

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 952**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/14** (2006.01)

**A61K 31/436** (2006.01)

**A61K 47/06** (2006.01)

**A61K 47/14** (2007.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.01.2011 PCT/IN2011/000006**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2011 WO11086574**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2011 E 11732743 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2525782**

54 Título: **Formulaciones de nano-vehículos y métodos para preparar los mismos**

30 Prioridad:

**18.01.2010 IN 133MU2010**

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

**10.10.2019**

73 Titular/es:

**CONCEPT MEDICAL RESEARCH PRIVATE LIMITED (50.0%)  
1-3, Silver Palm II, Near Sneh Milan Garden,  
Kadampalli, Nanpura  
Surat 395 001, IN y  
ENVISION SCIENTIFIC PRIVATE LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DOSHI, MANISH;  
SHERDIWALA, DIVYESH y  
SOJITRA, PRAKASH**

74 Agente/Representante:

**LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen**

ES 2 726 952 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Formulaciones de nano-vehículos y métodos para preparar los mismos

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere en general a formulaciones de nano-vehículos y a métodos para preparar las formulaciones de nano-vehículos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Con los avances en el uso de la nanotecnología en el campo de la ciencia médica, las partículas de tamaño nanométrico han ganado importancia en los sistemas de administración de fármacos. En general, los polímeros se utilizan junto con las partículas de tamaño nanométrico de fármacos para administrar estas partículas de tamaño nanométrico de fármacos a un sitio objetivo. Las nano-partículas de un fármaco encapsulado con un polímero pueden producir inflamación en el sitio objetivo. Además, debido a la degradación inadecuada del polímero, el fármaco se puede administrar de manera incontrolada. Además, la semidegradación de los polímeros puede provocar un "efecto cuchillo" y / o un "efecto borde" en el sitio objetivo. Además, cuando se utilizan polímeros para cargar un fármaco en los dispositivos médicos, penetra una cantidad muy baja del fármaco en los tejidos de los vasos sanguíneos.

15 Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de formulaciones de nano-vehículos que puedan lograr una mejor difusión del fármaco en el tejido y, de este modo, lograr el máximo efecto terapéutico con una cantidad mínima del fármaco administrado en un sitio objetivo. Además, existe la necesidad en la técnica de métodos para encapsular nano-partículas del fármaco para formar nano-vehículos sin utilizar polímeros.

20 WO 2004/069169 A2 describe nano-cápsulas que comprenden un agente terapéutico, en que una cobertura multicapa polielectrolítica encapsula dicho agente terapéutico, y un ligando específico de tejido unido a una superficie externa de dicha cobertura multicapa polielectrolítica.

25 "Bowen P.: Particle Size Distribution Measurement for Millimeters to Nanometers and from Rods to Platelets", Journal of Dispersion Science and Technology, Taylor and Francis Group, New York, NY, US, vol. 23, no.5, 1. Enero 2002 (2002-01-01)', páginas 631-662, XP009102859, ISSN: 0193-2691, DOI: 10.1081/DIS-120015368".

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para preparar nano-vehículos, en que dicho método incluye las características de la reivindicación 1. Las reivindicaciones dependientes muestran algunos ejemplos de un método de este tipo.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 ilustra la distribución de tamaño de las nano-partículas de fosfolípido de huevo detectada por Malvern Zeta Sizer (ZS90) de acuerdo con el Ejemplo 1.

La FIG. 2 ilustra la distribución de tamaños de nano-vehículos detectada por Malvern Zeta Sizer (ZS90) de acuerdo con el Ejemplo 1.

35 La FIG. 3 ilustra los nano-vehículos zeta potenciales detectados por Malvern Zeta Sizer (ZS90) de acuerdo con el Ejemplo 1.

La FIG. 4 ilustra un cromatograma obtenido por HPLC para el cálculo de sirolimus en solución A4 de acuerdo con el Ejemplo 1.

40 La FIG. 5 muestra una imagen de microscopía óptica del sistema de stent recubierto de acuerdo con el Ejemplo 2.

La FIG. 6 ilustra un cromatograma para la solución estándar de acuerdo con el Ejemplo 3.

La FIG. 7 ilustra un cromatograma para la solución de muestra de acuerdo con el Ejemplo 3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 Antes de describir en detalle las formas de realización que están de acuerdo con la invención, debe observarse que las formas de realización residen principalmente en formulaciones de nano-vehículos y métodos para preparar las formulaciones de nano-vehículos. Por consiguiente, se ha descrito que los componentes de la formulación y los pasos del método incluyen solo aquellos detalles específicos que son pertinentes para comprender las formas de realización de la invención con el fin de no oscurecer la descripción con detalles que serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica que tienen el beneficio de la descripción aquí contenida.

En este documento, los términos "comprende", "que comprenden" o cualquier otra variación de los mismos, pretenden abarcar una inclusión no exclusiva, de manera que un proceso, método que comprende una lista de elementos no incluye solo esos elementos, sino que puede incluir otros elementos no expresamente enumerados o inherentes a dicho proceso, método. Un elemento precedido por "comprende ... un / a" no excluye, sin más restricciones, la existencia de elementos idénticos adicionales en el proceso, método que comprende el elemento.

Además, antes de describir en detalle las formas de realización que están de acuerdo con la invención, debe observarse que todos los términos científicos y técnicos utilizados en este documento para describir la invención tienen los mismos significados que entendería un experto en la materia.

En términos generales, de acuerdo con diversas formas de realización, la invención describe un método para preparar nano-vehículos. El método incluye preparar una solución orgánica del uno o más fármacos disolviendo uno o más fármacos en uno o más disolventes orgánicos. El uno o más fármacos pueden seleccionarse de uno o más de, pero no se limitan a, un agente antirrestenótico, un agente antiproliferativo, un agente antiinflamatorio, un agente antineoplásico, un agente anticoagulante, un agente antifibrina, un agente antitrombótico, un agente antimitótico, un agente antibiótico, un agente antialérgico y un antioxidante, un agente antiproliferativo, estrógenos, un inhibidor de la proteasa, anticuerpos, un agente inmunosupresor, un agente citostático, un agente citotóxico, un bloqueador de los canales de calcio, un inhibidor de la fosfodiesterasa, un inhibidor de la prostaglandina, un suplemento dietético, vitaminas, un agente de agregación antiplaquetario y células epiteliales genéticamente modificadas.

Los ejemplos de un fármaco incluyen, pero no se limitan a, sirolimus, tacrolimus, paclitaxel, clobetasol, dexametasona, genisteína, heparina, beta-estadiol, rapamicina, everolimus, etilrapamicina, zotarolimus, ABT-578, Biolimus A9, docetaxel, metotrexato, azatioprina, vincristina, vinblastina, fluorouracilo, clorhidrato de doxorubicina, mitomicina, miomicina, novolimus, heparina sódica, una heparina de bajo peso molecular, un heparinoide, hirudina, argatroban, forskolina, vapiprost, prostaciclina, un análogo de prostaciclina, dextrano, D-pre-pro-arg-clorometilcetona, dipiridamol, glicoproteína IIb / IIIa, hirudina recombinante, bivalirudina, nifedipina, colchicinas, lovastatina, nitroprusida, suramina, un inhibidor de la serotonina, un esteroide, un inhibidor de la tioproteasa, triazolopirimidina, un óxido nítrico o donante de óxido nítrico, una super óxido dismutasa, una superóxido dismutasa mimética, estradiol, aspirina, angiopeptina, captopril, cilazapril, lisinopril, permirolast potasio, alfa-interferón, RGD bioactivo y sales, ésteres o análogos de los mismos.

Estos uno o más fármacos se disuelven en uno o más disolventes orgánicos. El uno o más disolventes orgánicos pueden ser, uno o más de, pero no están limitados a, uno o más disolventes orgánicos de bajo punto de ebullición y uno o más disolventes orgánicos con bajas temperaturas de evaporación. Los ejemplos de uno o más disolventes orgánicos pueden incluir, pero no se limitan a, acetona, metanol, etanol, alcohol isopropílico, 1-butanol, 2-butanol, 2-butanona, acetonitrilo, tetracloruro de carbono, clorobenceno, éter dietílico, dimetiléter dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etilo, clorometano, diclorometano y similares. En una forma de realización, la solución orgánica del uno o más fármacos se prepara disolviendo macro cristales de uno de sirolimus (rapamicina) y paclitaxel en uno o más de alcohol etílico y clorometano.

Posteriormente a la preparación de la solución orgánica del uno o más fármacos, se agrega una cantidad predeterminada de agua que tiene uno o más surfactantes disueltos a la solución orgánica de uno o más fármacos.

La cantidad predeterminada de agua puede depender de una cantidad del uno o más disolventes orgánicos utilizados para preparar la solución orgánica del uno o más fármacos. Una relación de la cantidad predeterminada de agua por la cantidad del uno o más disolventes orgánicos utilizados para preparar la solución orgánica del uno o más fármacos puede variar de 1:100 a 100:1. En una forma de realización, la relación de la cantidad predeterminada de agua por la cantidad de uno o más disolventes orgánicos utilizados para preparar la solución orgánica de uno o más fármacos se selecciona en función de uno o más puntos de re-precipitación asociados con el uno o más fármacos. Por ejemplo, una relación de la cantidad predeterminada de agua por la cantidad de uno o más disolventes orgánicos varía desde una parte de uno o más disolventes orgánicos por más de una parte de agua hasta el uno o más puntos de re-precipitación.

El uno o más surfactantes disueltos presentes en el agua pueden ser uno o más de, pero no están limitados a, un surfactante con un equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) que varía de 3.5 a 16, un emulsionante catiónico, un emulsionante aniónico, un emulsionante zwitteriónico y un emulsionante no iónico. Los ejemplos del uno o más surfactantes disueltos pueden incluir, pero no se limitan a, Tween-80, Tween-60, Tween 20, etoxilato de alcohol laurílico y etoxilato de alcohol tridecílico. Una relación de la cantidad predeterminada de agua por peso de uno o más surfactantes puede variar de  $1 \times 10^{-6}$  a 10% p / v. En una forma de realización, el uno o más surfactantes son Tween-80 y la relación de la cantidad predeterminada de agua por peso del uno o más surfactantes es de 20:1. La cantidad predeterminada de agua que tiene uno o más surfactantes disueltos se agrega a la solución orgánica de uno o más fármacos para obtener una primera mezcla.

El método incluye además la preparación de una solución orgánica de uno o más agentes biológicos utilizando uno o más disolventes orgánicos. El uno o más agentes biológicos pueden seleccionarse de uno o más de, pero no se limitan a, vehículos de fármacos, excipientes, componentes sanguíneos, excipientes derivados de la sangre,

fosfolípidos naturales, nano-partículas lipídicas sólidas, fosfolípidos obtenidos de un animal vivo, fosfolípidos sintéticos, lipoides, vitaminas y moléculas de azúcar.

Los ejemplos del uno o más agentes biológicos pueden incluir, pero no se limitan a, esteroides, vitaminas, estradiol, ácidos grasos esterificados, ácidos grasos no esterificados, glucosa, inositol, L-lactato, lipoproteínas, carbohidratos, fosfato de tricalcio, fosfato de calcio precipitado, fosfato de calcio tribásico, sustancias derivadas de al menos uno de humano, huevo y soja, fosfolipón 80H, fosfolipón 90H, Lipoide S75, Lipoide E80, Intralípido 20, Lipoide EPC, Lipoide E75, lípidos obtenidos de huevo, lípidos obtenidos de soja, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, cardiolipina y fosfatidiletanolamina.

El uno o más disolventes orgánicos pueden seleccionarse de uno o más de, pero no se limitan a, uno o más disolventes orgánicos de bajo punto de ebullición y uno o más disolventes orgánicos con bajas temperaturas de evaporación. Los ejemplos de uno o más disolventes orgánicos pueden incluir, pero no se limitan a, acetona, metanol, etanol, alcohol isopropílico, 1-butanol, 2-butanol, 2-butanona, acetonitrilo, tetracloruro de carbono, clorobenceno, éter dietílico, dimetiléter dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etilo, clorometano, diclorometano y similares. En una forma de realización, la solución orgánica del uno o más agentes biológicos se prepara disolviendo macro-partículas de Lipoide E80 en uno o más de alcohol etílico y clorometano.

Una vez que se ha preparado la solución orgánica del uno o más agentes biológicos, se agrega una cantidad predeterminada de agua que tiene uno o más surfactantes disueltos a la solución orgánica del uno o más agentes biológicos. La cantidad predeterminada de agua puede depender de una cantidad del uno o más disolventes orgánicos utilizados para preparar la solución orgánica del uno o más agentes biológicos. Una relación de la cantidad predeterminada de agua por la cantidad del uno o más disolventes orgánicos utilizados para preparar la solución orgánica del uno o más agentes biológicos puede variar de 1:100 a 100:1. En una forma de realización, la relación de la cantidad predeterminada de agua por la cantidad de uno o más disolventes orgánicos utilizados para preparar la solución orgánica de uno o más agentes biológicos se selecciona en función de uno o más puntos de re-precipitación asociados con el uno o más agentes biológicos. Por ejemplo, la relación de la cantidad predeterminada de agua por la cantidad de uno o más disolventes orgánicos varía desde una parte del uno o más disolventes orgánicos por más de una parte de agua hasta uno o más puntos de recirculación asociados con uno o más agentes biológicos.

El uno o más surfactantes disueltos presentes en el agua pueden ser uno o más de, pero no están limitados a, un surfactante con un equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) que varía de 3.5 a 16, un emulsionante catiónico, un emulsionante aniónico, un emulsionante zwitteriónico y un emulsionante no iónico. Los ejemplos de uno o más surfactantes disueltos pueden incluir, entre otros, Tween-80, Tween-60, Tween 20, etoxilato de alcohol laurílico y etoxilato de alcohol tridecílico. Una relación de la cantidad predeterminada de agua por peso de uno o más surfactantes puede variar de  $1 \times 10^6$  a 10% p / v. En una forma de realización, la relación de la cantidad predeterminada de agua por el peso de uno o más surfactantes es de 20:1. La cantidad predeterminada de agua que tiene uno o más surfactantes disueltos se agrega a la solución orgánica del uno o más agentes biológicos para obtener una segunda mezcla.

Posteriormente, la primera mezcla y la segunda mezcla se someten por separado a un proceso de homogeneización. El proceso de homogeneización puede incluir homogeneizar la primera mezcla y la segunda mezcla por separado en un homogeneizador de ultrasonidos durante un tiempo predeterminado a una frecuencia predeterminada. La homogeneización de la primera mezcla y la segunda mezcla se realiza para obtener una solución de nanocristales del uno o más fármacos y una solución de nano-partículas del uno o más agentes biológicos, respectivamente. El tiempo predeterminado y la frecuencia predeterminada se determinan en función del tamaño deseado de los nanocristales de uno o más fármacos y las nano-partículas de uno o más agentes biológicos. La frecuencia predeterminada puede variar de 1 Hz a 30 KHz y el tiempo predeterminado puede variar de 10 minutos a 200 minutos, dependiendo del tamaño deseado de los nano-cristales del uno o más fármacos y las nano-partículas del uno o más agentes biológicos. Además, uno o más de la frecuencia predeterminada y el tiempo predeterminado pueden variar durante el método para obtener el tamaño deseado de los nano cristales del uno o más fármacos y las nano-partículas del uno o más agentes biológicos sin apartarse del alcance de la invención.

Alternativamente, la homogeneización de la primera mezcla y la segunda mezcla se puede llevar a cabo por separado utilizando un homogeneizador de alta velocidad, un homogeneizador de alta presión y un molino de bolas.

Los nano-cristales de uno o más fármacos y las nano-partículas de uno o más agentes biológicos obtenidos pueden tener un diámetro promedio de 10 nm a 5000 nm.

Posteriormente, la solución de nanocristales del uno o más fármacos y la solución de nano-partículas de uno o más agentes biológicos se mezclan y se someten a un proceso de homogeneización para obtener una solución de nano-vehículos. El proceso de homogeneización puede incluir la homogeneización de la solución de nano-cristales del uno o más fármacos y la solución de nano-partículas del uno o más agentes biológicos juntos en un homogeneizador de ultrasonidos. El proceso de homogeneización se realiza durante un tiempo predeterminado a una frecuencia predeterminada para obtener una solución de nano cristales del uno o más fármacos y una solución de nano-partículas del uno o más agentes biológicos. El tiempo predeterminado y la frecuencia predeterminada se

seleccionan en función del tamaño deseado de los nano-vehículos. La frecuencia predeterminada puede variar de 1 Hz a 30 KHz y el tiempo predeterminado puede variar de 10 minutos a 200 minutos, dependiendo del tamaño deseado de los nano-vehículos. Además, uno o más de la frecuencia predeterminada y el tiempo predeterminado se pueden variar durante el método para obtener un tamaño deseado de los nano-vehículos.

5 Durante la homogeneización de la solución de nanocristales del uno o más fármacos y la solución de nanopartículas del uno o más agentes biológicos, los nanocristales del uno o más fármacos se encapsulan con las nanopartículas del uno o más agentes biológicos. En otras palabras, como resultado de la homogeneización, las nanopartículas de uno o más agentes biológicos entran en contacto con los nanocristales del uno o más fármacos y cubren los nanocristales del uno o más fármacos para formar los nano-vehículos. Los nano-vehículos así formados  
10 incluyen los nano-cristales del uno o más fármacos encapsulados con las nano-partículas del uno o más agentes biológicos. Los nano-vehículos pueden tener un diámetro promedio de 10 nm a 5000 nm.

Alternativamente, el proceso de homogeneización se puede llevar a cabo utilizando un homogeneizador de alta velocidad, un homogeneizador de alta presión y un molino de bolas para obtener la solución de nano-vehículos. La solución de los nano-vehículos se puede usar para recubrir un dispositivo médico utilizando métodos de recubrimiento conocidos en la técnica. El dispositivo médico puede ser un dispositivo médico que puede insertarse o implantarse en el cuerpo para administrar un fármaco a un sitio objetivo dentro del cuerpo. Los ejemplos del dispositivo médico pueden incluir, pero no se limitan a, un stent, un balón, un stent montado en un balón (un stent pre-plegado), un catéter con balón, un implante espinal, un implante dental, un osteoimplante, un dispositivo de administración transdérmica de fármacos y cualquier otro dispositivo médico que pueda estar recubierto con los nano-vehículos para administrar los nano-vehículos a un sitio objetivo.  
15  
20

Los ejemplos del stent pueden incluir, entre otros, un stent endo vascular, un stent vascular periférico, un stent uretral, un stent prostático, un injerto de stent, un stent implantable permanentemente y un stent implantable temporalmente. El stent puede estar compuesto por uno o más de, pero no se limita a, un metal, una aleación, un polímero biodegradable y un polímero no degradable, SS316L, una aleación de cromo-cobalto L605 y una aleación de níquel-titanio, y cualquier stent que pueda recubrirse con los nano-vehículos.  
25

El balón puede ser cualquier balón formado por un material elastomérico que puede inflarse utilizando medios de inflado adecuados en los procedimientos de angioplastia transluminal percutánea y que puede recubrirse con los nano-vehículos para administrar los nano-vehículos a un sitio objetivo. Los ejemplos del balón pueden incluir, pero no se limitan a, un balón de angioplastia y cualquier otro balón utilizado para procedimientos de intervención cardiovascular.  
30

El método incluye además someter la solución de los nano-vehículos a uno o más de un proceso de extracción interfacial y un proceso de diálisis. En una forma de realización, una solución acuosa de los nano-vehículos se somete al proceso de diálisis. El proceso de diálisis se puede llevar a cabo utilizando métodos y técnicas conocidos en la técnica. Por ejemplo, la solución acuosa de los nano-vehículos puede someterse al proceso de diálisis utilizando bolsas de diálisis y flujo de aire laminar.  
35

Utilizando el proceso de diálisis, el uno o más nano-cristales de uno o más fármacos que no están encapsulados por las nano-partículas del uno o más agentes biológicos pueden ser eliminados de la solución de los nano-vehículos. Además, las nano-partículas del uno o más agentes biológicos que no se utilizan en la encapsulación también pueden eliminarse de la solución de los nano-vehículos. Los nano-vehículos así obtenidos tienen una superficie que está sustancialmente desprovista de los nano-cristales del uno o más fármacos.  
40

La solución de los nano-vehículos también puede someterse a un proceso de extracción interfacial antes del proceso de diálisis o después del proceso de diálisis. La solución de los nano-vehículos puede extraerse utilizando un proceso de extracción de disolvente interfacial para obtener un extracto de los nano-vehículos. El proceso de extracción interfacial incluye mezclar la solución de los nano-vehículos en uno o más de los uno o más disolventes orgánicos para obtener una mezcla. La mezcla se agita durante un período de tiempo particular y posteriormente se deja reposar. Después del período de tiempo determinado, la mezcla se separa en una fase acuosa y una fase orgánica. La fase orgánica contiene los nano-vehículos. A continuación, puede filtrarse la fase orgánica para eliminar cualquier impureza y obtener el extracto de nano-vehículos.  
45

A continuación, el extracto de los nano-vehículos puede recubrirse en el dispositivo médico para obtener un dispositivo médico recubierto con los nano-vehículos para administrar los nano-vehículos a un sitio objetivo. Alternativamente, el extracto de los nano-vehículos puede someterse a solidificación para obtener nano-vehículos solidificados. Los nano-vehículos solidificados se pueden utilizar para formular una de una forma de dosificación sólida, una forma de dosificación líquida y una forma de dosificación semilíquida. Los nano-vehículos solidificados también se pueden utilizar para la administración localizada de un fármaco a un sitio objetivo. Por ejemplo, los nano-vehículos solidificados pueden utilizarse para la administración localizada de los fármacos a un tumor. Además, los nano-vehículos solidificados se pueden utilizar para formular inyectables. Los inyectables se pueden utilizar para la administración localizada del fármaco en pacientes con cáncer.  
50  
55

En términos generales, de acuerdo con diversas formas de realización, la invención también se refiere a formulaciones de nano-vehículos. Las formulaciones de nano-vehículos pueden incluir, pero no se limitan a, la solución de nano-vehículos, los nano-vehículos, los nano-vehículos solidificados, una forma de dosificación sólida que contiene los nano-vehículos, una forma de dosificación líquida que contiene los nano-vehículos, una forma de dosificación semisólida que contiene los nano-vehículos.

Los nano-vehículos incluyen los nano-cristales del uno o más fármacos rodeados por las nano-partículas del uno o más agentes biológicos. El uno o más agentes biológicos se seleccionan de modo que el uno o más agentes biológicos muestren una afinidad por los tejidos de un sitio objetivo. Dicha afinidad facilita la transferencia eficiente de los nano-vehículos al sitio objetivo durante un tiempo. Además, debido al proceso de diálisis, los nano-vehículos carecen sustancialmente de cristales de fármaco en la superficie de los nano-vehículos. Por lo tanto, se puede evitar un contacto directo del uno o más fármacos con la superficie del dispositivo médico. Además, el uno o más fármacos entran en contacto con los tejidos del sitio objetivo solo cuando el nano-vehículo penetra en el sitio objetivo y el uno o más agentes biológicos se disuelven. Por lo tanto, se evita la exposición directa del uno o más fármacos a los tejidos del sitio objetivo y la superficie del dispositivo médico. Además, dado que no se utiliza ningún polímero para preparar los nano-vehículos, los nano-vehículos son menos tóxicos en comparación con las formulaciones o dispositivos médicos de administración de fármacos que contienen polímeros. Debido a las propiedades del uno o más agentes biológicos y el tamaño de los nano-vehículos, se puede lograr una mayor biodisponibilidad de los fármacos, una mayor biocompatibilidad y un mayor suministro de un fármaco a la parte máxima del sitio objetivo con una carga óptima de fármacos.

#### Ejemplo 1

El fosfolípido de huevo se obtuvo de Lipoid GmbH, número de lote: 1032313-16/903. Sirolimus se obtuvo de Fujian Chemicals, China, con una pureza superior al 99.5%. El agua, otros disolventes y reactivos utilizados fueron de calidad HPLC.

Se disolvió fosfolípido de huevo (200 mg p / p) en metanol. Se añadieron 100 ml de agua de calidad HPLC y Tween 80 (5 mg) para obtener una solución acuosa de fosfolípido de huevo. La solución acuosa de fosfolípido de huevo (10 ml) se sometió a homogeneización ultrasónica durante 20 a 25 minutos en un baño de agua enfriada con hielo para obtener la Solución A1. La Solución A1 así obtenida contenía nano-partículas de fosfolípido de huevo. La solución A1 se analizó posteriormente para detectar el tamaño de partícula utilizando el detector de tamaño Malvern Zeta Sizer (ZS90) [Malvern, Reino Unido]. La FIG. 1 ilustra la distribución de tamaño de las nano-partículas de fosfolípido de huevo detectada por Malvern Zeta Sizer (ZS90). Se encontró que el diámetro z promedio de las nano-partículas del fosfolípido de huevo era de 246.7 nm con el mayor diámetro hasta 531.2 nm.

Se disolvió sirolimus (10 mg p / p) en 5 ml de metanol y luego se agregaron 100 ml de agua de calidad HPLC para obtener una solución acuosa de sirolimus por recristalización. La solución acuosa de sirolimus (100 ml) se sometió a homogeneización ultrasónica durante 100 a 200 minutos en un baño de agua enfriada con hielo para obtener Solución A2. La Solución A2 así obtenida contenía nanocristales de sirolimus.

Después de 100 a 180 minutos, se añadieron 5 ml de Solución A1 a la Solución A2 gota a gota utilizando una pipeta de 5 ml con un proceso de homogeneización ultrasónica. La mezcla resultante se sometió a un proceso de homogeneización ultrasónica durante otros 15 minutos después de la adición completa para obtener la Solución A3.

La solución A3 se mantuvo en un baño de agua con un limpiador ultrasónico (PCI) durante 20 minutos. La solución A3 así obtenida contenía nano-vehículos (nanocristales de sirolimus rodeados por nano-partículas de fosfolípido de huevo). La solución A3 se analizó posteriormente para detectar el tamaño de partícula utilizando el detector de tamaño Malvern Zeta Sizer (ZS90) [Malvern, Reino Unido]. La FIG. 2 ilustra la distribución de tamaño de los nano-vehículos detectados por Malvern Zeta Sizer (ZS90). Los z diámetros promedio de los nano-vehículos fueron de 229.7 nm con un diámetro máximo de hasta 615.1 nm.

Se midió el potencial zeta de los nano-vehículos para estimar la estabilidad de las partículas. La FIG. 3 ilustra los nano-vehículos zeta potenciales detectados por Malvern Zeta Sizer (ZS90). El potencial zeta medido de los nano-vehículos fue de -24 a -31 mV. Indica una estabilidad moderada de los nano-vehículos en forma acuosa.

La solución A3 (solución acuosa de nano-vehículos) se sometió adicionalmente a extracción con diclorometano. La solución A3 (10 ml) se transfirió a 100 ml de embudo de separación. Se añadieron 30 ml de diclorometano a los 100 ml del embudo de separación. La mezcla resultante se agitó durante 15 minutos y a continuación se dejó reposar. Posteriormente, se observaron dos capas, es decir, una capa acuosa y la capa de diclorometano en el embudo de separación de 100 ml. La capa de diclorometano se separó de la capa acuosa. De manera similar, se agregaron 20 ml de diclorometano a los 100 ml en la misma solución acuosa que contenía el embudo de separación para permitir la extracción. La mezcla resultante se agitó durante 15 minutos y a continuación se dejó reposar. Posteriormente, se observaron dos capas, es decir, una capa acuosa y la capa de diclorometano en el embudo de separación de 100 ml. La capa de diclorometano se separó de la capa acuosa. La mezcla resultante se agitó durante 15 minutos y a continuación se dejó reposar. Se separaron 50 ml de la capa de diclorometano y la solución resultante A4, es decir,

la solución extraída de los nano-vehículos se almacenó en un matraz de medición pequeño de color ámbar con un número de lote.

5 Se mezclaron cuatro lotes de la solución extraída de los nano-vehículos en un vaso de vidrio. El vaso de precipitados de vidrio se mantuvo en un baño de agua para permitir la evaporación del disolvente para obtener una concentración de sirolimus de aproximadamente 0.5 mg / ml. Además, la solución de nano-vehículos se probó para la concentración de sirolimus utilizando HPLC. La FIG. 4 ilustra un cromatograma obtenido por HPLC para el cálculo de sirolimus en la solución A4.

10 Se calculó el área de pico para la solución A4. Se encontró que el tiempo de retención para la solución de muestra fue de 3.35 minutos y el "Área de muestra" correspondiente al pico para la solución de muestra fue de 1751.241 mV \* Sec. Posteriormente, se calculó la cantidad de sirolimus presente en la solución A4 utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de fármaco (Sirolimus)} = (\text{Área de muestra} / \text{Área estándar}) * (\text{Concentración estándar} / \text{Concentración de muestra})$$

Por lo tanto,

$$\text{Cantidad de fármaco} = (1715.241 / 1546.577) * (50 / (1/10)) = 554.52 \mu\text{g} / \text{ml}$$

15 Por lo tanto, se encontró que la concentración de sirolimus en la solución A4 era de 554.52 g / ml.

Ejemplo 2

Preparación de un dispositivo médico recubierto con nano-vehículos:

20 La solución de los nano-vehículos es decir, la solución A4 (1.4 ml) se introdujo en un depósito de una máquina de recubrimiento. El sistema de stent (Amazonia Croco: 2.75 \* 08 mm) se montó en un mandril giratorio de la máquina de recubrimiento. El sistema de stent se expuso a una boquilla de atomización de la máquina de recubrimiento. El sistema de stent se hizo rotar a aproximadamente 5 a 40 rpm girando el mandril. Simultáneamente, la solución de nano-vehículos se pulverizó sobre el sistema de stent a una presión de gas inerte de 0.5 a 4.0 psi y dos oscilaciones. De este modo, se obtuvo el sistema de stent recubierto con los nano-vehículos (en adelante "el sistema de stent recubierto"). A continuación se retiró el sistema de stent recubierto y se examinó bajo un microscopio de alta resolución para determinar la nivelación de la superficie del recubrimiento y cualquier partícula extraña. La FIG. 5 representa una imagen de microscopía óptica del sistema de stent recubierto. El microscopio Labomed estaba equipado con una cámara digital Motic para la captura de imágenes.

Ejemplo 3

Detección del contenido de fármaco del sistema de stent recubierto:

30 La cantidad de sirolimus cargada en el sistema de stent recubierto se calculó utilizando un análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los parámetros operativos de HPLC se seleccionaron de tal manera que: la velocidad de flujo se estableció en 1.0 ml / min. ( $\pm 0.01$ ),  $\lambda$  Maxima se ajustó a 277 nm ( $\pm 1$  nm), la temperatura de la columna se ajustó a 50 °C ( $\pm 2$  °C), la sensibilidad del detector se ajustó a 0.02 AUFS, el volumen de inyección fue de 20  $\mu$ L. y el tiempo de análisis se ajustó a 20 minutos.

35 Se utilizó un sistema de HPLC [Análisis de gradiente de baja presión analítico 2010 equipado con muestreador automático (S 5200), detector visible por UV (UV 2230), bomba de HPLC (P2230) y estación de trabajo de cromatografía A 2000] para el análisis de HPLC. La columna - C<sub>18</sub> [RP<sub>18</sub> Longitud 4.6 mm x 250 mm, tamaño de partícula 5  $\mu$ m] se unió con horno de columna [PCI] para el calentamiento. Las muestras se filtraron a través del filtro de jeringa de 0.45 micrones de PTFE millipore antes del análisis para evitar cualquier materia particulada. Se utilizaron matraces volumétricos de clase A pre-calibrados. Se utilizó cristalería de color ámbar para proteger contra la luz. Todos los disolventes y reactivos de Renchem utilizados fueron de calidad HPLC. Sirolimus se utilizó tal como se recibió de Fujian Chemicals, China, con una pureza superior al 99.5%.

La fase móvil incluía acetonitrilo: metanol: agua en una relación de concentración de 22:67:11. La fase móvil se desgasificó posteriormente en un limpiador ultrasónico durante 10 minutos.

45 Se tomó sirolimus (0.5 mg) en un matraz de medición estándar (SMF) limpio y seco de 10 ml. A continuación, el SMF se llenó hasta la marca con la fase móvil y se agitó durante 5 a 10 minutos. El SMF se mantuvo luego en un limpiador ultrasónico y se desgasificó durante 10 minutos. La solución se filtró a continuación a través de un filtro de jeringa de 0.45 micras para obtener una solución estándar con "Concentración estándar" de 50  $\mu$ g / ml.

50 Utilizando el vial de muestra de 20  $\mu$ L, se inyectó la solución estándar en el sistema de HPLC utilizando un muestreador automático y se obtuvo un cromatograma para la solución estándar. La FIG. 6 ilustra un cromatograma para la solución estándar. Posteriormente, se calculó el área del pico para la solución estándar ("Área estándar"). Se

encontró que el tiempo de retención para la solución estándar fue de 3.61 minutos y que el "Área estándar" correspondiente al pico para la solución estándar fue de 1546.577 mV \* Sec.

5 Para la cuantificación del contenido de fármaco cargado en el sistema de stent, la solución de muestra se preparó insertando el sistema de stent recubierto en 10 ml de SMF cargado con metanol (10 ml). El SMF se mantuvo a continuación en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos para permitir que el sirolimus presente en el sistema de stent recubierto se disolviese completamente en el metanol. De esta manera, se obtuvo la solución de muestra.

10 La solución de muestra se inyectó en el inyector HPLC. Se obtuvieron un inyector y un cromatograma para la solución de muestra. La FIG. 7 ilustra un cromatograma para la solución de muestra. Posteriormente, se calculó el área del pico para la solución de muestra ("Área de muestra"). El tiempo de retención para la solución de muestra se encontró que era de 3.63 minutos y se encontró que el "Área de muestra" correspondiente al pico para la solución de muestra era de 197.032 mV \* Sec. Posteriormente, se calculó la cantidad de sirolimus presente en el sistema de stent recubierto utilizando la siguiente fórmula:

Cantidad de fármaco (cargado en el sistema de stent recubierto) =

(Área de muestra / Área estándar) \* (Concentración estándar / Concentración de muestra)

15 Por lo tanto, la cantidad de fármaco =  $(197.032 / 1546.577) * (50 / (1/10)) = 63.69 \mu\text{g}$

Por lo tanto, se encontró que la cantidad de fármaco cargada en el sistema de stent recubierto de 2.75 x 08 mm era de 63.69  $\mu\text{g}$ .

#### Ejemplo 4

Preparación de nano-vehículos solidificados y / o formas de dosificación sólidas de nano-vehículos:

20 La solución 4 se evaporó hasta la sequedad. Los residuos sólidos se recogieron y se secaron adicionalmente al vacío a 40 °C para eliminar los disolventes residuales. Los nano-vehículos solidificados resultantes se almacenaron en un vial de vidrio en un refrigerador a 4 – 10 °C.

#### Ejemplo 5

Preparación de inyectables:

25 Se disolvieron 10 mg de los nano-vehículos solidificados (obtenidos tal como se explica en el Ejemplo 4) en los 100 ml de etanol para obtener una solución de 0.1 mg / ml de los nano-vehículos solidificados. Se llenó 1 ml de solución de nano-vehículos en un vial hermético en condiciones estériles. Finalmente, el vial hermético se selló con purga de nitrógeno gaseoso para evitar cualquier contaminación del aire. A los viales así obtenidos se les asignó un número de lote y se almacenaron. De manera similar, se prepararon y almacenaron viales con 1 mg / ml y 5 mg / ml de concentración de nano-vehículos solidificados.

#### Ejemplo 6

Tratamiento de diálisis de la solución de nano-vehículos:

35 La bolsa de diálisis de 6 mm (Spectra Por 10 mm de diámetro plano) se enjuagó con agua caliente. Un extremo de la bolsa de diálisis se ató y a continuación el lado interno de la bolsa de diálisis se enjuagó con PBS. La solución A3 (obtenida en el Ejemplo 1) se transfirió a la bolsa de diálisis bajo una campana de flujo laminar (Alliance Enterprise, INDIA). El extremo abierto de la bolsa de diálisis se sujetó a continuación con un cierre de tubo de diálisis para evitar la contaminación de la interfaz líquido-aire. La bolsa de diálisis se sumergió en 500 ml a 1 L pre-enfriado (de 4 a 10 °C) de Tris-0.15 M de 25 mM desgasificado a pH 7.5 (RT) durante 12 - 18 horas y se desgasificó de 12 a 18 horas en PBS con pH 7.4 pH. Después de 24 a 36 horas, la bolsa de diálisis que contenía la solución A3 se retiró del medio bajo un flujo de aire laminar. La bolsa se cortó con una cuchilla estéril por encima de la pinza de manera cuidadosa y la muestra se transfirió al recipiente cerrado hermético.

45 Diversas formas de realización de la invención proporcionan formulaciones de nano-vehículos y métodos para preparar los nano-vehículos. Las formulaciones de nano-vehículos muestran una afinidad mejorada para los tejidos de un sitio objetivo, lo que facilita la transferencia eficiente de los nano-vehículos, al sitio objetivo durante un tiempo. La invención también proporciona nano-vehículos libres de polímeros que son menos tóxicos en comparación con las formulaciones o dispositivos médicos de administración de fármacos que contienen polímeros. Además, debido a las propiedades del uno o más agentes biológicos y el tamaño de los nano-vehículos, se puede lograr una mayor biodisponibilidad de los fármacos, una mayor biocompatibilidad y una administración mejorada de un fármaco a la parte máxima del sitio objetivo con una carga óptima de fármaco utilizando las formulaciones de los nano-vehículos descritos en este documento.

Los expertos en la materia se darán cuenta de que las ventajas reconocidas anteriormente y otras ventajas descritas en el presente documento son meramente ejemplares y no pretenden ser una representación completa de todas las ventajas de las diversas formas de realización de la invención.

5 En la presente memoria descriptiva, se han descrito formas de realización específicas de la presente invención. Sin embargo, un experto en la técnica aprecia que pueden realizarse diversas modificaciones y cambios sin apartarse del alcance de la presente invención, tal como se expone en las reivindicaciones a continuación. Por consiguiente, la memoria descriptiva y las figuras deben considerarse en un sentido ilustrativo en lugar de restrictivo, y todas estas modificaciones pretenden incluirse dentro del alcance de la presente invención. Los beneficios, las ventajas, las soluciones a los problemas y cualquier elemento (s) que pueda causar que se produzca algún beneficio, ventaja o solución o se hagan más pronunciados no deben interpretarse como características o elementos críticos, necesarios o esenciales de cualquiera o de todas las reivindicaciones. La presente invención se define únicamente por las reivindicaciones adjuntas, incluidas las modificaciones realizadas durante el período de esta solicitud y todos los equivalentes de las reivindicaciones tal como se publicaron.

10

## REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar nano-vehículos, en que el método comprende:
  - 5 mezclar una solución orgánica de un fármaco y una solución orgánica de un agente biológico por separado con una cantidad predeterminada de agua que tiene al menos un surfactante disuelto para obtener una primera mezcla y una segunda mezcla respectivamente;
  - homogeneizar la primera mezcla y la segunda mezcla por separado para obtener una solución de nanocristales del fármaco y una solución de nano-partículas del agente biológico respectivamente;
  - 10 someter la solución de nano-cristales del fármaco y la solución de nano-partículas del agente biológico juntas a una homogeneización por ultrasonidos para obtener una solución de nano-vehículos; y
  - realizar al menos uno de una extracción interfacial y una diálisis en la solución de nano-vehículos para obtener los nano-vehículos.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en que la extracción interfacial de la solución de nano-vehículos produce un extracto de los nano-vehículos, en que el extracto de los nano-vehículos puede recubrirse en un dispositivo médico.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, que comprende además solidificar los nano-vehículos para obtener nano-vehículos solidificados, en que los nano-vehículos solidificados pueden utilizarse para al menos uno de un suministro oral y un suministro sistémico del fármaco.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en que la solución orgánica del fármaco comprende el fármaco y un disolvente orgánico, en que el disolvente orgánico se selecciona de al menos uno de entre acetona, metanol, etanol, alcohol isopropílico, 1- butanol, 2- butanol, 2-butanona, acetonitrilo, tetracloruro de carbono, clorobenceno, éter dietílico, dimetiléter dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etilo, clorometano y diclorometano.
- 30 5. El método de la reivindicación 1, en que la solución orgánica del agente biológico comprende el agente biológico y un disolvente orgánico, en que el disolvente orgánico se selecciona de al menos uno de entre acetona, metanol, etanol, alcohol isopropílico, 1- butanol, 2- butanol, 2-butanona, acetonitrilo, tetracloruro de carbono, clorobenceno, éter dietílico, dimetiléter dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etilo, clorometano y diclorometano.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, en que al menos uno de una proporción de la cantidad predeterminada de agua por una cantidad de la solución orgánica del fármaco y una proporción de la cantidad predeterminada de agua por la solución orgánica del agente biológico varía de 1:100 a 100:1.
- 40 7. El método de la reivindicación 1, en que el al menos un surfactante disuelto se selecciona de al menos uno de un agente surfactante con un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) que varía de 3.5 a 16, Tween-80, Tween-60, Tween 20, etoxilato de alcohol laurílico, etoxilato de alcohol tridecílico, un emulsionante catiónico, un emulsionante aniónico, un emulsionante zwitter iónico y un emulsionante no iónico.
- 45 8. El método de la reivindicación 1, en que la primera mezcla y la segunda mezcla se homogeneizan por separado utilizando un homogeneizador de ultrasonido durante un tiempo que oscila entre 10 minutos y 200 minutos a una frecuencia que oscila entre 1 Hz y 30 kHz en un baño de agua helada.
- 50 9. El método de la reivindicación 1, en que la solución de nano-cristales del fármaco y la solución de nano-partículas del agente biológico se someten juntas a la homogeneización de ultrasonidos durante un tiempo que varía de 10 minutos a 200 minutos a una frecuencia desde 1 Hz hasta 30 kHz en un baño de agua helada.
- 55 10. El método de la reivindicación 1, en que el fármaco se selecciona de al menos uno de entre un agente antirrestenótico, un agente antiproliferativo, un agente antiinflamatorio, un agente antineoplásico, un agente anticoagulante, un agente antifibrina, un agente antitrombótico, un agente antimitótico, un agente antibiótico, un agente antialérgico y un antioxidante, un agente antiproliferativo, estrógenos, un inhibidor de la proteasa, anticuerpos, un agente inmunosupresor, un agente citostático, un agente citotóxico, un bloqueador de los canales de calcio, un inhibidor de la fosfodiesterasa, un inhibidor de la prostaglandina, un suplemento dietético, vitaminas, un agente de agregación antiplaquetario y células epiteliales genéticamente modificadas.
- 60 11. El método de la reivindicación 1, en que el fármaco se selecciona de al menos uno de sirolimus, tacrolimus, paclitaxel, clobetasol, dexametasona, genisteína, heparina, beta-estadiol, rapamicina, everolimus,

- 5 etilrapamicina, zotarolimus, ABT-578, Biolimus A9, docetaxel, metotrexato, azatioprina, vincristina, vinblastina, fluorouracilo, clorhidrato de doxorubicina, mitomicina, miomicina, novolimus, heparina de sodio, una heparina de bajo peso molecular, un heparinoide, hirudina, argatroban, forskolina, vapirost, prostaciclina, un análogo de prostaciclina, dextrano, D-phe-pro-arg-clorometilcetona, dipiridamol, glicoproteína IIb / IIIa, hirudina recombinante, bivalirudina, nifedipina, colchicinas, lovastatina, nitroprusida, suramina, un bloqueador de la serotonina, un esteroide, un inhibidor de la tioproteasa, triazolopirimidina, un óxido nítrico o donante de óxido nítrico, una superóxido dismutasa, una superóxido dismutasa mimética, estradiol, aspirina, angiopeptina, captopril, cilazapril, lisinopril, permirolast potasio, alfa interferón, RGD bioactivo y sales, ésteres o análogos de los mismos.
- 10
12. El método de la reivindicación 1, en que el fármaco es al menos uno de sirolimus, tacrolimus, paclitaxel y sales, ésteres o análogos de los mismos.
- 15
13. El método de la reivindicación 1, en que el agente biológico se selecciona de al menos uno de entre un vehículo de fármacos, un excipiente, un componente sanguíneo, un excipiente derivado de la sangre, un fosfolípido, nano-partículas lipídicas sólidas, un lipóide, una vitamina y una molécula de azúcar.
- 20
14. El método de la reivindicación 1, en que el agente biológico se selecciona de al menos uno de entre un esteroide, una vitamina, un estradiol, un ácido graso esterificado, un ácido graso no esterificado, glucosa, inositol, L-lactato, una lipoproteína, un carbohidrato, fosfato tricálcico, fosfato cálcico precipitado, una sustancia derivada de al menos uno de humano, huevo y soja, fosfolipón 80H, fosfolipón 90H, Lipoides S75, Lipoides E80, Intralípido 20, Lipoides EPC, Lipoides E75, un lípido obtenido de huevo, un lípido obtenido de la soja, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, cardiolipina y fosfatidiletanolamina.
- 25
15. El método de la reivindicación 1, en que el agente biológico se selecciona de al menos uno de entre un Lipoid E80 y un fosfolípido obtenido a partir de huevo.
- 30
16. El método de la reivindicación 1, en que los nano-vehículos comprenden el fármaco encapsulado dentro del agente biológico, en que la superficie de los nano-vehículos está desprovista del fármaco y los nano-vehículos están desprovistos de cualquier polímero.
17. El método de la reivindicación 1, en que el tamaño de los nano-vehículos varía de 10 nm a 5000 nm.

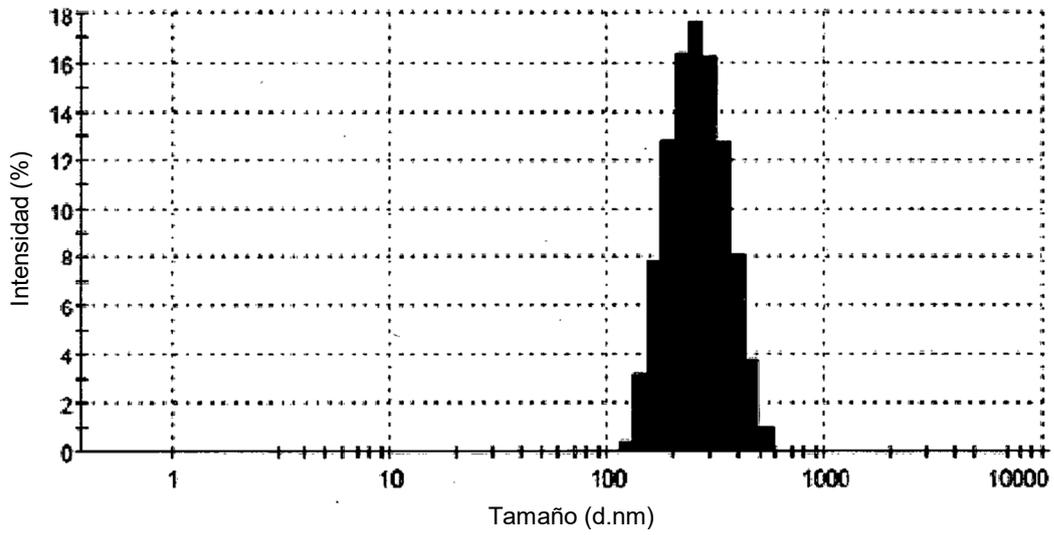


FIG. 1

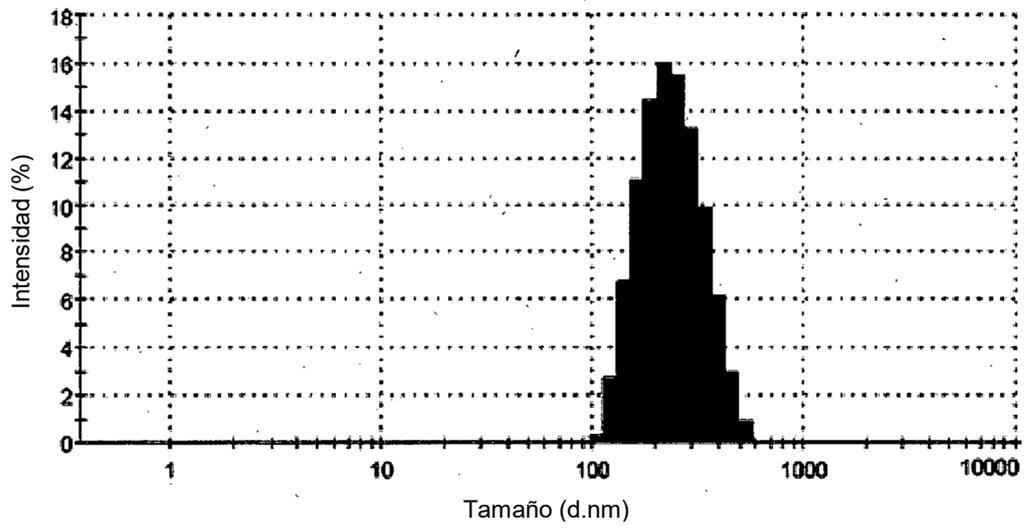


FIG. 2

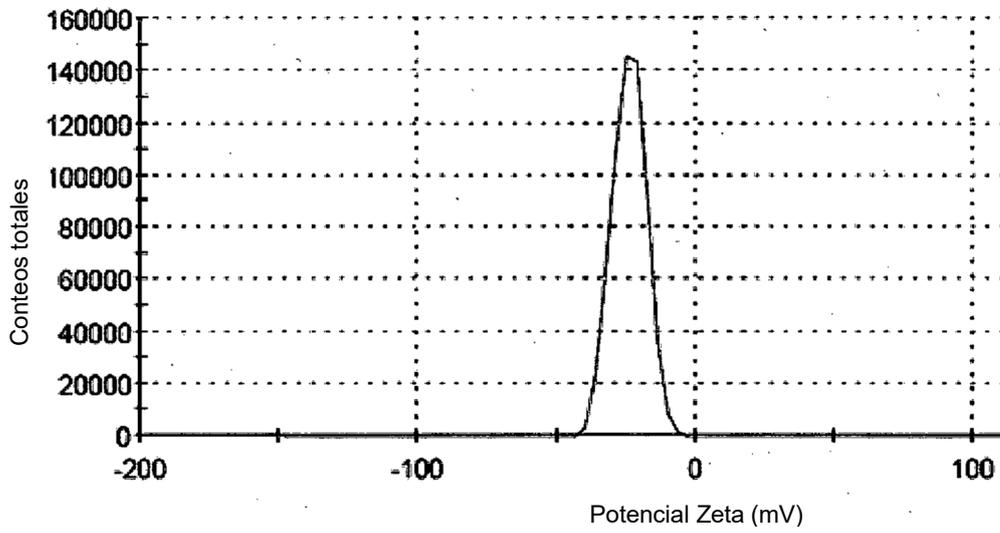
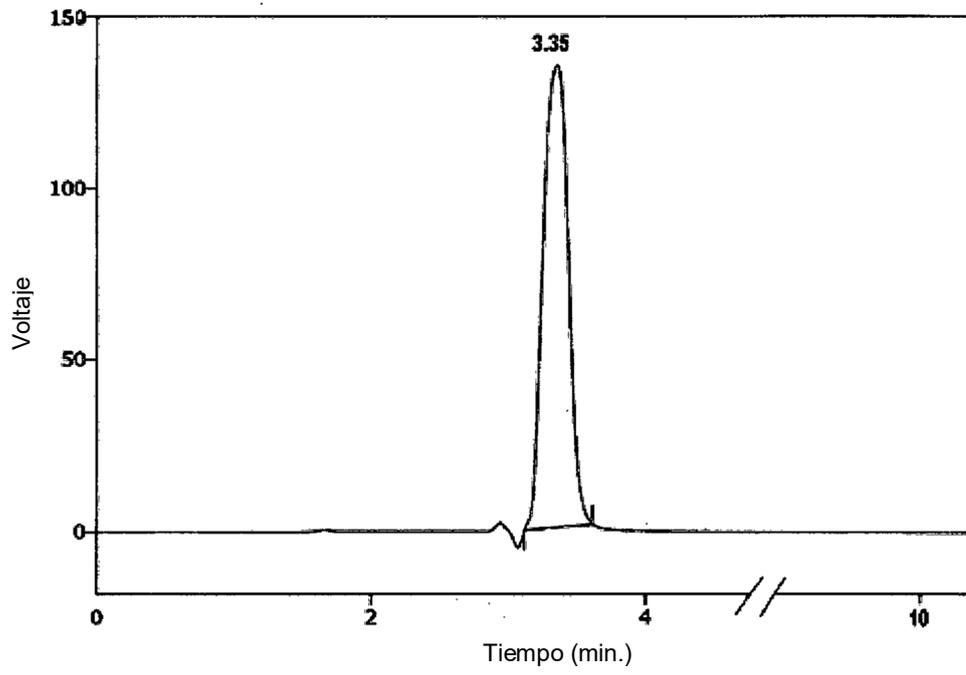


FIG. 3



**FIG. 4**



**FIG. 5**

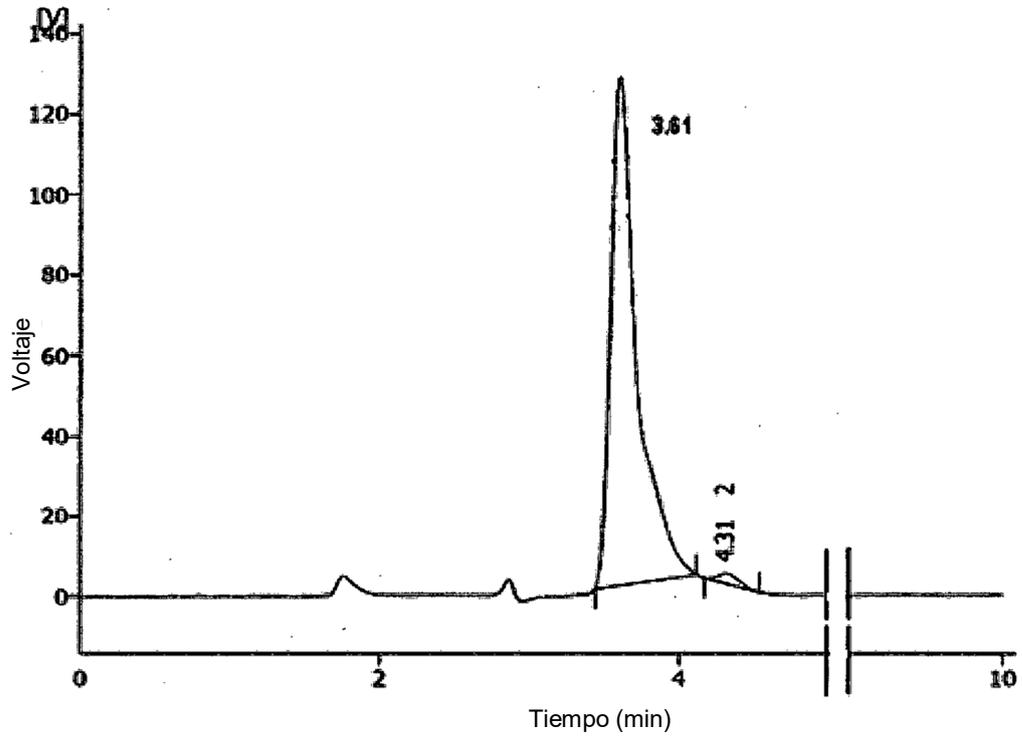


FIG. 6

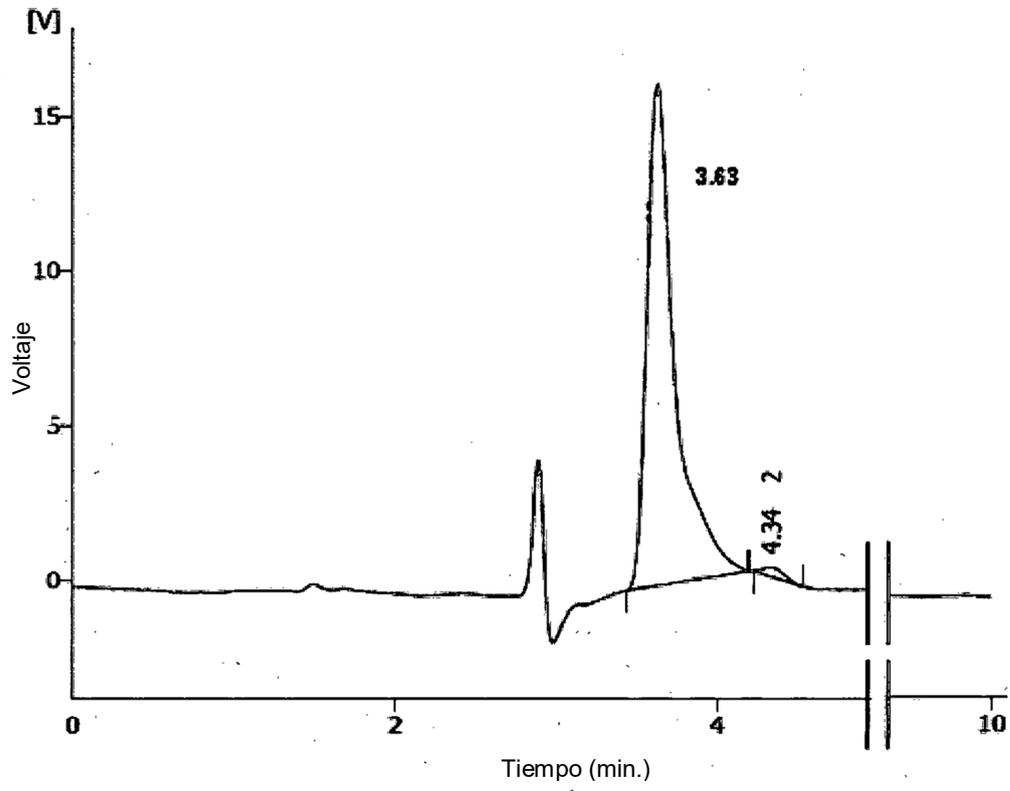


FIG. 7