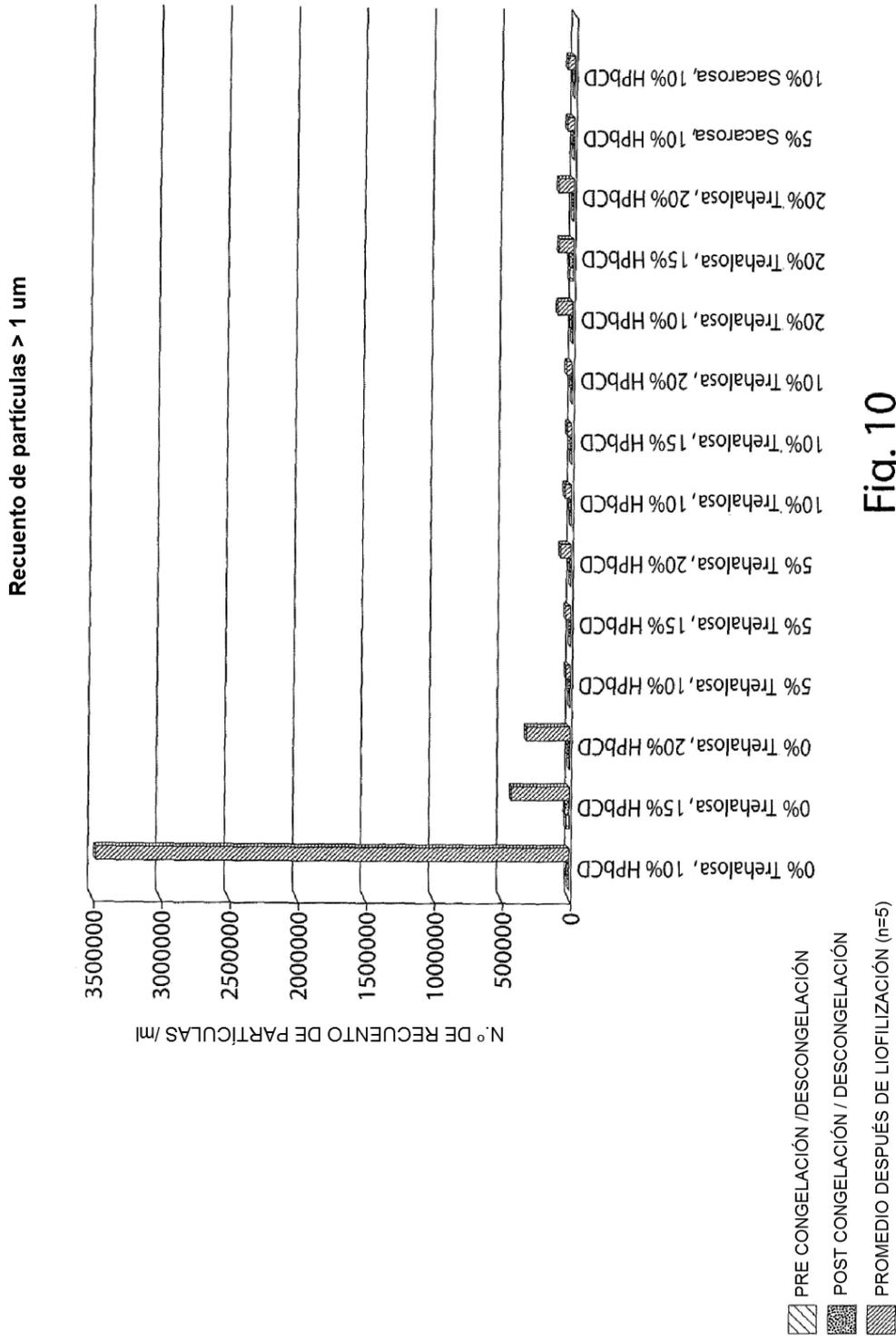


Fig. 9

PRE CONGELACIÓN /DESCONGELACIÓN
 POST CONGELACIÓN / DESCONGELACIÓN
 PROMEDIO DESPUÉS DE LIOFILIZACIÓN (n=5)



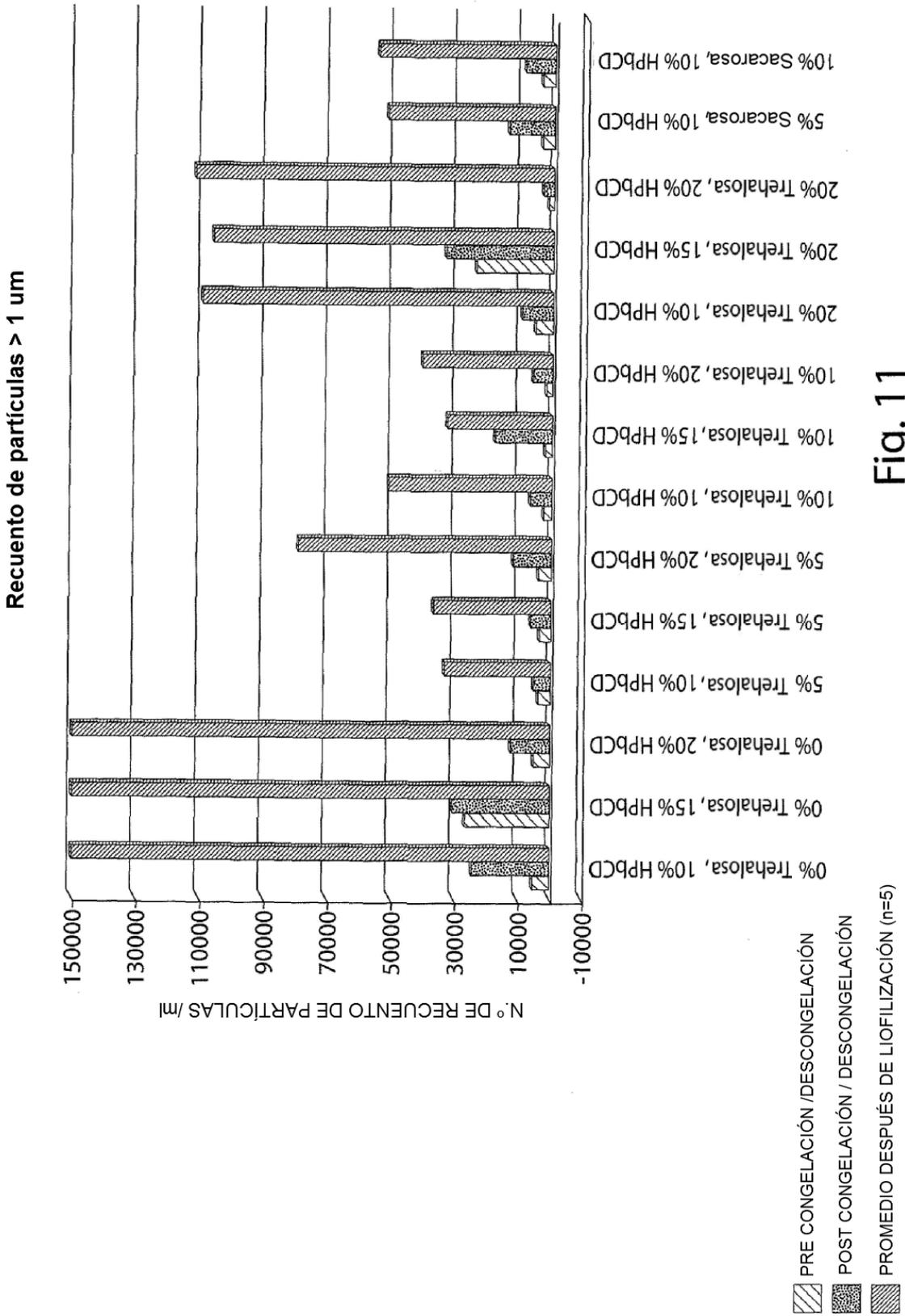


Fig. 11

93.54 Formulación de Lio Liberación *in vitro*

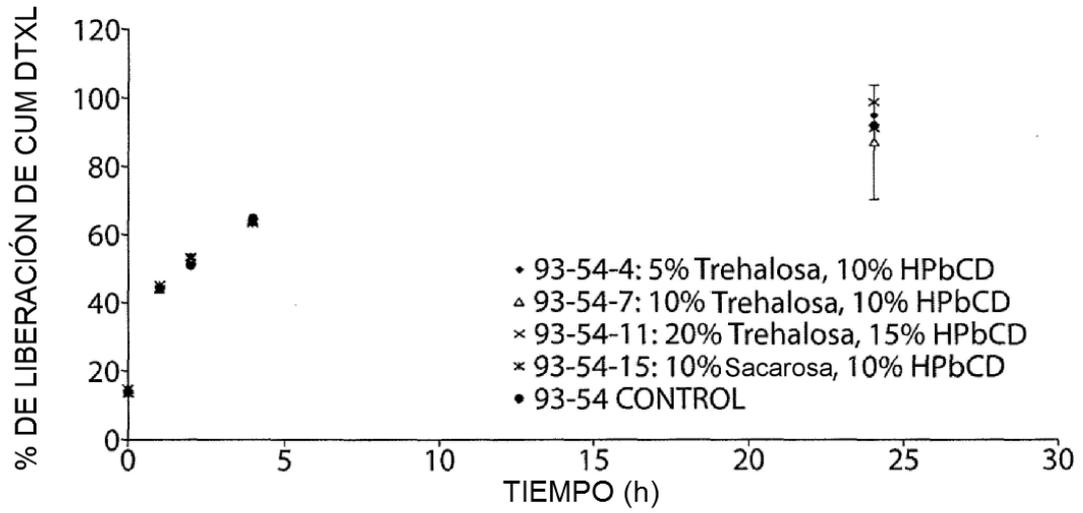


Fig. 12

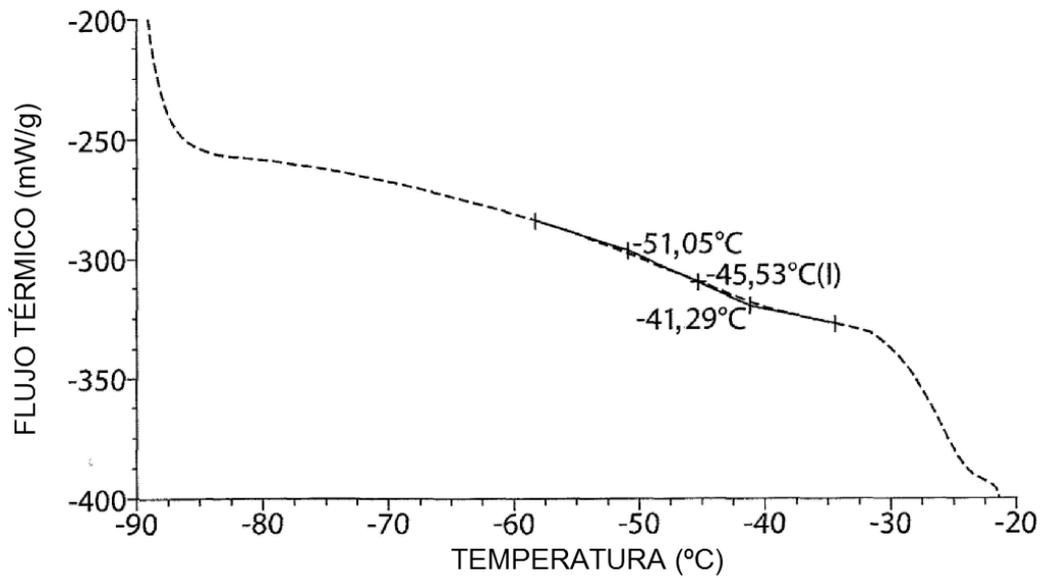


Fig. 13

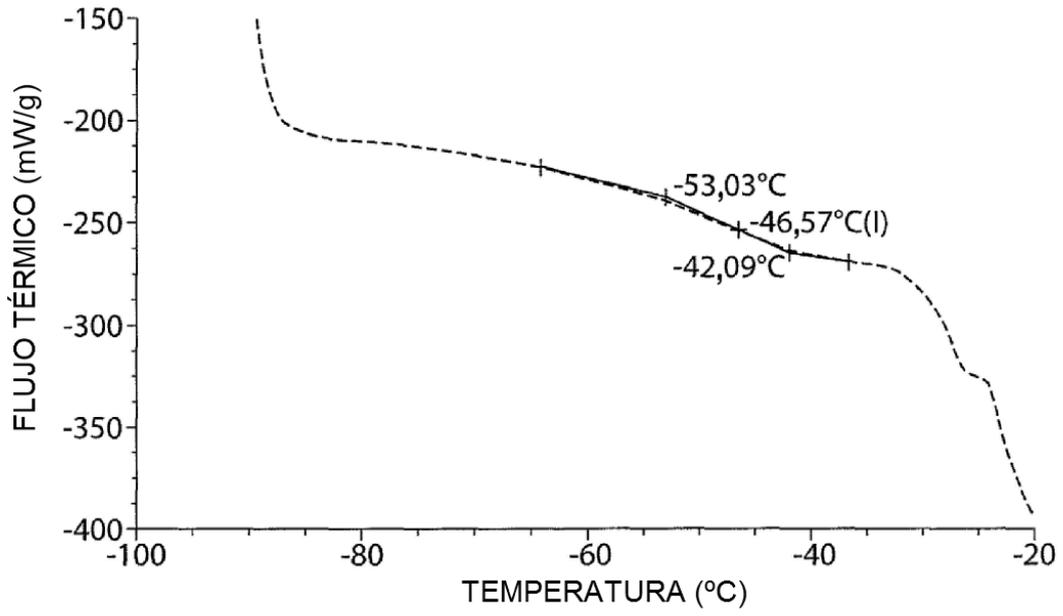


Fig. 14

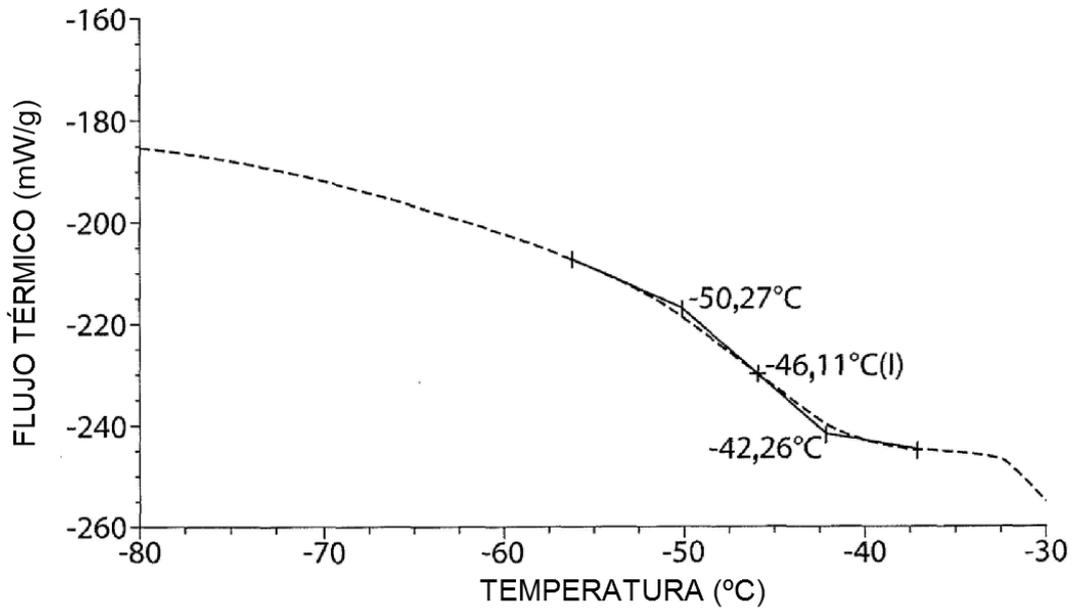


Fig. 15

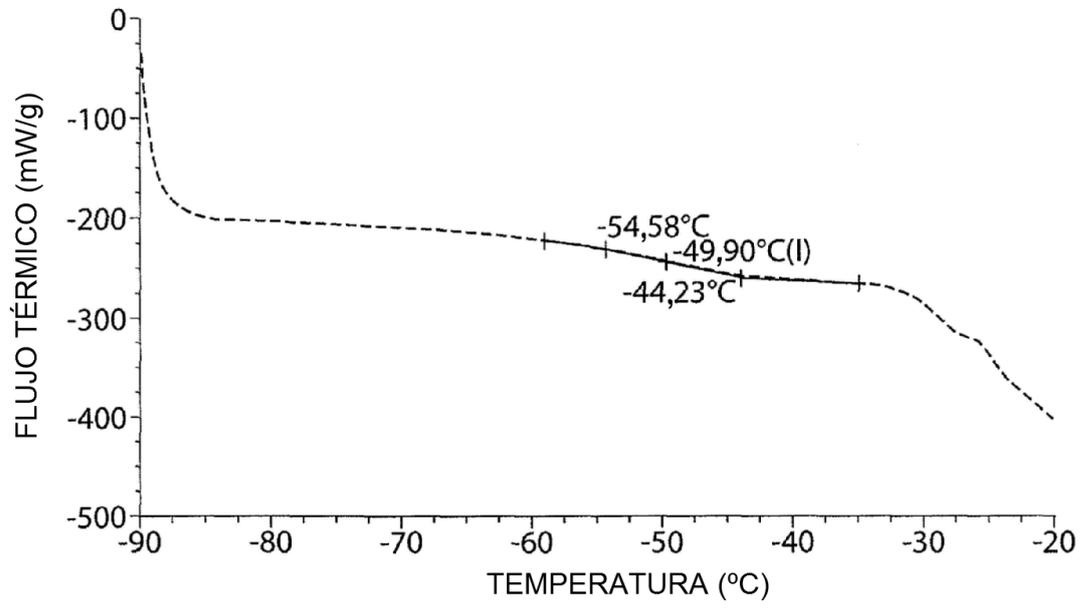


Fig. 16