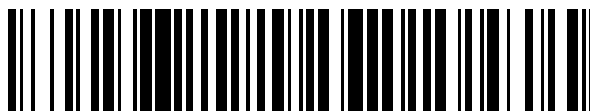


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 429**

51 Int. Cl.:

A61K 47/38 (2006.01)

C08F 8/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2015 PCT/EP2015/078005**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16087340**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2015 E 15801833 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 3233126**

54 Título: **Nanopartículas para encapsular compuestos, la preparación y usos de las mismas**

30 Prioridad:

01.12.2014 EP 14382486

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

12.08.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**IRACHE GARRETA, JUAN MANUEL;
HUARTE CIGANDA, JUDIT;
INCHAURRAGA CASADAMÓN, LAURA;
RUIZ GATÓN, LUISA FERNANDA y
MARTÍN ARBELLÁ, NEKANE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 722 429 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas para encapsular compuestos, la preparación y usos de las mismas

Campo de la invención

5 La presente invención está abarcada en el sector farmacéutico y en el sector de la nanotecnología y se refiere a la encapsulación de principios activos usando nanopartículas de nuevos conjugados de polímeros derivados del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico. La invención también se refiere a un procedimiento para producir tanto los conjugados como las nanopartículas, a composiciones que contienen dichos conjugados o nanopartículas, y a aplicaciones de los mismos.

Antecedentes de la invención

10 Varios de principios activos (fármacos), incluyendo muchos agentes antitumorales, se administran por vía parenteral, lo que provoca diversos problemas. El aumento en la calidad de vida de los pacientes así como la reducción de los costes de atención sanitaria deben enfatizarse entre las principales ventajas que estarían implicadas en la administración de agentes antitumorales mediante la vía oral. Esta vía de administración debe permitir una exposición continua de las células cancerosas al fármaco antitumoral a un nivel de concentración adecuado y sostenido, lo que puede mejorar entonces el índice terapéutico y reducir los efectos secundarios.

15 Cuando un fármaco se administra por vía oral, su biodisponibilidad es generalmente baja debido a varios factores tales como solubilidad, estabilidad dentro del intestino, permeabilidad y metabolismo de primer paso:

- compuestos con baja solubilidad y baja permeabilidad presentan desafíos en la formulación de formas de dosificación oral.
- 20 - se demuestra que el tracto gastrointestinal es un sitio de administración difícil debido al rápido recambio del moco y al tiempo de tránsito relativamente constante.
- los fármacos deben pasar a través de la pared intestinal y luego la circulación portal hasta el hígado; ambos sitios son sitios comunes de metabolismo de primer paso.
- 25 - la absorción de fármacos también puede estar limitada por mecanismos de flujo de salida, especialmente si los compuestos son de naturaleza lipófila. Por ejemplo, la glicoproteína P transportadora secretora ubicada en la superficie mucosa de las células epiteliales es responsable de la biodisponibilidad baja y variable de diversos fármacos (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel o camptotecina).

30 Estos factores, que pueden agruparse en dos categorías interrelacionadas, absorción (solubilidad y permeabilidad) y metabolismo, deben considerarse cuando se optimiza la biodisponibilidad oral de fármacos (Hayden Thomas *et al.*, Expert Opin Drug Metab Toxicol 2006; 2 (4): 591-608).

35 Una posible estrategia para superar los inconvenientes mencionados anteriormente puede ser el uso de nanopartículas poliméricas como vehículos para la administración oral de fármacos. La encapsulación de fármacos en sistemas de nanopartículas los protege contra las duras condiciones del intestino, conduce el fármaco cargado hasta la superficie de las células absorbentes y controla su liberación. La bioadhesión ha mejorado aún más la administración de fármacos. Existen varias ventajas en tener sistemas de administración de fármacos bioadhesivos: (i) como resultado de la adhesión, la formulación permanece más tiempo en el sitio de administración; (ii) mediante el uso de moléculas bioadhesivas específicas, será posible seleccionar como diana un sitio o tejido particular, por ejemplo, en el tracto gastrointestinal (GI); y (iii) el aumento del tiempo de residencia, si se combina con la liberación controlada de un fármaco, puede conducir a una menor frecuencia de administración (Woodley, Clin Pharmacokinet 2001; 40 (2): 77-84). Sin embargo, para lograr las propiedades bioadhesivas adecuadas, las nanopartículas tienen que mostrar propiedades mucopermeables para cruzar la capa de moco y, luego, establecer las interacciones adhesivas en la superficie del epitelio.

45 Muchos polímeros se han descrito como materiales útiles para preparar nanopartículas bioadhesivas para administración oral de fármacos, tales como quitosano, poli(alcohol vinílico) (PVA), homo y copolímeros de ácidos láctico y glicólico (PLGA) o diferentes copolímeros entre el metil vinil éter y anhídrido maleico (comercializado como Gantrez® de International Specialty Products ISP, EE. UU.).

50 La asociación o el recubrimiento de nanopartículas con compuestos hidrófilos adecuados puede cambiar sus características fisicoquímicas y, por tanto, modificar su distribución e interacción con el medio biológico, promoviendo la llegada del fármaco encapsulado a su sitio ideal para la acción o absorción. Una posible estrategia es el uso de nanopartículas decoradas con polietilenglicol (PEG), denominadas nanopartículas pegiladas.

Con respecto a su uso en administración oral, la asociación de polietilenglicoles con nanopartículas convencionales minimiza las interacciones de estos portadores con componentes de la luz. Este hecho está relacionado con la capacidad de los PEG para producir una corona hidrófila alrededor de las nanopartículas y ofrecer una superficie resbaladiza que impide la interacción de las proteínas (Gref *et al.*, Science 1994; 263: 1600-1603) y facilita el paso a

través de la capa mucosa protectora de la mucosa intestinal.

El principal inconveniente de esta estrategia es la estabilidad de la asociación de polietilenglicoles con la superficie de las nanopartículas (Peracchia *et al.*, Life Sci 1997; 6: 749-761). Se sabe que la capacidad del polietilenglicol para rechazar proteínas depende de la configuración, carga, longitud y flexibilidad de las cadenas de polímero (Torchillin, J Microencapsul 1998; 15: 1-19). El proceso para modificar la superficie de las nanopartículas se realiza principalmente por adsorción física (Stolnik *et al.*, Adv Drug Del Rev 1995; 16: 195-214) o por unión covalente en forma de dibloques o tribloques (De Jaeghere *et al.*, J Drug Target 2000; 8: 143-153). Dado que es preferible la unión covalente, la mayoría de las nanopartículas pegiladas se han preparado utilizando copolímeros de polietilenglicol con ácido láctico o glicólico. Sin embargo, este proceso de copolimerización requiere el uso de varios catalizadores y condiciones químicas específicas (Beletsi *et al.*, Int. J. Pharm 1999; 182: 187-197). Además, los residuos de disolventes orgánicos tóxicos usados en la síntesis orgánica (cloruro de metileno, tolueno, etc.) pueden ser problemáticos.

También se ha logrado la modificación de las nanopartículas de superficie de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA) con polietilenglicoles. La patente WO2005/104648 describe dos procesos diferentes para obtener nanopartículas pegiladas: (i) incubación simultánea del polímero PVM/MA y el polietilenglicol en un disolvente orgánico, antes de desolvatar el polímero y (ii) incubación de las nanopartículas de polímero biodegradable con una disolución acuosa de polietilenglicol. Ambos procesos son válidos para preparar nanopartículas de PVM/MA con polietilenglicol asociado a su superficie, sin embargo, el principal inconveniente de la adsorción simple es la rápida pérdida de la capa de recubrimiento *in vivo* (Neal *et al.*, J Pharm Sci 1998; 87: 242-1248) debido a la inestabilidad de la interacción.

El documento WO2005/104648 también da a conocer nanopartículas pegiladas de PVM/MA que tienen características superiores de adhesión intestinal en comparación con nanopartículas de PVM/MA que carecen de polietilenglicol. Estas nanopartículas han demostrado una gran versatilidad para encapsular moléculas biológicamente activas. Por ejemplo, el documento WO2009/121997 describe que la modificación y el recubrimiento de las nanopartículas de PVM/MA con un polietilenglicol permite obtener nanopartículas pegiladas capaces de encapsular cantidades considerables de fármacos de síntesis química. Sin embargo, la estabilidad del recubrimiento es baja y la capa de recubrimiento puede perderse con el tiempo.

Aunque los sistemas de administración de fármacos bioadhesivos pueden proporcionar un tiempo de tránsito gastrointestinal potenciado a través de la adhesión a la superficie de la mucosa gastrointestinal, una buena adhesión y un tránsito retardado no siempre se traducen en una biodisponibilidad mejorada (Davis SS. Drug Discovery Today 2005; 10 (4): 249-257). Si el fármaco no se disuelve fácilmente o no puede penetrar en la membrana epitelial debido a los mecanismos de flujo de salida, el tiempo en el sitio de absorción puede ser insuficiente. El documento WO2008/129106 da a conocer nanopartículas alternativas para la administración de fármacos que comprenden PVM/MA y una ciclodextrina que puede aumentar, cuando se administra por vía oral, la biodisponibilidad de los fármacos que son sustrato de la P-glicoproteína.

No obstante, todavía hay necesidad de mejorar la biodisponibilidad de algunos fármacos después de la administración oral. Por tanto, todavía se requiere mucho esfuerzo para desarrollar nuevos sistemas de administración de fármacos (por ejemplo, sintetizar nuevos polímeros y copolímeros) para igualar las propiedades hidrófilas/hidrófobas de varios fármacos junto con buenas propiedades fisicoquímicas (degradabilidad, estabilidad y fuerza mecánica) y características farmacéuticas mejoradas (distribución, bioadhesión y velocidad de liberación) de nanopartículas hechas de esos nuevos polímeros. Esto permitiría una mayor eficacia de absorción de los fármacos, permitiendo tratamientos alternativos a la perfusión hospitalaria, lo que permitiría reducir el coste de atención médica de los tratamientos con este tipo de fármacos y mejorar la calidad de vida del paciente.

Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es desarrollar nuevos sistemas de administración de fármacos que son estables dentro del tracto GI, pueden encapsular cantidades considerables de compuestos biológicamente activos (por ejemplo, fármacos o principios activos, particularmente fármacos hidrófobos) y aumentar la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral, es decir, proporcionar nuevos conjugados de polímero y nanopartículas hechas de los mismos que solucionan los inconvenientes anteriormente mencionados.

El trabajo que condujo a esta invención ha recibido financiación del Séptimo Programa Marco de la Unión Europea (7PM/2007-2013) en virtud del acuerdo de subvención n.º NMP4-LA-2011-280761.

Se ha observado que pueden sintetizarse nuevos conjugados de polímeros de éster de PVM/MA con un polietilenglicol o un derivado de polietilenglicol que contiene un grupo reactivo del hidroxilo-terminal mediante una reacción simple, y los resultados son adecuados para producir fácilmente nanopartículas con buenas características para la administración de compuestos biológicamente activos. Se ha encontrado especialmente que las nanopartículas formadas por estos nuevos conjugados de polímeros de éster de PVM/MA con un polietilenglicol o un derivado del mismo que contiene un grupo reactivo del hidroxilo-terminal son capaces de i) encapsular cantidades considerables de compuestos biológicamente activos (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel y camptotecina), y ii) cruzar

la capa de moco e interaccionar de manera íntima con la superficie de los enterocitos (mejorando la absorción del fármaco).

5 Sorprendentemente, las nanopartículas proporcionadas por esta invención permiten una biodisponibilidad aumentada de dichos compuestos biológicamente activos a través de la mucosa intestinal, obteniendo niveles plasmáticos prolongados y sostenidos de los mismos durante períodos de tiempo muy largos (por ejemplo, al menos 72 horas en el caso de docetaxel), lo que permite una administración alternativa a la perfusión hospitalaria, lo que permite una reducción del coste sanitario de los tratamientos con este tipo de fármaco y una mejora en la calidad de vida del paciente.

10 Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con una molécula terminada en hidroxilo, en el que dicha molécula terminada en hidroxilo se selecciona de entre un polietilenglicol y un derivado del mismo que contiene un grupo reactivo hidroxilo-terminal.

15 En una variante particular de la invención, la molécula terminada en hidroxilo es un polietilenglicol que no está ramificado y no tiene grupos hidroxilo sustituidos. En esta variante de la invención, los polietilenglicoles usados tienen preferiblemente un peso molecular comprendido en el intervalo de desde 400 hasta 35.000 Da; en una realización más particular el polietilenglicol se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol 1.000 (PEG1), polietilenglicol 2.000 (PEG2), polietilenglicol 6.000 (PEG6) y polietilenglicol 10.000 (PEG10).

20 En otra variante particular de la invención el polietilenglicol tiene un grupo hidroxilo sustituido. En esta variante de la invención, la molécula terminada en hidroxilo es por tanto un derivado de polietilenglicol que contiene un grupo reactivo hidroxilo-terminal, preferiblemente es un alquil éter de polioxietileno. En una realización más particular, el alquil éter de polioxietileno es un metil éter de polietilenglicol (mPEG), y puede seleccionarse del grupo que consiste en metoxi-polietilenglicol 1.000 (mPEG1), metoxi-polietilenglicol 2.000 (mPEG2), metoxi-polietilenglicol 6.000 (mPEG6) y metoxi-polietilenglicol 10.000 (mPEG10).

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con una molécula terminada en hidroxilo, en el que dicha molécula terminada en hidroxilo se selecciona de entre un polietilenglicol y un derivado del mismo que contiene un grupo reactivo hidroxilo-terminal, que comprende las etapas de:

- a) hacer reaccionar el PVM/MA con la molécula terminada en hidroxilo de la invención en un disolvente orgánico, y
- b) eliminar el disolvente orgánico.

30 Dicho procedimiento de la invención es simple y puede aplicarse a escala industrial. En una variante preferida de la invención, dicho procedimiento comprende una etapa adicional c) de purificar el conjugado de polímero de éster.

En una realización particular, la razón en peso entre el PVM/MA y la molécula terminada en hidroxilo en la disolución de la etapa a) es de 1:0,01-0,25, preferiblemente 1:0,015-0,2, más preferiblemente 1:0,05-0,125.

En otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado de polímero de éster obtenido mediante dicho procedimiento de la invención.

35 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un conjugado de polímero de éster de la invención u obtenido mediante un procedimiento de la invención, en la preparación de nanopartículas poliméricas para la administración de fármacos; preferiblemente administración oral de fármacos.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende i) un conjugado de polímero de éster de la invención o un conjugado de polímero de éster obtenido mediante un procedimiento de la invención, y ii) un portador; y a dicha composición de la invención para su uso en la administración de fármacos; preferiblemente administración oral de fármacos.

45 En aún otro aspecto, la invención se refiere a una nanopartícula que comprende i) una matriz de un conjugado de polímero de éster según la invención, o un conjugado de polímero de éster obtenido mediante el procedimiento de la invención, y ii) un compuesto biológicamente activo. En una realización particular, el compuesto biológicamente activo es un agente antitumoral. En una realización más particular, el agente antitumoral se selecciona del grupo que consiste en docetaxel, camptotecina y paclitaxel; preferiblemente el agente antitumoral es docetaxel.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para producir una nanopartícula según la invención que comprende las etapas de:

- 50 a) mezclar un conjugado de polímero de éster de la invención con el compuesto biológicamente activo en un medio orgánico, y
- b) desolvatar el conjugado de polímero de éster por medio de la adición de alcohol y agua en presencia de un metal divalente.

Preferiblemente, la etapa a) se realiza por medio del mezclado de (i) una disolución orgánica que contiene el conjugado de polímero de éster de la invención con (ii) una disolución orgánica o dispersión del compuesto biológicamente activo.

5 Preferiblemente, la etapa b) se realiza por medio de la adición de una mezcla hidroalcohólica que comprende un metal divalente a la mezcla obtenida en la etapa a).

En una realización particular el metal divalente se selecciona del grupo que consiste en calcio, magnesio, zinc, hierro en forma divalente, y combinaciones de los mismos; preferiblemente el metal divalente es calcio.

10 En una realización particular adicional, la razón en peso entre el conjugado de polímero de éster de la invención y el compuesto biológicamente activo en la mezcla de la etapa a) es de 1:0,01-0,20, preferiblemente 1:0,02-0,15, más preferiblemente 1:0,03-0,10.

15 En una variante de la invención, dicho procedimiento para producir una nanopartícula según la invención comprende una etapa adicional c) de eliminar el medio orgánico, y/o opcionalmente purificar; por ejemplo puede hacerse mediante técnicas de filtración o centrifugación hasta que se obtiene un sedimento. Asimismo, si se desea, dicho procedimiento para producir una nanopartícula según la invención puede comprender además una etapa adicional d) de secar las nanopartículas formadas, opcionalmente en presencia de un agente protector. En una realización particular de la invención, esta etapa adicional d) se realiza por medio de secado por pulverización o secado por congelación.

Relacionado con esto, en otro aspecto la invención se refiere a una nanopartícula obtenida mediante dicho procedimiento de la invención.

20 En otro aspecto, la invención se refiere a una nanopartícula según la invención o una nanopartícula obtenida mediante un procedimiento de la invención para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una nanopartícula según la invención o al uso de la nanopartícula obtenida mediante un procedimiento de la invención en la fabricación de una composición farmacéutica.

25 En aún otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende i) al menos una nanopartícula según la invención, o al menos una nanopartícula obtenida mediante un procedimiento de la invención, y ii) un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular de la invención, dicho portador o vehículo comprende un excipiente farmacéutico, aceptable para la administración del mismo por vía oral.

En otro aspecto, la invención se refiere a dicha composición farmacéutica de la invención para su uso en medicina.

30 En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende un agente antitumoral. Por tanto, en otro aspecto la invención se refiere a dicha composición farmacéutica de la invención que comprende un agente antitumoral para su uso en un método de prevención o tratamiento de cáncer; o alternativamente, la invención también se refiere al uso de una composición farmacéutica de la invención que comprende un agente antitumoral en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de cáncer.

35 En una realización más particular la composición farmacéutica se selecciona del grupo que consiste en:

una composición farmacéutica que comprende:

a) un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con polietilenglicol 2.000 desde el 38% hasta el 47%,

b) docetaxel desde el 3% hasta el 5%,

c) calcio desde el 0,1% hasta el 0,2%, y

40 d) un sacárido desde el 15% hasta el 40%,

en la que todas las proporciones son en peso con respecto al peso total de la composición;

una composición farmacéutica que comprende:

a) un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con metoxi-polietilenglicol 2.000 desde el 38% hasta el 47%,

b) docetaxel desde el 3% hasta el 5%,

45 c) calcio desde el 0,1% hasta el 0,2%, y

d) un sacárido desde el 15% hasta el 40%,

en la que todas las proporciones son en peso con respecto al peso total de la composición; y

una composición farmacéutica que comprende:

- a) un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con metoxi-polietilenglicol 2.000 desde el 30% hasta el 40%,
- b) camptotecina desde el 0,08% hasta el 1,5%,
- c) calcio desde el 0,10% hasta el 0,20%, y
- 5 d) un sacárido desde el 15% hasta el 40%,

en la que todas las proporciones son en peso con respecto al peso total de la composición.

Breve descripción de las figuras

FIGURA 1. Espectros infrarrojos del PVM/MA y conjugados de polímeros de éster del PVM/MA con polietilenglicol 2.000 (PVM/MA-PEG2), polietilenglicol 6.000 (PVM/MA-PEG6), polietilenglicol 10.000 (PVM/MA-PEG10) y metoxi-polietilenglicol 2.000 (PVM/MA-mPEG2).

FIGURA 2. Espectros de ¹H-RMN de A) PVM/MA; y de conjugados de polímeros de éster de PVM/MA con B) polietilenglicol 2.000 (PVM/MA-PEG2), C) polietilenglicol 6.000 (PVM/MA-PEG6), D) polietilenglicol 10.000 (PVM/MA-PEG10) y E) metoxi-polietilenglicol 2.000 (PVM/MA-mPEG2).

FIGURA 3. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de formulaciones de nanopartículas de poli(anhídrido). A) PEG2-CPT trad (nanopartículas de PVM/MA tradicionales pegiladas con PEG2 que encapsulan camptotecina); B) PEG6-CPT trad (nanopartículas de PVM/MA tradicionales pegiladas con PEG6 que encapsulan camptotecina); C) mPEG2-CPT conj (nanopartículas de conjugado de polímero de éster de PVM/MA con mPEG2 que encapsulan camptotecina).

FIGURA 4. Perfil de liberación de docetaxel a partir de las formulaciones de nanopartículas de DTX (nanopartículas de PVM/MA convencionales que encapsulan docetaxel), PEG2-DTX trad (nanopartículas de PVM/MA tradicionales pegiladas con PEG2 que encapsulan docetaxel), mPEG2-DTX conj (nanopartículas de conjugado de polímero de éster de PVM/MA con mPEG2 que encapsulan docetaxel) y PEG2-DTX conj (nanopartículas de conjugado de polímero de éster de PVM/MA con PEG2 que encapsulan docetaxel) tras incubación en fluido gástrico simulado (0-2 h) y fluido intestinal simulado (2-12 h) a 37°C. Los datos se representan como media ± D.E. (n=3).

FIGURA 5. Perfil de concentración de docetaxel en plasma-tiempo tras la administración intravenosa (i.v.) de una dosis de 30 mg/kg de Taxotere[®]. Los datos se expresan como media ± D.E., (n=3 por punto de tiempo).

FIGURA 6. Perfil de concentración de docetaxel en plasma-tiempo tras la administración de una única dosis oral de 30 mg/kg. Los animales recibieron formulaciones de Taxotere[®] oral, nanopartículas de DTX (nanopartículas de PVM/MA convencionales que encapsulan docetaxel), PEG2-DTX trad (nanopartículas de PVM/MA tradicionales pegiladas con PEG2 que encapsulan docetaxel), mPEG2-DTX conj (nanopartículas de conjugado de polímero de éster de PVM/MA con mPEG2 que encapsulan docetaxel) y PEG2-DTX conj (nanopartículas de conjugado de polímero de éster de PVM/MA con PEG2 que encapsulan docetaxel). A) En el plazo de las primeras 8 h y B) durante 72 h. Los datos se expresan como media ± D.E. (n=5).

FIGURA 7. Perfil de liberación de camptotecina a partir de formulaciones de PEG2-CPT trad (nanopartículas de PVM/MA tradicionales pegiladas con PEG2 que encapsulan camptotecina), PEG6-CPT trad (nanopartículas de PVM/MA tradicionales pegiladas con PEG6 que encapsulan camptotecina) y mPEG2-CPT conj (nanopartículas de conjugado de polímero de éster de PVM/MA con mPEG2 que encapsulan camptotecina), tras incubación en fluido gástrico simulado (0-2 h) y fluido intestinal simulado (2-14 h) en condiciones de sumidero, 37°C, 60 rpm. Los datos se expresan como media ± D.E., (n=3).

FIGURA 8. Perfil de concentración de camptotecina en plasma-tiempo tras la administración intravenosa (i.v.) de una dosis de 1 mg/kg de suspensión. Los datos se expresan como media ± D.E., (n=3 por punto de tiempo).

FIGURA 9. Perfil de concentración en plasma-tiempo de camptotecina en ratas Wistar macho tras una única dosis (1 mg/kg) de una suspensión oral, formulaciones de PEG2-CTP trad (nanopartículas de PVM/MA tradicionales pegiladas con PEG2 que encapsulan camptotecina) y mPEG2-CPT conj (nanopartículas de conjugado de polímero de éster de PVM/MA con mPEG2 que encapsulan camptotecina). Los datos se expresan como media ± D.E. (n=6).

FIGURA 10. Visualización por microscopía de fluorescencia de nanopartículas marcadas fluorescentemente con rojo Lumogen, en secciones longitudinales del íleon proximal de ratas, dos horas tras su administración oral como una única dosis. (A, B) Nanopartículas de PVM/MA convencionales que encapsulan rojo Lumogen[®]; (C, D) nanopartículas que comprenden una matriz de un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con mPEG2 que encapsulan rojo Lumogen[®] (mPEG2-LUM conj).

Descripción detallada de la invención

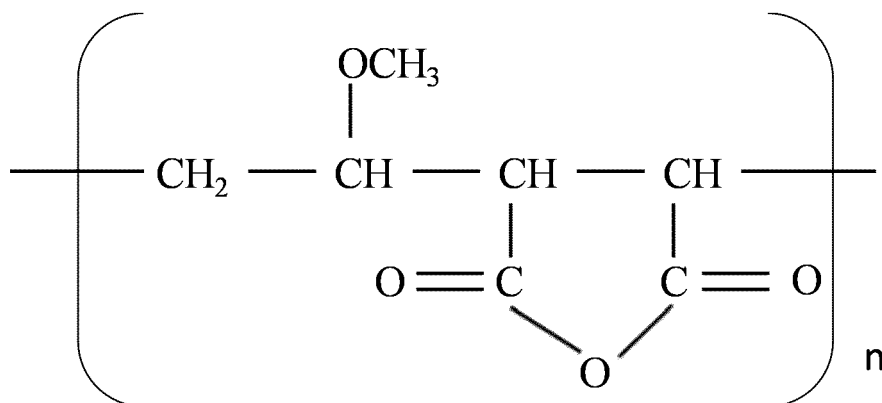
La presente invención proporciona nuevos sistemas de administración de fármacos (nuevos conjugados de polímeros y nanopartículas hechas de los mismos) que pueden encapsular cantidades considerables de compuestos biológicamente activos, son estables dentro del tracto GI y aumentan la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral.

- 5 Se ha encontrado sorprendentemente que pueden sintetizarse nuevos conjugados de polímeros de éster de PVM/MA con un polietilenglicol (o derivado del mismo que contiene un grupo reactivo hidroxilo-terminal) mediante una reacción simple, y los resultados son adecuados para producir fácilmente nanopartículas con características mejoradas para la administración de compuestos biológicamente activos. Se ha encontrado especialmente que las nanopartículas formadas por estos nuevos conjugados de polímeros de éster de PVM/MA con un polietilenglicol (o derivado del mismo que contiene un grupo reactivo hidroxilo-terminal) son capaces de encapsular cantidades considerables de compuestos biológicamente activos y aumentar su biodisponibilidad oral.

Definiciones

Con el propósito de facilitar la comprensión de la presente invención, el significado de algunos términos y expresiones tal como se usan en el contexto de la invención se expone a continuación.

- 15 Tal como se usa en el presente documento, "poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico)" (PVM/MA) se refiere al copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico (comercializado por International Specialty Products, ISP, bajo la marca comercial Gantrez[®] AN). Por tanto, las expresiones, "PVM/MA", poli(anhídrido) o Gantrez[®] AN son sinónimos y se usan indistintamente en esta descripción. El copolímero Gantrez[®] AN contiene unidades alternas de metil vinil éter y anhídrido maleico, que tienen la fórmula:



- 20 El carácter fundamental de esta polimerización requiere que una unidad de anhídrido maleico debe estar adyacente a una unidad de metil vinil éter y viceversa, dando como resultado un verdadero copolímero alternante. Los grupos anhídrido en la estructura de Gantrez[®] AN permiten la interacción química de este polímero con moléculas que contienen hidroxilo a través de un mecanismo de reacción de sustitución nucleófila.

- 25 El copolímero Gantrez[®] AN se suministra como un polvo blanco insoluble en agua y se emplea ampliamente para fines farmacéuticos y médicos, como adhesivos para prótesis dentales, agentes espesantes y de suspensión y como adyuvantes para la preparación de parches transdérmicos. La toxicidad oral de este copolímero es bastante baja (la DL₅₀ en cobayas es de aproximadamente 8-9 g/kg), por lo que también se ha usado como material para la preparación de portadores nanoparticulados. En una realización particular de la invención, el copolímero de PVM/MA tiene un peso molecular comprendido en el intervalo de desde 80 hasta 2.500 kDa, preferiblemente desde 85 hasta 2.000 kDa, más preferiblemente desde 90 hasta 220 kDa.

- 35 Tal como se usa en el presente documento, "éster" se refiere a un éster (como de un PVM/MA) que contiene al menos un grupo éster (es decir, al menos una unidad de anhídrido de PVM/MA se esterifica con una molécula terminada en hidroxilo). Según la presente invención, al menos una unidad de anhídrido de PVM/MA se esterifica con una molécula terminada en hidroxilo seleccionada de entre un polietilenglicol y un derivado de polietilenglicol que contiene un grupo reactivo terminado en hidroxilo. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de ésteres de PVM/MA son aquellos en los que el grado de sustitución es de al menos el 5%, el 10%, el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90% o el 95%.

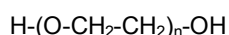
- 40 Tal como se usa en el presente documento, el "grado de esterificación" (DE) o el "grado de sustitución" (DS) del conjugado de polímero de éster de la invención se define como el porcentaje de unidades de anhídrido que están esterificadas con una molécula terminada en hidroxilo según la presente invención, es decir, el porcentaje de enlaces éster que se forman. En una realización particular, el grado de esterificación puede medirse mediante procesos convencionales conocidos por el experto en la técnica, y que se describen, a modo de ilustración, en la parte experimental adjunta a los ejemplos descritos más adelante.

Tal como se usa en el presente documento, una “molécula terminada en hidroxilo” es una molécula con al menos un grupo hidroxilo primario (-OH). Según la presente invención, dicha molécula terminada en hidroxilo se selecciona de entre un polietilenglicol y un derivado de polietilenglicol que contiene un grupo reactivo hidroxilo-terminal, tal como se define a continuación.

- 5 En la presente descripción, se entiende que el término “polietilenglicol” (PEG) es cualquier polímero hidrófilo soluble en agua que contiene grupos éter unidos por 2 átomos de carbono, opcionalmente grupos etileno ramificados. Por tanto, esta definición incluye polietilenglicoles ramificados o no ramificados.

PEG también se conoce como poli(óxido de etileno) (PEO) o polioxietileno (POE) (los tres nombres son químicamente sinónimos y se refieren a un oligómero o polímero de óxido de etileno). El término también incluye derivados de uno de los grupos hidroxilo terminales, que pueden modificarse (uno de los dos extremos). Por tanto, según la presente invención, pueden usarse derivados de polietilenglicol que mantienen un grupo hidroxilo primario (-OH).

Los polietilenglicoles son polímeros solubles en agua que han sido aprobados (FDA) para la administración oral, parenteral y tópica de fármacos. Los polietilenglicoles se producen por medio de polimerización de óxido de etileno (OE) en presencia de agua, monoetilenglicol o dietilenglicol como iniciadores de la reacción en un medio alcalino (“1,2-Epóxidos de polímeros: polímeros de óxido de etileno y copolímeros” en Encyclopedia of Polymer Science and Engineering; Mark, H.F. (Ed.), John Wiley and Sons Inc., 1986, págs. 225-273). Cuando se alcanza el peso molecular deseado (generalmente controlado por medio de mediciones de viscosidad en proceso), la reacción de polimerización finaliza al neutralizar el catalizador con un ácido (ácido láctico, ácido acético o similar). El resultado es un polímero lineal que tiene una estructura muy simple:



en donde (n) es el número de monómeros o unidades de EO. Este término polietilenglicol se usa normalmente para indicar la influencia significativa de los grupos terminales hidroxilo sobre las propiedades fisicoquímicas de estas moléculas. El término PEG se usa normalmente en combinación con un valor numérico. En la industria farmacéutica, el número indica el peso molecular medio, mientras que en la industria cosmética el número que acompaña a las letras PEG se refiere a las unidades de EO polimerizadas que forman la molécula (Handbook of Pharmaceutical Excipients, Rowe R.C., Sheskey P. J., Weller P.J. (Eds.), 4ª edición, Pharmaceutical Press y American Pharmaceutical Association, Londres, Reino Unido, 2003). Los PEG están incluidos en diversas farmacopeas, aunque la nomenclatura difiere (International Harmonisation: Polyethylene glycol (PEG): Pharmeuropa 1999, 11, 612-614). Según el Handbook of Pharmaceutical Excipients (cuarta edición), 2003, editado por R.C. Rowe, P.J. Sheskey y P.J. Weller publicado por Pharmaceutical Press (Londres, Reino Unido) y la American Pharmaceutical Association (Washington, EE. UU.), los polioxietilenglicoles también se denominan polietilenglicoles, macrogoles o PEG. Las farmacopeas británica y europea usan polietilenglicoles y macrogoles, mientras que la farmacopea de los Estados Unidos (USP) usa polietilenglicoles.

35 En una variante de la invención, los polietilenglicoles usados tienen preferiblemente un peso molecular comprendido en el intervalo de desde 400 hasta 35.000 Da. En una variante preferida de la invención, el polietilenglicol usado tiene un peso molecular igual a o mayor de 400, más preferiblemente igual a o mayor de 1.000; se prefieren especialmente valores comprendidos entre 1.000 y 20.000, más preferiblemente entre 2.000 y 10.000 Da. Los ejemplos no limitativos ilustrativos de PEG que pueden usarse en la presente invención incluyen polietilenglicol 1.000, polietilenglicol 2.000, polietilenglicol 6.000 o polietilenglicol 10.000 (PEG1, PEG2, PEG6 o PEG10 respectivamente).

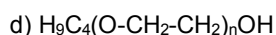
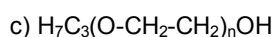
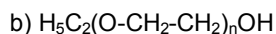
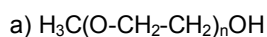
Los PEG con un peso molecular menor de 400 son líquidos no volátiles a temperatura ambiente. PEG 600 muestra un punto de fusión comprendido entre 17 y 22°C, mientras que los PEG con pesos moleculares medios comprendidos entre 800 y 2.000 son materiales pastosos con bajos puntos de fusión. Por encima de un peso molecular de 3.000 Da, los PEG son sólidos y hasta PEG 35.000 están disponibles comercialmente. Por otro lado, aunque el punto de fusión de los PEG aumenta cuando aumenta el peso molecular, el punto de ebullición aumenta hasta un valor máximo de 60°C. Asimismo, cuando aumenta el peso molecular, disminuye su solubilidad acuosa. En cualquier caso, para PEG 35.000 puede disolverse en agua una cantidad cercana al 50% p/v.

Desde un punto de vista toxicológico, los PEG se consideran más bien no tóxicos y no inmunogénicos (Hermansky S.J *et al.*, Food Chem Toxic., 1995, 33, 139-140; Final Report on the Safety Assessment of PEGs: J.A. C. T., 1993, 12, 429-457; Polyethylene glycol, 21 CFR 172.820, FDA). La ingesta diaria máxima definida por la OMS es de 10 mg/kg (Polietilenglicoles; Vigésimo tercer informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios; Organización Mundial de la Salud, Ginebra; Serie de Informes Técnicos 1980, 648, 17-18).

Los derivados de polietilenglicol tienen características ventajosas que son similares a los PEG tradicionales, como su solubilidad acuosa, inactividad fisiológica, baja toxicidad y estabilidad en condiciones muy diferentes. Estos derivados incluyen productos muy diferentes y se caracterizan por el grupo funcional que sustituye al hidroxilo primario. Según la presente invención, pueden usarse derivados de polietilenglicol que contienen un grupo reactivo hidroxilo-terminal.

En una realización particular, dicho derivado de polietilenglicol que contiene un grupo reactivo hidroxilo-terminal es un alquil éter polioxi-etileno. Los compuestos de alquil éteres de polioxi-etileno tienen la fórmula general $H_{(2m+1)}C_m(O-CH_2-CH_2)_nOH$. Se denominarán C_mE_n indicando m el número de carbonos en la cadena de alquilo y siendo n el número de unidades de óxido de etileno en el resto hidrófilo. Ejemplos ilustrativos, no limitativos son: metil éteres de polietilenglicol, también conocidos como metoxi-polietilenglicoles (mPEG); etil éteres de polietilenglicol; propil éteres de polietilenglicol; y butil éteres de polietilenglicol.

Las estructuras químicas de algunos alquil éteres de polioxi-etileno correspondientes a los grupos mencionados anteriormente se indican a continuación de manera ilustrativa:



Los ejemplos no limitativos de los alquil éteres de polioxi-etileno que pueden usarse en la presente invención incluyen el metil éter de polietilenglicol 1.000 o metoxi-polietilenglicol 1.000 (mPEG1); el metil éter de polietilenglicol 2.000 o metoxi-polietilenglicol 2.000 (mPEG2); el metil éter de polietilenglicol 6.000 o metoxi-polietilenglicol 6.000 (mPEG6); el metil éter de polietilenglicol 10.000 o metoxi-polietilenglicol 10.000 (mPEG10).

También pueden señalarse los siguientes entre los derivados de polietilenglicoles que contienen un grupo reactivo hidroxilo-terminal que pueden usarse en la presente invención:

- Metacrilato de poli(etilenglicol)

- Acrilato de poli(etilenglicol)

- Monolaurato de poli(etilenglicol)

- Monooleato de poli(etilenglicol)

- Tridecil éter de poli(etilenglicol) (12)

- Tetrahidrofurfuril éter de poli(etilenglicol)

La elección de los polietilenglicoles y derivados permite modular las características del sistema generado y el uso de mezclas de los mismos añade un factor de variabilidad más. Desde el punto de vista práctico, es importante adaptar y seleccionar el sistema más adecuado para cada molécula activa y para cada vía de administración.

Tal como se usa en el presente documento, el "peso molecular" se define como la masa molar promedio de una molécula. A diferencia de las moléculas pequeñas, el peso molecular de un polímero no es un valor único. Más bien, un polímero dado tendrá una distribución de pesos moleculares dependiendo, por ejemplo, de la forma en que se produce el polímero. Por tanto, como se usa en el presente documento, el término peso molecular para polímeros se refiere a la distribución del peso molecular, o del peso molecular promedio. Sin embargo, hay muchas formas de calcular el peso molecular promedio. Según la presente invención, el peso molecular promedio de los polímeros de éster preformados de la invención se determina por 1H -RMN, y el peso molecular promedio de PVM/MA comercial se determina mediante SEC-MALLS, tal como se describe, a modo de ilustración, en la parte experimental adjunta a los ejemplos descritos más adelante.

Tal como se usa en el presente documento, "nanopartícula" se refiere a sistemas coloidales de tipo esférico o de forma similar (nanocápsula o nanoesfera) con un tamaño inferior a 1 micrómetro (μm), preferiblemente en el intervalo de desde 10 hasta 900 nanómetros (nm).

Tal como se usa en el presente documento, el término "compuesto biológicamente activo" (BAC) se refiere a cualquier molécula pequeña (por ejemplo, un fármaco o principio activo de un medicamento) o un derivado de la misma que se administra a un sujeto, preferiblemente un ser humano, con fines profilácticos o terapéuticos; es decir, cualquier sustancia o compuesto químico con un peso molecular por debajo de 900 Daltons que pueda usarse en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de una enfermedad o para mejorar el bienestar físico y mental de seres humanos y animales. Tal como se usa en el presente documento, el término "derivado", aplicado a un compuesto biológicamente activo, incluye profármacos y análogos de dicho compuesto biológicamente activo.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "agente antitumoral", "agente anticancerígeno" o "agente antineoplásico" (utilizados indistintamente en esta descripción), generalmente se refieren a sustancias que inhiben o suprimen el crecimiento y la proliferación de células cancerosas. Los agentes antitumorales también pueden incluir compuestos que destruyen las células cancerosas o interfieren con la división celular, compuestos que bloquean determinadas hormonas implicadas en el cáncer, compuestos que inhiben o impiden el crecimiento de nuevos vasos

sanguíneos (por ejemplo, inhibidores de la angiogénesis), agentes que dañan el ADN (por ejemplo, agentes alquilantes, tales como cisplatino, carboplatino y oxaloplatino; antimetabolitos; e inhibidores de la topoisomerasa), y compuestos con propiedades anticancerígenas (por ejemplo, taxanos, alcaloides de la vinca y alcaloides vegetales). El término "agente antitumoral" también incluye radioterapia. Un agente antitumoral también puede incluir un agente específico para proteínas desreguladas de células cancerosas, tal como un inhibidor de tirosina cinasas receptoras.

Tal como se usa en el presente documento, un "metal divalente" incluye cualquier elemento metálico cuya valencia es 2, por ejemplo, un metal alcalinotérreo, por ejemplo, calcio, magnesio, zinc, etc., o, si tiene varias valencias, una de ellas es 2, por ejemplo, hierro, etc., con la condición de que sea farmacéuticamente aceptable.

Tal como se usa en el presente documento, "tamaño medio" se refiere al diámetro promedio de la población de nanopartículas que se mueven juntas en un medio acuoso. El tamaño medio de estos sistemas puede medirse mediante procesos convencionales conocidos por el experto en la técnica, y que se describen, a modo de ilustración, en la parte experimental adjunta a los ejemplos descritos a continuación. El tamaño medio de las partículas puede verse afectado principalmente por la cantidad y el peso molecular del PVM/MA, por la naturaleza y la cantidad de la molécula terminada en hidroxilo de la invención, por la naturaleza y la cantidad de la molécula biológicamente activa presente en las nanopartículas de la invención (en general, cuanto mayor sea la cantidad o el peso molecular de dichos componentes, mayor será el tamaño promedio de la nanopartícula) y por algunos parámetros del proceso para la producción de dichas nanopartículas. Las nanopartículas de la invención se caracterizan por tener un tamaño de partícula medio inferior a 1 μm , normalmente comprendido en el intervalo de desde 1 hasta 999 nm, preferiblemente desde 10 hasta 900 nm, más preferiblemente desde 100 hasta 500 nm, todavía más preferiblemente desde 150 hasta 400 nm. En una realización particular, las nanopartículas de la invención tienen un tamaño de partícula medio de aproximadamente 250 nm aproximadamente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa que un compuesto o combinación de compuestos es suficientemente compatible con los otros componentes de una formulación y no es perjudicial para el sujeto hasta los niveles aceptables para los estándares de la industria.

Tal como se usa en el presente documento, el término "portador" se refiere a un diluyente con el que se administra el principio activo o el fármaco. Se conocen ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables en el estado de la técnica e incluyen disoluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin, 1995. Preferiblemente, los portadores de la invención están aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerados en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "prevenir" se refiere a evitar que ocurra, exista o, como alternativa, retrasar la aparición o reaparición de una enfermedad, trastorno o estado al que se aplica tal término, o de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o estado. El término "prevención" se refiere al acto de prevenir, tal como se definió "prevenir" de manera inmediatamente anterior.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere a revertir, aliviar o inhibir el progreso del trastorno o estado al que se aplica tal término, o uno o más síntomas de tales trastornos o estado. El término "tratamiento" se refiere al acto de tratar, tal como se definió "tratar" de manera inmediatamente anterior.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" significa animales, en particular mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, gansos y seres humanos. Los sujetos particularmente preferidos son seres humanos de ambos sexos.

Conjugados de polímeros de éster de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico)

La presente invención proporciona nuevos conjugados de polímeros de éster de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) (PVM/MA) con moléculas terminadas en hidroxilo. Los términos "éster", "poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico)" y "molécula terminada en hidroxilo", tal como se usan en este documento, se han definido previamente y se incorporan en el presente documento como referencia. Por tanto, según la presente invención, al menos una unidad de anhídrido de polímero de PVM/MA se esterifica con una molécula terminada en hidroxilo seleccionada de entre: un polietilenglicol y un derivado de polietilenglicol que contiene un grupo reactivo terminado en hidroxilo, a continuación en el presente documento "molécula terminada en hidroxilo de la invención".

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con una molécula terminada en hidroxilo, en el que dicha molécula terminada en hidroxilo se selecciona de entre un polietilenglicol y un derivado del mismo que contiene un grupo reactivo terminado en hidroxilo, a continuación en el presente documento, "conjugado de polímero de éster de la invención".

En una realización particular, al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el

90% o al menos el 95% de las unidades de anhídrido del polímero de PVM/MA se esterifican con la molécula terminada en hidroxilo de la invención. Por ejemplo, un grado de esterificación de al menos el 5% proporciona buenos resultados.

5 En una variante de la invención, la molécula terminada en hidroxilo es un polietilenglicol que no está ramificado y no tiene grupos hidroxilo sustituidos. En esta variante de la invención, los polietilenglicoles usados tienen preferiblemente un peso molecular comprendido en el intervalo de desde 400 hasta 35.000 Da. En una variante preferida de la invención, el polietilenglicol usado tiene un peso molecular igual a o mayor de 400, más preferiblemente igual a o mayor de 1.000; se prefieren especialmente valores comprendidos en el intervalo de desde 1.000 hasta 20.000, más preferiblemente desde 2.000 hasta 10.000 Da. En una variante más preferida de la invención, la molécula terminada en hidroxilo es un polietilenglicol seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol 1.000 (PEG1), polietilenglicol 2.000 (PEG2), polietilenglicol 6.000 (PEG6) y polietilenglicol 10.000 (PEG10).

15 En otra variante, la molécula terminada en hidroxilo de la invención es un polietilenglicol con un grupo hidroxilo sustituido. En esta variante de la invención, la molécula terminada en hidroxilo es, por tanto, un derivado de polietilenglicol que contiene un grupo reactivo terminado en hidroxilo, preferiblemente es un alquil éter de polioxietileno. En una realización más particular, el alquil éter de polioxietileno es un metil éter de polietilenglicol (mPEG). En una realización todavía más preferida, el metil éter de polietilenglicol se selecciona del grupo que consiste en metoxi-polietilenglicol 1.000 (mPEG1), metoxi-polietilenglicol 2.000 (mPEG2), metoxi-polietilenglicol 6.000 (mPEG6) y metoxi-polietilenglicol 10.000 (mPEG10).

20 El peso molecular promedio del conjugado de polímero de éster de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; sin embargo, en una realización particular, el conjugado de polímero de éster de la invención tiene un peso molecular promedio comprendido en el intervalo de desde 85 hasta 3.000 kDa, preferiblemente desde 90 hasta 2.500 kDa, más preferiblemente desde 95 hasta 250 kDa.

Procedimiento para obtener un conjugado de polímero de éster de la invención

25 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con una molécula terminada en hidroxilo, en el que dicha molécula terminada en hidroxilo se selecciona de entre un polietilenglicol y un derivado del mismo que contiene un grupo reactivo hidroxilo-terminal (es decir el conjugado de polímero de éster de la invención), a continuación en el presente documento denominado "procedimiento [1] de la invención", que comprende las etapas de:

- 30 a) hacer reaccionar el PVM/MA con la molécula terminada en hidroxilo de la invención en un disolvente orgánico, y
b) eliminar el disolvente orgánico.

Esta etapa a) del "procedimiento [1] de la invención" incluye disolver e incubar el PVM/MA, y la molécula terminada en hidroxilo de la invención en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, acetona, para que tenga lugar la reacción. La incubación de la mezcla se lleva a cabo preferiblemente bajo agitación a una temperatura comprendida en el intervalo de desde 15°C hasta 80°C, más preferiblemente en el intervalo de desde 45°C hasta 65°C, lo más preferiblemente a 55°C. El tiempo de incubación puede variar desde 1 hasta 24 h. En una realización particular preferida, la incubación se lleva a cabo durante 2-4 h. Por ejemplo, una incubación de la mezcla a 55°C durante 3 h proporciona buenos resultados. Alternativamente, también es posible hacer reaccionar el PVM/MA y la molécula terminada en hidroxilo bajo agitación a temperatura ambiente (T/A) durante periodos de tiempo más prolongados (24-48 h).

40 El disolvente orgánico se elimina en la etapa b) mediante cualquier procedimiento adecuado, tal como evaporación a presión reducida, evaporación a temperatura ambiente o centrifugación a vacío. En una realización particular, la etapa b) comprende eliminar el disolvente orgánico mediante evaporación a presión reducida.

45 En una realización preferida, el procedimiento [1] de la invención comprende una etapa adicional c) de purificar el conjugado de polímero de éster de la invención. En una variante particular, la etapa adicional c) comprende varios lavados con un líquido en el que el polímero es insoluble (pero no la molécula terminada en hidroxilo sin reaccionar); y filtración a vacío hasta que no se detectan trazas de molécula terminada en hidroxilo sin reaccionar en el líquido (por ejemplo midiendo mediante cromatografía en capa fina, CCF). En una variante preferida, el líquido de lavado es una mezcla de diclorometano/metanol. Por ejemplo, una mezcla de CH₂Cl₂/CH₃OH (9:1) usada como fase móvil, y yodo para el revelado en CCF, proporcionan buenos resultados.

50 Los detalles de la molécula terminada en hidroxilo de la invención se han mencionado previamente en la sección de "Definiciones", y también en relación con el conjugado de polímero de éster de la invención, y se incorporan en el presente documento como referencia. Según estos, en una realización particular del procedimiento [1] de la invención, la molécula terminada en hidroxilo que reacciona con el PVM/MA en la etapa a) es un polietilenglicol; preferiblemente un polietilenglicol seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol 1.000 (PEG1), polietilenglicol 2.000 (PEG2), polietilenglicol 6.000 (PEG6) y polietilenglicol 10.000 (PEG10). En otra realización particular del procedimiento [1] de la invención, la molécula terminada en hidroxilo que reacciona con el PVM/MA en

la etapa a) es un derivado de polietilenglicol que contiene un grupo reactivo hidroxilo-terminal, preferiblemente un alquil éter de polioxietileno; más preferiblemente un metil éter de polietilenglicol (mPEG); lo más preferiblemente un metil éter de polietilenglicol seleccionado del grupo que consiste en metoxi-polietilenglicol 1.000 (mPEG1), metoxi-polietilenglicol 2.000 (mPEG2), metoxi-polietilenglicol 6.000 (mPEG6) y metoxi-polietilenglicol 10.000 (mPEG10).

5 La razón en peso entre el PVM/MA y la molécula terminada en hidroxilo de la invención en la disolución de la etapa a) del procedimiento [1] de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; sin embargo, en una realización particular, la razón en peso de PVM/MA:molécula terminada en hidroxilo está comprendida en el intervalo de desde 1:0,01 hasta 1:0,25; preferiblemente desde 1:0,015 hasta 1:0,2; más preferiblemente desde 1:0,05 hasta 1:0,125. De una manera ilustrativa no limitativa, cuando la molécula terminada en hidroxilo es un polietilenglicol, una razón en peso de PVM/MA:PEG de 1:0,05, 1:0,1, 1:0,125 ó 1:0,25 proporciona buenos resultados. De un modo similar, cuando la molécula terminada en hidroxilo es un metoxi-polietilenglicol, una razón en peso de PVM/MA:mPEG de 1:0,01, 1:0,015, 1:0,025, 1:0,05, 1:0,01 ó 1:0,2 proporciona buenos resultados.

15 En otras palabras, la razón en peso entre la molécula terminada en hidroxilo de la invención y el PVM/MA en la disolución de la etapa a) del procedimiento [1] de la invención está comprendida en el intervalo de desde 1:4 hasta 1:100; preferiblemente desde 1:5 hasta 1:66; más preferiblemente desde 1:8 hasta 1:20. De una manera ilustrativa no limitativa, cuando la molécula terminada en hidroxilo es un polietilenglicol, una razón en peso PEG:PVM/MA de 1:4, 1:8, 1:10 ó 1:20 proporciona buenos resultados. De manera similar, cuando la molécula terminada en hidroxilo es un metoxi-polietilenglicol, una razón en peso de mPEG:PVM/MA de 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:66 ó 1:100 proporciona buenos resultados.

20 El conjugado de polímero de éster obtenido mediante el procedimiento [1] de la invención, es decir, el conjugado de polímero de éster de PVM/MA con una molécula terminada en hidroxilo, en el que dicha molécula terminada en hidroxilo se selecciona de entre un polietilenglicol y un derivado del mismo que contiene un grupo reactivo hidroxilo-terminal, producido por medio de un procedimiento que comprende: a) hacer reaccionar el PVM/MA con la molécula terminada en hidroxilo de la invención en un disolvente orgánico y b) eliminar el disolvente orgánico, forma un aspecto adicional de la presente invención.

Aplicaciones del conjugado de polímero de éster de la invención

Los conjugados de polímeros de éster preformados de la invención han mostrado buenas propiedades fisicoquímicas y farmacológicas, y pueden usarse como materiales de partida en la formación de nanopartículas para la administración de compuestos biológicamente activos. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere al uso de un conjugado de polímero de éster de la invención, o un conjugado de polímero de éster obtenido mediante el procedimiento [1] de la invención, en la preparación de nanopartículas poliméricas para administración de fármacos; preferiblemente administración oral de fármacos.

35 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende i) un conjugado de polímero de éster de la invención o un conjugado de polímero de éster obtenido mediante el procedimiento [1] de la invención, y ii) un portador, a continuación en el presente documento "composición [1] de la invención". En una realización particular la composición [1] de la invención comprende al menos una concentración del 2% (p/v) de un conjugado de polímero de éster de la invención o de un conjugado de polímero de éster obtenido mediante el procedimiento [1] de la invención.

40 Como ejemplo ilustrativo, dicha composición [1] de la invención puede usarse como base para la fabricación de nanopartículas para la administración de compuestos biológicamente activos. Por tanto, en aún otro aspecto, la invención se refiere a dicha composición [1] de la invención para su uso en la administración de fármacos; preferiblemente administración oral de fármacos.

Nanopartícula

45 En otro aspecto, la invención se refiere a una nanopartícula que comprende una matriz de un conjugado de polímero de éster de la invención. Las nanopartículas de la invención tienen la capacidad de encapsular un compuesto biológicamente activo (BAC), y pueden usarse como sistema de administración de fármacos.

50 Por tanto, en una realización particular, opcionalmente en combinación con una o más características de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, la nanopartícula comprende además un compuesto biológicamente activo, a continuación en el presente documento identificado en esta descripción como "nanopartícula de la invención".

55 El término "compuesto biológicamente activo" (BAC) se ha definido previamente y se refiere a cualquier molécula pequeña (por ejemplo, un fármaco o principio activo de un medicamento) o derivado del mismo que se administra a un sujeto, preferiblemente un ser humano, con fines profilácticos o terapéuticos; es decir, cualquier sustancia o compuesto químico con un peso molecular por debajo de 900 Daltons que puede usarse en el tratamiento, la cura, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad, o para mejorar el bienestar físico y mental de seres humanos y animales. Tal como se usa en el presente documento, el término "derivado", aplicado a una molécula pequeña, incluye profármacos y análogos de dicha molécula.

El BAC puede seleccionarse de una variedad de clases conocidas de fármacos, incluyendo, por ejemplo: agentes antitumorales o antineoplásicos, agentes analgésicos, agentes anestésicos, agentes antiinflamatorios, agentes antiarrítmicos, agentes antihipertensivos, agentes antianginosos, agentes antiasmáticos, antibióticos (incluyendo penicilinas), agentes anticoagulantes, agentes antidepresivos, agentes antipsicóticos, agentes antidiabéticos, antiepilépticos, antihistamínicos, antitusivos, agentes antimuscarínicos, agentes antimicobacterianos, agentes antioxidantes, antipiréticos, inmunosupresores, inmunoestimulantes, agentes antitiroideos, antihelmínticos, agentes antivirales, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, sedantes ansiolíticos (hipnóticos y neurolépticos), astringentes, agentes bacteriostáticos, agentes bloqueantes beta-adrenérgicos, hemoderivados y sustitutos, broncodilatadores, agentes tamponantes, agentes inotrópicos cardíacos, quimioterápicos, medios de contraste, corticosteroides, supresores de la tos (expectorantes y mucolíticos), agentes de diagnósticos, agentes de diagnóstico por imagen, diuréticos, dopaminérgicos (agentes antiparkinsonianos), etc. Las nanopartículas de la invención pueden incorporar uno o más de dicho BAC.

Los ejemplos de BAC según la presente invención son docetaxel, paclitaxel, camptotecina, actinomicina D, albendazol, aldosterona, alprazolam, amiodarona, amitriptilina, amprenavir, asimadolina, atorvastatina, bunitrolol, buspirona, carbamazepina, carvedilol, celiprolol, ciclosporina A, cimetidina, clotrimazol, colchicina, cortisona, daunorubicina, debrisoquina, dexametasona, diazepam, digitoxina, digoxina, diltiazem, domperidona, doxorubicina, efavirenz, epirubicina, eritromicina, ergotamina, glucurónido de estradiol, erlotinib, etopósido, fenitoína, fentanilo, felodipino, fenotiazinas, fexofenadina, fluoroquinolonas, fluorouracilo, FK-506, gentamicina, griseofulvina, hidrocortisona, imatinib, indinavir, itraconazol, ivermectina, ketoconazol, kaempferol, levofloxacino, lidocaína, loperamida, losartán, lovastatina, mebendazol, metilprednisolona, metotrexato, mibefradilo, midazolam, nisoldipino, morfina, nelfinavir, nifedipino, nitrendipino, nifedipino, ondansetrón, pentazocina, praziquantel, prednisolona, prednisona, quercetina, quinidina, ranitidina, rapamicina, rifabutina, rifampicina, ritonavir, saquinavir, sirolimús, sulfametizol, tracolimús, tamoxifeno, talinolol, tenipósido, terfenadina, tetraciclina, topotecán, triamcinolona, valsopodar, verapamilo, vinblastina, viscristina, vindesina, zopiclona, derivados de los mismos, y mezclas de los mismos.

Las nanopartículas de la invención son particularmente útiles para la administración por vía oral de BAC hidrófoba (clase II y clase IV del sistema de clasificación de biofarmacia).

En una realización particular de la invención, el BAC presente en las nanopartículas de la invención es un agente antitumoral (por ejemplo, docetaxel, paclitaxel, camptotecina, doxorubicina, epirubicina, fluorouracilo, ciclofosfamida, metotrexato, etc.). En una realización más particular, el BAC se selecciona del grupo que consiste en docetaxel, camptotecina y paclitaxel. En una realización todavía más particular, el BAC es docetaxel.

Las nanopartículas de la invención permiten modificar la distribución del BAC que contienen cuando se administran por una vía que proporciona acceso a cualquier mucosa del organismo (por ejemplo, vía oral, etc.).

Dichas nanopartículas de la invención tienen un tamaño de partícula inferior a 1 μm , normalmente comprendido entre 1 y 999 nm, preferiblemente entre 10 y 900 nm, más preferiblemente entre 50 y 550 nm, incluso más preferiblemente entre 100 y 500 nm, todavía más preferiblemente entre 150 y 400 nm.

Procedimiento para obtener nanopartículas

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir nanopartículas que comprenden una matriz de un conjugado de polímero de éster de la invención y un compuesto biológicamente activo (es decir, las nanopartículas de la invención), a continuación en el presente documento "procedimiento [2] de la invención", que comprende las etapas de:

- a) mezclar un conjugado de polímero de éster de la invención con un compuesto biológicamente activo en un medio orgánico, y
- b) desolvatar el conjugado de polímero de éster por medio de la adición de alcohol y agua en presencia de un metal divalente.

En una realización particular, opcionalmente en combinación con una o más características de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el medio orgánico en la etapa a) es acetona; y el alcohol usado en la etapa b) es etanol.

El metal divalente que puede usarse para poner en práctica el procedimiento [2] de la invención se selecciona del grupo que consiste en calcio, magnesio, zinc, hierro en forma divalente, y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, opcionalmente en combinación con una o más características de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el metal divalente es calcio; y puede obtenerse por ejemplo a partir de una sal de calcio. Ejemplos no limitativos ilustrativos de sales de calcio son cloruro de calcio, acetato de calcio, gluconato de calcio, lactato de calcio, sorbato de calcio, y mezclas de los mismos; preferiblemente la sal de calcio es cloruro de calcio.

La etapa a) del procedimiento [2] de la invención se realiza mediante métodos convencionales conocidos por los

expertos en la técnica, por ejemplo por medio de:

- disolver el conjugado de polímero de éster de la invención en un medio orgánico, y añadir el compuesto biológicamente activo; o alternativamente,

- 5 - mezclar (i) una disolución orgánica que contiene el conjugado de polímero de éster de la invención con (ii) una disolución orgánica o dispersión del compuesto biológicamente activo.

La etapa b) del procedimiento [2] de la invención también se realiza mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, por medio de:

- añadir (iii) un alcohol a la mezcla obtenida en la etapa a), e inmediatamente añadir una (iv) disolución acuosa de un metal divalente, o alternativamente,

- 10 - añadir una (v) mezcla hidroalcohólica que comprende un metal divalente a la mezcla obtenida en la etapa a).

El procedimiento [2] de la invención cubre todas las posibles combinaciones de los métodos anteriores de las etapas a) o b) descritos en el presente documento. Sin embargo, en una realización preferida, opcionalmente en combinación con una o más características de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el procedimiento [2] de la invención comprende las etapas de:

- 15 a) mezclar (i) una disolución orgánica que contiene el conjugado de polímero de éster de la invención con (ii) una disolución orgánica o dispersión del compuesto biológicamente activo, y

b) desolvatar el conjugado de polímero de éster por medio de la adición de una mezcla hidroalcohólica que comprende un metal divalente a la mezcla obtenida en la etapa a).

- 20 En una realización particular de la invención, opcionalmente en combinación con una o más características de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, la mezcla hidroalcohólica es (agua/alcohol) 1:1 (v/v). En otra realización particular, opcionalmente en combinación con una o más características de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, dicha mezcla hidroalcohólica comprende el 0,5-5% (v/v) de una fuente de un metal divalente; preferiblemente el 1-3%. En una realización particular adicional dicha fuente de un metal divalente es una disolución acuosa que comprende el 0,5-1% (p/v) de la sal correspondiente.

- 25 En una realización particular adicional, opcionalmente en combinación con una o más características de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, la razón en peso entre el conjugado de polímero de éster de la invención y el compuesto biológicamente activo en la mezcla de la etapa a) está comprendida en el intervalo de desde 1:0,01 hasta 1:0,20, preferiblemente desde 1:0,02 hasta 1:0,15, más preferiblemente desde 1:0,03 hasta 1:0,10.

- 30 De una manera ilustrativa no limitativa, cuando el BAC es docetaxel o paclitaxel, una razón en peso de conjugado de polímero de éster:BAC de 1:0,05 o 1:0,10 proporciona buenos resultados. De un modo similar, cuando el BAC es camptotecina, una razón en peso de conjugado de polímero de éster:BAC de 1:0,03 o 1:0,06 proporciona buenos resultados.

- 35 En una realización particular, opcionalmente en combinación con una o más características de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, la razón orgánica/hidroalcohólica (v/v) en la mezcla obtenida al final del procedimiento [2] de la invención es de 1:1-1:4, preferiblemente es de 1:2.

- 40 En una variante de la invención, dicho procedimiento para producir una nanopartícula según la invención comprende una etapa adicional c) de eliminar medio orgánico (por ejemplo, por medio de evaporación a presión reducida), y/o opcionalmente purificar (por ejemplo, por medio de técnicas de filtración, centrifugación o ultracentrifugación). Asimismo, si se desea, dicho procedimiento [2] de la invención puede incluir una etapa adicional d) de secar las nanopartículas formadas con el fin de obtener las nanopartículas de la invención en forma de un polvo. Esta forma de presentación de dichas nanopartículas contribuye a su estabilidad y es además particularmente útil para su aplicación final en productos farmacéuticos.

- 45 Puede usarse prácticamente cualquier técnica o método convencional adecuado para secar las nanopartículas para realizar esta etapa de secado; sin embargo, en una realización particular, el secado de la suspensión que contiene nanopartículas se lleva a cabo por medio de secado por pulverización o por medio de secado por congelación (liofilización); preferiblemente por medio de secado por congelación. Este tratamiento se lleva a cabo generalmente añadiendo un agente protector adecuado de dichas nanopartículas, tales como un sacárido, por ejemplo sacarosa, lactosa, trehalosa, manitol, maltodextrina, glucosa, sorbitol, maltosa, etc., y mezclas de los mismos a la suspensión de las nanopartículas. Dicho agente protector protege las nanopartículas de la invención frente a la degradación así como la oxidación durante el proceso de secado.

- 50 Las nanopartículas que pueden obtenerse por medio del procedimiento [2] de la invención tienen las características de las nanopartículas de la invención. Por tanto, las nanopartículas obtenidas mediante el procedimiento [2] de la invención, es decir, las nanopartículas que comprenden una matriz de un conjugado de polímero de éster de la

invención y un compuesto biológicamente activo producido por medio de un procedimiento que comprende: a) mezclar un conjugado de polímero de éster de la invención con un compuesto biológicamente activo en un medio orgánico y b) desolvatar el conjugado de polímero de éster por medio de la adición de alcohol y agua en presencia de un metal divalente forman un aspecto adicional de la presente invención.

- 5 Particularmente, las nanopartículas que comprenden una matriz de un conjugado de polímero de éster de la invención y un BAC obtenidas por medio de un procedimiento que comprende: a) mezclar (i) una disolución orgánica que contiene el conjugado de polímero de éster de la invención con (ii) una disolución orgánica o dispersión del compuesto biológicamente activo y b) desolvatar el conjugado de polímero de éster por medio de la adición de una mezcla hidroalcohólica que comprende un metal divalente a la mezcla obtenida en la etapa a), forman un aspecto adicional de la presente invención, opcionalmente en combinación con una o más características de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación.

Aplicaciones de las nanopartículas

- 15 Las nanopartículas proporcionadas por la presente invención (es decir nanopartícula que comprende una matriz de un conjugado de polímero de éster de la invención, así como las nanopartículas directamente obtenidas mediante el procedimiento [2] de la invención) permiten la encapsulación de cantidades considerables de compuestos biológicamente activos, y su incorporación en composiciones farmacéuticas. Dichas nanopartículas pueden presentarse en forma de una suspensión, preferiblemente en un medio acuoso o, alternativamente, pueden presentarse en forma de un polvo seco, por ejemplo como un liofilizado junto con un agente crioprotector, manteniendo el BAC en una condición estable y permitiendo su almacenamiento durante periodos prolongados de tiempo.

- 20 Las nanopartículas de la invención parecen ser capaces de atravesar la capa mucosa e interactuar de un modo íntimo con la superficie de los enterocitos, mejorando la absorción del fármaco a través de la mucosa oral. De manera importante, las nanopartículas proporcionadas por la presente invención aumentan la biodisponibilidad oral del BAC, proporcionando niveles en plasma sostenidos y constantes. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una nanopartícula según la invención o una nanopartícula obtenida mediante el procedimiento [2] de la invención para su uso en medicina. Alternativamente, la invención se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una nanopartícula de la invención, o una nanopartícula obtenida mediante un procedimiento [2] de la invención.

- 25 La dosis de nanopartículas de la invención cargadas que va a administrarse a un sujeto que necesita tratamiento con el BAC debe ser suficiente para desencadenar una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente a lo largo del tiempo. Por tanto, se administran nanopartículas a un paciente en una cantidad suficiente para prevenir, aliviar, reducir, curar o al menos detener parcialmente síntomas y/o complicaciones de la enfermedad. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". La dosis puede variar dentro de un amplio intervalo, y dependerá, entre otras características, de la naturaleza del BAC, su actividad o potencia, la cantidad de BAC por nanopartículas, etc. Sólo mediante fines ilustrativos, la dosis de las nanopartículas cargadas que va a administrarse a un sujeto puede estar comprendida, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal, preferiblemente, entre 0,1 y 2 mg por kg de peso corporal.

- 30 Los detalles del BAC se han mencionado en la sección de "Definiciones", y también en relación con las nanopartículas de la invención, y se incorporan en el presente documento como referencia. El BAC que está comprendido en las nanopartículas se elige dependiendo de la enfermedad que va a tratarse. En una realización particular, opcionalmente en combinación con una o más características de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, el BAC es un agente antitumoral; en una realización más particular el BAC se selecciona del grupo que consiste en docetaxel, camptotecina y paclitaxel. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una nanopartícula que comprende una matriz de un conjugado de polímero de éster de la invención y un BAC (es decir una nanopartícula de la invención o una nanopartícula obtenida mediante el procedimiento [2] de la invención), en la que el BAC es un agente antitumoral, para su uso en un método de prevención o tratamiento de cáncer; en otras palabras, la invención también se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de cáncer que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una nanopartícula que comprende una matriz de un conjugado de polímero de éster de la invención y un BAC, en el que el BAC es un agente antitumoral.

- 35 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una nanopartícula de la invención, o a uso de una nanopartícula obtenida mediante el procedimiento [2] de la invención en la fabricación de una composición farmacéutica.

- 40 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica, a continuación en el presente documento "composición farmacéutica de la invención", que comprende i) al menos una nanopartícula de la invención o al menos una nanopartícula obtenida mediante el procedimiento [2] de la invención, y ii) un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, dicha composición farmacéutica de la invención comprende una pluralidad de nanopartículas de la invención y/o una pluralidad de nanopartículas obtenidas mediante un procedimiento [2] de la invención. Los detalles de las nanopartículas ya se han definido anteriormente y se incorporan en el presente documento como referencia.

Ventajosamente, las nanopartículas en la composición farmacéutica de la invención tienen un tamaño medio comprendido en el intervalo de desde 10 hasta 900 nm, preferiblemente desde 50 hasta 550, más preferiblemente desde 100 hasta 500 nm, incluso más preferiblemente desde 150 hasta 400 nm, todavía más preferiblemente de aproximadamente 250 nm.

- 5 La composición farmacéutica de la invención puede formularse en una forma de dosificación farmacéutica sólida (por ejemplo, comprimidos, cápsulas, comprimidos recubiertos, granulados, supositorios, sólidos cristalinos o amorfos estériles que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas, etc.), líquida (por ejemplo suspensión o dispersión de las nanopartículas, etc.) o semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). Las composiciones farmacéuticas descritas comprenderán portadores o vehículos adecuados para cada formulación. Además, la
10 composición farmacéutica puede contener, según sea apropiado, estabilizadores, suspensiones, conservantes, tensioactivos y similares. Estos excipientes se elegirán según la forma de dosificación farmacéutica seleccionada.

- 15 En una realización específica, dicha composición farmacéutica se formula como una forma de dosificación farmacéutica adecuada para su administración mediante una vía de acceso a las mucosas. En una realización preferida, la composición farmacéutica proporcionada por esta invención se administra por vía oral; por tanto el portador o vehículo comprende uno o más excipientes farmacéuticos aceptables para la administración por vía oral. Se preparan convencionalmente formulaciones orales mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Puede encontrarse una revisión de las diferentes formas de administración de principios activos, de los excipientes que van a usarse, y de los procedimientos para fabricarlos en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Fauli i Trillo, 10 edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

- 20 En otra realización específica, la composición farmacéutica de la invención se prepara en forma de un polvo seco, por ejemplo como un liofilizado.

- 25 Las composiciones farmacéuticas según esta invención pueden contener el BAC o principio activo en una cantidad que está en el intervalo de desde el 0,05% hasta el 50%, preferiblemente desde el 0,1% hasta el 30%, más preferiblemente del 0,5% al 25%, incluso más preferiblemente del 1% al 20%, en las que los porcentajes anteriores son p/p frente al peso total de la composición o forma de dosificación. No obstante, la proporción adecuada dependerá de cada caso del BAC incorporado.

- 30 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica de la invención para su uso en medicina. En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica de la invención en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad. Alternativamente, la invención se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición farmacéutica de la invención.

- 35 La dosis terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que va a administrarse depende del caso individual y, habitualmente, ha de adaptarse a las condiciones del caso individual para lograr un efecto óptimo. Por tanto depende, por supuesto, de la frecuencia de administración y de la potencia y duración de la acción del BAC empleado en cada caso para terapia o profilaxis, pero también de la naturaleza y gravedad de la enfermedad y los síntomas, y del sexo, edad, peso, medicación conjunta y receptividad individual del sujeto que va a tratarse y de si la terapia es aguda o profiláctica. Las dosis pueden adaptarse dependiendo del peso del sujeto, y para administración pediátrica.

- 40 En una realización particular, opcionalmente en combinación con una o más características de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación, la composición farmacéutica de la invención comprende i) al menos una nanopartícula que comprende una matriz de un conjugado de polímero de éster de la invención y un BAC (es decir una nanopartícula de la invención o una nanopartícula obtenida mediante el procedimiento [2] de la invención), en la que el BAC es un agente antitumoral, y ii) un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el agente antitumoral se selecciona del grupo que consiste en docetaxel, camptotecina y paclitaxel;
45 preferiblemente es docetaxel.

En esta realización particular en la que el BAC es un agente antitumoral, la composición farmacéutica de la invención puede usarse en un método de prevención o tratamiento de cáncer.

- 50 Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de cáncer que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la invención que comprende un agente antitumoral; alternativamente, la invención también se refiere al uso de una composición farmacéutica de la invención que comprende un agente antitumoral en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de cáncer.

En una realización más particular la composición farmacéutica de la invención se selecciona del grupo que consiste en:

- 55 una composición farmacéutica que comprende:

a) un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con polietilenglicol 2.000 desde el 38% hasta el 47%,

- b) docetaxel desde el 3% hasta el 5%,
- c) calcio desde el 0,1% hasta el 0,2%, y
- d) un sacárido desde el 15% hasta el 40%,

en la que todas las proporciones son en peso con respecto al peso total de la composición;

5 una composición farmacéutica que comprende:

- a) un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con metoxi-polietilenglicol 2.000 desde el 38% hasta el 47%,
- b) docetaxel desde el 3% hasta el 5%,
- c) calcio desde el 0,1% hasta el 0,2%, y
- d) un sacárido desde el 15% hasta el 40%,

10 en la que todas las proporciones son en peso con respecto al peso total de la composición; y,
una composición farmacéutica que comprende:

- a) un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con metoxi-polietilenglicol 2.000 desde el 30% hasta el 40%,
- b) camptotecina desde el 0,08% hasta el 1,5%,
- c) calcio desde el 0,10% hasta el 0,20%, y

15 d) un sacárido desde el 15% hasta el 40%,

en la que todas las proporciones son en peso con respecto al peso total de la composición.

La presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento.

Ejemplos

20 Los siguientes ejemplos describen la producción y caracterización de conjugados de polímeros de éster de copolímero de poli(vinil metil éter y anhídrido maleico) (PVM/MA o Gantrez® AN) con un polietilenglicol o derivado del mismo que contiene un grupo reactivo hidroxilo-terminal. Además, los siguientes ejemplos describen la producción y caracterización de nanopartículas basadas en dichos conjugados de polímeros de éster de PVM/MA con diferentes tipos de polietilenglicoles o derivados de los mismos que contienen un grupo reactivo hidroxilo-terminal y moléculas biológicamente activas. Se ha encontrado especialmente que estas nanopartículas son capaces de i) encapsular cantidades considerables de compuestos biológicamente activos (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel y camptotecina), y ii) cruzar la capa de moco e interactuar de manera íntima con la superficie de los enterocitos (mejorando la absorción del fármaco).

25 Tal como puede observarse en dichos ejemplos, cuando se usa docetaxel como compuesto biológicamente activo, su incorporación en dichas nanopartículas permite mantener niveles en plasma constantes y sostenidos de dicho fármaco durante al menos 72 h. Asimismo, con camptotecina incluida en las nanopartículas de la invención como compuesto biológicamente activo, los niveles en plasma se mantienen durante al menos 48 h.

Los materiales generales se describen en primer lugar.

MATERIALES

35 Se adquirió poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) o poli(anhídrido) (PVM/MA) [Gantrez® AN 119] de ISP (Barcelona, España). 21CECpharm (Londres, Reino Unido) suministró camptotecina (99,0%), paclitaxel (USP 26, calidad > 99,5%) y docetaxel (99,0%). Se obtuvo Taxotere® de Aventis-Pharma (Cedex, Francia). La disolución salina tamponada con fosfato (PBS), pancreatina, metoxi-polietilenglicol 2.000 (mPEG2) y polietilenglicoles 2.000, 6.000 y 10.000 (PEG2, PEG6 y PEG10) los proporcionó Sigma-Aldrich (España). La pepsina, la acetona, el etanol y el acetonitrilo se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). El agua reactiva desionizada (resistividad de 18,2 MΩ) se preparó mediante un sistema de purificación de agua (Wasserlab, España). Todos los reactivos y productos químicos usados fueron de calidad analítica.

Estos ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

EJEMPLO 1

45 Preparación de nanopartículas de PVM/MA convencionales.

Preparación de nanopartículas de PVM/MA convencionales vacías (NP)

5 Se disolvieron 100 mg de PVM/MA en 5 ml de acetona y se formaron nanopartículas mediante la adición de una mezcla de etanol y agua (1:1, v/v). Luego, se eliminaron los disolventes orgánicos por evaporación a presión reducida y se filtró la suspensión resultante a través de una membrana de 0,45 μm y se purificó dos veces mediante centrifugación a 27.000 xg durante 20 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en agua. Finalmente, se congeló la formulación y se secó por congelación (Genesis 12EL, Virtis, EE.UU.) usando sacarosa (5% p/p) como crioprotector. Estas son nanopartículas vacías de PVM/MA, a continuación en el presente documento formulaciones de NP (NP).

Preparación de nanopartículas de PVM/MA convencionales que encapsulan paclitaxel (PTX)

10 Se prepararon nanopartículas de PVM/MA cargadas con paclitaxel mediante un método de desplazamiento de disolvente con algunas modificaciones. En resumen, se dispersaron 10 mg de paclitaxel en 5 ml de acetona que contenía 100 mg de PVM/MA. La mezcla resultante se mantuvo bajo agitación magnética durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se formaron nanopartículas mediante la adición de 10 ml de etanol, seguido de la adición de 10 ml de una disolución acuosa que contenía 20 mg de edetato de disodio. Después de la
15 homogeneización por agitación magnética durante 10 min, se eliminaron los disolventes orgánicos por evaporación a presión reducida (Büchi R-144, Suiza) y las suspensiones resultantes se purificaron por filtración tangencial en tubos Vivaspín a 3000 xg durante 20 min. Los sobrenadantes se eliminaron y los sedimentos se resuspendieron en agua. El proceso de purificación se repitió dos veces y, finalmente, las formulaciones se congelaron y se secaron por congelación (Genesis 12EL, Virtis, EE.UU.) usando sacarosa (5%) como crioprotector. Estas formulaciones son
20 nanopartículas de PVM/MA cargadas con PTX, en adelante formulaciones de PTX.

Preparación de nanopartículas de PVM/MA convencionales que encapsulan docetaxel (DTX)

25 Se prepararon nanopartículas de PVM/MA cargadas con docetaxel mediante un método de desplazamiento de disolvente con algunas modificaciones. En resumen, se dispersaron 10 mg de docetaxel en 5 ml de acetona que contenía 100 mg de PVM/MA. La mezcla resultante se mantuvo bajo agitación magnética durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se formaron nanopartículas mediante la adición de 10 ml de etanol, seguido de la adición de 10 ml de una disolución acuosa que contenía 20 mg de edetato de disodio. Después de la homogeneización por agitación magnética durante 10 min, los disolventes orgánicos se eliminaron por evaporación a presión reducida (Büchi R-144, Suiza) y las suspensiones resultantes se purificaron por filtración tangencial en tubos Vivaspín a 3000 xg durante 20 min. Los sobrenadantes se eliminaron y los sedimentos se resuspendieron en agua.
30 El proceso de purificación se repitió dos veces y, finalmente, las formulaciones se congelaron y se secaron por congelación (Genesis 12EL, Virtis, EE.UU.) usando sacarosa (5%) como crioprotector. Estas formulaciones son nanopartículas de PVM/MA cargadas con DTX, en adelante formulaciones de DTX.

Preparación de nanopartículas de PVM/MA convencionales que encapsulan camptotecina (CPT)

35 Se disolvieron 100 mg de PVM/MA y 10 mg de camptotecina y se dispersaron en 2 y 3 ml de acetona, respectivamente. La camptotecina se sonicó durante 1 minuto y se mezcló con la solución de PVM/MA. Inmediatamente, se formaron nanopartículas mediante la adición de una mezcla de etanol y agua (1: 1, v/v). Luego, los disolventes orgánicos se eliminaron por evaporación a presión reducida y la suspensión resultante se filtró a través de una membrana de 0,45 μm y se purificó dos veces por centrifugación a 27.000 xg durante 20 min. Finalmente, la formulación se congeló y se secó por congelación (Genesis 12EL, Virtis, EE.UU.) usando sacarosa (5%, p/p) como crioprotector. Estas formulaciones son nanopartículas de PVM/MA cargadas con CPT, en adelante formulaciones de CPT.
40

Ejemplo 2Preparación de nanopartículas de PVM/MA pegiladas tradicionales

Preparación de nanopartículas de PVM/MA pegiladas tradicionales vacías (PEG trad)

45 Se prepararon nanopartículas de PVM/MA pegiladas mediante un método de desplazamiento del disolvente. En resumen, se disolvieron 12,5 mg de polietilenglicol (PEG2, PEG6 o PEG10) en 3 ml de acetona y, luego, se añadieron a una disolución de 100 mg de PVM/MA en 2 ml del mismo disolvente orgánico. La mezcla resultante se mantuvo bajo agitación magnética durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se formaron nanopartículas mediante la adición de 10 ml de etanol, seguido de la adición de 10 ml de agua. Los disolventes orgánicos se
50 eliminaron por evaporación a presión reducida (Büchi R-144, Suiza) y las suspensiones resultantes se purificaron por filtración tangencial en tubos Vivaspín a 3000 xg durante 20 min. Los sobrenadantes se eliminaron y los sedimentos se resuspendieron en agua. El proceso de purificación se repitió dos veces y, finalmente, las formulaciones se congelaron y se secaron por congelación (Genesis 12EL, Virtis, EE.UU.) usando sacarosa (5%) como crioprotector. Las nanopartículas pegiladas resultantes de PVM/MA son: formulaciones de PEG2 trad, PEG6 trad y PEG10 trad.
55

Preparación de nanopartículas de PVM/MA pegiladas tradicionales que encapsulan paclitaxel (PEG-PTX trad)

Se prepararon nanopartículas de PVM/MA pegiladas que contienen paclitaxel mediante un método de desplazamiento de disolvente con algunas modificaciones. En resumen, por un lado, se disolvieron 12,5 mg de polietilenglicol (PEG2, PEG6 o PEG10) en 3 ml de acetona y, luego, se añadieron a una disolución de 100 mg de PVM/MA en 2 ml del mismo disolvente orgánico. La mezcla resultante se mantuvo bajo agitación magnética. En paralelo, se disolvieron 10 mg de paclitaxel en 0,5 ml de acetona y se añadieron a la mezcla de polímeros. Luego, la fase orgánica (que contenía paclitaxel, PVM/MA y PEG) se agitó magnéticamente durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se formaron nanopartículas mediante la adición de 10 ml de etanol, seguido de la adición de 10 ml de una disolución acuosa que contenía 20 mg de edetato de disodio. Después de la homogeneización por agitación magnética durante 10 min, se eliminaron los disolventes orgánicos por evaporación a presión reducida (Büchi R-144, Suiza) y las suspensiones resultantes se purificaron por filtración tangencial en tubos Vivaspin a 3000 xg durante 20 min. Los sobrenadantes se eliminaron y los sedimentos se resuspendieron en agua. El proceso de purificación se repitió dos veces y, finalmente, las formulaciones se congelaron y se secaron por congelación (Genesis 12EL, Virtis, EE.UU.) usando sacarosa (5%) como crioprotector. Por tanto, están disponibles nanopartículas pegiladas tradicionales de PVM/MA cargadas con PTX, a continuación en el presente documento, formulaciones de PEG2-PTX trad, PEG6-PTX trad y PEG10-PTX trad.

Preparación de nanopartículas de PVM/MA pegiladas tradicionales que encapsulan docetaxel (PEG-DTX trad)

Se disolvió en primer lugar polietilenglicol 2.000 (12,5 mg) en 3 ml de acetona y se añadió a una disolución de 100 mg de PVM/MA también en 2 ml de acetona. La mezcla resultante se mantuvo bajo agitación magnética. Por otro lado, se disolvió docetaxel en 0,5 ml de acetona y se añadió a la solución. Luego, la fase orgánica que contenía docetaxel, PVM/MA y PEG2 se incubó durante un período de aproximadamente 1 h bajo agitación magnética a temperatura ambiente. Posteriormente, se formaron nanopartículas mediante la adición de 10 ml de etanol, seguido de la adición de 10 ml de una disolución acuosa que contenía glicina (50 mg) y edetato de disodio (18 mg) y se dejó homogeneizar durante 10 minutos. Los disolventes orgánicos se eliminaron por evaporación a presión reducida y el volumen final se ajustó con disolución de glicina a 10 ml. La suspensión se purificó por filtración tangencial en tubos Vivaspin (MWCO de 300.000, Sartorius Group, Alemania) a 4.000 xg durante 15 min. Los sedimentos se resuspendieron en agua y la etapa de purificación se repitió dos veces. Finalmente, se congelaron las formulaciones y luego se secaron por congelación usando sacarosa (5%) como crioprotector. Por tanto, están disponibles nanopartículas pegiladas tradicionales de PVM/MA cargadas con DTX, a continuación en el presente documento, formulaciones de PEG2-DTX trad.

Preparación de nanopartículas de PVM/MA pegiladas tradicionales que encapsulan camptotecina (PEG-CPT trad)

Se prepararon nanopartículas pegiladas a una razón de polímero/CPT/PEG de 1/0,03/0,125. Se disolvieron PEG2 o PEG6, y camptotecina, en acetona y se mezclaron en diferentes condiciones. Inmediatamente, se formaron nanopartículas mediante la adición de una mezcla de etanol, agua, glicina y edetato de disodio. Después de la homogeneización durante 10 minutos, se eliminaron los disolventes orgánicos por evaporación a presión reducida. Luego, las suspensiones resultantes se filtraron a través de una membrana de 0,45 μm y se purificaron dos veces a través de tubos Vivaspin (MWCO de 300.000, grupo Sartorius, Alemania) a 3000 xg durante 20 min. Finalmente, las formulaciones se congelaron y luego se secaron por congelación (Genesis 12EL, Virtis, EE.UU.) usando sacarosa (5%, p/p) como crioprotector. Por tanto, están disponibles nanopartículas pegiladas tradicionales de PVM/MA cargadas con CPT, a continuación en el presente documento, formulaciones de PEG2-CPT trad y PEG6-CPT trad.

40 Ejemplo 3

Preparación y caracterización de conjugados de polímeros de éster de PVM/MA.

3.1 Preparación de conjugados de polímeros de éster de PVM/MA.

En este caso, se sometieron a prueba polietilenglicoles de diferentes pesos moleculares 2.000, 6.000 ó 10.000 y metoxi-polietilenglicol 2000.

45 Para preparar los conjugados de polímeros de éster, se disolvieron 5 g de PVM/MA en 250 ml de un disolvente orgánico (es decir, acetona) y se incubaron con diferentes cantidades de polietilenglicol o derivado del mismo durante 3 h con agitación magnética a 50°C. Las razones de molécula terminada en hidroxilo:(PVM/MA) sometidas a prueba fueron:

- mPEG:(PVM/MA) 1:5; para mPEG2

50 PEG:(PVM/MA) 1:20; 1:8; para PEG2, PEG6 y PEG10

Después de la incubación, se eliminó el disolvente y se secó el conjugado de polímero de éster resultante mediante evaporación a presión reducida (Büchi R210, Suiza). Finalmente, los conjugados de polímeros de éster secos obtenidos se purificaron mediante lavado con diclorometano (CH_2Cl_2) y filtración a vacío (filtro de vidrio, Merck Millipore, Alemania) hasta que no se detectaron trazas de molécula terminada en hidroxilo sin reaccionar en el líquido mediante cromatografía en capa fina (CCF). Para este fin, se usó una mezcla de diclorometano/metanol $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) como fase móvil y yodo para revelar. Esta etapa mejorará la solubilidad del nuevo conjugado de

polímero en un disolvente orgánico.

3.2 Caracterización de conjugados de polímeros de éster de PVM/MA.

Después de la síntesis, los conjugados de polímeros de éster resultantes de PVM/MA con PEG2, PEG6 y PEG10 (en una razón de PEG:PVM/MA de 1:8) y el conjugado de polímero de éster de PVM/MA con mPEG2 (en una razón de mPEG:PVM/MA de 1:5) se caracterizaron fisicoquímicamente para obtener evidencias de la modificación de la estructura principal de PVM/MA, así como para estimar el grado de sustitución (DS) y el peso molecular (M_w).

Se emplearon las siguientes técnicas:

Espectroscopia infrarroja (IR): la espectroscopia IR se realizó en un equipo Nicolet Avatar 360FT-IR (Thermo, EE.UU.) basándose en tecnología de reflectancia. Esta técnica permitió identificar la unión del grupo funcional -OH de la molécula terminada en hidroxilo (PEG o mPEG) con los grupos anhídrido de PVM/MA.

Análisis elemental (CHN): todos los conjugados de polímeros de éster preformados se analizaron en un aparato CHN-900 Leco (Leco Corporations, EE.UU.). Esta técnica ayuda a determinar la composición de los polímeros y detectar las diferencias en la relación de contenido de C/H cuando la molécula terminada en hidroxilo (PEG o mPEG) se incorpora a la estructura de PVM/MA.

Valoración: en primer lugar, se hidrataron PVM/MA o sus conjugados de polímeros de éster y se dispersaron en agua hasta su solubilización total. En este momento, se valoraron las disoluciones acuosas de los polímeros con una disolución de NaOH 0,2 N en presencia de fenolftaleína, usada como indicador. La valoración se usó para medir el porcentaje de grupos carboxílicos libres (-COOH). La disminución de los grupos carboxílicos libres en los conjugados de polímeros de éster en comparación con el polímero de PVM/MA no modificado evidenció la unión de la molécula.

Cromatografía de exclusión molecular - dispersión de luz láser de múltiples ángulos (SEC-MALLS): la técnica de SEC-MALLS es la clave para determinar la masa molecular de un polímero en disolución. Esta técnica usa una curva de calibración de los tiempos de elución frente a la masa molar en las columnas de exclusión molecular y una única medición de un polímero permite conocer su peso molecular.

Dispersión de luz dinámica (DLS): esta técnica proporciona el radio hidrodinámico (R_h) de los polímeros, proporcionando una estimación de la conformación más probable del polímero en disolución. Las mediciones de DLS se realizaron a un ángulo de dispersión de 90° usando un espectrómetro de correlación de fotones DynaPro-MS/X equipado con un correlador multi-tau de 248 canales y una unidad de temperatura de efecto Peltier (Protein Solutions Inc, EE.UU.). La longitud de onda del láser fue de 852,2 nm a una intensidad del 100%. Los conjugados de polímeros se midieron a 25°C usando tetrahidrofurano como disolvente.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear ($^1\text{H-RMN}$): Se registraron los espectros de $^1\text{H-RMN}$ en un aparato Bruker Avance 400 de 400 MHz (Bruker, EE.UU.) usando un programa de pulsos zg30 y un tiempo de espera entre pulsos (D_0) de 1 s. Los conjugados de polímeros de éster preformados se disolvieron en acetona deuterada (acetona- d_6), como solvente.

3.3 Resultados

El estudio de espectroscopia infrarroja de conjugados de polímeros de éster preformados mostró la formación de una nueva unión a $\sim 1705\text{ cm}^{-1}$ asociada con el estiramiento del nuevo grupo éster carbonilo ν (C = O) originado como resultado de la reacción del hidroxilo de PEG o mPEG con grupos anhídrido de PVM/MA, véase la figura 1.

Una vez que se evidenció por IR que se había desarrollado un enlace entre el polímero y la molécula terminada en hidroxilo, se llevaron a cabo estudios adicionales para evidenciar la modificación del polímero.

La tabla 1 resume la composición en carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O) determinada para el polímero de PVM/MA original y sus conjugados de polímeros de éster. El análisis elemental mostró una disminución en el % de C y un aumento en el % de O, lo que confirma un cambio marcado en la composición de conjugados de polímeros de éster de PVM/MA en comparación con PVM/MA no modificado, siendo la razón de C con respecto a O (razón de C/O) menor para los conjugados de polímeros de éster que para el copolímero original.

Tabla 1. Análisis elemental del PVM/MA y de sus conjugados de polímeros de éster

Polímero	% de C	% de H	% de O	C/O
PVM/MA	53,49	5,18	41,33	1,29
PVM/MA-PEG2	49,78	5,19	45,03	1,11
PVM/MA-PEG6	49,96	5,18	44,89	1,11
PVM/MA-PEG10	49,85	5,68	44,47	1,12

PVM/MA-mPEG2	48,33	6,01	45,66	1,06
--------------	-------	------	-------	------

Por otro lado, la valoración confirmó una reducción en la cantidad de grupos -COOH libres, debido a la ocupación del anillo de anhídrido por la unión de la molécula terminada en hidroxilo (PEG o mPEG) (tabla 2).

Tabla 2. Valoración de PVM/MA y sus conjugados de polímeros de éster.

Polímero	% de COOH libre
PVM/MA	100
PVM/MA-PEG2	57,67
PVM/MA-PEG6	40,68
PVM/MA-PEG10	54,79
PVM/MA-mPEG2	50,27

5 DLS mostró los valores de radio hidrodinámico de PVM/MA y de conjugados de polímeros de éster de PVM/MA con PEG o mPEG. En todos los casos, el radio hidrodinámico aumenta con respecto al PVM/MA de partida, excepto para el conjugado de PVM/MA-metoxi polietilenglicol 2.000, que muestra un valor ligeramente inferior pero muy similar en comparación con el polímero de PVM/MA sin modificar (tabla 3). Esto indicaría un cambio en la conformación molecular cuando los conjugados de polímeros se disuelven en un disolvente orgánico. La ausencia de átomos de hidrógeno en el grupo metoxi en las moléculas de mPEG promovería el plegamiento de la molécula en menor grado que los grupos hidroxilo presentes en las moléculas de PEG.

Tabla 3. Determinación del radio hidrodinámico (R_h) de PVM/MA y sus conjugados de éster utilizando DLS.

Polímero	R_h
PVM/MA	18,96
PVM/MA-PEG2	1158,68
PVM/MA-PEG6	518,85
PVM/MA-PEG10	114,52
PVM/MA-mPEG2	12,89

Finalmente, los espectros de $^1\text{H-RMN}$ de los conjugados de polímeros de éster mostraron en todos los casos la presencia de un desplazamiento químico correspondiente a unidades de poli(etileno) de $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2-$ en las moléculas (PEG o mPEG) (figura 2).

15 Para estimar el porcentaje de las moléculas terminadas en hidroxilo en los conjugados de polímeros de éster (DS) resultantes, se calculó la razón entre el área del pico asociado a los protones "a" en la molécula de PVM/MA (véase la figura 2A) y el área de un pico de molécula terminada en hidroxilo característico (nuevo desplazamiento químico en el conjugado de polímero de éster destacado en las figuras 2B-2E).

20 Con estos resultados, se estimó también el peso molecular medio (M_w) de los conjugados resultantes, considerando 95,5 kDa el peso molecular de Gantrez[®] AN 119, tal como se calculó por SEC-MALLS (tabla 4).

Tabla 4. Peso molecular estimado (M_w) y grado de sustitución (DS) de los diferentes conjugados sometidos a prueba calculados mediante una $^1\text{H-RMN}$.

Polímero	M_w (KDa)	D.S. (%)
PVM/MA	95,5*	-
PVM/MA-PEG2	103,11	7,4
PVM/MA-PEG6	107,69	11,3
PVM/MA-PEG10	104,79	8,9
PVM/MA-mPEG2	102,98	7,3

(*) Peso molecular obtenido por SEC/MALLS.

Una vez que se purificaron y caracterizaron los conjugados de polímeros de éster, se llevó a cabo la preparación de las nanopartículas y también se realizó el estudio de sus propiedades.

25 Ejemplo 4

Preparación de nanopartículas que comprenden una matriz de un conjugado de polímero de éster de PVM/MA

Preparación de nanopartículas vacías que comprenden una matriz de un conjugado de polímero de éster de PVM/MA (PEG conj o mPEG conj)

5 La preparación de las nanopartículas se llevó a cabo de la siguiente manera. Se disolvieron 100 mg de polímeros de éster preformados de PVM/MA conjugados con polietilenglicol 2.000, polietilenglicol 6.000, polietilenglicol 10.000 [las razones de PEG2:(PVM/MA), PEG6:(PVM/MA) y PEG10:(PVM/MA) usadas fueron 1:20] o metoxi-polietilenglicol 2.000 [la razón de mPEG2:(PVM/MA) fue de 1:5] en 5 ml de acetona y se desolvataron mediante la adición de 10 ml de una mezcla hidroalcohólica 1:1 (v/v) (agua/etanol) que contenía el 1% (v/v) de una disolución acuosa de CaCl₂ al 0,8% (p/v) bajo agitación magnética a temperatura ambiente. Los disolventes orgánicos se eliminaron por evaporación a presión reducida (Büchi R210, Suiza). Las suspensiones resultantes se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm y se purificaron por centrifugación (Sigma 3 K30, Alemania) a 17.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se eliminaron y los sedimentos se resuspendieron en agua. La etapa de purificación se repitió dos veces. Finalmente, las formulaciones se congelaron y se secaron por congelación (Genesis 12EL, Virtis, EE.UU.) usando sacarosa (5% p/v) como crioprotector. De esta manera, se obtuvieron nanopartículas no cargadas a partir de conjugados de polímeros de éster preformados de PVM/MA con PEG2, PEG6, PEG10 o mPEG2: formulaciones de PEG2 conj, PEG6 conj, PEG10 conj y mPEG2 conj, respectivamente.

Preparación de nanopartículas que comprenden una matriz de un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con metoxi-polietilenglicol 2.000 que encapsulan paclitaxel (mPEG2-PTX conj)

20 Se disolvieron 100 mg de conjugado de polímero de éster preformado de PVM/MA con metoxi-polietilenglicol 2.000 [razón de mPEG2:(PVM/MA) de 1:5] en 4 ml de acetona. En paralelo, se dispersaron 10 mg de paclitaxel en 1 ml de acetona. La disolución del conjugado y la dispersión de paclitaxel se mezclaron con agitación magnética a temperatura ambiente, y luego se formaron las nanopartículas mediante la adición de 10 ml de una mezcla hidroalcohólica 1:1 (v/v) (agua/etanol) que contenía el 1% (v/v) de una disolución acuosa de CaCl₂ al 0,8% (p/v). Los disolventes orgánicos se eliminaron por evaporación a presión reducida (Büchi R210, Suiza). Las suspensiones resultantes se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm y se purificaron por centrifugación (Sigma 3 K30, Alemania) a 17.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se eliminaron y los sedimentos se resuspendieron en agua. La etapa de purificación se repitió dos veces. Finalmente, las formulaciones se congelaron y se secaron por congelación (Genesis 12EL, Virtis, EE.UU.) usando sacarosa (5% p/v) como crioprotector. Estas son formulaciones de nanopartículas de MPEG2-PTX conj.

30 Preparación de nanopartículas que comprenden una matriz de un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con polietilenglicol 2.000 que encapsulan paclitaxel (PEG2-PTX conj)

35 Se disolvieron 100 mg de conjugado de polímero de éster preformado de PVM/MA con polietilenglicol 2.000 [razón de PEG2:(PVM/MA) de 1:20] en 4 ml de acetona. En paralelo, se dispersaron 10 mg de paclitaxel en 1 ml de acetona. La disolución del conjugado y la dispersión de paclitaxel se mezclaron con agitación magnética a temperatura ambiente, y luego se formaron las nanopartículas mediante la adición de 10 ml de una mezcla hidroalcohólica 1:1 (v/v) (agua/etanol) que contenía el 1% (v/v) de una disolución acuosa de CaCl₂ al 0,8% (p/v). Los disolventes orgánicos se eliminaron por evaporación a presión reducida (Büchi R210, Suiza). Las suspensiones resultantes se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm y se purificaron por centrifugación (Sigma 3 K30, Alemania) a 17.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se eliminaron y los sedimentos se resuspendieron en agua. La etapa de purificación se repitió dos veces. Finalmente, las formulaciones se congelaron y se secaron por congelación (Genesis 12EL, Virtis, EE.UU.) usando sacarosa (5% p/v) como crioprotector. Estas son formulaciones de nanopartículas de PEG2-PTX conj.

Preparación de nanopartículas que comprenden una matriz de un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con metoxi-polietilenglicol 2.000 que encapsulan docetaxel (mPEG2-DTX conj)

45 Se disolvieron 100 mg de conjugado de polímero de éster preformado de PVM/MA con metoxi-polietilenglicol 2.000 [razón de mPEG2:(PVM/MA) de 1:5] en 4 ml de acetona. En paralelo, se dispersaron 10 mg de docetaxel en 1 ml de acetona. La disolución del conjugado y la dispersión de docetaxel se mezclaron con agitación magnética a temperatura ambiente, y luego se formaron las nanopartículas mediante la adición de 10 ml de una mezcla hidroalcohólica 1:1 (v/v) (agua/etanol) que contenía el 1% (v/v) de una disolución acuosa de CaCl₂ al 0,8% (p/v). Los disolventes orgánicos se eliminaron por evaporación a presión reducida (Büchi R210, Suiza). Las suspensiones resultantes se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm y se purificaron por centrifugación (Sigma 3 K30, Alemania) a 17.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se eliminaron y los sedimentos se resuspendieron en agua. La etapa de purificación se repitió dos veces. Finalmente, las formulaciones se congelaron y se secaron por congelación (Genesis 12EL, Virtis, EE.UU.) usando sacarosa (5% p/v) como crioprotector. Estas son formulaciones de nanopartículas de MPEG2-DTX conj.

55 Preparación de nanopartículas que comprenden una matriz de un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con polietilenglicol 2.000 que encapsulan docetaxel (PEG2-DTX conj)

Se disolvieron 100 mg de conjugado de polímero de éster preformado de PVM/MA con polietilenglicol 2.000 [razón de PEG2:(PVM/MA) de 1:20] en 4 ml de acetona. En paralelo, se dispersaron 10 mg de docetaxel en 1 ml de

- 5 acetona. La disolución del conjugado y la dispersión de docetaxel se mezclaron luego con agitación magnética a temperatura ambiente, y las nanopartículas se formaron mediante la adición de 10 ml de una mezcla hidroalcohólica 1:1 (v/v) (agua/etanol) que contenía el 1% (v/v) de una disolución acuosa de CaCl₂ al 0,8% (w/v). Los disolventes orgánicos se eliminaron por evaporación a presión reducida (Büchi R210, Suiza). Las suspensiones resultantes se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm y se purificaron por centrifugación (Sigma 3 K30, Alemania) a 17.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se eliminaron y los sedimentos se resuspendieron en agua. La etapa de purificación se repitió dos veces. Finalmente, las formulaciones se congelaron y se secaron por congelación (Genesis 12EL, Virtis, EE.UU.) usando sacarosa (5% p/v) como crioprotector. Estas son formulaciones de nanopartículas de PEG2-DTX conj.
- 10 Preparación de nanopartículas que comprenden una matriz de un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con metoxi-polietilenglicol 2.000 que encapsulan camptotecina (mPEG2-CPT conj)
- 15 Se disolvieron 100 mg de conjugado de polímero de éster preformado de PVM/MA con metoxi-polietilenglicol 2.000 [razón de mPEG2:(PVM/MA) de 1:5] en 4 ml de acetona. En paralelo, se dispersaron 3 mg de camptotecina en 1 ml de acetona y se sonicaron durante 30 s. La disolución del conjugado y la dispersión de la camptotecina se mezclaron con agitación magnética a temperatura ambiente, y luego se formaron las nanopartículas mediante la adición de 10 ml de una mezcla hidroalcohólica 1:1 (v/v) (agua/etanol) que contenía el 3% (v/v) de una disolución acuosa de CaCl₂ al 0,8% (p/v). Después de la eliminación de los disolventes orgánicos a presión reducida (Büchi R210, Suiza), las suspensiones resultantes se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm y se purificaron por centrifugación (Sigma 3 K30, Alemania) a 17.000 rpm durante 20 min. Los sobrenadantes se eliminaron y los sedimentos se resuspendieron en agua. Finalmente, las formulaciones se congelaron y se secaron por congelación (Genesis 12EL, Virtis, EE.UU.) usando sacarosa (5% p/v) como crioprotector. Estas son formulaciones de nanopartículas de MPEG2-CPT conj.
- 20

Ejemplo 5

Caracterización físicoquímica de las nanopartículas

- 25 Para realizar estos estudios, se usaron las formulaciones de nanopartículas descritas en los ejemplos 1, 2 y 4.

5.1 Material y métodos

- 30 Se determinaron el diámetro hidrodinámico medio de las nanopartículas y el potencial zeta mediante espectroscopia de correlación de fotones (PCS) y anemometría doppler láser electroforética, respectivamente, usando un sistema analizador Zetasizer (Brookhaven Instruments Corporation, Nueva York, EE.UU.). El diámetro de las nanopartículas se determinó después de la dispersión en agua ultrapura (1:10) y se midió a 25°C mediante un ángulo de dispersión de la luz dinámica de 90°C. El potencial zeta se determinó en el mismo equipo tal como sigue: se diluyeron 200 µl de las mismas muestras en 2 ml de una disolución de KCl 0,1 mM.

- 35 El estudio de la morfología superficial de las formulaciones también se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en un microscopio electrónico de barrido digital Zeiss DSM940 (Oberkochen, Alemania) junto con un sistema de imagen digital (Point Electronic GmbH, Alemania). Previamente, las nanopartículas se diluyeron con agua desionizada y se centrifugaron a 17.000 rpm (Sigma 3 K30, Alemania) durante 20 minutos a 4°C. El sedimento se secó y se ensombreció con una capa de oro de 9 nm en un instrumento de recubrimiento por pulverización catódica Emitech K 550 (Ahsford, Reino Unido). Finalmente, se calculó el rendimiento de la formación de nanopartículas por gravimetría a partir de la diferencia entre la cantidad inicial del polímero usado para preparar nanopartículas y el peso de las muestras secadas por congelación.
- 40

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(\frac{NP_{\text{final}}}{\text{Polímero inicial}} \right) \times 100$$

Contenido de paclitaxel de las nanopartículas

- 45 Se cuantificó la cantidad de paclitaxel cargado en las nanopartículas por HPLC-UV en un instrumento Agilent modelo 1200 serie LC y un detector de matriz de diodos fijado a 228 nm. El sistema cromatográfico estaba equipado con una columna Phenomenex Gemini C18 de 150 mm x 3 mm de fase inversa (tamaño de partícula de 5 µm) y una precolumna (Phenomenex SecurityGuard C18). La fase móvil, bombeada a 0,5 ml/min, fue una mezcla de tampón fosfato (0,01 M, pH 2) y acetonitrilo (50:50, v/v). La columna se ajustó a 30°C y el volumen de inyección fue de 100 µl. Se usó docetaxel como patrón interno. Las curvas de calibración se diseñaron a lo largo del intervalo de 80 y 7000 ng/ml ($r^2 > 0,999$). El límite de cuantificación se calculó que era de 40 ng/ml. Para el análisis, las

nanopartículas se solubilizaron con acetonitrilo (1:5 v/v). Las muestras se transfirieron a viales de inyector automático, se taparon y se colocaron en el inyector automático de HPLC. Cada muestra se analizó por triplicado y los resultados se expresaron como la cantidad de paclitaxel (en μg) por mg de nanopartículas.

Contenido de docetaxel de las nanopartículas

5 Se cuantificó la cantidad de docetaxel cargado en las nanopartículas por HPLC-UV en un instrumento Agilent modelo 1200 serie LC y un detector de matriz de diodos fijado a 228 nm. El sistema cromatográfico estaba equipado con una columna Phenomenex Gemini C18 de 150 mm x 3 mm de fase inversa (tamaño de partícula de 5 μm) y una precolumna (Phenomenex SecurityGuard C18). La fase móvil, bombeada a 0,5 ml/min, fue una mezcla de tampón fosfato (0,01 M, pH 2) y acetonitrilo (50:50, v/v). La columna se colocó a 30°C y el volumen de inyección fue de 100 μL . Se usó paclitaxel como patrón interno. Las curvas de calibración se diseñaron a lo largo del intervalo de 1,25 y 320 $\mu\text{g/ml}$ ($r^2 > 0,999$). El límite de cuantificación se calculó que era de 60 ng/ml. Para el análisis, las nanopartículas se solubilizaron con acetonitrilo (1:8 v/v). Las muestras se transfirieron a viales de inyector automático, se taparon y se colocaron en el inyector automático de HPLC. Cada muestra se analizó por triplicado y los resultados se expresaron como la cantidad de docetaxel (en μg) por mg de nanopartículas.

15 Contenido de camptotecina de las nanopartículas

Se cuantificó la cantidad de camptotecina cargada en las nanopartículas por HPLC-FLD en un instrumento Agilent modelo 1100 serie LC y un detector de fluorescencia ajustado a la excitación y emisión de 380 y 418 nm, respectivamente. El sistema cromatográfico estaba equipado con una columna Phenomenex Gemini C18 de 150 mm x 3 mm de fase inversa (tamaño de partícula 5 μm) y una precolumna (Phenomenex SecurityGuard C18). La fase móvil, bombeada a 1 ml/min, consistió en una mezcla 50:50 (v/v) de acetonitrilo y ácido trifluoroacético al 0,01% (v/v). La columna se colocó a 30°C y el volumen de inyección fue de 20 μl . Las curvas de calibración se diseñaron a lo largo del intervalo de 0,48 y 8000 ng/ml ($r^2 > 0,999$). El límite de cuantificación se calculó que era de 1,3 ng/ml.

25 Para el análisis, las nanopartículas se solubilizaron con acetonitrilo (1:10, v/v). Las muestras se transfirieron a viales de inyector automático, se taparon y se colocaron en el inyector automático de HPLC. Cada muestra se analizó por triplicado y los resultados se expresaron como la cantidad de camptotecina (en μg) por mg de nanopartículas.

5.2 Resultados

Las características fisicoquímicas principales de las diferentes formulaciones de nanopartículas no cargadas se resumen en la tabla 5.

30 Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de las diferentes nanopartículas de PVM/MA no cargadas sintetizadas. Datos expresados como media \pm D.E. (n = 3).

	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Contenido de ligando ($\mu\text{g/mg}$ de NP)*	Rendimiento (%)
NP	297 \pm 1	0,025 \pm 0,015	-40 \pm 2	-	74
PEG2 trad	148 \pm 2	0,095 \pm 0,009	-41 \pm 3	59	71
PEG6 trad	131 \pm 1	0,104 \pm 0,011	-40 \pm 0,2	89	66
PEG10 trad	208 \pm 1,4	0,081 \pm 0,023	-43 \pm 0,5	60	82
PEG2 conj	134 \pm 1	0,163 \pm 0,015	-44 \pm 1	27 \pm 1	58
PEG6 conj	230 \pm 1	0,082 \pm 0,008	-35 \pm 1	39 \pm 1	77
PEG10 conj	322 \pm 8	0,231 \pm 0,018	-32 \pm 1	35 \pm 1	64
mPEG2 conj	259 \pm 6	0,200 \pm 0,040	-33 \pm 4	95 \pm 1	81

* Contenido de ligando (molécula terminada en hidroxilo) en conjugados de polímeros calculado por $^1\text{H-RMN}$.

35 Puede observarse que el contenido de la molécula terminada en hidroxilo (ligando) en las nanopartículas de mPEG2-conj es significativamente mayor en comparación con el resto de las nanopartículas de conjugados de polímeros. Esto es lógico porque la cantidad inicial de mPEG2 usada para formar el conjugado de polímero de éster de PVM/MA es mucho mayor respecto a PEG2, PEG6 o PEG10.

Caracterización de las nanopartículas cargadas de paclitaxel

40 Las características fisicoquímicas principales de las diferentes formulaciones de nanopartículas cargadas con paclitaxel (PEG-PTX) se resumen en la tabla 6. En primer lugar, las nanopartículas que contienen el conjugado de PEG2 (conjugado de polímero de éster de PVM/MA con PEG2) mostraron tamaños más grandes que las nanopartículas con conjugado de mPEG2 (conjugado de polímero de éster de PVM/MA con mPEG2). Para el conjugado de PEG2, los tamaños eran cercanos a 400 nm, mientras que para la otra formulación que contenía el

conjugado de mPEG2 los tamaños eran más pequeños, de alrededor de 300 nm.

5 Con respecto al potencial zeta, las nanopartículas cargadas que contienen conjugado de mPEG2 presentaron una carga superficial ligeramente más negativa, de alrededor de -38 mV. Las nanopartículas formuladas con conjugado de PEG2 mostraron una carga superficial de alrededor de -33 mV. Además, el rendimiento del proceso se calculó que era de alrededor del 70% para ambas formulaciones. El enfoque en la cantidad de PTX cargada en las nanopartículas, para los conjugados de mPEG2 y PEG2, se calculó que era de alrededor de 160 µg/mg de NP.

Tabla 6 Caracterización fisicoquímica de las diferentes nanopartículas de PVM/MA. Datos expresados como media ± S.D. (n = 3).

Formulaciones	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Carga de PTX (µg de PTX/mg de NP)	Rendimiento (%)
NP	297 ±1	0,025	-40 ± 2	-	74
PTX	177±3	0,038	-44,2±7,1	78,1±3,2	62
PEG2 trad	148±2	0,095±0,009	-41±3	-	71
PEG6 trad	131±1	0,104±0,011	-40±0,2	-	66
PEG10 trad	208±1,4	0,081±0,023	-43±0,5	-	82
PEG2-PTX trad	178±4	0,154	-40,3±1,1	150,1±5,2	60±4
PEG6-PTX trad	180±5	0,173	-39,5±4,2	144,1±3,1	64
PEG10-PTX trad	188±2	0,136	-41,1±1,3	144,5±6,4	63
PEG2 conj	134±1	0,163±0,015	-44±1	-	58
mPEG2 conj	259±6	0,200±0,040	-33±4	-	81
PEG2-PTX conj	430±8	0,280	-33±6	152±8	69±8
mPEG2-PTX conj	318±9	0,230	-38±4	160±9	70±4

10 Si se compara el rendimiento de nanopartículas entre las formulaciones de PEG2-PTX trad y PEG2-PTX conj, el porcentaje de nanopartículas formadas es mayor en el caso de usar el conjugado de polímero de éster de PVM/MA con PEG2.

Caracterización de las nanopartículas cargadas de docetaxel

15 Se prepararon con éxito nanopartículas de conjugados mediante el método de desplazamiento de disolvente. Las características fisicoquímicas principales de las diferentes formulaciones de nanopartículas cargadas con docetaxel (PEG-DTX) se resumen en la tabla 7. En primer lugar, las nanopartículas cargadas que contienen el conjugado de PEG2 (conjugado de polímero de éster de PVM/MA con PEG2) mostraron tamaños más grandes que las nanopartículas cargadas con conjugado de mPEG2 (conjugado de polímero de éster de PVM/MA con mPEG2). Para el PEG2, los tamaños eran cercanos a 400 nm, mientras que para la otra formulación que contenía mPEG2 los tamaños eran más pequeños, de alrededor de 300 nm.

20 Con respecto al potencial zeta, las nanopartículas que contienen mPEG2 presentaron una carga superficial ligeramente más negativa, de alrededor de -39 mV. Las nanopartículas formuladas con conjugado de PEG2 mostraron una carga superficial de alrededor de -33 mV.

25 Además, el rendimiento del procedimiento se calculó que era de alrededor del 60% para ambas formulaciones. Centrándose en la cantidad de docetaxel cargado en las nanopartículas, para el conjugado de mPEG2 y PEG2 se calculó que era de alrededor de 100 µg/mg de NP.

Tabla 7. Caracterización fisicoquímica de las diferentes nanopartículas de PVM/MA. Datos expresados como media ± D.E. (n = 3).

Formulaciones	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Carga DTX (µg de DTX/mg de NP)	Rendimiento (%)
NP	297±1	0,025±0,015	-40±2	-	74
DTX	219±2	0,128±0,029	-43±1	60±2	65
PEG2 trad	148±2	0,095±0,009	-41±3	-	71
PEG2-DTX trad	203±4	0,060±0,010	-36±4	110±3	62±3

PEG2 conj	134±1	0,163±0,015	-44±1	-	58
mPEG2 conj	259±6	0,200±0,040	-33±4	-	81
PEG2-DTX conj.	415±4	0,246±0,024	-33±1	94±5	64±9
mPEG2-DTX conj	339±7	0,083±0,038	-39±5	100±6	60±9

Caracterización de las nanopartículas cargadas de camptotecina

Las características fisicoquímicas de las nanopartículas resultantes que contienen camptotecina se resumen en la tabla 8. Cuando las nanopartículas se cargaron con camptotecina en nanopartículas de mPEG2 conj (conjugado de polímero de éster de PVM/MA con mPEG2), el tamaño medio fue de aproximadamente 195 nm. El índice de polidispersidad (PDI) fue inferior a 0,3, lo que implica formulaciones homogéneas. Con respecto al potencial zeta de las nanopartículas, las formulaciones se formaron por partículas con cargas superficiales negativas, de alrededor de -36 mV. Además, el rendimiento del procedimiento fue de aproximadamente el 70%. Con respecto a la carga de fármaco, la cantidad de camptotecina encapsulada en nanopartículas de los conjugados alcanzó 11 µg/mg. La cantidad de camptotecina cargada en nanopartículas pegiladas tradicionales fue ligeramente mayor para PEG2-CPT tradicional que para PEG6-CPT tradicional, alcanzando 9 µg/mg de nanopartículas.

Tabla 8. Caracterización fisicoquímica de las diferentes nanopartículas. Datos expresados como media ± D.E. (n = 3).

Formulaciones	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Carga CPT (µg de CPT/mg de NP)	Rendimiento (%)
NP	297±1	0,025±0,015	-40±2	-	74
CPT	150	0,190	-33	2,9	36,5
PEG2 trad	148±2	0,095±0,009	-41±3	-	71
PEG6 trad	131±1	0,104±0,011	-40±0,2	-	66
PEG2-CPT trad	120±2	0,130±0,020	-42±4	8,9±1,1	61±7
PEG6-CPT trad	118±5	0,120±0,030	-35±6	8,2±0,9	54±9
mPEG2 conj	259±6	0,200±0,040	-33±4	-	81
mPEG2-CPT conj	195±2	0,230±0,030	-36±3	10,9±0,2	69±4

El análisis morfológico mediante microscopía electrónica de barrido (figura 3) mostró que todos los tipos de nanopartículas de poli(anhídrido) consistían en una población homogénea de partículas esféricas de un tamaño similar al medido por espectroscopia de correlación de fotones. La superficie de las nanopartículas parecía ser lisa, sin áreas rugosas visibles en su superficie.

Ejemplo 6

Estudios *in vitro* e *in vivo* de docetaxel

6.1 Estudio de liberación *in vitro* de docetaxel

Se realizaron experimentos de liberación, en condiciones de sumidero, a 37°C utilizando fluidos gástrico (SGF; pH 1,2; pepsina al 0,32% p/v) e intestinal (SIF; pH 6,8; pancreatina al 1% p/v) simulados que contenían el 0,5% de polisorbato 80 (Tween® 80) como agente solubilizante para docetaxel. Los estudios se realizaron con agitación en una incubadora de agitación Vortemp 56™ (Labnet International Inc., NJ, EE.UU.) después de la dispersión de las nanopartículas en el medio apropiado.

Para cada punto de tiempo, se resuspendieron 50 µg de docetaxel formulado en nanopartículas en 2 ml del fluido simulado correspondiente. Las formulaciones sometidas a ensayo fueron nanopartículas de DTX (nanopartículas de PVM/MA convencionales que encapsulan docetaxel), PEG2-DTX trad (nanopartículas de PVM/MA tradicionales pegiladas con PEG2 que encapsulan docetaxel), mPEG2-DTX conj. (nanopartículas de conjugado de polímero de éster de PVM/MA con mPEG2 que encapsulan docetaxel) y PEG2-DTX conj (nanopartículas de conjugado de polímero de éster de PVM/MA con PEG2 que encapsulan docetaxel).

La concentración de las nanopartículas en el medio de liberación se ajustó con el fin de evaluar las condiciones de hundimiento para docetaxel. Las diferentes formulaciones se mantuvieron en el SGF durante 2 horas y durante 12 horas en SIF. En diferentes puntos de tiempo, se recogieron tubos de muestra y se centrifugaron a 27.000 xg durante 20 minutos. Finalmente, se filtraron los sobrenadantes y se cuantificó la cantidad de docetaxel liberado de las formulaciones por HPLC (curvas de calibración de docetaxel libre en sobrenadantes obtenidos de SGF y SIF, $r^2 > 0,999$). Los perfiles de liberación se expresaron en términos de porcentaje de liberación acumulada y se representaron gráficamente frente al tiempo.

6.2 Estudios farmacocinéticos *in vivo* de nanopartículas que encapsulan docetaxel en ratones Balb/c

Administración de nanopartículas cargadas con DTX a ratones.

Se realizaron estudios farmacocinéticos en ratones hembra Balb/c (20-22 g) obtenidos de Harlan (Barcelona, España). Los estudios se realizaron de acuerdo con las directrices y políticas éticas para investigaciones en animales de laboratorio aprobadas por el Comité Ético para la Experimentación Animal de la Institución (número de protocolo E21-12) de acuerdo con la legislación europea sobre experimentos con animales (86/609/UE). Antes del experimento, los animales se alimentaron de manera adaptativa durante 1 semana con libre acceso a alimentos y agua potable ($22 \pm 2^\circ\text{C}$; ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad; 50-60% de humedad relativa). Antes de la administración oral de las formulaciones, los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche para evitar la interferencia con la absorción, permitiendo libre acceso al agua.

Para el estudio farmacocinético, los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos basándose en los momentos de las tomas de muestras de sangre. Cada punto de tiempo correspondió a 3 animales. Los grupos experimentales fueron nanopartículas de DTX, PEG2-DTX trad, mPEG2-DTX conj y PEG2-DTX conj. Como controles, un grupo de animales recibió Taxotere® por vía intravenosa (i.v.) y otro grupo se trató con la formulación comercial por vía oral. Cada animal recibió la cantidad equivalente de docetaxel a una dosis de 30 mg/kg de peso corporal o bien por vía oral con una aguja roma a través del esófago en el estómago o bien por vía intravenosa a través de la vena de la cola.

Se recogieron muestras de sangre a los tiempos establecidos después de la administración (0, 10 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 3 h, 6 h, 8 h, 24 h, 48 h y 72 h). Se usó EDTA como agente anticoagulante. El volumen de sangre se recuperó por vía intraperitoneal con un volumen igual de solución salina normal precalentada a la temperatura corporal. Las muestras se colocaron inmediatamente en hielo y se centrifugaron a 2.500 xg durante 10 minutos. El plasma se separó en tubos limpios y se mantuvo congelado a -20°C hasta el análisis por HPLC.

Cuantificación por HPLC de DTX en muestras de plasma

Se determinó la cantidad de docetaxel en plasma por HPLC-UV. Se usaron curvas de calibración para la conversión del área cromatográfica de DTX/PTX en concentración. Se prepararon muestras de calibrador y control de calidad añadiendo volúmenes apropiados de docetaxel patrón en disolución de etanol a plasma libre de fármaco. Se diseñaron curvas de calibración en el intervalo de 100 a 6250 ng/ml ($r^2 > 0,999$). Se mezcló una alícuota (200 μl) de plasma con 25 μl de disolución patrón interna (paclitaxel, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en etanol, previamente evaporada). Después de mezclar con vórtex, se logró la extracción líquido-líquido mediante la adición de 4 ml de terc-butil metil éter después de agitación suave con vórtex (1 min). La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 3000 xg, y luego, la capa orgánica se transfirió a un tubo limpio y se evaporó hasta que se secó (Savant, Barcelona, España). Finalmente, el residuo se disolvió en 125 μl de disolución de reconstitución (tampón acetonitrilo-fosfato 0,01 M pH = 2; 50:50, v/v) y se transfirió a viales de inyector automático, se tapó y se colocó en el inyector automático de HPLC. Se inyectó una parte alícuota de 100 μl de cada muestra en la columna de HPLC.

35 Análisis de datos farmacocinéticos

El análisis farmacocinético de la concentración en plasma representada gráficamente frente a los datos de tiempo, obtenidos después de la administración de las diferentes formulaciones de DTX, se analizó utilizando un modelo no compartimental con el software WinNonlin 5.2 (Pharsight Corporation, EE.UU.). Se estimaron los siguientes parámetros: concentración en plasma máxima (C_{max}), tiempo en que se alcanza la concentración máxima (T_{max}), área bajo la curva de concentración-tiempo desde el tiempo 0 hasta ∞ (AUC), tiempo de residencia medio (MRT), aclaramiento (CI), volumen de distribución (V) y semivida en la fase terminal ($t_{1/2Z}$).

Además, se estimó la biodisponibilidad oral relativa, F (%), de docetaxel mediante la siguiente ecuación:

$$F(\%) = \frac{AUC_{\text{oral}}}{AUC_{\text{i.v.}}} \times 100$$

donde AUC i.v. y AUC oral correspondían a las áreas bajo la curva para las administraciones intravenosa y oral, respectivamente.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm D.E. de al menos tres experimentos. Se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de la U de Mann-Whitney para investigar las diferencias estadísticas. En todos los casos, se consideró que $p < 0,05$ era estadísticamente significativo. Todo el procesamiento de datos se realizó usando el programa estadístico GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, EE.UU.).

6.3 Resultados

Estudio de liberación *in vitro* de docetaxel

Se evaluaron los perfiles de liberación de docetaxel de formulaciones de nanopartículas después de su incubación en dos medios diferentes: fluidos gástrico e intestinal simulados que contenían Tween 80 al 0,5% (p/v) como agente solubilizante. La figura 4 ilustra los perfiles de liberación de docetaxel a partir de nanopartículas de DTX, formulaciones de nanopartículas de PEG2-DTX trad, PEG2-DTX conj y mPEG2-DTX conj como porcentaje acumulado de fármaco liberado en función del tiempo. En todos los casos, cuando las nanopartículas se dispersaron en SGF, no se observó liberación de fármaco. En cambio, cuando las nanopartículas se dispersaron en el SIF, se liberó docetaxel.

Para PEG2-DTX trad, el patrón de liberación en SIF se caracterizó por un importante efecto de estallido de aproximadamente el 75% del fármaco cargado en los primeros 30 minutos, seguido de una fase de liberación más sostenida de hasta 10 horas. Por otro lado, para las nanopartículas de DTX, las curvas de liberación de docetaxel en SIF mostraron una descarga de docetaxel más lenta que la de PEG2-DTX trad, seguida de una liberación más constante hasta el final del estudio en el que se liberó casi toda su carga.

Tanto las formulaciones de nanopartículas de PEG2-DTX conj como de mPEG2-DTX conj mostraron un perfil de liberación similar. En presencia de SIF, la liberación de docetaxel presentó un patrón de liberación bifásico caracterizado por una rápida liberación de estallido inicial de hasta el 90% del fármaco cargado, seguido de una fase de liberación más sostenida. Se obtuvo una liberación completa de DTX para todas las muestras a 10-11 horas después del inicio del estudio.

Estudios farmacocinéticos de nanopartículas que contienen docetaxel en ratones Balb/c

El perfil de concentración en plasma-tiempo de docetaxel después de la administración i.v. de Taxotere® (dosis única de 30 mg/kg) a ratones Balb/c hembra se muestra en la figura 5. La concentración en plasma de fármaco disminuyó rápidamente con el tiempo de forma bifásica y los datos se ajustaron a un modelo no compartimental. Los niveles de docetaxel en plasma fueron cuantificables hasta 12 horas después de la administración.

La figura 6 muestra los perfiles de concentración en plasma frente al tiempo después de la administración oral de docetaxel (dosis única de 30 mg/kg) a ratones Balb/c cuando se administra como Taxotere® comercial, o se encapsula en las diferentes formulaciones de nanopartículas de poli(anhídrido): en nanopartículas de PVM/MA convencionales (formulación de DTX), nanopartículas de PVM/MA tradicionales pegiladas con PEG2 (PEG2-DTX trad) o nanopartículas de conjugados de polímeros de éster de PVM/MA con PEG2 (PEG2-DTX conj) o con mPEG2 (mPEG2-DTX conj). Cuando se administró Taxotere® comercial a ratones por vía oral, se encontró que los niveles de docetaxel en plasma estaban siempre por debajo del límite de cuantificación de la técnica analítica cromatográfica. Por el contrario, cuando el docetaxel se cargó en nanopartículas, estas formulaciones mostraron niveles en plasma sostenidos. En todos los casos, hubo un rápido aumento inicial en los niveles en plasma anticancerígenos durante las primeras 1,5-2 horas, alcanzando la C_{max} , seguido de un lento declive que se prolongó durante al menos 8 horas para la formulación de DTX (véase la figura 6A), y aproximadamente 70 horas para las formulaciones de PEG2-DTX trad, PEG2-DTX conj y mPEG2-DTX conj (véase la figura 6B). Al comparar PEG2-DTX trad con PEG2-DTX conj y mPEG2-DTX conj, los niveles en plasma de docetaxel alcanzados con nanopartículas de conjugados de polímeros de éster de PVM/MA con PEG2000 y mPEG2000 fueron más altos que los de las nanopartículas de PVM/MA tradicionales pegiladas con PEG2000.

La tabla 9 resume los parámetros farmacocinéticos calculados con un análisis no compartimental de los datos experimentales obtenidos después de la administración de las diferentes formulaciones de docetaxel a ratones. En primer lugar, para la formulación comercial administrada por medio de la vía i.v., el valor medio de AUC fue de 143 $\mu\text{g h/ml}$. La concentración máxima (C_{max}) fue de 198 $\mu\text{g/ml}$ y T_{max} de 0 h. El MRT fue de 1,4 horas y la semivida de la fase terminal ($t_{1/2z}$) de la curva se estimó que era de 1,5 h.

Por otro lado, los valores de C_{max} de docetaxel en las nanopartículas de poli(anhídrido) estuvieron entre 1,3 y 2 $\mu\text{g/ml}$, siendo el orden de clasificación de este parámetro: mPEG2-DTX conj = PEG2-DTX conj > PEG2-DTX trad > DTX. Además, se alcanzó la C_{max} a las 0 h después de la administración i.v. de Taxotere® y se retrasó hasta 0,8 h para la formulación de DTX, y 1,5-2 h para las formulaciones de mPEG2-DTX conj y PEG2-DTX conj.

Comparando las formulaciones de conjugados y tradicionales de PEG, para PEG2-DTX conj y mPEG2-DTX conj, los valores de AUC fueron de 1,3 y 1,8 veces, respectivamente, más altos que el AUC obtenida para PEG2-DTX trad, lo que demuestra una mayor capacidad para promover la absorción oral del taxano. Además, el tiempo de residencia medio (MRT) del fármaco en plasma y su semivida de la fase terminal ($t_{1/2z}$) se prolongaron enormemente cuando se administraron en las formulaciones de conjugado de polímeros de éster (mPEG2-DTX conj, PEG2-DTX conj) por vía oral.

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos de docetaxel obtenidos después de la administración intravenosa y oral de Taxotere® comercial y formulado en diferentes nanopartículas a una única dosis de 30 mg/kg a ratones Balb/c hembra. Datos expresados como media \pm D.E. (n = 3)

Formulación	Vía	AUC ($\mu\text{g h/ml}$)	Cmax ($\mu\text{g/ml}$)	Tmax (h)	t _{1/2z} (h)	Cl (ml/h)	V (ml)	MRT (h)	Fr
Taxotere®	i.v.	142,6±0,8	197,9±38	0	1,5±0,1	3,9±0,3	8,2±0,9	1,4±0,1	100
Taxotere®	oral	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DTX	oral	6,9±1,8	1,3±0,5	0,8	2,2±0,4	4,9±1,2	15,4±2,3	4,2±0,3	4,9
PEG2-DTX trad	oral	45,9±3,7	1,5±0,4	2	34,7±9,8	4,2±0,3	192,4±19,4	43,5±9,9	32,2
PEG2-DTX conj.	oral	58,1±7,2	1,7±0,2	2	35,8±9,1	6,0±2,4	225,1±86,1	58,7±79	40,7
mPEG2-DTX conj	oral	80,6±9,1	1,7±0,1	1,5	43,1±4,4	4,2±0,5	240,1±87,9	61,1±7,7	56,5

AUC: área bajo la curva de concentración-tiempo desde el tiempo 0 hasta ∞ ; Cmax: concentración en plasma máxima; Tmax: tiempo hasta alcanzar la concentración en plasma máxima; t_{1/2z}: semivida de la fase terminal; Cl: aclaramiento; V: volumen de distribución; MRT: tiempo de residencia medio; Fr: biodisponibilidad oral relativa. N.D.: no detectado.

De la misma manera, el volumen de distribución (V) del fármaco anticancerígeno cuando se cargó en nanopartículas de conjugado (225 ml para PEG2-DTX conj y 240 ml para mPEG2-DTX conj) fue mayor que cuando el fármaco se administró por vía intravenosa en forma de Taxotere® (8 ml), y mayor que cuando el fármaco se administró por vía oral encapsulado en nanopartículas de PVM/MA convencionales (15 ml) o nanopartículas de PVM/MA pegiladas tradicionales (192 ml). Por el contrario, el aclaramiento de docetaxel fue siempre similar e independiente de tanto la formulación como la vía de administración utilizada.

Finalmente, se calculó que la biodisponibilidad oral relativa del docetaxel administrado en nanopartículas pegiladas tradicionales (PEG2-DTX trad) es de alrededor del 32%. Para las nanopartículas no pegiladas, se encontró que la biodisponibilidad oral era solo del 5%. Para formulaciones de conjugados, los datos obtenidos fueron altos, variando de desde el 40 hasta el 57% para PEG2-DTX conj y mPEG2-DTX conj. Sorprendentemente, las formulaciones preparadas a partir de los conjugados de polímeros de éster mejoraron la biodisponibilidad oral relativa de docetaxel.

En resumen, las formulaciones de nanopartículas de conjugados y tradicionales de PEG fueron capaces de cargar docetaxel, presentando características adecuadas para su administración oral. Cuando se administraron por vía oral, estas nanopartículas ofrecieron niveles en plasma prolongados y sostenidos de docetaxel durante 3 días. Sin embargo, para las nanopartículas “desnudas”, la concentración en plasma de docetaxel fue inicialmente alta pero disminuyó rápidamente y no se encontraron niveles cuantificables 12 h después de la administración. Además, los estudios farmacocinéticos revelaron una mayor capacidad de los nanoportadores de conjugados para mejorar la biodisponibilidad oral de docetaxel, especialmente para mPEG2-DTX conj, que alcanzó una biodisponibilidad oral cercana al 57%, 1,8 veces más que la de las nanopartículas pegiladas tradicionales.

20 Ejemplo 7

Estudios de camptotecina *in vitro* e *in vivo*

7.1 Estudio de liberación *in vitro* de camptotecina

Se realizaron experimentos de liberación en condiciones de sumidero a 37°C utilizando fluidos gástrico (SGF; pH 1,2; pepsina al 0,32% p/v) e intestinal (SIF; pH 6,8; pancreatina al 1% p/v) simulados. Los estudios se realizaron con agitación en una incubadora de agitación Vortemp 56™ (Labnet International Inc., NJ, EE.UU.) después de la dispersión de las nanopartículas en el medio apropiado.

Para cada punto de tiempo, se resuspendieron 0,8 μg de camptotecina formulada en nanopartículas de PVM/MA tradicionales pegiladas con PEG2 (PEG2-CPT trad) o PEG6 (trad de PEG6-CPT) y en nanopartículas de conjugados de polímeros de éster de PVM/MA con mPEG2 (mPEG2-CPT conj) en 1 ml del fluido simulado correspondiente. Las diferentes formulaciones se mantuvieron en el SGF durante 2 h, y durante 14 h en SIF. En diferentes puntos, se recogieron tubos simples y se centrifugaron en tubos Vivaspin (MWCO de 300.000, grupo Sartorius, Alemania) a 3.000 xg durante 5 min. La cantidad de camptotecina liberada de las formulaciones se cuantificó por HPLC (curvas de calibración de camptotecina libre en sobrenadantes obtenidos de SGF y SIF, $r^2 > 0,999$).

7.2 Estudios farmacocinéticos *in vivo* de nanopartículas que encapsulan camptotecina en ratas Wistar.

35 Administración de nanopartículas cargadas con camptotecina a ratas

Se realizaron estudios farmacocinéticos en ratas Wistar macho obtenidas de Harlan (Barcelona, España). Los estudios se realizaron de acuerdo con las directrices y políticas éticas para investigaciones en animales de laboratorio aprobadas por el Comité Ético para la Experimentación Animal de la Institución (número de protocolo 058-12) de acuerdo con la legislación europea sobre experimentos con animales (86/609/UE).

40 Antes del experimento, los animales se alimentaron de forma adaptativa durante 1 semana con libre acceso a

alimentos y agua potable ($22 \pm 2^\circ\text{C}$; ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad; 50-60% de humedad relativa). Antes de la administración oral de las formulaciones, los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche para evitar la interferencia con la absorción, permitiendo el libre acceso al agua.

5 Para el estudio farmacocinético, las ratas se dividieron aleatoriamente en 2 grupos ($n = 6$). Como controles, un grupo de animales recibió una dosis de 1 mg/kg de una suspensión de camptotecina por vía oral (con una aguja roma a través del esófago en el estómago) y otro grupo recibió la suspensión de camptotecina por vía intravenosa (a través de la vena de la cola). Los grupos experimentales recibieron por vía oral la dosis de camptotecina equivalente formulada en nanopartículas de mPEG2-CPT conj y PEG2-CPT trad.

10 Se recogieron muestras de sangre en tiempos establecidos después de la administración (0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 30 y 48 h). Se usó EDTA como agente anticoagulante. El volumen de sangre se recuperó por vía intraperitoneal con un volumen igual de solución salina normal precalentada a la temperatura corporal. Las muestras se colocaron inmediatamente en hielo y se centrifugaron a 2.500 xg durante 10 min. El plasma se separó en tubos limpios y se mantuvo congelado a -20°C hasta el análisis por HPLC.

Cuantificación por HPLC de camptotecina en muestras de plasma.

15 La cantidad de camptotecina se determinó en plasma mediante HPLC-FLD en un instrumento Agilent modelo 1100 serie LC y un detector de fluorescencia fijado a la excitación y emisión de 380 y 418 nm, respectivamente. El sistema cromatográfico estaba equipado con una columna Phenomenex Gemini C18 de 150 mm x 3 mm de fase inversa (tamaño de partícula de 5 μm) y precolumna (Phenomenex Security Guard C18). La fase móvil, bombeada a 1 ml/min, consistió en una mezcla 50:50 (v/v) de acetonitrilo y una disolución de ácido trifluoroacético al 0,01% (v/v).
20 La columna se colocó a 30°C y el volumen de inyección fue de 100 μl . Las curvas de calibración y los controles de calidad se diseñaron a lo largo del intervalo de 0,48 y 8000 ng/ml ($r^2 > 0,999$) añadiendo volúmenes apropiados de camptotecina patrón en dimetilsulfóxido/acetonitrilo/ácido trifluoroacético 1:8,9:0,1 (v/v/v) a plasma libre de fármaco.

25 Se mezcló una alícuota (100 μl) de plasma con 4 volúmenes de acetonitrilo y se agitó con vórtex durante 2 minutos para lograr la precipitación de las proteínas plasmáticas. Después de la centrifugación (5000 xg, 5 minutos), se recogió el sobrenadante y se evaporó hasta que se secó (Savant, Barcelona, España). Finalmente, el residuo se disolvió en 120 μl de disolución de reconstitución de dimetilsulfóxido/acetonitrilo/ácido trifluoroacético 1:8,9:0,1 (v/v/v) y se transfirió a viales de inyector automático, se tapó y se colocó en el inyector automático de HPLC. El límite de cuantificación se calculó que era de 2,6 ng/ml con una desviación estándar relativa del 4,6%.

Análisis de datos farmacocinéticos

30 El análisis farmacocinético de la concentración en plasma representada gráficamente frente a los datos de tiempo, obtenidos después de la administración de las diferentes formulaciones de camptotecina, se analizó usando un modelo no compartimental con el software WinNonlin 5.2 (Pharsight Corporation, EE.UU.). Se estimaron los siguientes parámetros: concentración en plasma máxima (C_{max}), tiempo en que se alcanza la concentración máxima (T_{max}), área bajo la curva de concentración-tiempo desde el tiempo 0 hasta ∞ (AUC), tiempo de residencia medio (MRT), aclaramiento (Cl), volumen de distribución (V) y semivida en la fase terminal ($t_{1/2z}$).
35

Además, la biodisponibilidad oral relativa, F_r , de camptotecina se expresó como la razón entre el área bajo la curva de concentración-tiempo desde el tiempo 0 a ∞ (AUC) de las formulaciones sometidas a ensayo y la de la suspensión oral de CPT administrada.

Análisis estadístico

40 Para las caracterizaciones físicoquímicas y farmacéuticas de las formulaciones, los datos se expresan como la media \pm desviación estándar (D.E.) de al menos tres experimentos.

45 Se analizaron estadísticamente parámetros *in vivo* farmacocinéticos. Se usó la prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica seguida de la prueba de la U de Mann-Whitney para investigar las diferencias estadísticas. En todos los casos, valores de p inferiores a 0,05 se consideraron como diferencia estadísticamente significativa. Todo el procesamiento de datos se realizó con el software estadístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, EE.UU.).

7.3 Resultados

Estudio de liberación *in vitro* de camptotecina

50 Se evaluó la cinética de liberación de camptotecina a partir de nanopartículas en fluidos gástrico e intestinal simulados (que contienen polisorbato 80 como agente solubilizante para la camptotecina) (figura 7). Este patrón se caracterizó por una primera etapa de sin liberación cuando las nanopartículas se dispersaron en SGF, y una etapa de liberación (cuando las nanopartículas se dispersaron en SIF) en la que el fármaco se liberó inicialmente de manera rápida seguido de una fase de liberación más sostenida. Para nanopartículas pegiladas tradicionales (PEG2-CPT trad y PEG6-CPT trad), esta liberación más rápida tuvo efecto en las primeras 5 horas (después de la incubación en SIF) y la última etapa de la liberación sostenida tardó 11 horas hasta que las nanopartículas

completaron la liberación del 100% de su carga. La cinética de liberación de camptotecina a partir de mPEG2-CPT conj mostró un perfil de liberación que puede dividirse en tres fases diferentes. En la primera, cuando las nanopartículas se dispersaron en SGF durante las primeras 2 h, la cantidad de camptotecina liberada fue muy baja (alrededor del 10%). Luego, cuando las nanopartículas se desplazaron a un SIF, se observó un efecto de liberación de estallido. Por tanto, alrededor del 90% del fármaco inicial cargado se liberó bruscamente de la formulación de nanopartículas. Finalmente, la tercera etapa se caracterizó por una liberación lenta y sostenida del fármaco restante que se liberó completamente en el plazo de las siguientes 12 horas del experimento (14 horas después del comienzo del estudio).

Estudios farmacocinéticos de nanopartículas que contienen camptotecina en ratas Wistar

El perfil de concentración en plasma-tiempo de la camptotecina después de una única administración intravenosa a una dosis de 1 mg/kg se muestra en la figura 8. Se administró camptotecina como una suspensión con un tamaño de partícula de $1,500 \pm 144$ nm y un PDI de $0,44 \pm 0,05$. Los datos se analizaron mediante un modelo no compartimental. La concentración en plasma de camptotecina disminuyó rápidamente después de la administración, no siendo detectable 6 horas después de la administración. Después de la administración, la concentración en plasma del fármaco alcanzó 430 ng/ml (C_{max}) y los valores para AUC y $t_{1/2z}$, fueron de 0,39 $\mu\text{g h/ml}$ y 0,69 horas, respectivamente. El aclaramiento y el volumen de distribución del fármaco se calculó que eran de 755 ml/h y 683 ml, respectivamente (tabla 10).

La Figura 9 muestra los perfiles de concentración en plasma de camptotecina después de la administración de una única dosis oral (1 mg/kg) a ratas Wistar macho en suspensión o cargadas en nanopartículas. Cuando la suspensión del fármaco se administró por vía oral, los niveles en plasma aumentaron rápidamente alcanzando la C_{max} 30 min después de la administración. Luego los niveles en plasma sostenidos del fármaco se mantuvieron durante al menos 4 horas y, finalmente, los niveles de camptotecina disminuyeron rápidamente. Por tanto, 10 horas después de la administración, no se observaron niveles detectables de camptotecina en plasma.

Para la camptotecina cargada en nanopartículas y administrada a la misma dosis (1 mg/kg), la principal diferencia con la formulación de suspensión acuosa fue que los niveles de fármaco fueron cuantificables en plasma durante un período de tiempo más prolongado. Por tanto, los animales que recibieron camptotecina incluida en nanopartículas pegiladas tradicionales (PEG2-CPT trad) mostraron una primera fase caracterizada por niveles crecientes de fármaco en plasma durante las primeras 1,5 horas, seguida de una fase de disminución lenta y prolongada con niveles cuantificables de camptotecina hasta 24 horas. Se encontró que el AUC era aproximadamente 2 veces más alta que cuando se administró el fármaco por vía oral como una suspensión. Además, aunque no se encontraron diferencias estadísticas, el volumen de distribución del fármaco cuando se administró en estas nanopartículas pegiladas fue 1,5 veces el del fármaco desnudo administrado por vía oral como una suspensión.

Para nanopartículas de conjugados de polímeros de éster de PVM/MA (mPEG2-CPT conj) administradas a la misma dosis (1 mg/kg), el perfil inicial de la curva plasmática fue bastante similar; sin embargo, la cantidad cuantificada de fármaco fue mayor que para la formulación convencional y, lo que es más importante, los niveles en plasma se mantuvieron en el tiempo hasta 48 h después de la administración. Globalmente, los niveles de camptotecina obtenidos en plasma después de la administración oral de mPEG2-CPT conj fueron mayores que para la suspensión acuosa y para las nanopartículas pegiladas tradicionales (PEG2-CPT trad), siendo el AUC 7,6 veces y 4,2 veces más alta, respectivamente.

La tabla 10 resume los principales parámetros farmacocinéticos estimados con un análisis no compartimental de los datos experimentales obtenidos después de la administración de las diferentes formulaciones a ratas. Para mPEG2-CPT conj, se encontró que el AUC de camptotecina era significativamente mayor ($p < 0,05$) que para la suspensión acuosa del fármaco. Otra diferencia entre las nanopartículas y la suspensión fue el tiempo de residencia medio del fármaco (MRT). En este caso, el MRT fue significativamente diferente ($p < 0,01$) entre el fármaco desnudo y mPEG2-CPT conj (10 veces más alto), pero no se encontraron diferencias significativas entre el control y PEG2-CPT trad. De manera similar, la semivida de la fase terminal de la curva ($t_{1/2z}$) también fue significativamente mayor cuando la camptotecina se encapsuló en mPEG2-CPT conj que cuando se formuló como una suspensión tradicional, pero no cuando se formuló en PEG2-CPT trad. Según este resultado, el aclaramiento del fármaco cuando se administró en mPEG2-CPT conj fue aproximadamente 11 veces más bajo que el valor obtenido cuando se administró como una suspensión ($p < 0,01$). Del mismo modo, cuando se comparó la formulación de mPEG2-CPT conj con PEG2-CPT trad, se encontró que el AUC era significativamente mayor ($p < 0,05$), y también se encontraron significaciones estadísticas con respecto a MRT y $t_{1/2z}$ ($p < 0,01$).

Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos estimados después de una única dosis oral de 1 mg/kg de suspensión de CPT, PEG2-CPT trad y mPEG2-CPT conj. Datos expresados como media (\pm D.E.) (N = 6)

Formulación	Ruta	AUC ($\mu\text{g h/ml}$)	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	T_{max} (h)	$t_{1/2z}$ (h)	Cl (ml/h)	V (ml)	MRT (h)	Fr
Suspensión de CPT	i.v.	0,39 \pm 0,12	0,43 \pm 0,25	0,01	0,69 \pm 0,13	755 \pm 289	683 \pm 147	1 \pm 0,4	-
Suspensión de CPT	oral	0,38 \pm 0,21	0,08 \pm 0,02	0,5	1,6 \pm 0,8	619 \pm 357	1545 \pm 414	5,9 \pm 1,4	1

PEG2-CPT trad	oral	0,7±0,31	0,07±0,03	3	3,2±1,1	534±221	2383±1003	11,4±5,5	1,8
mPEG2-CPT conj	oral	2,9±1,2*†	0,08±0,03	1,5	25,4±10,7***††	84±63***††	2510±1110	51±20***††	7,6

† Prueba de la U de Man-Whitney de mPEG2-CPT conj frente a PEG2-CPT trad (valor de $p < 0,05$).

†† Prueba de la U de Man-Whitney de mPEG2-CPT conj frente a PEG2-CPT trad (valor de $p < 0,01$).

* Prueba de la U de Man-Whitney de mPEG2-CPT conj frente a suspensión oral de camptotecina (valor de $p < 0,05$).

** Prueba de la U de Man-Whitney mPEG2-CPT conj. frente a suspensión oral de camptotecina (valor de $p < 0,01$).

AUC: área bajo la curva de concentración-tiempo desde el tiempo 0 hasta ∞ ; Cmax: concentración en plasma máxima; Tmax: tiempo hasta alcanzar la concentración en plasma máxima; t1/2z: semivida de la fase terminal; Cl: aclaramiento; V: volumen de distribución; MRT: tiempo de residencia medio; Fr: biodisponibilidad oral relativa.

En resumen, ambos tipos de nanopartículas (PEG2-CPT trad y mPEG2-CPT conj) que encapsulan camptotecina parecían ser adecuadas para la administración oral en el ensayo *in vitro*, dado que no se observó liberación del fármaco hasta que se incubaron en condiciones intestinales. Sin embargo, en el ensayo *in vivo*, mPEG2-CPT conj mostró una biodisponibilidad notablemente mayor, 4,3 veces la de PEG2-CPT trad.

5 Ejemplo 8

Estudios de biodistribución de nanopartículas.

Para visualizar y evaluar la distribución y la capacidad de las nanopartículas que comprenden una matriz de un conjugado de polímero de éster de PVM/MA para interactuar con la mucosa intestinal, se llevaron a cabo estudios de microscopía de fluorescencia.

10 8.1 Preparación de nanopartículas cargadas con Lumogen.

Se marcaron fluorescentemente nanopartículas de PVM/MA convencionales vacías y nanopartículas que comprenden una matriz de un conjugado de polímero de éster de PVM/MA con metoxi-polietilenglicol 2.000 (mPEG2 conj) con rojo Lumogen.

15 Se prepararon nanopartículas cargadas con Lumogen añadiendo 0,5 mg de rojo Lumogen® en la fase de acetona (5 ml) que contenía el PVM/MA (Gantrez® AN) o su conjugado de polímero de éster con mPEG2 (mPEG2-LUM conj) antes de la formación de nanopartículas tal como se describió en los ejemplos 1 y 4. Se obtuvieron formulaciones de LUM y mPEG2-LUM conj respectivamente.

8.2 Estudios de distribución *in vivo* de nanopartículas cargadas con Lumogen en la mucosa intestinal en ratas Wistar

20 Se llevaron a cabo estudios de biodistribución usando nanopartículas marcadas fluorescentemente que encapsulan rojo Lumogen.

Los experimentos con animales se realizaron siguiendo un protocolo aprobado por el Comité de Ética y Bioseguridad de la Institución de acuerdo con la legislación europea sobre experimentos con animales (número de protocolo 059-13). Se administró por vía oral una única dosis de 1 ml de una suspensión acuosa que contenía 10 mg de nanopartículas marcadas fluorescentemente a ratas Wistar macho. Dos horas después, se sacrificaron los animales y se extirpó el intestino. Se recogieron porciones de íleon de 1 cm, se almacenaron en el medio de procedimiento tisular Tissue-Tek® OCT y se congelaron a -80°C. Cada porción se cortó luego en secciones de 5 μ m en un criostato y se unió a portaobjetos de vidrio. Finalmente, estas muestras se fijaron con formaldehído y se incubaron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) durante 15 minutos antes del ensamblaje del cubreobjetos.

30 Se visualizó la presencia de nanopartículas cargadas de manera fluorescente en la mucosa intestinal en un microscopio de fluorescencia (Axioimager M1, Zeiss) con una cámara acoplada (AxioCam ICc3, Zeiss) y una fuente fluorescente (HBO 100, Zeiss).

8.3 Resultados

35 Las nanopartículas cargadas con Lumogen mostraron propiedades físicoquímicas similares a las determinadas para las nanopartículas vacías: 215 nm, -36 mV para las nanopartículas de LUM y 205 nm, -35 mV para las formulaciones de mPEG2-LUM conj.

40 Sorprendentemente, las nanopartículas de mPEG2-LUM conj mostraron una distribución diferente dentro de la mucosa del íleon que las nanopartículas de LUM. Las nanopartículas de PVM/MA convencionales parecen estar atrapadas en la capa de moco que cubre el epitelio intestinal (figuras 10A, 10B) mientras que las nanopartículas de conjugados de polímeros de éster de PVM/MA fueron capaces de cruzar la capa de moco e interactuar de una manera más íntima con la superficie de los enterocitos (figuras 10C, 10D). Este hallazgo confirma que la superficie de las nanopartículas de los conjugados de polímeros de éster es diferente a la del PVM/MA original. Es posible plantear la hipótesis de que durante la formación de nanopartículas las áreas hidrófilas de los conjugados se orientarían a través de la fase acuosa formando una corona hidrófila en la superficie de las nanopartículas, lo que conferiría propiedades "resbaladizas" a las nanopartículas resultantes y, por tanto, la capacidad de cruzar la capa de

moco y alcanzar la superficie de los enterocitos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una nanopartícula, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - a) mezclar un conjugado de polímero de éster con un compuesto biológicamente activo en un medio orgánico, y
 - 5 b) desolvatar el conjugado de polímero de éster por medio de la adición de alcohol y agua, en presencia de un metal divalente,

en el que el conjugado de polímero de éster es un conjugado de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) con una molécula terminada en hidroxilo, en el que dicha molécula terminada en hidroxilo se selecciona de un polietilenglicol y un derivado del mismo que contiene un grupo reactivo hidroxilo-terminal.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que etapa b) se realiza por medio de la adición de una mezcla hidroalcohólica que comprende un metal divalente a la mezcla obtenida en la etapa a).
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la razón en peso entre el conjugado de polímero de éster y el compuesto biológicamente activo en la mezcla de la etapa a) es de 1:0,01-0,20, preferiblemente 1:0,02-0,15, más preferiblemente 1:0,03-0,10.
- 15 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el conjugado de polímero de éster puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende las etapas de:
 - a) hacer reaccionar el poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) con la molécula terminada en hidroxilo en un disolvente orgánico, y
 - b) eliminar el disolvente orgánico.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 4, que comprende además purificar el conjugado de polímero de éster.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el derivado de polietilenglicol que contiene un grupo reactivo hidroxilo-terminal es un alquil éter de polioxietileno.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el alquil éter de polioxietileno es un metil éter de polietilenglicol.
- 25 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el metil éter de polietilenglicol se selecciona del grupo que consiste en metoxi-polietilenglicol 1.000 (mPEG1), metoxi-polietilenglicol 2.000 (mPEG2), metoxi-polietilenglicol 6.000 (mPEG6) y metoxi-polietilenglicol 10.000 (mPEG10).
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto biológicamente activo es un agente antitumoral.
- 30 10. Nanopartícula obtenida mediante un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Nanopartícula según la reivindicación 10 para su uso en medicina.
12. Composición farmacéutica que comprende i) al menos una nanopartícula según la reivindicación 10 y ii) un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, en la que comprende un agente antitumoral.
14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13 seleccionada del grupo que consiste en:

una composición farmacéutica que comprende:

 - a) un conjugado de polímero de éster de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) con polietilenglicol 2.000 desde el 38% hasta el 47%,
 - 40 b) docetaxel desde el 3% hasta el 5%,
 - c) calcio desde el 0,1% hasta el 0,2%, y
 - d) un sacárido desde el 15% hasta el 40%,

en la que todas las proporciones son en peso con respecto al peso total de la composición;

una composición farmacéutica que comprende:

a) un conjugado de polímero de éster de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) con metoxi-polietilenglicol 2.000 desde el 38% hasta el 47%,

b) docetaxel desde el 3% hasta el 5%,

c) calcio desde el 0,1% hasta el 0,2%, y

5 d) un sacárido desde 15% hasta el 40%,

en la que todas las proporciones son en peso con respecto al peso total de la composición; y

una composición farmacéutica que comprende:

a) un conjugado de polímero de éster de poli(metil vinil éter-co-anhídrido maleico) con metoxi-polietilenglicol 2.000 desde el 30% hasta el 40%,

10 b) camptotecina desde el 0,08% hasta el 1,5%,

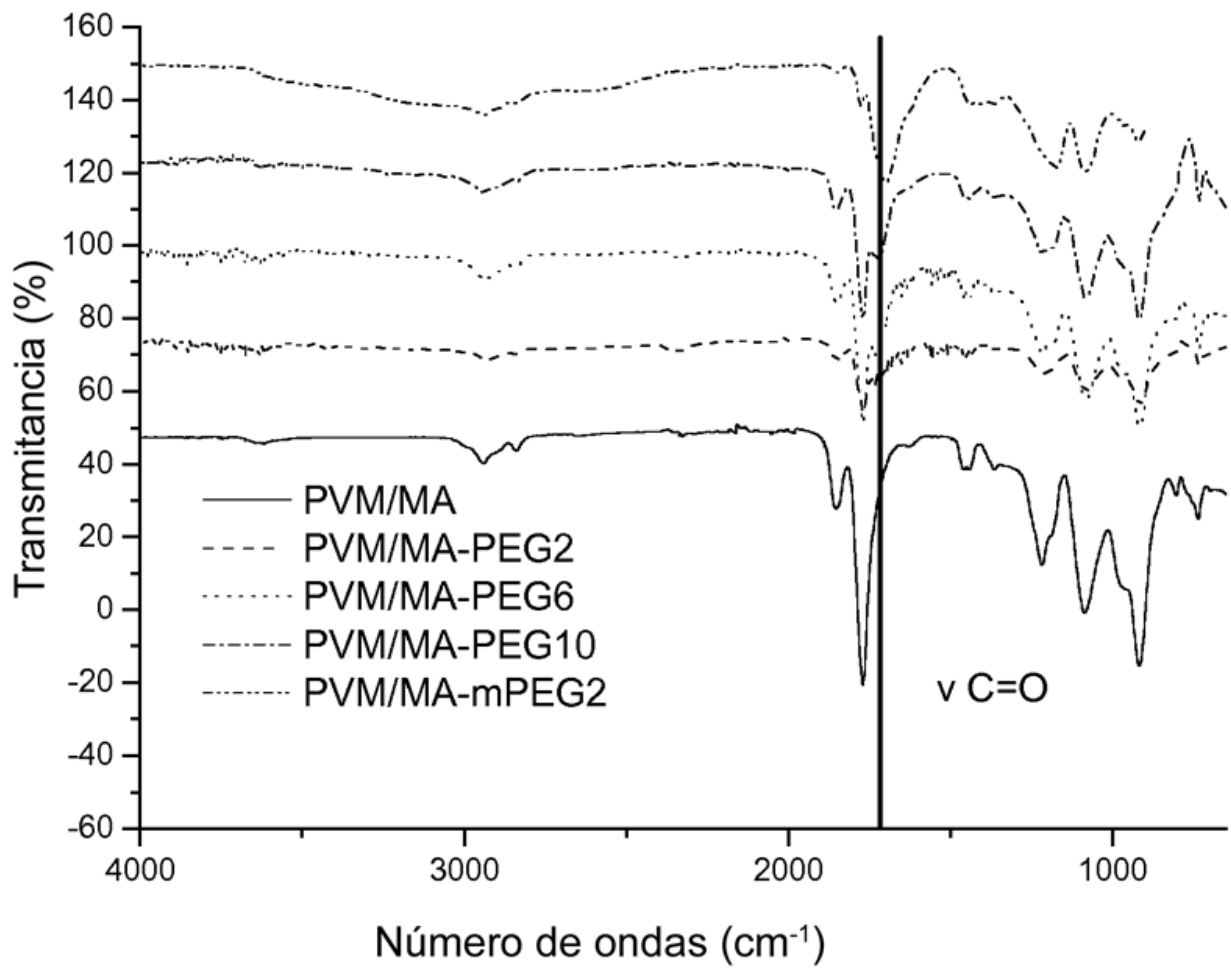
c) calcio desde el 0,1% hasta el 0,2%, y

d) un sacárido desde el 15% hasta el 40%,

en la que todas las proporciones son en peso con respecto al peso total de la composición.

15. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, para su uso en medicina.

15

**FIG. 1**

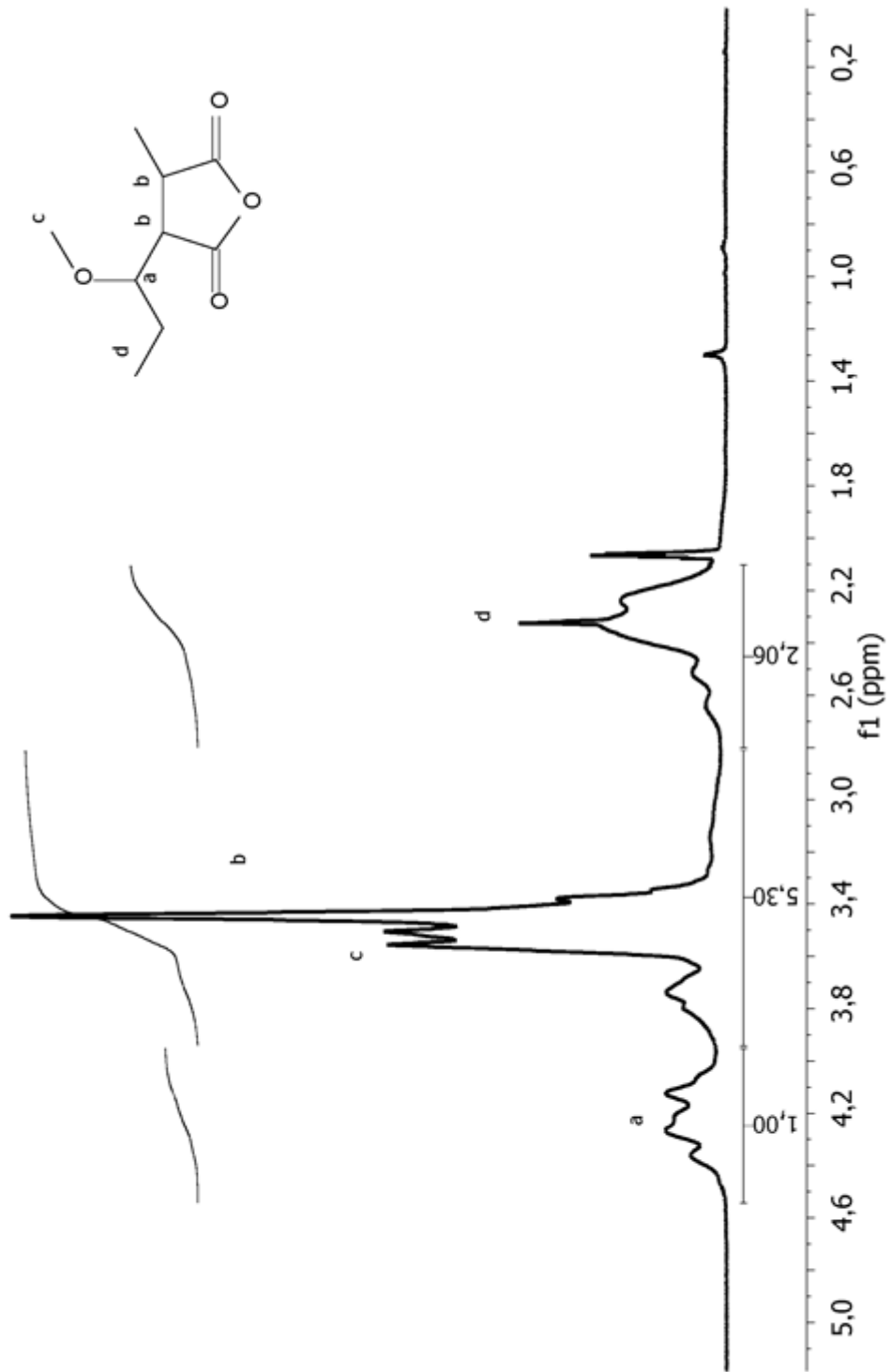


FIG. 2A

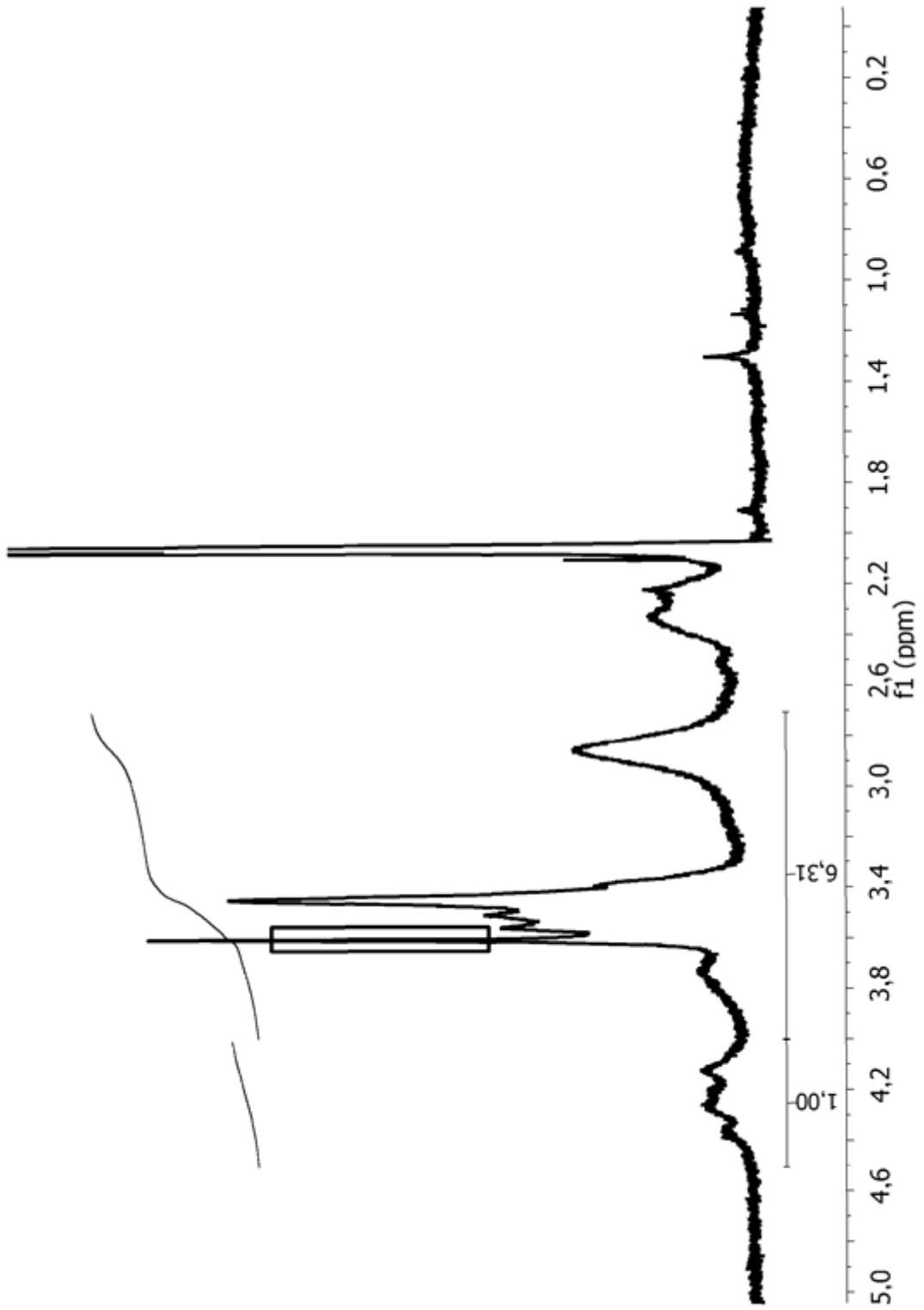


FIG. 2B

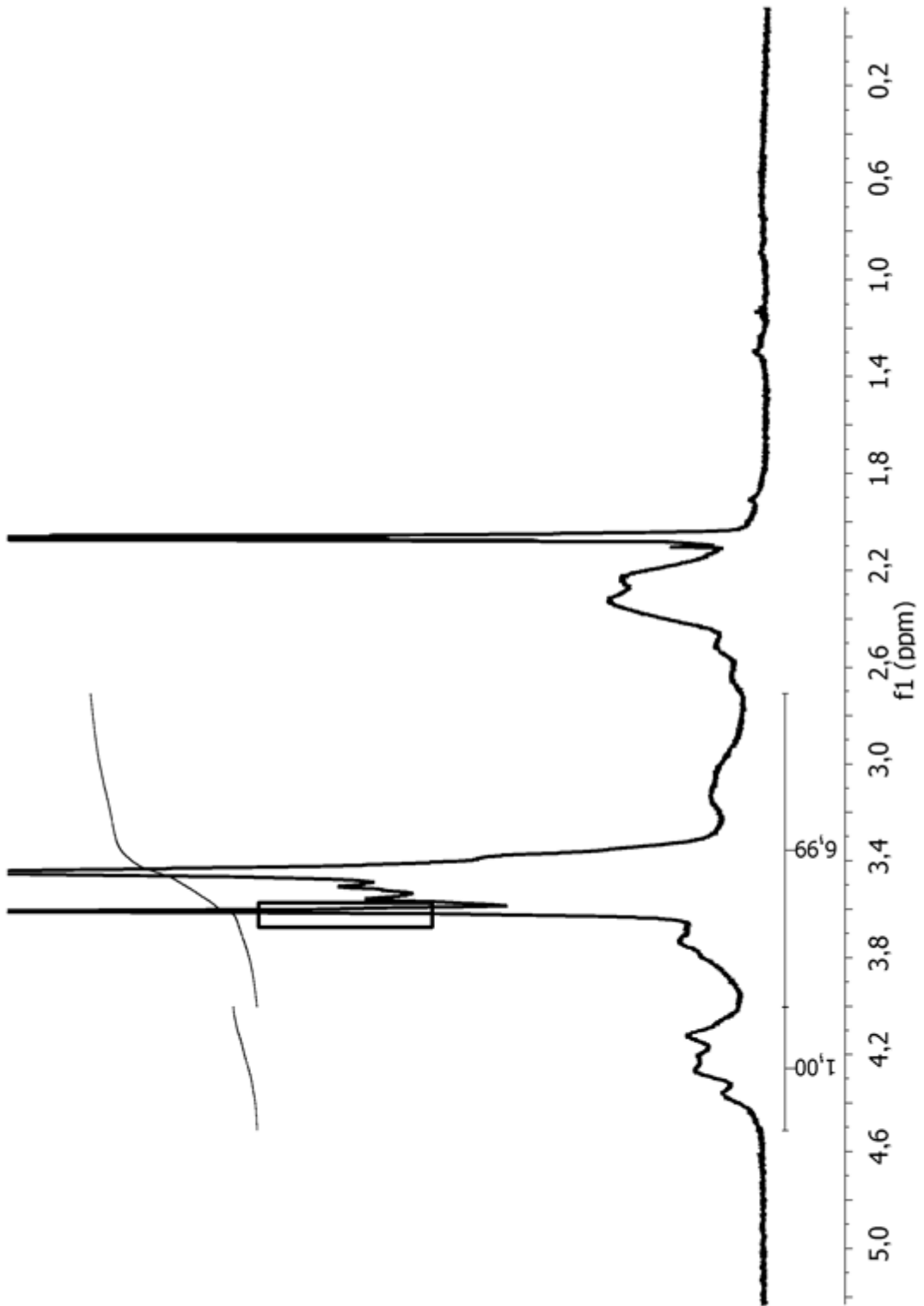


FIG. 2C

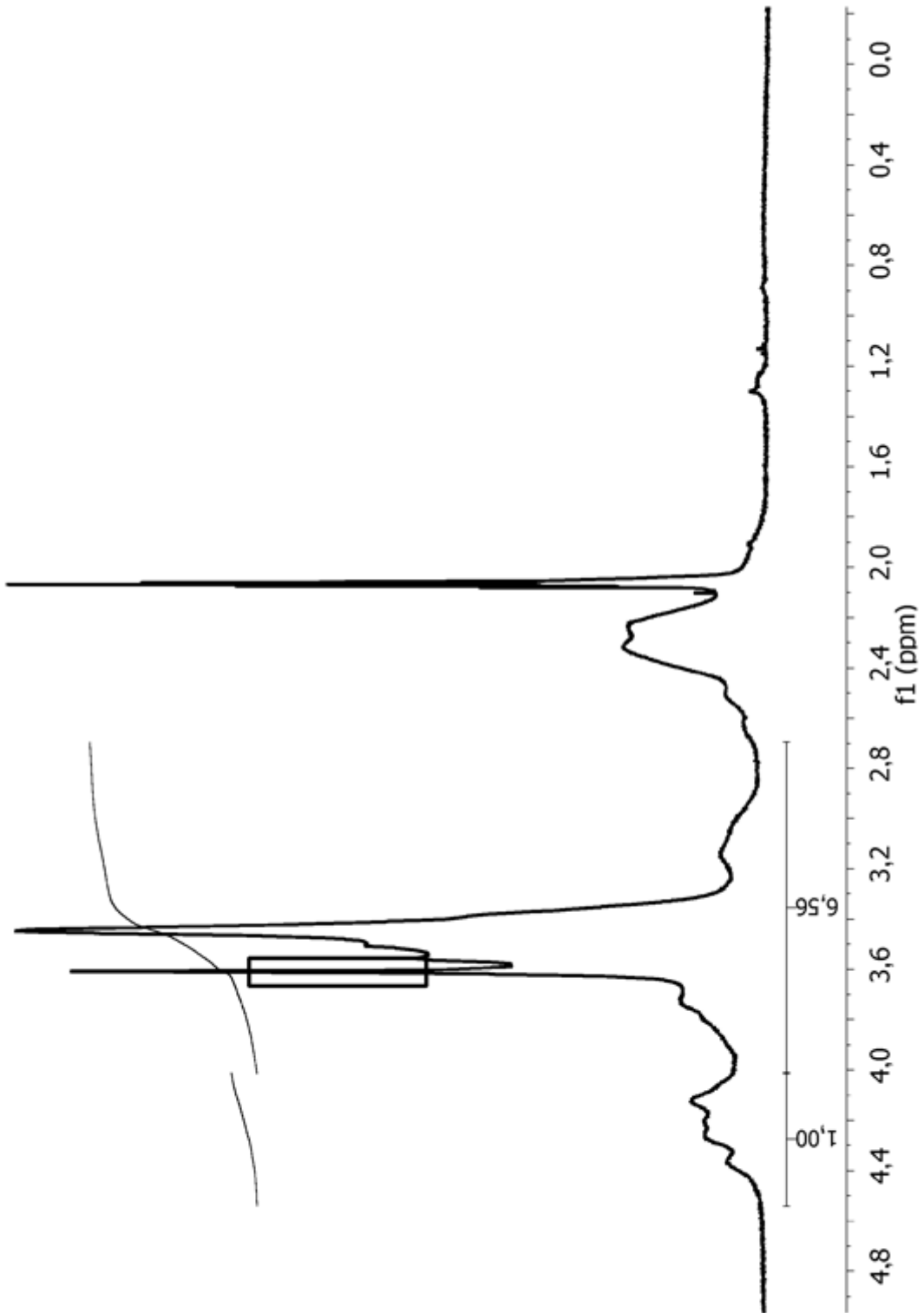


FIG. 2D

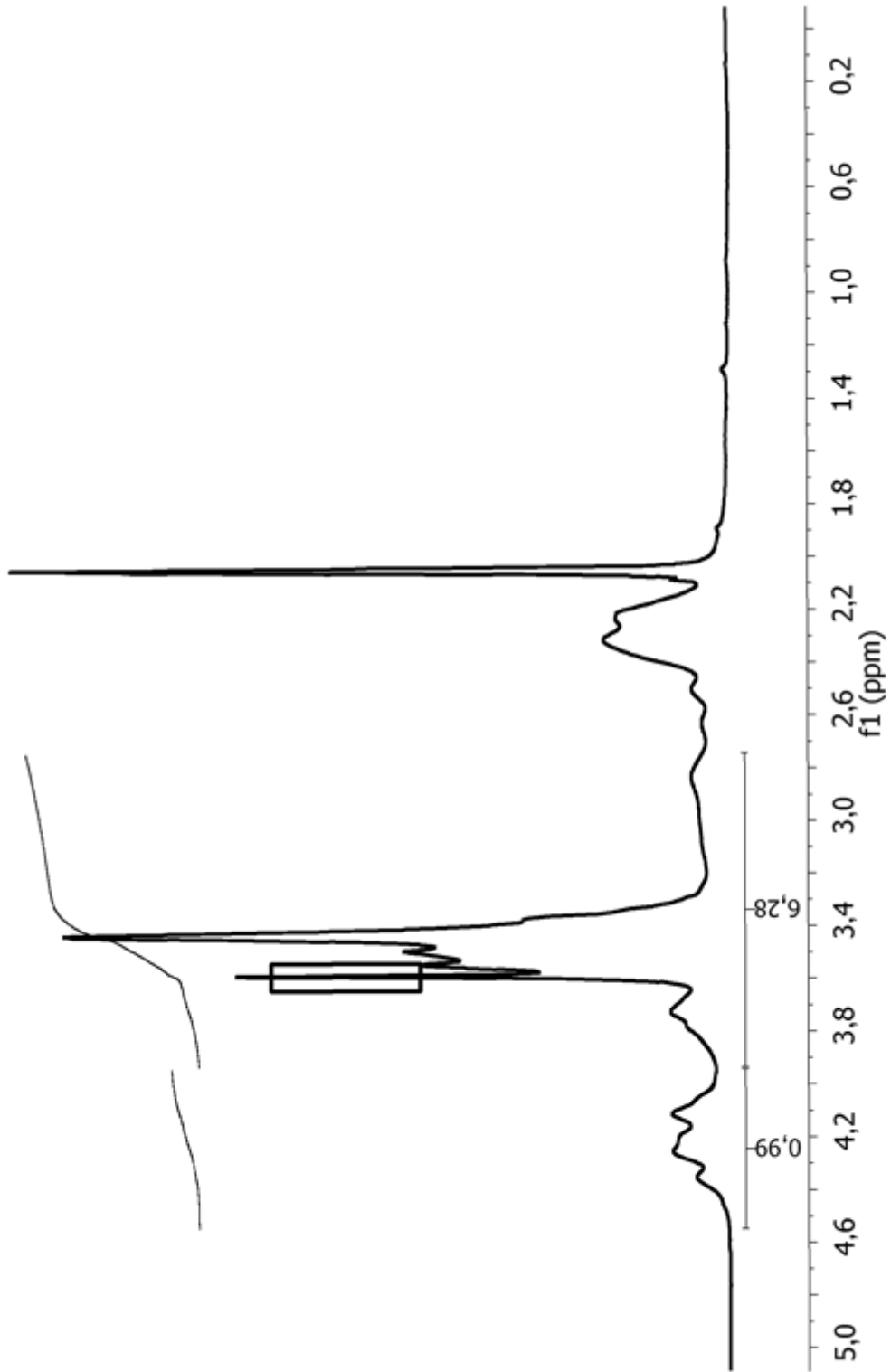


FIG. 2E

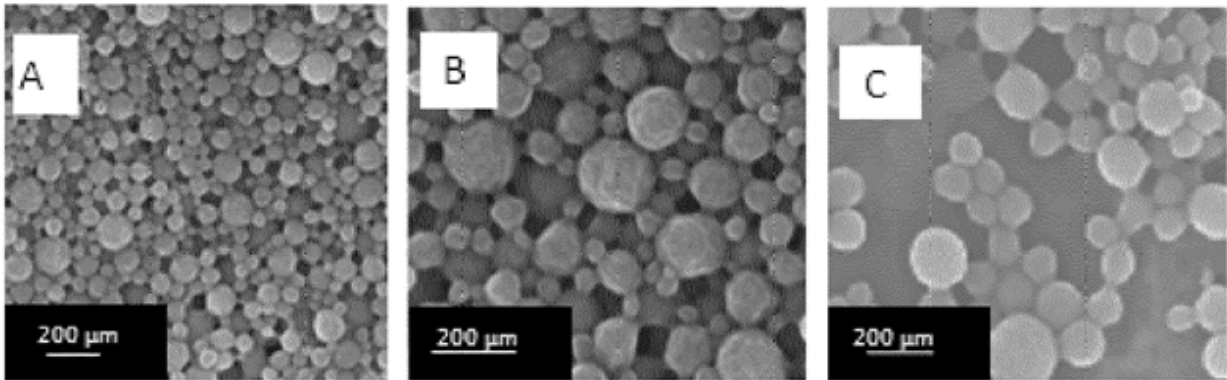


FIG. 3

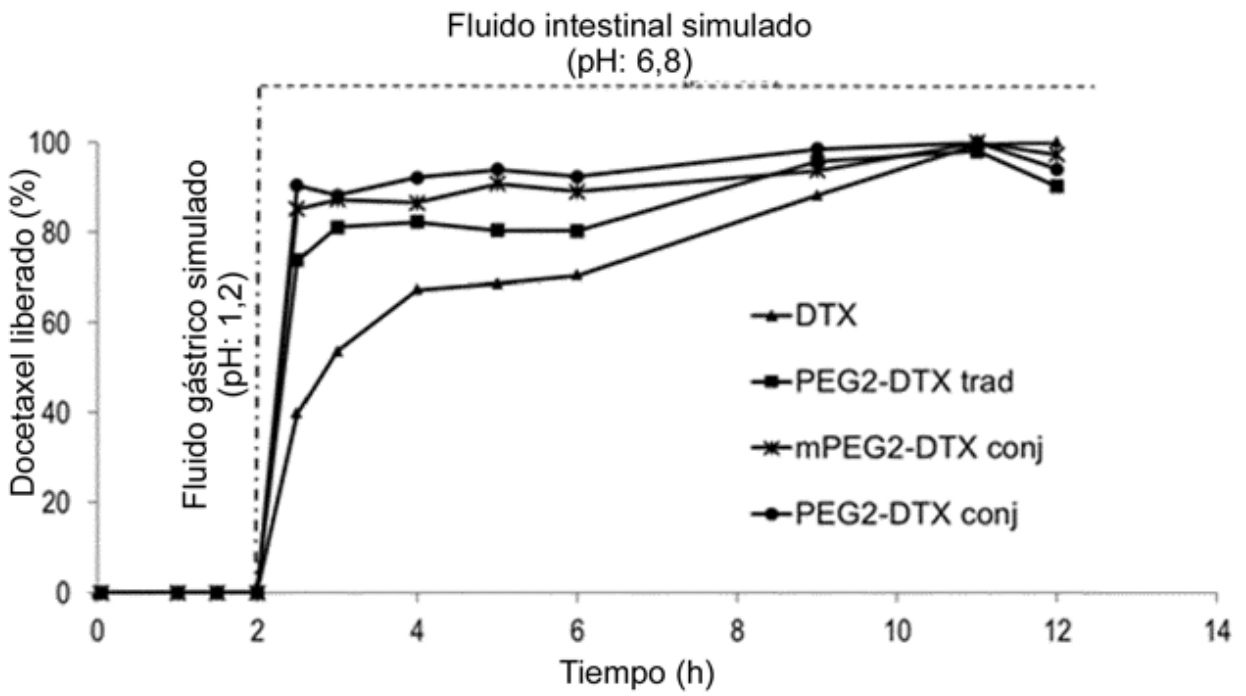


FIG. 4

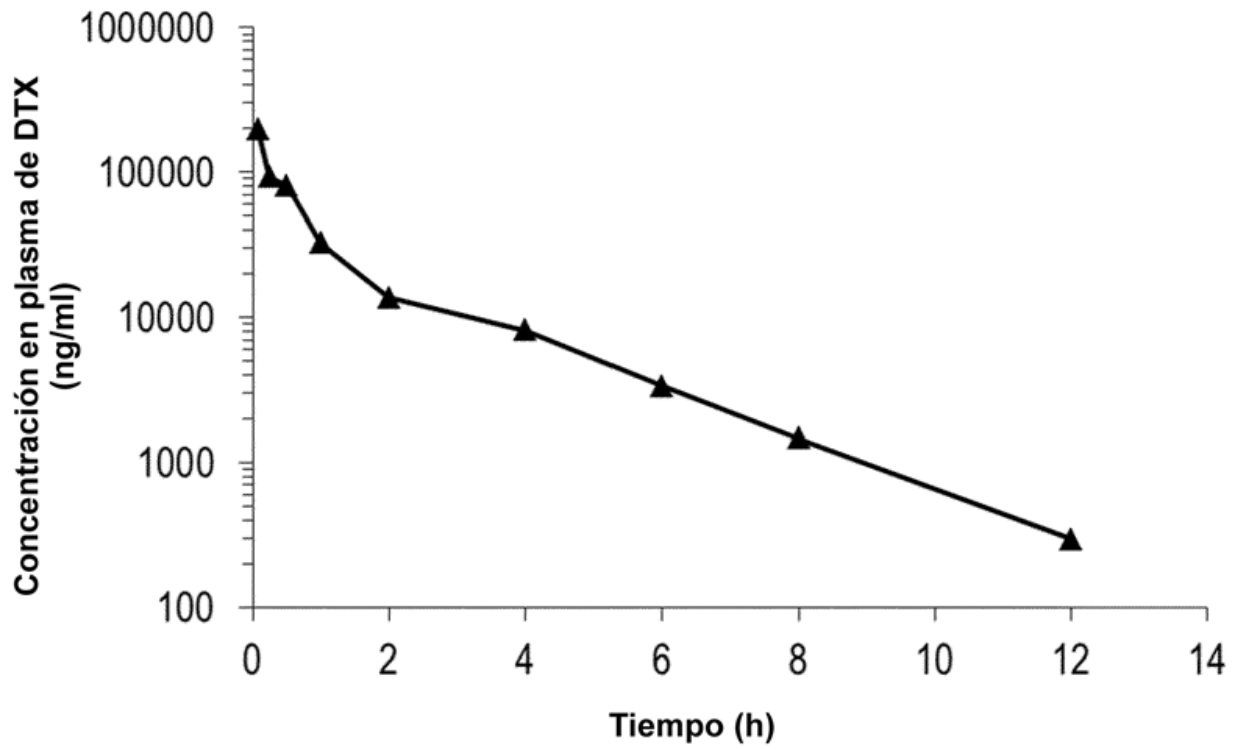


FIG. 5

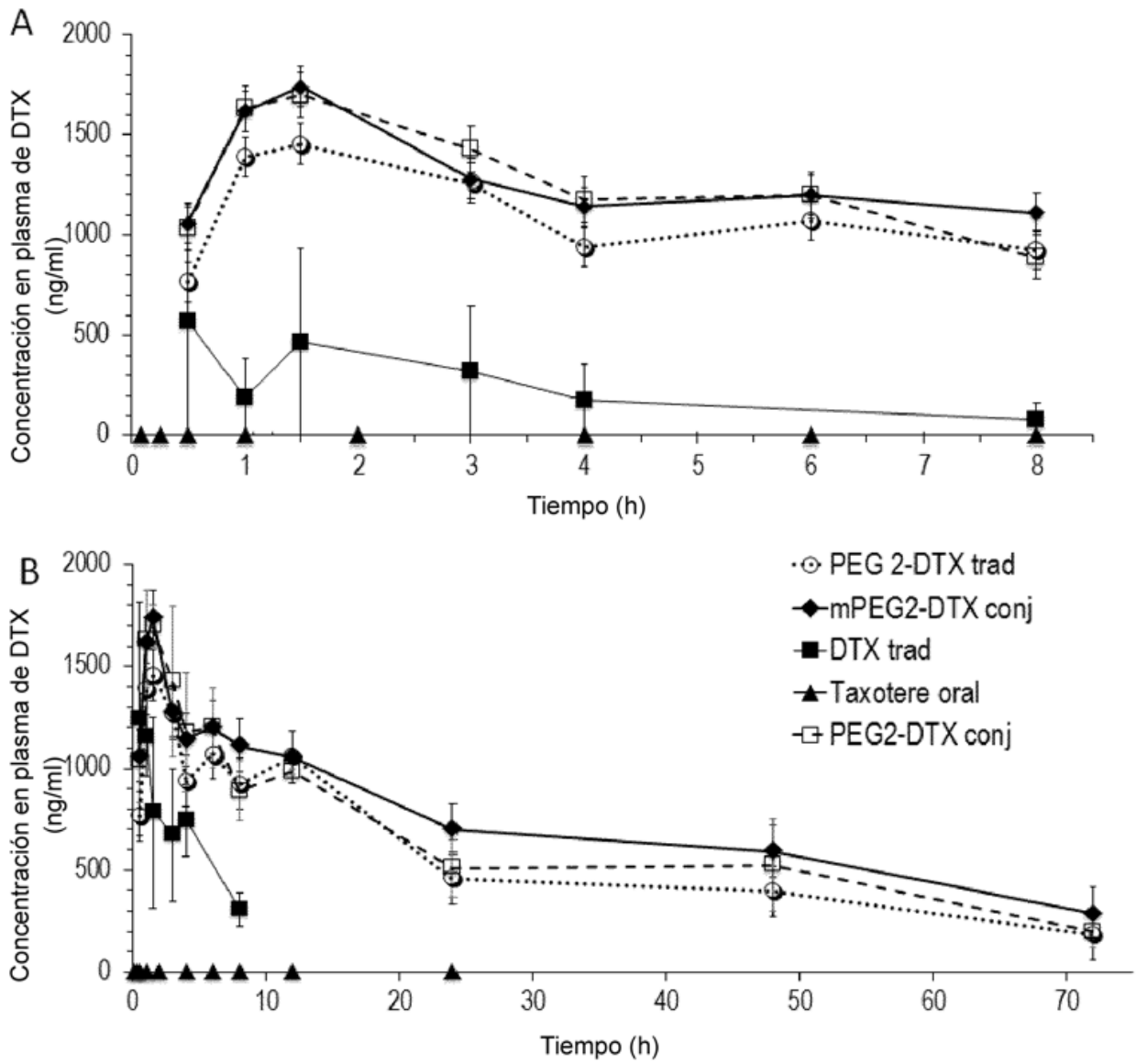


FIG. 6

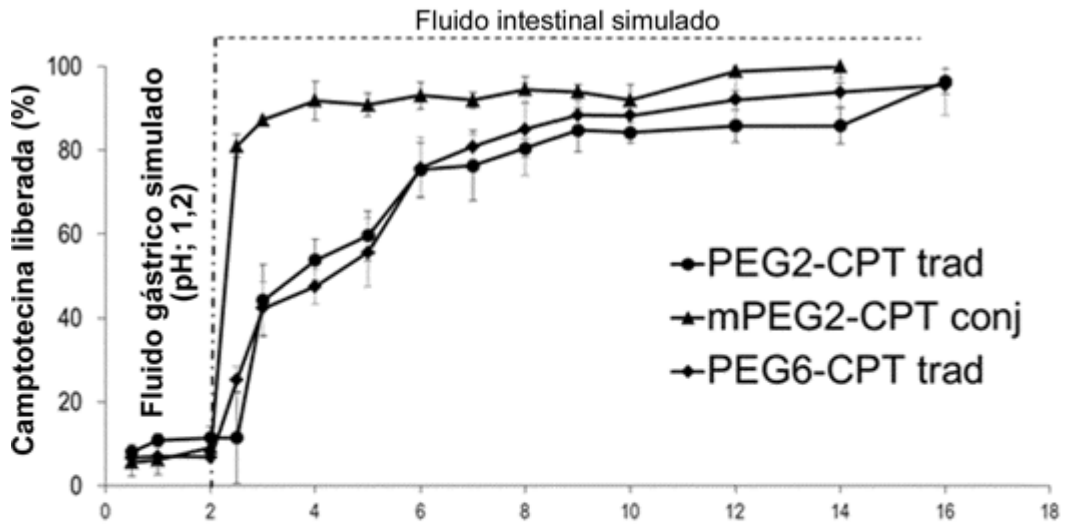


FIG. 7

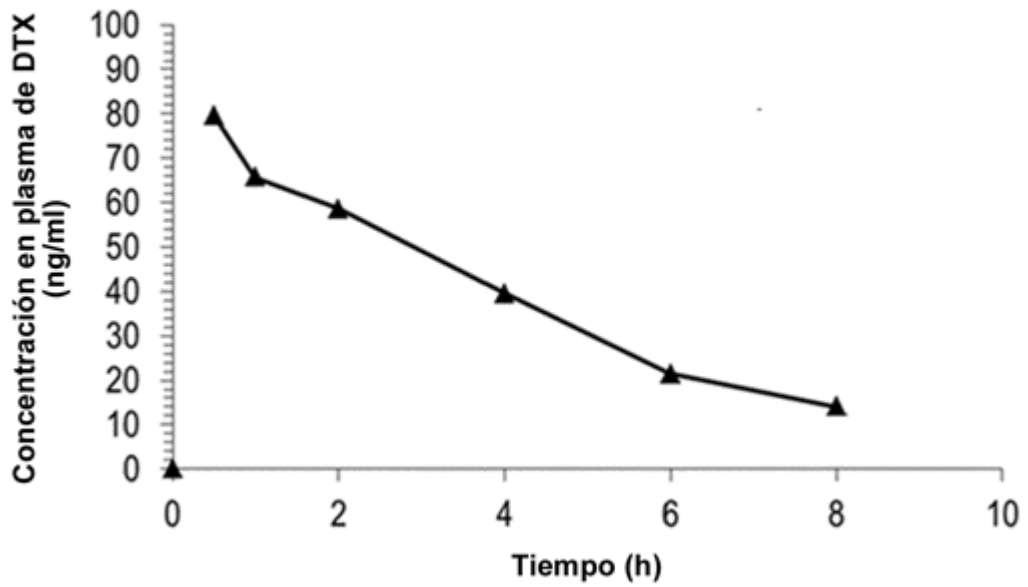


FIG. 8

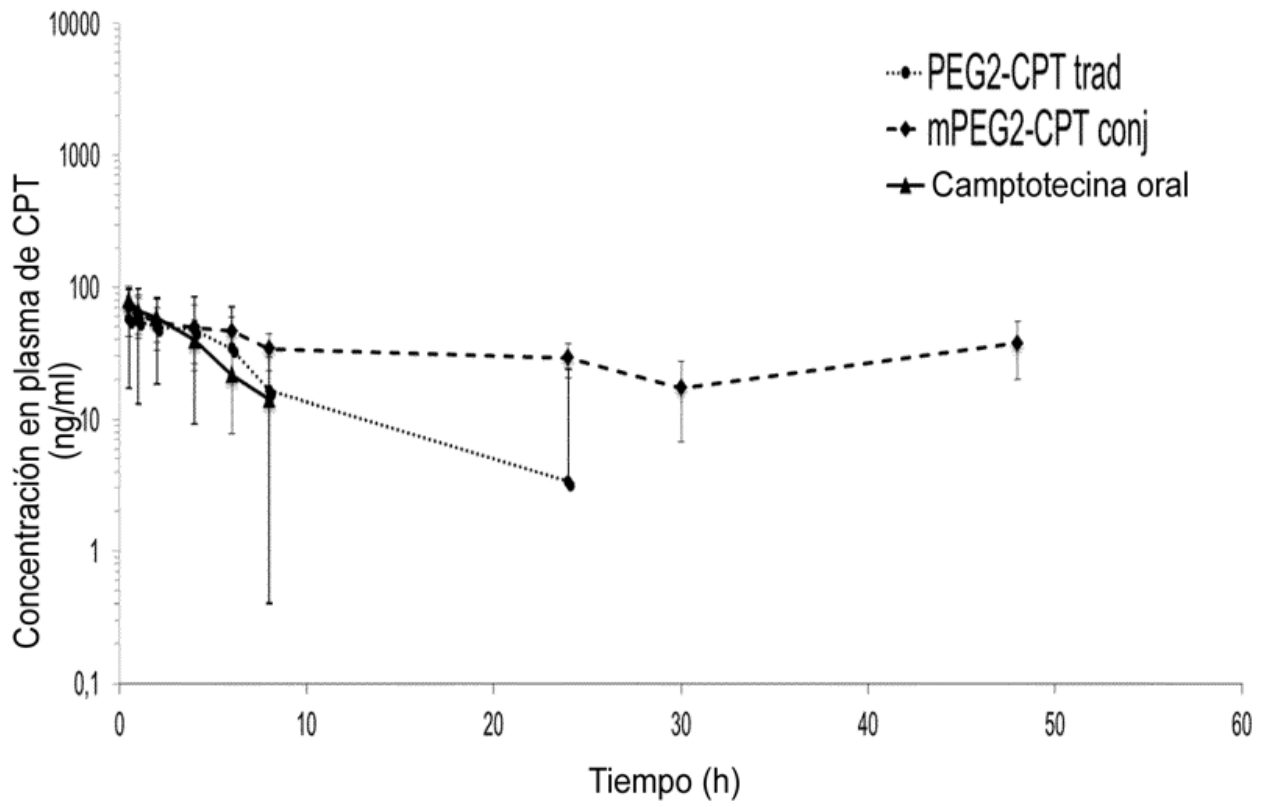


FIG. 9

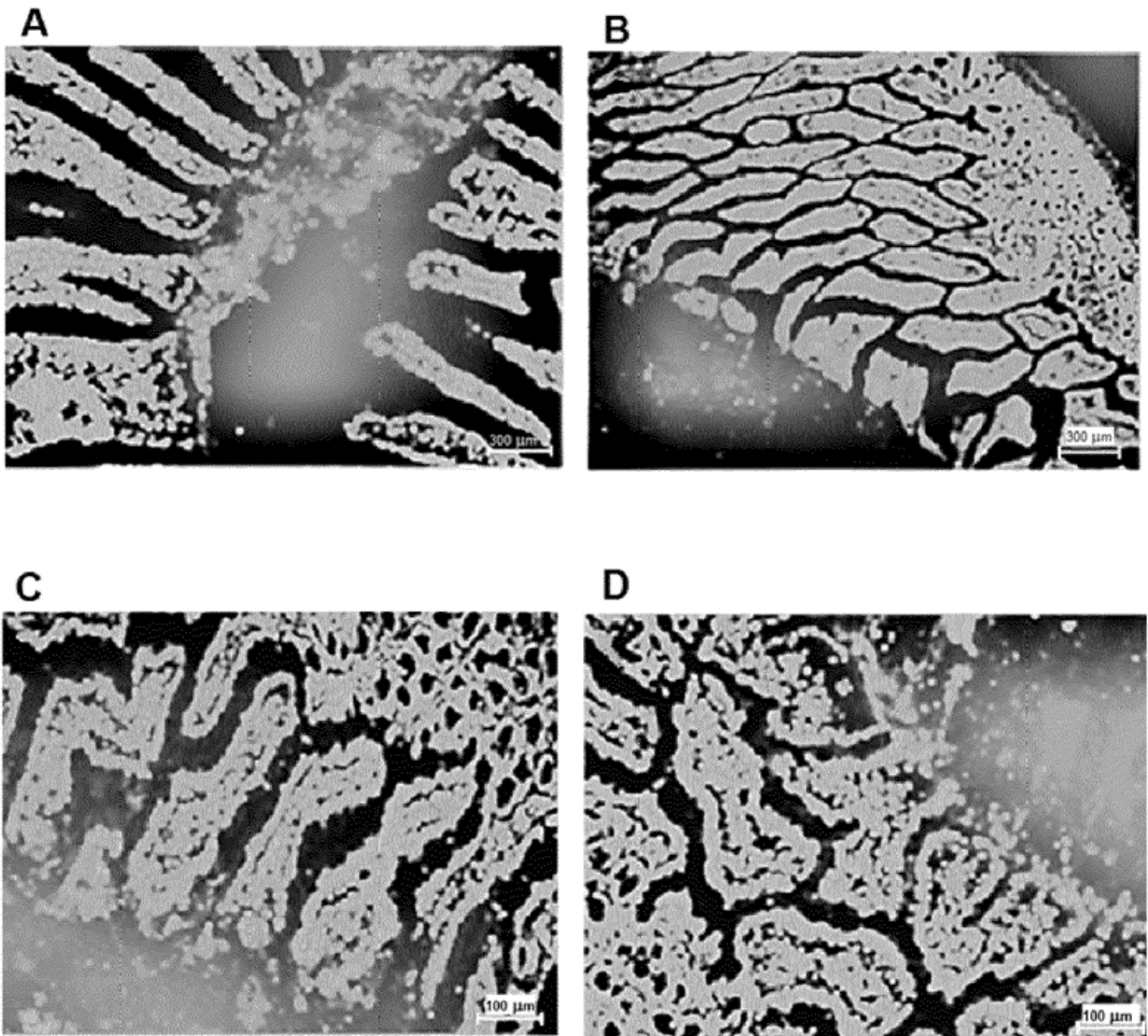


FIG. 10