

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 194**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00	(2006.01) A61K 31/366	(2006.01)
A61K 9/51	(2006.01) A61K 31/7048	(2006.01)
A61K 47/22	(2006.01) A61K 9/127	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01) A61K 36/67	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)	
A61K 31/436	(2006.01)	
A61K 31/05	(2006.01)	
A61K 31/17	(2006.01)	
A61K 31/343	(2006.01)	
A61K 31/352	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2013 PCT/IL2013/050047**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013 WO13108254**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2013 E 13703152 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2804587**

54 Título: **Formulación y método para aumentar la biodisponibilidad oral de fármacos**

30 Prioridad:

19.01.2012 US 201261588341 P
26.03.2012 US 201261615457 P
04.09.2012 US 201261696540 P
24.09.2012 US 201261704893 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.01.2020

73 Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY
 OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM
 LTD. (100.0%)
 Hi-Tech Park, Edmond J. Safra Campus, Givat Ram
 91390 Jerusalem, IL**

72 Inventor/es:

**HOFFMAN, AMNON;
 DOMB, ABRAHAM J.;
 ELGART ANNA y
 CHERNIAKOV, IRINA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 739 194 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

Formulación y método para aumentar la biodisponibilidad oral de fármacos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una formulación para aumentar la biodisponibilidad oral de fármacos cannabinoides utilizando pro-nanolipoesferas (PNL) y PNL que incorporan piperina.

Antecedentes de la invención

10 Muchos sistemas de dispersión están actualmente en uso o se están explorando para uso como vehículos de sustancias, particularmente compuestos biológicamente activos. Estos sistemas están diseñados para proteger la sustancia del entorno durante la administración, y para proporcionar una liberación controlada de la sustancia a un área fijada como objetivo. En algunos casos, el objetivo es acceder a sitios específicos en el cuerpo usando la dispersión. En otros casos, el objetivo es preparar un sistema portador de fármacos que actúe como reservorio en el sitio de inyección. Los sistemas de dispersión usados para formulaciones farmacéuticas y cosméticas pueden clasificarse como suspensiones o bien partículas que varían en tamaño desde algunos nanómetros hasta cientos de micrómetros, dispersadas en un medio acuoso o no acuoso usando agentes de suspensión. Las partículas sólidas incluyen microesferas, microcápsulas, nanopartículas y nanoesferas.

15 Uno de los métodos in situ de preparación de lipoesferas con un tamaño de partícula por debajo de 100 nanómetros se desarrolló usando un sistema [1] preconcentrado dispersable. Este sistema de administración, denominado pro-nanolipoesfera (LIPOESFERAS) está basado en una disolución que contiene un fármaco, un triglicérido, un fosfolípido y otros aditivos, en una mezcla de tensioactivos habituales, y un disolvente orgánico que es miscible con todos los componentes. Esta disolución forma espontáneamente nanopartículas cuando está en medios acuosos, e incluso in vivo, p.ej., el contenido del lumen GI superior.

20 La patente de EE.UU. N° 7.919.113 [2] describe preparaciones concentradas dispersables (nano-lipoesferas) para la solubilización de fármacos lipófilos para potenciar la biodisponibilidad de fármacos insolubles en agua.

25 Cuando se da por vía oral, un fármaco es absorbido en la monocapa de enterocitos en el lado basolateral del intestino, donde puede sufrir metabolismo y/o eflujo de vuelta al lumen por transportadores trans-membranales. Desde el lado apical de los enterocitos el fármaco es administrado por la vena portal al hígado, y después a la circulación sanguínea sistémica. La biodisponibilidad se define como la fracción de una dosis administrada de fármaco no cambiado que alcanza la circulación sistémica. Por definición, cuando una medicación se administra por vía intravenosa, su biodisponibilidad es 100%.

30 La investigación en el campo de la absorción de fármacos se ha centrado en maneras de aumentar la eficacia de los fármacos aumentando la absorción de los fármacos. Para este fin, se han usado métodos para aumentar la absorción de fármacos usando liposomas como vehículos y diseñando fármacos más lipófilos. Sin embargo, estos métodos no han tenido éxito en eludir la biotransformación en el hígado y la secreción biliar de los fármacos.

35 Por tanto, cuando se administra por vía oral una medicación, su biodisponibilidad disminuye generalmente debido a una absorción incompleta y al metabolismo de primer paso, y también puede variar de paciente a paciente. La biodisponibilidad es una de las herramientas esenciales en farmacocinética, ya que debe ser considerada cuando se calculan dosificaciones para vías intravenosas de administración.

40 A pesar de los grandes avances en el área de diversos sistemas de administración de fármacos tales como nanolipoesferas, muchos fármacos son propensos a una biodisponibilidad oral escasa, debido a barreras biológicas al nivel de los enterocitos, denominado "metabolismo de primer paso intestinal". Estos procesos biológicos incluyen metabolismo de Fase I, a saber, enzimas oxidativas, y metabolismo de Fase II, que incluye conjugación, sulfación y glucuronidación por enzimas intestinales. Además, la escasa biodisponibilidad oral se atribuye a transportadores de eflujo, p.ej. glicoproteína de permeabilidad (P-gp) en la membrana luminal de los enterocitos [3].

45 La P-gp puede efluir diversos fármacos de las células, lo que conduce al final a una terapia de fármacos sin éxito. También afecta a diversos parámetros farmacocinéticos de los fármacos, tales como sustratos de P-gp, como absorción, distribución, metabolismo y excreción del cuerpo, lo que conduce a una biodisponibilidad modificada y posibles reacciones adversas de los fármacos. Por tanto, se cree que la bomba de eflujo de P-glicoproteína impide que ciertos compuestos farmacéuticos atraviesen las células mucosales del intestino delgado y, por lo tanto, sean absorbidos en la circulación sistémica.

50 El conocimiento de las estrategias para eludir la bomba de eflujo de P-gp es crítico para la terapia de fármacos dirigidos a un objetivo y el diseño de formulaciones, y el desarrollo de formas de dosificación. Está establecido que los fármacos y excipientes interactúan con la P-gp en un proceso complicado, y la información de su mecanismo de interacción no está clara aún.

Aunque hay varios métodos para inhibir procesos metabólicos y de eflujo mediante agentes farmacológicos, hay

soluciones farmacéuticas limitadas para vencer este problema. Mucho más difícil es el caso del metabolismo de Fase II, donde actualmente no hay tecnologías eficaces que controlen este proceso biológico en el marco clínico.

La piperina es un alcaloide responsable de la acritud de la pimienta negra (*Piper nigrum*) y la pimienta larga (*Piper longum*), junto con la chavicina (un isómero de la piperina). El compuesto activo tanto en *Piper longum* como en *Piper nigrum* es la piperina (1-piperoilpiperidina), que se ha demostrado que posee actividad potenciadora de la biodisponibilidad con varios fármacos estructural y terapéuticamente diversos. Se ha encontrado que la propiedad potenciadora de la biodisponibilidad de la piperina puede ser atribuida a una absorción aumentada, que puede ser debida a una alteración en la dinámica de los lípidos de la membrana y un cambio en la conformación de enzimas en el intestino [4].

Kulkarni SK, et al., [5] examinaron el efecto antidepresor de curcumina con piperina, y concluyeron que la combinación de piperina (2,5 mg/kg, i.p. 21 días), con curcumina (20 y 40 mg/kg, i.p.) mostró una potenciación significativa de sus efectos antiinmovilidad, potenciadores de los neurotransmisores e inhibitorios de la monoamina oxidasa (MAO-A) en comparación con el efecto de la curcumina en solitario.

Pattanaik, S, et al., [6] examinaron el efecto de la administración simultánea de piperina (20 mg, p.o.) sobre la concentración en plasma de carbamazepina (300 mg o 500 mg), dos veces al día, en pacientes epilépticos, y encontraron que la piperina aumentó significativamente las concentraciones en plasma medias de carbamazepina en ambos grupos de dosis.

La patente de EE.UU. N° 5.439.891 [7] describe que se demostró que el constituyente activo de *Piper longum* y *Piper nigrum*, piperina, aumenta la biodisponibilidad de ciertos fármacos antituberculosos y antileprósicos como rifampicina, isoniazid, pirazinamida, etambutol y dapsona.

La patente de EE.UU. N° 5.616.593 [8] describe el uso de piperina para mejorar la biodisponibilidad de sustancias usadas para tratar la enfermedad del sistema cardiovascular, el sistema nervioso central, el tratamiento gastrointestinal o el sistema hemopoyético.

La patente de EE.UU. N° 5.536.506 [9] y la patente de EE.UU. N° 5.972.382 [10] describen composiciones y métodos para la mejora de la absorción gastrointestinal y la utilización sistémica de nutrientes y suplementos nutricionales, en donde las composiciones comprenden un mínimo de 98 por ciento del alcaloide piperina puro.

La solicitud de patente internacional WO2010/010431 describe una formulación auto-nanoemulsionante estable que contiene piperina, para la administración oral de fármacos lipófilos con capacidad de carga de fármacos y biodisponibilidad oral.

Referencias

- [1] Bekerman, T., J. Golenser, y A. Domb. J Pharm Sci., 93(5): 1264-70, 2004.
- [2] Patente de EE.UU. N° 7.919.113.
- [3] Lipinski, C.A. et al., Adv Drug Deliv Rev., 46(1-3):p. 3-26, 2001.
- [4] PATIL UK, International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research, 4:16-23, octubre de 2011.
- [5] Kulkarni S.K., Bhutani M.K., Bishnoi M. Psychopharmacology (Berl), 201:435-442, 2008.
- [6] Pattanaik S, et al., Phytoter Res. 23(9):1281-6, 2009. Doi: 10.1002/ptr.2676
- [7] Patente de EE.UU. N° 5.439.891.
- [8] Patente de EE.UU. N° 5.616.593.
- [9] Patente de EE.UU. N° 5.536.506.
- [10] Patente de EE.UU. N° 5.972.382.
- [11] Koul S, et al. Bioorg Med Chem., 8(1):251-68. 2000.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a la optimización de la biodisponibilidad de fármacos cannabinoides. El fin de la presente solicitud es proporcionar una formulación en nanopartículas superior, p.ej., un sistema de administración, para potenciar la biodisponibilidad oral de fármacos cannabinoides, que tienen una biodisponibilidad oral baja, combinando su administración con pro-nanolipoesferas (PNLs) o con piperina cargada en PNL (denominada en la presente memoria abreviadamente como piperina-PNL). La tecnología de PNL o piperina-PNL potencia la biodisponibilidad oral de fármacos, en particular fármacos lipófilos, biodisponibilidad que es limitada no solo debido al metabolismo de Fase I y/o el eflujo de P-gp sino también debido al metabolismo de Fase II directo en el intestino.

Los inventores de la presente invención han desarrollado sistemas de piperina-PNL que tienen múltiples actividades productivas concertadas que en total potencian sinérgicamente la biodisponibilidad de fármacos escasamente biodisponibles y dan como resultado una absorción más estable, y menos variable, de los fármacos desde el tracto gastrointestinal, y, por lo tanto, también una reducción de la dosis requerida del fármaco.

El desarrollo de piperina-PNL está basado en un sistema de pro-nanodispersión PNL que emplea una mezcla administrada por vía oral de lípidos, tensioactivos y co-disolvente, denominada en la presente memoria "concentrado

dispersable". Este concentrado puede administrarse por vía oral en combinación con un agente activo que se administra dentro de la formulación en pro-nanodispersión o bien se proporciona poco antes o después de la administración de la unidad de dosificación PNL (p.ej., cápsula de gelatina blanda). Por tanto, cuando se alcanza la fase acuosa del tracto gastrointestinal (GI), el PNL es liberado y forma espontáneamente nanopartículas de fármaco encapsuladas con un diámetro de partícula de 500 nm o menos.

La piperina-PNL utiliza este concepto y de una manera sinérgica con piperina, un componente derivado de alimentos naturales, y aumenta las propiedades de potenciación de la absorción del PNL descritas en la patente de EE.UU. N° 7.919.113 [2].

Además, debido a la escasa solubilidad en agua de la piperina y su muy buena solubilidad en lípidos, puede incorporarse fácilmente en el núcleo lipídico del PNL. Incorporar piperina en PNL presenta una oportunidad de manipular los sistemas críticos representados por el marcado efecto de primer paso de diversos fármacos (p.ej. cannabidiol y tetrahidrocannabinol). La incorporación de piperina aumenta la concentración de piperina que alcanza el intestino y el hígado, y potencialmente inhibe de manera competitiva el metabolismo de los fármacos en esos sitios metabólicos. Como resultado, la biodisponibilidad oral de los fármacos podría ser potenciada adicionalmente en comparación con la administración de los fármacos en PNL que no contiene piperina.

Como sabe un experto en la técnica, el aumento en la biodisponibilidad de un fármaco se define como un aumento en el Área Bajo la Curva (AUC); que es la medida integrada de las concentraciones sistémicas del fármaco con el tiempo, en unidades de masa-tiempo/volumen. La AUC desde tiempo cero (el tiempo de dosificación) hasta tiempo infinito (cuando no queda fármaco en el cuerpo) después de la administración de una dosis de fármaco es una medida de la exposición del paciente al fármaco.

Los inventores de la presente invención han encontrado, sorprendentemente, que la administración de cannabidiol (CBD) en piperina-PNL dio como resultado una biodisponibilidad oral relativa significativamente más alta en comparación con la administración de cannabidiol en PNLs sin piperina. La administración oral de CBD-piperina-PNL dio como resultado unos valores de AUC y C_{max} significativamente más altos, en 5 veces y 15 veces, respectivamente, en comparación con el control (como se describe adicionalmente más adelante), avalando el aumento en la biodisponibilidad oral de fármacos que es atribuido al sistema piperina-PNLs de la presente invención.

Por tanto, en un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición (formulación o un sistema de administración de fármacos) para la administración oral de al menos un fármaco, comprendiendo dicha composición:

a) un concentrado dispersable, caracterizado por ser capaz de formar, tras el contacto con una disolución acuosa, partículas de un diámetro medio menor que 500 nm, comprendiendo dicho concentrado dispersable:

(i) al menos un tensioactivo;

(ii) al menos un componente sólido a temperatura ambiente como se define en la reivindicación 1; y

(iii) un disolvente anfifílico;

b) una cantidad de al menos una piperina, análogo de piperina o isómero de la misma, en una cantidad suficiente para aumentar la biodisponibilidad de dicha composición, en donde la composición contiene un cannabinoide como fármaco.

El "concentrado dispersable" es una composición que forma espontáneamente una dispersión de nanopartículas en un medio acuoso, por ejemplo en agua tras una dilución, o en los jugos gástricos después de una administración oral. El "concentrado dispersable" incluye las composiciones que forman partículas sólidas que tienen un diámetro medio menor que 500 nm tras el contacto con un medio acuoso.

El "medio acuoso" hace referencia a un medio a base de agua, es decir, un medio líquido en el que el agua es el componente principal. De acuerdo con la presente invención, el medio acuoso puede ser el fluido digestivo formado en el estómago (p.ej., fluido gástrico formado por células que recubren el estómago), fluidos del tracto GI o cualquier medio líquido, in vivo o ex vivo en el que el concentrado dispersable definido en la presente memoria se disuelva.

El "tensioactivo" es cualquier compuesto anfifílico reconocido generalmente en la técnica por tener cualidades activas en superficies. Los tensioactivos incluyen generalmente compuestos aniónicos, catiónicos, no iónicos y de ion dipolar, descritos más adelante en la presente memoria. En algunas realizaciones, el tensioactivo es una combinación de al menos un tensioactivo de HLB (equilibrio hidrófilo/lipófilo) alto que tiene un HLB de al menos aproximadamente 8, con al menos un tensioactivo que es un tensioactivo de HLB bajo que tiene un HLB menor que aproximadamente 5.

En algunas realizaciones, el tensioactivo se selecciona de polioxietileno, monolaurato de sorbitán, monooleato de sorbitán y mezclas de los mismos.

En otras realizaciones, la composición comprende además una grasa etoxilada y compuestos grasos. Algunos ejemplos no limitantes se seleccionan de polietilenglicol-aceite de ricino hidrogenado (p.ej. cremofor y cremofor RH).

En aún otras realizaciones, la composición comprende además un fosfolípido seleccionado de un fosfolípido de huevo, un fosfolípido de soja y lecitina de diversas calidades y purezas.

En aún otras realizaciones, la composición comprende además un éster de ácido graso, p.ej., un éster de ácido graso que es una grasa sólida a temperatura ambiente tal como tricaprina.

- 5 En algunas realizaciones, la composición de la presente invención es de un tamaño de partícula que es menos que aproximadamente 200 nm.

En otras realizaciones, la composición es de un tamaño de partícula que es menos que aproximadamente 100 nm.

En aún otras realizaciones, la composición es de un tamaño de partícula que es menos que aproximadamente 50 nm.

- 10 Como se emplea en la presente memoria, el término "componente sólido" hace referencia a materiales sólidos que son sólidos a temperatura ambiente (definida en la presente memoria como 25°C) y que se disuelven en el concentrado dispersable, y que tras la dispersión en medio acuoso se hacen parte de las nanopartículas sólidas formadas.

Los componentes sólidos a ser usados en la presente invención se seleccionan de ácidos grasos, aminas grasas y alcoholes grasos o sus respectivos ésteres o amidas que se funden a una temperatura por encima de 25°C. Se describen en la presente memoria polímeros que son sólidos a 25°C, y parafinas y ceras que son sólidas a 25°C.

- 15 En algunas realizaciones, los ésteres de ácidos grasos se seleccionan de mono-, di- y triglicéridos y ésteres de ácidos grasos con alcoholes de cadena larga y corta que son sólidos a 25°C. En otras realizaciones, los componentes sólidos se seleccionan de tricaprina, trilaurina, trimiristina, tripalmitina, triestearina y mezclas de las mismas que son sólidas a 25°C.

- 20 En aún otras realizaciones, los componentes sólidos son compuestos que se solidifican in situ tras la dispersión en medio acuoso, p.ej., aceites vegetales parcial o totalmente hidrogenados que son sólidos a 25°C.

El "disolvente anfífilico" utilizado en una composición de la invención se selecciona de ésteres de alquilo inferiores (que tienen entre 1 y 8 átomos de carbono) de ácido láctico, ésteres de lactona de alquilo inferiores (que tienen entre 1 y 8 átomos de carbono) y N-metilpirrolidona. Algunos ejemplos no limitantes de ésteres de alquilo inferiores incluyen ésteres de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, hexilo, pentilo y octilo.

- 25 En algunas realizaciones, el disolvente anfífilico se selecciona de lactato de metilo, lactato de etilo, lactato de propilo, espirolactona y N-metilpirrolidona.

En algunas realizaciones, el disolvente anfífilico es una combinación de un éster de alquilo inferior de ácido láctico con N-metilpirrolidona.

- 30 En algunas realizaciones, el disolvente anfífilico comprende una combinación de un disolvente seleccionado de la familia de ésteres alquílicos inferiores de ácido láctico con un disolvente seleccionado de la familia de ésteres de lactona de alquilo o N-metilpirrolidona.

En otras realizaciones, el disolvente anfífilico se combina con un disolvente orgánico hidrófilo tal como etilenglicol, glicofurol o PEG 400.

- 35 Como se sabe, "piperina" es (E,E)1-[5-(1,3-benzodioxil)-5-il]-1-oxo-2,4-pentadienil]piperidina, que es el constituyente principal de muchas especies de Piper. De acuerdo con la presente invención, la piperina puede obtenerse en el mercado o de varias especies de pimientas de la familia *Piperaceae* (p.ej., *Piper nigrum*, *P. longum*, *P. tuberculatum*, *P. hancei*, *P. hispidum*, *P. retrofactum*, *P. attenuatum*, *P. genuense*, *P. chaba*, *P. aurantiacum*, *P. auritum*, *P. cubeba*, *P. peltatum*, *P. umbellatum* y *P. mystheticum*. *P. nigrum*).

En algunas realizaciones, la piperina utilizada de acuerdo con la invención se obtiene de *Piper longum* o *Piper nigrum*.

- 40 En otras realizaciones, la piperina utilizada de acuerdo con la invención está en forma pura (p.ej. piperina en una pureza de >95%).

- 45 En otras realizaciones, la piperina es un análogo de piperina (p.ej., derivados en los que el anillo de la piperidina está sustituido, p.ej., por un grupo amino, o un grupo éster (p.ej., ésteres de alquilo C₁₋₆) de metabolitos que contienen un grupo OH como se describe, por ejemplo, en Koul S, et al. [11]. Los análogos de piperina pueden obtenerse sintéticamente o producirse a partir de una fuente natural.

En otras realizaciones, la piperina es un isómero de piperina (p.ej. chavicina).

En algunas realizaciones, la cantidad de piperina en la composición de la invención está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal.

- 50 De acuerdo con la presente invención, la piperina o isómero de la misma puede incorporarse o no en las nanopropiedades formadas tras el contacto del concentrado dispersable con una disolución acuosa, y también puede

incorporarse parcialmente en dichas lipoesferas.

La composición que comprende piperina (y/o un isómero de piperina de la misma) y denominada brevemente piperina-PNL también se refiere en lo sucesivo como una composición *vacía*, en comparación con una composición que comprende un fármaco (descrita más adelante).

5 El aumento en la biodisponibilidad de fármacos atribuible a la administración de la piperina, como se describe en la presente memoria, puede determinarse midiendo las concentraciones sistémicas de fármaco totales con el tiempo después de la administración de una composición que comprende piperina y el fármaco en comparación con después de la administración del fármaco en solitario, definido como un aumento en el Área Bajo la Curva (AUC) como se describió anteriormente.

10 Por tanto, cuando la piperina o isómero de la misma se usan en cantidades suficientes en la composición de la presente invención, la actividad de P-gp y Citocromo P₄₅₀ 3A4 (abreviado como CYP3A4) se reduce.

Las cantidades suficientes de piperina o isómero de la misma son las cantidades necesarias para elevar las concentraciones sistémicas del fármaco con el tiempo, y pueden determinarse midiendo las concentraciones sistémicas de fármaco totales como reconoce fácilmente el experto en la materia.

15 El aumento en la biodisponibilidad del fármaco conseguido mediante el uso de la composición de la invención y practicando los métodos descritos en la presente memoria también da como resultado una reducción en la variación interindividual e intraindividual en la biodisponibilidad oral del fármaco, permitiendo al facultativo estandarizar mejor los regímenes de administración del fármaco usando el sistema piperina-PNL de la presente invención.

La composición definida en la presente memoria comprende al menos un fármaco, que es un cannabinoide.

20 El "fármaco" es generalmente cualquier compuesto químico capaz de ser administrado a un mamífero, que modifica o altera la fisiología del mamífero. Por tanto, de acuerdo con la presente invención, el "fármaco" es cualquier sustancia destinada al uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o un trastorno, a condición de que la composición contenga un cannabinoide como fármaco. Los fármacos incluyen sustancias sintéticas y existentes en la naturaleza, así como productos farmacéuticos reconocidos, tales como los enumerados en la Farmacopea de Estados Unidos, 25 (USP36 NF31, 2013: U.S. Pharmacopoeia National Formulary United States Pharmacopoeial Convention 36th Edition 2012; ISBN 978-3769258844).

La siguiente discusión es para ser entendida con la condición previa de que la composición contiene un cannabinoide como fármaco.

30 En algunas realizaciones, el fármaco es un compuesto lipófilo o una mezcla de dos o más compuestos lipófilos diferentes. Como se emplea en la presente memoria, el "compuesto lipófilo" es un compuesto que en su forma no ionizada es más soluble en lípido o grasa que en agua.

En algunas realizaciones, el compuesto lipófilo es un compuesto que tiene un LOG P ≥ 2 (siendo Log P una estimación de la lipofilicidad global de un compuesto, como reconoce el experto en la materia).

35 Los compuestos lipófilos, como se describe en la presente memoria, son generalmente compuestos que tienen una biodisponibilidad oral limitada debido al metabolismo de primer paso, por (1) enzimas metabólicas de Fase I, p.ej. CYP3A4, (2) enzimas metabólicas de fase II intraenterocitos (p.ej. UDP-glucuronosiltransferasas, sulfotransferasas, N-acetiltransferasas, glutatión S-transferasas y metiltransferasas; (3) eflujo de enterocitos de vuelta al lumen gastrointestinal por bombas de eflujo (responsables de la exportación de muchos fármacos lipófilos y anfífilos que impide su absorción intracelular) tales como P-gp (que está extensamente distribuida y expresada en el epitelio intestinal), y por tanto están asociadas con una biodisponibilidad oral escasa y variable.

40 En algunas realizaciones, los compuestos lipófilos son compuestos clasificados como Clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) propuesto por Amidon, G.L., et al. Pharm. Res., 12(3):413-20, 1995. El BCS es un modelo experimental que mide la permeabilidad y solubilidad en condiciones prescritas. Se considera que los compuestos de Clase II del BCS tienen baja solubilidad y alta permeabilidad, y los compuestos de Clase IV se caracterizan por tener baja solubilidad y baja permeabilidad.

45 Algunos ejemplos no limitantes de compuestos lipófilos que están sometidos tanto a CYP3A4 como eflujo por P-gp incluyen amiodarona, tacrolimus, cannabidiol, ciclosporina, indinavir, nifedipina, quinidina y verapamilo.

Algunos ejemplos no limitantes de compuestos que están sometidos a metabolismo de CYP3A4 intestinal y que no están sometidos a sustratos de eflujo por P-gp incluyen felodipina, midazolam, nifedipina y propafenona.

50 Algunos ejemplos no limitantes para compuestos sometidos a eflujo por P-gp y que no están sometidos a sustratos de metabolismo de CYP3A4 son talinolol y fexofenadina.

En algunas realizaciones, el compuesto lipófilo es un compuesto de Clase IV del BCS (p.ej. hidroclorotiazida, anfotericina B).

- Los ejemplos para compuestos escasamente solubles en agua con una biodisponibilidad oral afectada por el metabolismo de primer paso intestinal y hepático y sometidos a eflujo por P-gp son amlodipina, diltiazem, felodipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina, verapamilo, sirolimus, tacrolimus, atorvastatina, lovastatina, simvastatina, fexofenadina, buspirona, carbamazepina, pimozida, midazolam, triazolam, alendazol, itraconazol, cisaprida, colchicina, sildenafil, anfotericina B, esteroides, polifenoles y cannabinoides.
- 5 En algunas realizaciones, el compuesto lipófilo es un nutraceutico, un producto alimenticio o un agente homeopático (p.ej., polifenoles, carotenoides, ciclosporina).
- En otras realizaciones, el fármaco es un compuesto lipófilo o una mezcla de al menos dos compuestos lipófilos.
- En algunas realizaciones, el compuesto lipófilo es Amiodarona.
- 10 En algunas realizaciones, el compuesto lipófilo es Tacrolimus.
- En algunas realizaciones, el compuesto lipófilo es Talinolol.
- En aún otras realizaciones, el compuesto lipófilo es ciclosporina A.
- La composición de la presente invención contiene un cannabinoide o una mezcla de cannabinoides como fármaco. Algunos ejemplos no limitantes de cannabinoides son tetrahidrocannabinol, cannabidiol (CBD), cannabinol, cannabigerol, tetrahidrocannabivarina, cannabidivarina y cannabicromeno.
- 15 De acuerdo con la presente invención, dado que la composición comprende un fármaco, como se define en la presente memoria, el fármaco puede incorporarse o no en las pro-nanolipoesferas formadas tras el contacto del concentrado dispersable con una disolución acuosa, y también puede incorporarse parcialmente en dichas lipoesferas.
- En algunas realizaciones, la composición de la invención comprende además un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, que es fisiológicamente tolerable y no produce por regla general una reacción adversa alérgica o similar, tales como molestias gástricas y mareos, cuando se administra a un mamífero tal como un ser humano.
- 20 La composición de la presente invención es una composición adecuada para la administración por vía oral (p.ej. bucal, sublabial, sublingual) usando una cápsula ingerible o cualquier otro medicamento formado en una corteza relativamente estable (p.ej. cápsula de gel blando, píldora, comprimido, gránulo).
- 25 En algunas realizaciones, la composición y el fármaco se administran en la misma formulación farmacéutica, es decir, en una única forma de dosificación unitaria.
- Se describe en la presente memoria que una composición y fármaco pueden ser administrados en una formulación farmacéutica diferente, es decir, en una forma de dosificación unitaria independiente.
- 30 De acuerdo con la presente invención, la composición definida en la presente memoria puede ser diluida o combinada también en un alimento o bebida antes de su alimentación a un sujeto.
- Hay un procedimiento no reivindicado en la presente memoria para preparar la composición de la invención, comprendiendo dicho procedimiento:
- 35 (a) disolver el disolvente anfífilo y opcionalmente fosfolípido (y opcionalmente calentar suavemente para conseguir la completa disolución del fosfolípido),
- (b) añadir al menos un tensioactivo a la disolución obtenida en la etapa (a) (y opcionalmente calentar suavemente y agitar para obtener una disolución homogénea).
- Este procedimiento está de acuerdo con la presente invención en tanto en cuanto dé como resultado composiciones de acuerdo con la reivindicación 1.
- 40 Dicho procedimiento puede comprender además una etapa (c) de añadir el fármaco (p.ej. como un polvo) al preconcentrado formado en la etapa (b) y opcionalmente calentar suavemente (p.ej. a entre aproximadamente 30°C y entre aproximadamente 50°C) y agitar para obtener una disolución homogénea que, tras una agitación suave en fase acuosa, forma espontáneamente una nanodispersión encapsulada del fármaco.
- 45 Cuando se desea una composición que comprende piperina, puede añadirse piperina (p.ej. como un polvo) con el fármaco.
- La relación de disolvente anfífilo y fosfolípido en la etapa (a) de dicho procedimiento puede estar entre 8 y 1, respectivamente.
- La relación de disolvente anfífilo y fosfolípido en la etapa (a) de dicho procedimiento puede ser aproximadamente 8:1, respectivamente.

La presente invención también contempla el uso de la composición de la invención para la preparación de un medicamento para aumentar la biodisponibilidad de un fármaco.

5 El medicamento puede incluir vehículos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes o diluyentes, que son bien conocidos por los expertos en la técnica y están fácilmente disponibles al público. Se prefiere que el vehículo farmacéuticamente aceptable sea uno que sea químicamente inerte a la piperina-PNL y el fármaco activo, y uno que no tenga efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso.

10 Las composiciones para administración oral pueden comprender (a) disoluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz de la composición disuelta en un diluyente no acuoso; (b) cápsulas, sachés, comprimidos, pastillas para chupar y grageas, que contienen cada uno una cantidad predeterminada de la composición, como sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido no acuoso apropiado; y (e) emulsiones no acuosas adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y los alcoholes de polietileno, con o sin la adición de un tensioactivo, agente de suspensión o agente emulsionante farmacéuticamente aceptables. Las formas de cápsulas pueden ser del tipo habitual de gelatina con corteza dura o blanda que contienen, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio y almidón de maíz. Las formas de comprimidos pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, celulosa microcristalina, goma arábiga, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes amortiguadores, agentes disgregantes, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes y vehículos farmacológicamente compatibles. Las formas de pastillas para chupar pueden comprender la composición en un aroma, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto, así como pastillas que comprenden la composición en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga, emulsiones y geles.

En otro de sus aspectos, que no se reivindica, la presente invención proporciona el uso de la composición de la invención para aumentar la biodisponibilidad de un fármaco.

25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona la composición de la invención para el uso en el tratamiento de al menos una enfermedad y/o trastorno.

La enfermedad es una enfermedad tratable con al menos un cannabinoide.

30 La “enfermedad tratable con al menos un cannabinoide” hace referencia generalmente a una enfermedad o trastorno seleccionado de dolor de cáncer intratable, dolor neuropático y crónico, dolor postoperatorio, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y espasticidad, fibromialgia, inflamación, trastornos gastrointestinales (p.ej. náusea y vómitos, trastornos de motilidad), esquizofrenia aguda, cáncer, tics y problemas de comportamiento experimentados por pacientes con el síndrome de Tourette, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, diabetes y complicaciones diabéticas, trastornos cerebrovasculares y glaucoma.

35 El término “tratamiento” o cualquier variación lingüística del mismo se usa en la presente memoria para denotar tratar la enfermedad, trastorno o afección, o mejorar, aliviar, reducir o suprimir síntomas de la enfermedad, o ralentizar o detener el progreso de la enfermedad.

En aún otro de sus aspectos, la presente invención proporciona el uso de la composición de la invención en combinación con otras modalidades terapéuticas.

40 Como se emplea en la presente memoria, el término “modalidades terapéuticas” hace referencia generalmente a cualquier agente terapéutico, tratamiento o protocolo/método que puede usarse en el tratamiento o alivio de una enfermedad o trastorno o al menos un síntoma de los mismos.

En algunas realizaciones, la modalidad terapéutica se selecciona de quimioterapia, terapia hormonal, terapia de radiación, cirugía, terapia biológica e inmunoterapia.

En algunas realizaciones, la modalidad terapéutica es una terapia no de fármaco.

45 Por tanto, según este aspecto de la invención, puede administrarse a un sujeto un agente terapéutico (que pertenece a la otra modalidad terapéutica) de acuerdo con el régimen terapéutico que es dictado por dicha otra modalidad terapéutica, mientras que la composición de la invención puede administrarse secuencialmente o sustancialmente de manera simultánea en formas de dosificaciones unitaria simples o múltiples.

50 De acuerdo con la presente invención, la administración del agente terapéutico que pertenece a dicha otra modalidad terapéutica puede llevarse a cabo por cualquier vía apropiada, que incluye vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares o cualquier otra vía de administración que sea adecuada para conseguir el efecto deseable de la otra modalidad terapéutica.

En algunas realizaciones, la composición de la invención se usa para tratar al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno tratados por dicha otra modalidad terapéutica. Por ejemplo, cuando la enfermedad es cáncer y la modalidad

terapéutica está indicada para erradicar el cáncer, la composición definida en la presente memoria puede usarse para tratar los síntomas de dolor asociados con el cáncer.

5 En otras realizaciones, la composición de la invención se usa como una terapia de adición (adyuvante) a dicha otra modalidad terapéutica para aumentar el tratamiento de la enfermedad o trastorno a ser tratados por dicha otra modalidad terapéutica. De acuerdo con tales realizaciones la administración de la composición de la invención junto con dicha otra modalidad terapéutica da como resultado un tratamiento más eficaz (p.ej. acortamiento del periodo de tiempo para conseguir la remisión, tratamiento y/o mejoría) de la enfermedad o trastorno tratados con dicha otra modalidad terapéutica que el que se habría obtenido sin la administración de la composición de la invención.

10 De manera general, cuando se usa en una terapia de adición, la composición de la invención se administra menos que 24 horas después del inicio del tratamiento con dicha otra modalidad terapéutica.

En la presente memoria se describe de manera ilustrativa un kit para administración oral de la composición de la invención, comprendiendo dicho kit:

- a) una composición vacía como se define en la presente memoria;
- b) instrucciones de uso.

15 El kit definido en la presente memoria puede comprender además al menos un fármaco, como se define en la presente memoria.

20 Los componentes compuestos en cualquiera de los kits pueden estar contenidos en un único recipiente o unidad contenedora o en recipientes independientes, y contener una etiqueta pegada a o empaquetada con el contenedor que describe los contenidos de los recipientes y proporciona indicaciones y/o instrucciones con respecto a la administración de los contenidos de los recipientes a un sujeto mamífero necesitado de tratamiento con dicho(s) kit(s). La forma de kit es particularmente ventajosa cuando los componentes están contenidos en recipientes diferentes para la administración en diferentes cantidades de dosificación o cuando el médico prescriptor desea la titulación de los componentes individuales del kit (p.ej., concentrado dispersable, piperina y fármaco).

25 Se describe además en la presente memoria una composición para administración oral de al menos un fármaco, que es un cannabinoide, comprendiendo dicha composición un concentrado dispersable, caracterizado por ser capaz de formar, tras el contacto con una disolución acuosa, partículas de un tamaño menor que aproximadamente 500 nm, comprendiendo dicho concentrado dispersable:

- (i) al menos un tensioactivo;
- (ii) al menos un componente sólido a temperatura ambiente; y
- 30 (iii) un disolvente anfifílico.

Debe apuntarse que donde se describen diversas realizaciones usando un intervalo dado, el intervalo se da como tal meramente por conveniencia y brevedad, y no debe ser interpretado como una limitación inflexible en el alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo tiene descritos específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo.

35 Se aprecia que ciertos rasgos de la invención, que se describen, por claridad, en el contexto de realizaciones independientes, también pueden ser proporcionados en combinación en una única realización. De manera inversa, diversos rasgos de la invención, que se describen, por ejemplo, en el contexto de una única realización, también pueden ser proporcionados por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertos rasgos descritos en el contexto de diversas realizaciones no son para ser considerados rasgos esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización sea inoperativa sin esos elementos.

Breve descripción de los dibujos

45 A fin de entender mejor el tema que se describe en la presente memoria e ilustrar cómo puede llevarse a cabo en la práctica, se describirán ahora realizaciones a modo de ejemplo no limitante solamente, con referencia a los dibujos acompañantes, en los que:

La Fig. 1 presenta un perfil de disolución comparativo de nanolipoesferas de AM (Amiodarona) que contienen cápsulas de gelatina blanda a pH 6,8 y 1,2 (n=3 para cada pH).

La Fig. 2 presenta una representación gráfica de la concentración de AM en plasma-tiempo (media \pm S.E.M.) después de la administración PO de AM y nanolipoesferas de AM, 12,5 mg/kg (n=6 para cada grupo).

50 La Fig. 3 presenta una representación gráfica de la concentración de CBD en plasma-tiempo (media \pm S.E.M.) después de la administración PO de CBD y nanolipoesferas de CBD, 12,5 mg/kg (n=6 para cada grupo).

La Fig. 4 presenta una representación gráfica de la concentración de talinolol en plasma-tiempo (media \pm S.E.M.) después de la administración por vía oral (PO) de 4 mg/kg de talinolol frente a nanolipoesferas de AM (n=5 para cada grupo).

5 La Fig. 5 presenta concentraciones en plasma ($\mu\text{g/ml}$) y tejido ($\mu\text{g/g}$) de AM después de la administración PO de 12,5 mg/kg de AM y nanolipoesferas de AM durante 5 días. Se encontró una diferencia significativa tanto en las concentraciones en plasma como en corazón e hígado correspondientes. (n=3 para cada grupo).

10 Las Figs. 6A-D presentan una representación gráfica de la concentración de AM en plasma-tiempo (media \pm S.E.M.) después de la administración PO de 12,5 mg/kg de AM frente a nanolipoesferas de AM (A), AM frente a nanolipoesferas de AM + blanco (B), nanolipoesferas de AM frente a nanolipoesferas de AM + blanco (C), y nanolipoesferas de AM frente a nanolipoesferas de AM + nanolipoesferas de blanco en la dosis de 12,5 mg/kg (D). (n=6 para cada grupo).

La Fig. 7 presenta una representación gráfica de la concentración de AM en plasma-tiempo (media \pm S.E.M.) después de la administración PO de nanolipoesferas de blanco después de la administración de AM (12,5 mg/kg) después de 2 h o agua después de la administración de AM (12,5 mg/kg) después de 2 h (n=3 para cada grupo).

15 La Fig. 8 presenta los cambios en el IBI medios (como porcentaje de la línea de base) después de la administración de 12,5 mg/kg de AM en 3 formulaciones diferentes: AM, nanolipoesferas de AM, nanolipoesferas de AM + blanco y administración de nanolipoesferas de blanco. El fármaco se administró a t=60 min (n=6 para cada grupo).

20 La Fig. 9 presenta cambios en el HR medio (como porcentaje de la línea de base) después de la administración de 12,5 mg/kg de AM en 3 formulaciones diferentes: AM, nanolipoesferas de AM, nanolipoesferas de AM + blanco y administración de nanolipoesferas de blanco. El fármaco se administró a t=60 min (n=6 para cada grupo).

La Fig. 10 presenta un perfil de concentración en plasma-tiempo (\pm SE) obtenido después de la administración IV de 12,5 $\mu\text{g/kg}$ de Amiodacore® y nanolipoesferas de AM.

25 La Fig. 11 presenta valores de papp (\pm SEM) de talinolol frente a talinolol+nanolipoesferas de blanco en el modelo Caco-2 en direcciones A a B y B a A (n=3 para cada grupo). Se obtuvieron valores de Papp significativamente más altos ($p<0,001$) de talinolol+nanolipoesferas de blanco frente a talinolol en la dirección A a B. Se obtuvo una reducción significativa ($p<0,001$) en los valores de Papp para talinolol+nanolipoesferas de blanco frente a talinolol en la dirección B a A.

30 La Fig. 12 presenta la diferencia ($p<0,01$) encontrada entre concentraciones de AM intacta que quedaron después de 120 min de incubación de nanolipoesferas de AM frente a AM en microsomas CYP3A4 de rata aislados. Se encontró una diferencia significativa ($p<0,05$) entre testosterona con nanolipoesferas de blanco frente a testosterona en solitario incubada en las mismas condiciones (n=3 para cada estudio).

35 La Fig. 13 presenta valores de TEER (diagrama de la línea exterior) (\pm SD) de monocapas de células Caco-2 en presencia de nanolipoesferas de blanco frente a tampón, que se usó como control (n=3). El diagrama de columnas insertado representa valores de Papp (\pm SD) de manitol a través de las monocapas de Caco-2 en presencia de nanolipoesferas de blanco frente a tampón.

40 La Fig. 14 presenta el tanto por ciento de liberación de LDH (con relación a un control de 100% de liberación) tras la incubación de células Caco-2 con un medio que contenía diversas concentraciones de nanolipoesferas de blanco. Las nanolipoesferas aumentaron la liberación de LDH de una manera dependiente de la concentración, con la toxicidad más alta obtenida a una concentración de nanolipoesferas de 10%, y una toxicidad despreciable producida por una concentración de nanolipoesferas de 1% y menos.

La Fig. 15 presenta una representación gráfica de concentración de CBD en plasma-tiempo (media \pm S.E.M.) después de la administración PO de CBD, CBD-PNL y CBD-piperina-PNL a ratas, CBD 15 mg/kg; piperina 10 mg/kg (n=6 para cada grupo). (*) Se encuentra una diferencia significativa ($p<0,05$) del valor correspondiente de CBD.

45 La Fig. 16 presenta una representación gráfica de concentración en plasma frente al tiempo para CBD y cannabidiol (CBD)-PNL con y sin diversos potenciadores de la absorción: resveratrol (CBD-resveratrol-PNL), curcumina 1% y 2% (CBD-curcumina 1%-PNL y CBD-curcumina 2%-PNL, respectivamente) y CBD-piperina-PNL a ratas, CBD-15 mg/kg; (n=6 para cada grupo). *La concentración de piperina y resveratrol en la formulación fue 2%; **PNL- Pro-Nanolipoesferas. ***CBD- cannabidiol. (*) Se encuentra una diferencia significativa ($p<0,05$) del valor correspondiente de CBD. (†) Se encuentra una diferencia significativa ($p<0,05$) del valor correspondiente de CBD-PNL.

50 Descripción detallada de realizaciones

La presente invención se basa por tanto en el entendimiento de que es posible aumentar la biodisponibilidad oral de un fármaco, tal como un fármaco que contiene un compuesto lipófilo, administrando el fármaco en una composición que comprende pro-nanolipoesferas que incorporan piperina.

Los siguientes ejemplos específicos ilustran diversos aspectos de la presente invención, y no pretenden ser limitantes

de ninguna manera. Para todos los ejemplos, todos los ingredientes se disolvieron en el disolvente usando un agitador magnético, y se calentaron suavemente (~40-45°C) durante 15-45 minutos hasta que los ingredientes se disolvieron completamente. Para obtener partículas, la formulación del concentrado se diluyó en al menos 10 volúmenes de agua en disolución acuosa.

- 5 Para todos los experimentos descritos a continuación, el tamaño de partícula de la formulación diluida se midió con un analizador de tamaños de partícula VLA (Coulter N4 MD Submicron Particle Size Analyzer), adecuado para la determinación de tamaños de partícula submicrométricos. Se añadieron aproximadamente 75 µl de la formulación del concentrado a cinco mililitros de agua. El tamaño de partícula de la formulación diluida no cambió cuando se dispersó en cinco mililitros de disolución de HCl 0,1 N. Para todos los experimentos descritos a continuación, a menos que se indique otra cosa, el ingrediente farmacéutico activo (API) estuvo en la forma de base (y no en la forma de sal).

Los siguientes resultados experimentales presentan un amplio intervalo de experimentos que son acordes con la invención, en tanto en cuanto contienen un componente sólido como se define en la reivindicación 1, una piperina o un análogo o isómero de la misma, y un cannabinoide como fármaco.

Preparación de una composición que contiene amiodarona HCl (referencia)

- 15 La composición que contiene amiodarona HCl o tacrolimus, disolvente, TRC (tricaprina) o alternativamente TRL (trilaurina), fosfolípido de huevo (Avanti, EE.UU.), Tween™ 20, SPAN™ 80 y Cremophor™ se preparó como se da en la Tabla 1 (todas las cantidades de ingredientes en la Tabla 1, así como en las siguientes tablas, se dan en miligramos). Todas las composiciones tenían un tamaño de partícula menor que 100 nm. El tamaño de partícula disminuyó según aumentó la cantidad de lactato de etilo o bien polietilenglicol (PEG) 400. El lactato de etilo fue generalmente más eficaz que el polietilenglicol (PEG) 400 para proporcionar tamaños de partícula más pequeños.

Tabla 1. Formulaciones básicas de preconcentrado de Amiodarona

Ingrediente	1	2	3	4	5	6
Amiodarona HCL	10	10	10	10	20	20
Tricaprina	40	-	40	-	-	52
Trilaurina	-	40	-	40	52	-
Fosfolípidos de huevo	40	40	40	40	20	20
Tween™ 20	60	60	60	60	52	52
SPAN™ 80	40	40	40	40	52	52
Cremophor™	52	20	20	20	52	52
Lactato de etilo	160	160	-	-	190	180
Polietilenglicol (PEG) 400	-	-	160	160	-	-

Efecto de diversos ingredientes activos farmacéuticos (API) hidrófobos y vitaminas sobre el tamaño de partícula (referencia)

- 25 Se prepararon diferentes composiciones que contenían diversos Ingredientes Activos Farmacéuticos (API) hidrófobos y vitaminas como se describe en las Tablas 2A y 2B. Se examinó el efecto de los APIs sobre el tamaño de partícula cuando se dispersan en agua. Brevemente, el tamaño de las gotitas de las composiciones que incluían API hidrófobo era de pequeño tamaño (menos que 100 nm) en los casos de baja concentración de API, pero el tamaño de partícula aumentó en los casos en donde la concentración de API era más grande (y estaba por encima de 100 nm en algunos casos). Se recibió un fenómeno similar con las vitaminas.

También se ensayaron otros APIs hidrófobos y vitaminas, y se obtuvieron resultados similares (no mostrados en la siguiente tabla). En todos los casos, el ingrediente activo farmacéutico (API) estaba en la forma de base (y no en la forma de sal).

Tabla 2A. Formulaciones de diversos API hidrófobos en diferentes concentraciones

Ingrediente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Trilaurina	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Fosfolípidos de huevo	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

ES 2 739 194 T3

SPAN™ 80	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Tween™ 20	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Cremophor™	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Lactato de etilo	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140
Soltanol	20	40	-	-	-	-	-	-	-	-
Flecainida	-	-	20	40	-	-	-	-	-	-
Propafenona	-	-	-	-	20	40	-	-	-	-
Ezetimiba	-	-	-	-	-	-	20	40	-	-
Doxorudicina	-	-	-	-	-	-	-	-	20	40

Tabla 2B. Formulaciones de diversos API hidrófobos y vitaminas en diferentes concentraciones

Ingrediente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Trilaurina	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Fosfolípidos de huevo	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
SPAN™ 80	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Tween™ 20	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Cremophor™	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Lactato de etilo	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140
Sildenafil	20	40	-	-	-	-	-	-	-	-
Tadalafilo	-	-	30	60	-	-	-	-	-	-
Vardenafilo	-	-	-	-	20	40	-	-	-	-
Maxiletina	-	-	-	-	-	-	20	40	-	-
Vitamina D2	-	-	-	-	-	-	-	-	40	-
Vitamina D3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40

Formación de un preconcentrado de Amiodarona HCL (referencia)

- 5 La composición de Amiodorona HCL final se basó en estudios preliminares de optimización de formulaciones y se seleccionó según la capacidad de solubilización óptima del ingrediente activo y el tamaño de partícula más pequeño obtenido tras la dilución en fase acuosa, como se describió anteriormente. Inicialmente se pusieron un co-disolvente anfílico (lactato de etilo) y un fosfolípido (lecitina) en la relación de 8:1 respectivamente en un tubo de escintilación limpio y se calentaron hasta 40°C hasta que la lecitina se disolvió completamente. Después se añadieron un triglicérido
- 10 (trilaurina), aceite de ricino polioxilo 40-hidroxi, Tween 20 y Span 80 en la relación de 1:1:1:1; la mezcla se agitó suavemente y se calentó hasta 45°C hasta que se formó una disolución homogénea. Además, se añadió polvo de Amiodorona HCL, formando el preconcentrado de AM que contenía 3% de AM. Este preconcentrado se agitó suavemente y se calentó hasta 45°C hasta que se formó una disolución homogénea. Tras una agitación suave en fase acuosa, este preconcentrado forma espontáneamente una nanoemulsión aceite en agua de fármaco encapsulado. Se
- 15 usó el contenido de ampollas de Amiodacre® (50 mg/ml de Amiodarona HCl, 20,2 mg/ml de alcohol bencílico y 100 mg/ml de Tween 80 en agua) como AM de control en todos los estudios in vivo e in vitro.

Se preparó un preconcentrado de talinolol por el mismo método que el preconcentrado de amiodarona HCL, excepto por el diferente triglicérido que se usó. Para la preparación del preconcentrado se usó un triglicérido y lecitina. La concentración del compuesto, es decir, talinolol, en el preconcentrado fue 1%.

- 20 Se preparó un preconcentrado de blanco por el mismo método que el preconcentrado de amiodarona HCL, excepto que no se añadió ingrediente activo.

Se prepararon nanolipoesferas de tacrolimus por el mismo método para producir un preconcentrado que contenía 5% de tacrolimus. Se usaron cápsulas de Prograf® como tacrolimus de control en todos los estudios in vivo.

Nanolipoesferas de cannabidiol (CBD)

5 La formulación de nanolipoesferas de CBD se preparó por el método de preparación de preconcentrados. La composición de las nanolipoesferas finales se basó en estudios preliminares de optimización de formulaciones y se seleccionó según la capacidad de solubilización óptima del ingrediente activo y el tamaño de partícula más pequeño obtenido tras la dilución en fase acuosa. Antes de añadir el ingrediente activo, se prepararon dos tipos de mezclas. La primera es una mezcla de co-disolvente anfílico (lactato de etilo) y fosfolípido (lecitina) en la relación de 8:1, respectivamente. La segunda es una mezcla de un triglicérido (tricaprina), aceite de ricino polioxilo 40-hidroxi, Tween 10 y Span 80 en la relación de 1:1:1:1. Ambas mezclas se agitaron suavemente y se calentaron hasta 40°C hasta que se formó una disolución homogénea. Ambas mezclas se añadieron en la relación de 1:1 en peso a un tubo de escintilación limpio que contenía polvo de CBD, formando el preconcentrado de nanolipoesferas de CBD que contenía 3% de CBD. Este preconcentrado se agitó suavemente y se calentó hasta 40°C hasta que se formó una disolución homogénea. Tras una agitación suave en fase acuosa, este preconcentrado forma espontáneamente una nanoemulsión aceite en agua de fármaco encapsulado. Se usó una disolución de CBD en propilenglicol/EtOH/agua 15 30/30/40 respectivamente como control en todos los estudios in vivo.

Caracterización de las formulaciones

20 El diámetro de partícula medio, el potencial zeta y el índice de polidispersidad de las formulaciones formadas por dilución 1:10 del preconcentrado en agua se enumeran en la Tabla 3. Se administraron a los animales formulaciones de Amiodarona HCL, talinolol, CBD y blanco por dilución 1:10 del preconcentrado en agua. Por tanto, las caracterizaciones se evaluaron en AM después de esta dilución.

Tabla 3. Diámetro de partícula medio, potencial zeta e índice de polidispersidad de las formulaciones formadas por dilución 1:10 del preconcentrado en agua

Formulación	Tamaño (d. nm.)	Potencial zeta (mv)	Pdi
Amiodarona HCL	10	35,2	0,48
CBD	26		0,07
Talinolol	45	5,9	0,45
Blanco	52	13,2	0,38

25 Estudios de liberación de fármaco

Se evaluaron cápsulas de gelatina blanda que contenían nanolipoesferas de AM (0,5 g) en cuanto a liberación in vitro usando el método USP 24 estándar, un equipo de aparato II (palas) (Caleva ST7, G.B. Caleva Ltd., Dorset, UK). Se usó una velocidad de agitación de 75 rpm a 37°C en 500 ml de medio de liberación (pH 6,8 o bien pH 1,2). En puntos de tiempo predeterminados se extrajeron muestras del medio de liberación (0,5 ml) y se analizaron por HPLC (sección de métodos analíticos) en cuanto al contenido de AM. El tampón gástrico de pH 1,2 se preparó como sigue: se mezclaron 250 ml de NaCl 0,2M con 425 ml de HCl 0,2M, después se añadió agua destilada para hacer un volumen total de 1 l. El tampón duodenal de pH 6,8 se preparó como sigue: se mezclaron 112 ml de NaOH 0,1 M con 250 ml de dihidrogenofosfato de potasio, después se añadió agua destilada para hacer un volumen total de 1 l.

Estudio del tiempo de emulsificación

35 Para evaluar las propiedades de autoemulsificación, se evaluó el tiempo de emulsificación de las pro-nanolipoesferas según la Pharmacopea de Estados Unidos (USP) XXIII, aparato de disolución II (Caleva ST7, G.B. Caleva Ltd., Dorset, UK). Brevemente, se añadieron gota a gota 0,5 ml de las pro-nanolipoesferas a 500 ml de agua destilada a 37°C. Se proporcionó una agitación suave mediante una pala de disolución de acero inoxidable estándar que giraba a 50 rpm. El tiempo de emulsificación se evaluó visualmente como se reportó anteriormente.

40 Resultados del tiempo de emulsificación y liberación de fármaco

En ambos entornos de pH ensayados, las pro-nanolipoesferas presentaron un perfil de disolución similar, donde el fármaco se liberó enteramente en aproximadamente 10 minutos (Fig. 1). El tiempo de emulsificación obtenido para las pro-nanolipoesferas fue ~10 s.

Estudios farmacocinéticos in vivo

45 Animales: Se usaron ratas Wistar macho que pesaban 300-350 g para los estudios farmacocinéticos in vivo y

permeabilidad ex vivo. El proyecto estaba adherido a los principios del Cuidado Animal en Laboratorio. Todos los animales fueron privados de comida, pero no de agua 12 h antes de los experimentos. Todos los procedimientos quirúrgicos y experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética en la Experimentación con Animales de la Escuela Médica Hadassah de la Universidad Hebrea, Jerusalén. Se puso una cánula permanente en la vena yugular derecha de cada animal para el muestreo de sangre sistémica, por un método descrito por Hoffman, A. y G. Levy, J. Pharmacol Exp Ther., 249(1):117-22, 1989.

Estudios de biodisponibilidad de Amiodarona (AM)

Se prepararon nanolipoesferas de AM nuevas 30 min antes de cada experimento, mezclando en vórtex 1 ml del preconcentrado en 9 ml de agua precalentada a 37°C durante 30 s. La concentración de AM obtenida fue 3 mg/ml. Las nanolipoesferas de AM (12,5 mg/kg) se administraron a los animales por alimentación forzada oral (n=6). El grupo de control recibió 12,5 mg/kg de disolución de AM preparada a partir del contenido de ampollas Amiodacore® (AM 50 mg/ml) disuelto en agua para obtener una concentración de 5 mg/ml (n=6). Se tomaron muestras de sangre sistémica (0,35 ml) a 5 min predosis, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 26, 36 y 48 h postdosis.

Para estudios de biodisponibilidad de tacrolimus, se prepararon nanolipoesferas de tacrolimus nuevas 30 min antes de cada experimento, mezclando en vórtex 1 ml del preconcentrado en 9 ml de agua precalentada a 37°C durante 30 s. La concentración de AM obtenida fue 0,5 mg/ml. Las nanolipoesferas de tacrolimus (1 mg/kg) se administraron a los animales por alimentación forzada oral (n=6). El grupo de control recibió 1 mg/kg de suspensión de tacrolimus preparada a partir del contenido de cápsulas Prograf® suspendido en agua para obtener una concentración de 0,5 mg/ml (n=6). Se tomaron muestras de sangre sistémica (0,3 ml) a 5 min predosis, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 4, 8 y 12 h postdosis.

Para estudios de biodisponibilidad relativa de talinolol: se prepararon nanolipoesferas nuevas 30 min antes de cada experimento, mezclando en vórtex el preconcentrado en agua (1:9) precalentada a 37°C durante 30 s. La concentración de talinolol obtenida fue 1 mg/ml. Las nanolipoesferas de talinolol (4 mg/kg) se administraron a los animales por alimentación forzada oral (n=6). El grupo de control recibió 4 mg/kg de talinolol disuelto en PEG400:agua:etanol 25:60:15 para obtener una concentración de 1 mg/ml (n=6).

Para estudios de biodisponibilidad oral relativa de CBD, se prepararon nanolipoesferas nuevas 30 min antes de cada experimento, mezclando en vórtex el preconcentrado en agua (1:9) precalentada a 37°C durante 30 s. La concentración de CBD obtenida fue 3 mg/ml. Las nanolipoesferas de CBD (15 mg/kg) se administraron a los animales por alimentación forzada oral (n=6). El grupo de control recibió 15 mg/kg de disolución de CBD en propilenglicol/EtOH/agua 30/30/40 respectivamente (1 mg/ml) (n=6).

Se tomaron muestras de sangre sistémica (0,35 ml) a 5 min predosis, 20 min, 40 min, 1h, 1,3 h, 1,6 h, 2 h, 3 h y 4 h postdosis.

Resultados farmacocinéticos de AM

Los perfiles de concentración en plasma con el tiempo para AM y nanolipoesferas de AM después de la administración oral de una dosis equivalente a 12,5 mg/kg de AM se muestran en la Fig. 2. Los parámetros AUC y C_{max} correspondientes obtenidos en estos experimentos in vivo se enumeran en la Tabla 4. La biodisponibilidad de las nanolipoesferas de AM fue significativamente mayor en comparación con la AM en solitario. Se obtuvieron resultados similares para los valores C_{max} .

Otro hallazgo es que la absorción errática que caracteriza a la Amiodarona se hace más regular cuando el fármaco se administra en la nanoformulación. Las fluctuaciones reducidas en C_{max} son de alta importancia, dado que la Amiodarona se caracteriza por una ventana terapéutica estrecha y efectos secundarios que ponen en riesgo la vida. La reducción de tales fluctuaciones puede mejorar la seguridad de la terapia con Amiodarona. Además, la reducción de dosis global que puede conseguirse por una biodisponibilidad más alta podría dar como resultado una reducción de los efectos secundarios de este fármaco.

Resultados farmacocinéticos de tacrolimus

La representación gráfica de la concentración de tacrolimus frente al tiempo después de la administración oral del fármaco en solitario o compuesto en nanolipoesferas (1 mg/kg) se presenta en la Fig. 3, y los parámetros farmacocinéticos derivados se presentan en la Tabla 6.

La biodisponibilidad de las nanolipoesferas de tacrolimus fue significativamente mayor en comparación con el tacrolimus en solitario. Se obtuvieron resultados similares para los valores C_{max} .

La Tabla 5 demuestra claramente la variabilidad reducida en las concentraciones de tacrolimus en plasma obtenida después de la administración de nanolipoesferas de tacrolimus. La Tabla 5 representa el coeficiente de variación (%CV) en diversos puntos de tiempo durante dos horas después de la administración.

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos derivados de la administración PO de tacrolimus y tacrolimus - SNEDDS 1 mg/kg (n = 5 para cada grupo). *Se encuentra una diferencia significativa ($p < 0,05$) del valor correspondiente de tacrolimus.

C _{max} (ng/ml)	AUC (h*ng/ml)	
14,7±4/11	40,8±10,6	tacrolimus
23,8±2,66(*)	69,4±8,96(*)	Nanolipoesferas de tacrolimus

- 5 Tabla 5. Coeficiente de variación (%CV) en diversos puntos de tiempo durante dos horas después de la administración oral de tacrolimus y nanolipoesferas de tacrolimus 1 mg/kg (n = 5 para cada grupo). * %CV significativamente más bajo que los valores correspondientes en el mismo punto de tiempo en el grupo que recibió tacrolimus en solitario.

tacrolimus	nanolipoesferas de tacrolimus	tiempo (h)
95,1	31,5 (*)	0,25
90,8	35,8 (*)	0,5
73,2	9,1 (*)	0,75
83,5	22,0 (*)	1
70,5	30,7 (*)	1,5
103,5	45,4 (*)	2

- 10 Estos hallazgos demuestran que la biodisponibilidad de Amiodarona y tacrolimus aumenta no solo cuando están encapsulados en nanolipoesferas, sino incluso la presencia simultánea de nanolipoesferas vacías (es decir, sin fármaco) en el intestino. Además, la encapsulación en nanolipoesferas reduce la alta variabilidad en las concentraciones en plasma, típica para la Amiodarona, tacrolimus y otros compuestos de clase II BCS.

Resultados farmacocinéticos de CBD

- 15 Los perfiles de concentración en plasma con el tiempo para CBD y nanolipoesferas de CBD después de la administración oral de 15 mg/kg de CBD a ratas se muestran en la Fig. 3. Los parámetros AUC y C_{max} correspondientes obtenidos en estos experimentos in vivo se enumeran en la Tabla 6.

La biodisponibilidad de las nanolipoesferas de CBD fue significativamente mayor en comparación con el CBD en solitario. Se obtuvieron resultados similares para los valores C_{max}.

- 20 Tabla 6. Parámetros farmacocinéticos derivados de la administración PO de CBD y nanolipoesferas de CBD 15 mg/kg (n = 6 para cada grupo). * Se encuentra una diferencia significativa ($p < 0,05$) del valor correspondiente de CBD.

AUC (min*ng/ml)	C _{max} (ng/ml)	
15.533±11.679	105±103	CBD
46.356±14.567 (*)	337±100 (*)	Nanolipoesferas de CBD

- 25 Por tanto, la incorporación de CBD en nanolipoesferas es una estrategia prometedora para vencer los obstáculos principales en el modo de desarrollo de tratamientos orales con CBD tales como el metabolismo hepático de primer paso, la inestabilidad en el pH gástrico ácido y/o la baja solubilidad en agua, que conducen a una absorción incompleta.

Resultados farmacocinéticos de talinolol

- 30 Se obtuvieron concentraciones de talinolol en plasma significativamente más altas después de la administración de nanolipoesferas de talinolol en comparación con talinolol libre (Fig. 4). El aumento correspondiente en los valores AUC y C_{max} se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Resumen de parámetros farmacocinéticos derivados de la administración PO de talinolol frente a nanolipoesferas de talinolol a la dosis de 4 mg/kg (n = 5 para cada grupo).

Talinolol	Nanolipoesferas de talinolol	
11,9±2,71 (*)	35,98±8,09	AUC (h*ng/ml)
5,55±1,65	15,28±4,7	C _{max} (ng/ml)
1,15±0,19	1,31±0,23	T _{1/2} (h)

5 En base a este hallazgo, los autores de la invención concluyen que las nanolipoesferas poseen la capacidad de inhibir el eflujo P-gp intestinal y por tanto aumentar la biodisponibilidad oral de sustratos del eflujo P-gp intraenterocitos tras la administración oral.

Estudios de distribución en tejidos de AM

10 Las ratas fueron asignadas al azar en dos grupos (n=3 para cada grupo) y recibieron AM o nanolipoesferas de AM (12,5 mg/kg) durante 5 días, una vez al día por alimentación forzada oral. Dos horas después de la última dosis, se sacrificaron las ratas mediante CO₂ y el hígado y el corazón se retiraron y pesaron. También se recogieron muestras de plasma.

15 Los resultados de la distribución en tejidos (Fig. 5) corroboran el AUC en plasma aumentado obtenido después de la administración única de nanolipoesferas de AM. Después de la administración oral crónica de nanolipoesferas de AM y AM, los autores de la invención observaron concentraciones de AM en tejidos (corazón e hígado) y en plasma correspondientes aumentadas en el grupo de las nanolipoesferas de AM. De manera interesante, el grado de aumento fue similar en ambos tejidos y plasma (aproximadamente 1,5 veces). Dado que la AM tiene un alto volumen de distribución y se une extensamente a los tejidos, la correlación entre los resultados de dosificación simple y múltiple recalca que la biodisponibilidad potenciada de las nanolipoesferas de AM es un efecto constante y profundo.

Estudios de co-administración de nanolipoesferas de blanco

20 Para la evaluación del efecto de la co-administración de nanolipoesferas de blanco sobre la biodisponibilidad de AM, se prepararon nanolipoesferas de blanco nuevas que no contenían AM como se describió anteriormente, y se administraron por alimentación forzada oral. Se administró AM (Amiodacore®) inmediatamente después de eso por la misma vía (n=6). El volumen de las nanolipoesferas de blanco fue igual al volumen de nanolipoesferas de AM administrado en los estudios de biodisponibilidad, y la dosis de AM fue 12,5 mg/kg (aproximadamente 150 µl de disolución de AM de 25 mg/ml).

25 Para la evaluación del efecto de la co-administración de nanolipoesferas de blanco sobre la biodisponibilidad de nanolipoesferas de AM, se prepararon nanolipoesferas de AM como se describió anteriormente, y se administraron por alimentación forzada oral. La dosis administrada fue 12,5 mg/kg (n=6). Se prepararon nanolipoesferas de blanco nuevas y se administró 1 ml por la misma vía. Se tomaron muestras de sangre sistémica (0,35 ml) a 5 min de predosis, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 postdosis. Para impedir la deshidratación se administraron volúmenes iguales de disolución fisiológica a las ratas después de cada extracción de muestra de sangre. Se separó el plasma por centrifugación (4.000 g, 7 min, 4°C) y se almacenó a -20°C para los análisis pendientes (Figs. 6A-D).

Resultados de la co-administración de nanolipoesferas de blanco

35 La biodisponibilidad de nanolipoesferas de AM, nanolipoesferas de AM + blanco, y nanolipoesferas de AM + nanolipoesferas de blanco fue significativamente mayor en comparación con la AM en solitario. Se obtuvieron resultados similares para los valores C_{max}. Además, el valor de AUC después de la administración de nanolipoesferas de AM + nanolipoesferas de blanco fue significativamente más alto que otros sistemas de administración. No se encontró diferencia significativa entre los valores de AUC y C_{max} obtenidos después de la administración de nanolipoesferas de AM y de nanolipoesferas de AM+blanco. Estos resultados demuestran que la co-administración de nanolipoesferas de blanco con el fármaco tiene el mismo efecto sobre su biodisponibilidad que la incorporación en las nanolipoesferas.

45 Tabla 8. Resumen de parámetros farmacocinéticos derivados de la administración PO de AM, nanolipoesferas de AM, AM + nanolipoesferas de blanco y nanolipoesferas de AM + nanolipoesferas de blanco en la dosis de 12,5 mg/kg (n = 5 para cada grupo). * Se encuentra una diferencia significativa (p<0,05) del valor correspondiente de amiodarona. † Se encuentra una diferencia significativa (p<0,05) del valor correspondiente de (amiodarona + nanolipoesferas de blanco) y (nanolipoesferas + nanolipoesferas de blanco).

	AM	Nanolipoesferas de AM	Nanolipoesferas de AM + nanolipoesferas de blanco	AM + nanolipoesferas de blanco
AUC (h*µg/ml)	4,54±2,6	9,52±0,47 (*)	13,0±4,78 (*†)	10,65±4,38 (*)
Cmax (µg/ml)	0,36±0,07	0,66±0,08	1,32±0,54 (*†)	0,73±0,16 (*)
T1/2 (h)	11,3±4,26	18,0±5,41	16,6±6,36	12,3±2,21
V/F (ml/kg)	34.320±5.447	33.774±8.638	24.421±8.099	22.451±4.950
CL/F (ml/h/kg)	2.412±1.428	1.315±66,3	1.061±396	1.309±454
F (%)	23,66	49,60 (*)	67,96 (*)	55,50 (*)

Los valores de biodisponibilidad absoluta (F) se calcularon usando la siguiente ecuación

$$F = \frac{AUC_{iv} * Dosis_{po}}{AUC_{po} * Dosis_{iv}}$$

y utilizando los valores AUC_{iv} de AM de los estudios preliminares de los autores de la invención.

- 5 Además, los valores CL absolutos se volvieron a calcular multiplicando el CL/F obtenido para cada grupo por su valor F correspondiente calculado como se describió anteriormente. No se encontró diferencia significativa entre los valores CL de los diferentes grupos de estudio y el valor Cl_{iv} del estudio preliminar de los autores de la invención, implicando que la administración de nanolipoesferas no afectó a la velocidad y grado de aclaramiento de AM.

Investigación de la duración del efecto de las nanolipoesferas sobre la absorción GI y la recuperación de enterocitos

- 10 Se administraron nanolipoesferas de blanco recién preparadas como se describió anteriormente por alimentación forzada oral. El volumen de las nanolipoesferas de blanco fue igual al volumen de nanolipoesferas de AM administrado en los estudios de biodisponibilidad. Después de 2 horas se administró una disolución de AM de 12,5 mg/kg preparada a partir del contenido de ampollas de Amiodacore® como se describió anteriormente (n=3). El grupo de control recibió una disolución de 12,5 mg/kg de AM preparada a partir de ampollas de Amiodacore® en el mismo punto de tiempo
- 15 (n=3). En la investigación de la duración del efecto de las nanolipoesferas sobre la absorción GI de AM, el último punto de muestreo fue 12 horas, suponiendo que el efecto no durará más allá de esta fase.

Resultados de la duración del efecto de las nanolipoesferas sobre la absorción GI y recuperación de enterocitos

- 20 Los perfiles de concentración en plasma con el tiempo para AM después de la administración oral a una dosis de 12,5 mg/kg 2 horas después de la administración de nanolipoesferas de blanco o agua se muestran en la Fig. 7. No hubo diferencia significativa en las concentraciones en plasma de AM entre los grupos. Estos resultados sugieren que el efecto de las nanolipoesferas sobre la biodisponibilidad de AM es reversible y no dura más que 2 horas.

Estudio farmacodinámico (PD) de AM

- 25 La mayoría de las investigaciones descritas hasta ahora evaluaron la farmacocinética del fármaco cuando se incorpora en lipoesferas, y muy pocas investigaciones han demostrado eficacia farmacodinámica. Aunque los estudios farmacocinéticos son suficientes para establecer una prueba conceptual para las lipoesferas, los resultados del estudio farmacocinético deben ser corroborados preferiblemente por estudios farmacodinámicos. Esto es particularmente importante para fármacos que no muestran correlación farmacocinética-farmacodinámica. Tales aspectos deben ser considerados cuidadosamente mientras se planean investigaciones sobre las lipoesferas.

- 30 Se ha reportado que la bradicardia y la hipotensión son los efectos hemodinámicos más habituales causados por la administración aguda de AM. Varios estudios evaluaron el efecto de AM sobre la frecuencia cardíaca en ratas que se movían libremente usando un método de radiotelemedría después de una administración de AM IV y PO. La radiotelemedría es "la vanguardia de la técnica" para monitorizar funciones fisiológicas en animales despiertos y moviéndose libremente, a la vez que se minimizan los artefactos de estrés y los efectos de la anestesia.

- 35 Da Silva et al. (Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., 283(2):R543-8m 2002) reportaron un aumento significativo en un intervalo R-R de 5 min post administración de AM IV (50 mg/kg). Tal bradicardia, observada en varios estudios después de una única dosis IV alta de AM, puede ser atribuida a varios mecanismos; por ejemplo, acciones bloqueantes de los canales de Na⁺ y Ca²⁺ que deprimen la automaticidad del nódulo sinusal, un bloqueo del beta-adrenorreceptor no competitivo, una acción simpátolítica similar a la de la reserpina y un bloqueo directo del canal de

K⁺. En contraste, una dosis de AM más baja (25 mg/kg) desencadenó una breve taquicardia, indicando que solo la dosis de AM más alta pudo contrarrestar el baroreflejo que permite que ocurra la taquicardia refleja.

El efecto deferente de la AM sobre la frecuencia cardíaca se usó como marcador farmacodinámico para la evaluación del efecto farmacológico de la AM después de la administración oral.

5 Implantación de transmisores

Se mantuvieron ratas Wistar macho (Harlan, Israel) que pesaban 300-350 g en un ciclo de 12 h de luz/oscuridad con acceso libre a agua y comida (pienso estándar para ratas). Los animales fueron anestesiados para el periodo de cirugía por inyección intraperitoneal de 1 ml/kg de disolución de ketamina-xilazina (90/10%, respectivamente).

10 Se implantó subcutáneamente un transmisor ECG (TA11CA-F40, Data Sciences International Inc., St. Paul, MN) sobre la escápula con las conexiones en una configuración Conexión 2 haciendo un túnel subcutáneamente desde la incisión dorsal usando un trocar. La conexión negativa se puso en el área el hombro derecho y la conexión positiva se puso inmediatamente a la izquierda del espacio xifoide y caudal a la caja torácica.

Después de la cirugía se dejó que los animales se recuperaran durante 5 días. Durante las primeras 72 horas del periodo de recuperación los animales se trataron con Bitryl (5 mg/kg) y Tramadol (5 mg/kg).

15 Registro de datos y análisis

Una noche antes del registro los animales se volvieron a colocar en sus jaulas en la sala de registro a fin de ajustarlos al nuevo entorno. El experimento empezó después de que los animales estuvieron al menos 8 horas con privación de comida.

20 La señal de los transmisores se recibió mediante dos receptores RLA 2000 y se transmitió por medio de una Matriz de Intercambio de Datos a una tarjeta Dataquest PCI. Los datos se registraron de manera continua durante todo el experimento a una velocidad de 1.000 Hz sin corte de filtro y a una escala completa a 10 mV.

Los datos recogidos se interpretaron mediante el programa Dataquest A.R.T. El IBI (duración R-R, s) y HR (bpm) se calcularon en valores medios de cada 10 min del registro.

25 Al comienzo se registró la línea de base al menos durante 120 min. Después de establecer un registro estable se trataron las ratas por alimentación forzada oral. Durante el tratamiento se recogieron los datos y después se extrajeron en un análisis posterior.

Protocolo de dosificación

Dos grupos de tres ratas recibieron el tratamiento de una manera cruzada, lo que significa que cada rata recibió cada tratamiento una vez. Los tratamientos fueron como sigue:

30 AM: 12,5 mg/kg de disolución de AM preparada a partir del contenido de ampollas Amiodacore® (AM 50 mg/ml) disuelto en agua para obtener una concentración de 2,5 mg/ml.

35 Nanolipoesferas de AM: Se prepararon nanolipoesferas nuevas que contenían AM 30 min antes de cada tratamiento, por mezcla en vórtex de la pro-nanodispersión que contenía AM en agua (1:9) precalentada a 37°C durante 30 s. La concentración de AM obtenida fue 30 mg/ml. Las nanolipoesferas de AM (12,5 mg/kg) se administraron a los animales por alimentación forzada oral.

Después de cada fase de registro se dejaron las ratas durante el periodo de eliminación de 7 días antes de la siguiente fase de registro.

40 AM + lipoesferas de blanco: Se prepararon nanolipoesferas de blanco nuevas que no contenían AM como se describió anteriormente y se administraron por alimentación forzada oral. Se administró AM (Amiodacore®) inmediatamente después de eso por la misma vía. El volumen de las nanolipoesferas de blanco fue igual al volumen de nanolipoesferas de AM administradas al grupo de AM, y la dosis fue 12,5 mg/kg, idéntica.

Nanolipoesferas de blanco con nanolipoesferas de AM: Se prepararon nanolipoesferas de AM como se describió anteriormente y se administraron por alimentación forzada oral. La dosis administrada fue 12,5 mg/kg. Se prepararon nanolipoesferas de blanco nuevas y se administró 1 ml por la misma vía.

45 Un grupo de simulación recibió un volumen equivalente de nanolipoesfera sin ningún ingrediente activo.

Después de cada fase de registro se dejaron las ratas durante el periodo de eliminación de 7 días antes de la siguiente fase de registro.

Resultados farmacodinámicos

Una semana después de la implantación de los transmisores ninguno de los animales exhibió cambios significativos

en el peso corporal en comparación con el estado precirugía. Se observó un patrón de comportamiento normal 48-72 horas después de la cirugía, incluyendo ritmo circadiano, aseo, exploración de la jaula y reactividad a la manipulación.

5 Inicialmente, se realizó un registro de la línea de base a fin de obtener el patrón de señal y asegurar que las conexiones del ECG eran estables en sus puntos de inserción. Las señales del ECG no se filtraron ni suavizaron, ni durante la sesión de registro ni durante el análisis. Todos los animales mostraron una fuerza de señal y un patrón de ondas de ECG buenos. El registro dio amplitudes de onda R adecuadas y complejos QRS para las determinaciones de frecuencia cardíaca (HR) y variabilidad del intervalo R-R intralátido (IBI).

10 A fin de inspeccionar por separado el efecto de cada método de administración, los autores de la invención calcularon primero la duración del IBI de línea de base media a lo largo de 60 min antes de la administración. El fármaco se administró a t=60 min. Después de la administración se calculó el dato a lo largo de 180 min. El cambio neto se calculó como el porcentaje del cambio para cada modo de administración de fármaco en relación con el registro de la línea de base. Los cambios desde la línea de base en dos parámetros: IBI y HR se analizaron en dos puntos: 90 min después de la administración (fase media) y 180 min después de la administración (fase final) (Tablas 9A-B y 10A-B, respectivamente).

15 El grupo operado en simulación que recibió solo las nanolipoesferas de blanco sin ningún compuesto activo no exhibió ningún cambio significativo en la duración de IBI y HR.

Después de la administración de AM (12,5 mg/kg), los valores IBI medios disminuyeron de $0,175 \pm 0,006$ s a $0,143 \pm 0,0074$ s, y la frecuencia cardíaca aumentó de $344 \pm 13,58$ BPM a $452,916 \pm 20,01$ como se esperaba.

20 Cuando el fármaco se incorporó en las nanolipoesferas (nanolipoesferas de AM) el IBI medio aumentó de $0,179 \pm 0,0026$ s a $0,197 \pm 0,009$ s, y la frecuencia cardíaca disminuyó de $390,9 \pm 9,4$ BPM a $365,334 \pm 7,089$ BPM. Por tanto, al igual que cuando se incorporó el fármaco a la misma dosificación en las nanolipoesferas, se mostró un efecto inverso. Este efecto del fármaco, bradicardia, es característico a la alta dosificación de AM, lo que significa que la incorporación de fármaco a las nanolipoesferas aumenta la biodisponibilidad del fármaco y las concentraciones del fármaco en el sitio activo (tejido cardíaco). Se creó un efecto bradicárdico similar cuando se co-administró AM con nanolipoesferas de blanco (AM + nanolipoesferas de blanco): el IBI medio aumentó de $0,175 \pm 0,002$ s a $0,184 \pm 0,003$ s, y la HR disminuyó de $377,54 \pm 4,82$ BPM a $342,522 \pm 13,94$ BPM (Fig. 8 y 9).

30 Tabla 9: Cambios en HR (A) e IBI (B) medios (como porcentaje de la línea de base) después de la administración de 12,5 mg/kg de AM en 3 formulaciones diferentes: AM, nanolipoesferas de AM (SNEDDS), AM + nanolipoesferas de blanco y administración de nanolipoesferas de blanco, medidos en la fase media (90 min después de la administración oral)

A.			
FRECUENCIA CARDIACA (BPM)			
% DE CAMBIO	FASE MEDIA	LÍNEA DE BASE	
131,28	452,916±20,01	344±13,58	AM
93,46	365,334±7,089	390,9±9,4	SNEDDS DE AM
90,73	342,522±13,93	377,54±4,82	AM + SNEDDS DE BLANCO
105,72	354,605±18,43	335,42±12,89	SIMULACIÓN
FRECUENCIA CARDIACA (BPM)			
% DE CAMBIO	FASE FINAL	LÍNEA DE BASE	
128,43	443,07±11,06	344±13,58	AM
95,37	372,839±11,54	390,9±9,4	SNEDDS DE AM
92,61	349,626±8,00	377,54±4,82	AM + SNEDDS DE BLANCO
106,09	355,870±11,63	335,42±12,9	SIMULACIÓN
B.			
IBI (s)			

B.			
IBI (s)			
% DE CAMBIO	FASE MEDIA	LÍNEA DE BASE	
88,86	0,1435±0,008	0,175±0,006	AM
110,01	0,197±0,009	0,179±0,0026	SNEDDS DE AM
104,04	0,182±0,003	0,175±0,002	AM + SNEDDS DE BLANCO
98,57	0,173±0,01	0,175±0,001	SIMULACIÓN
IBI (s)			
% DE CAMBIO	FASE FINAL	LÍNEA DE BASE	
89,79	0,143±0,007	0,175±0,006	AM
108,76	0,195±0,008	0,179±0,0026	SNEDDS DE AM
105,39	0,184±0,003	0,175±0,002	AM + SNEDDS DE BLANCO
98,39	0,172±0,01	0,175±0,001	SIMULACIÓN

Tabla 10: HR (A) e IBI (B) medios Y CAMBIOS (como porcentaje de la línea de base) después de 12,5 mg/kg de AM después de la administración en 3 formulaciones diferentes: AM, nanolipoesferas de AM, AM + nanolipoesferas de blanco y administración de nanolipoesferas de blanco, medidos en la fase final (180 min después de la administración oral).

5

A.			
FRECUENCIA CARDIACA (BPM)			
% DE CAMBIO	FASE MEDIA	LÍNEA DE BASE	
131,28 (*)	452,916±20,01	344±13,58	AM
93,46 (*)	365,334±7,089	390,9±9,4	SNEDDS DE AM
90,73 (*)	342,522±13,94	377,54±4,82	AM + SNEDDS DE BLANCO
105,72	354,605±18,43	335,42±12,89	SIMULACIÓN
FRECUENCIA CARDIACA (BPM)			
% DE CAMBIO	FASE FINAL	LÍNEA DE BASE	
128,43 (*)	443,07±11,06	344±13,58	AM
95,37 (*)	372,839±11,54	390,9±9,4	SNEDDS DE AM
9,61 (*)	349,626±8,00	377,54±4,82	AM + SNEDDS DE BLANCO
106,09	355,870±11,63	335,42±12,89	SIMULACIÓN
B.			
IBI (s)			
% DE CAMBIO	FASE MEDIA	LÍNEA DE BASE	
88,86 (*)	0,1435±0,008	0,175±0,006	AM

B.			
IBI (s)			
% DE CAMBIO	FASE MEDIA	LÍNEA DE BASE	
110,01 (*)	0,197±0,009	0,179±0,0026	SNEDDS DE AM
104,04 (*)	0,182±0,003	0,175±0,002	AM + SNEDDS DE BLANCO
96,57	0,173±0,01	0,175±0,001	SIMULACIÓN
IBI (s)			
% DE CAMBIO	FASE FINAL	LÍNEA DE BASE	
89,79 (*)	0,143±0,007	0,175±0,006	AM
108,76 (*)	0,195±0,008	0,179±0,0026	SNEDDS DE AM
105,39 (*)	0,184±0,003	0,175±0,002	AM + SNEDDS DE BLANCO
98,39	0,172±0,01	0,175±0,001	SIMULACIÓN

Estos hallazgos demuestran que la biodisponibilidad de Amiodarona aumenta no solo cuando está encapsulada en nanolipoesferas, sino incluso con la presencia simultánea de nanolipoesferas vacías (es decir, sin fármaco) en el intestino. Además, la encapsulación en nanolipoesferas reduce la alta variabilidad en las concentraciones en plasma, típicas para amiodarona y otros compuestos de clase 2 del BCS. Los estudios farmacodinámicos de los autores de la invención corroboran los hallazgos farmacodinámicos y demuestran un efecto farmacodinámico similar tras la administración de nanolipoesferas de AM y AM + nanolipoesferas de blanco, que es significativamente diferente del efecto farmacodinámico obtenido tras la administración de AM libre.

Administración parenteral de las nanolipoesferas

En cuanto a la administración IV, la formulación de nanolipoesferas altera los parámetros de biodistribución de una molécula dada, así como su disposición. La Fig. 10 demuestra el perfil de concentración en plasma-tiempo obtenido después de la administración IV de 12,5 µg/kg de Amiodacore® y nanolipoesferas de AM. Puede verse que la administración de nanolipoesferas dio como resultado concentraciones en plasma más altas de AM en el compartimento central durante la primera fase de disposición. Los AUCs fueron 22,1 y 17,1 µg/ml después de la administración de nanolipoesferas de AM y Amiodacore® respectivamente.

Puede verse que las nanolipoesferas también alteran los parámetros farmacocinéticos del fármaco administrado. Se observa una reducción significativa en el volumen de distribución y en el aclaramiento de amiodarona cuando se administra como nanolipoesferas (Tabla 11). La reducción en Vss es un resultado de la mejor solubilidad del fármaco en plasma mientras está encapsulado en nanolipoesferas. Por tanto, se retiene más fármaco en el compartimento central. Según el fármaco encapsulado en la formulación alcanza barreras que contienen P-gp (tales como la barrera sangre-cerebro), podría poseer cualidades de penetración mejoradas debido a la capacidad de inhibición de P-gp de la formulación. Como resultado, la penetración de fármacos parenterales a tejidos que expresan P-gp será mejorada.

Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos obtenidos después de la administración IV de 12,5 µg/kg de Amiodacore® y nanolipoesferas de AM.

Cl (ml/h(kg))	Vss (ml/kg)	AUC (h*ug/ml)	HL (h)	
549	8.002	22,9	17,1	nanolipoesferas
818	18.138	15,3	22,1	Amiodacore

Investigación mecanística in vitro

Estudios de permeabilidad in vitro usando células Caco-2:

La línea celular Caco-2 es un modelo in vitro ampliamente usado para estudiar diversos aspectos de la permeabilidad intestinal de moléculas de fármacos, que fue establecido por Fogh en 1974. La línea celular Caco-2 deriva de un

carcinoma de colon humano. Estas células se diferencian espontáneamente a enterocitos en condiciones de cultivo celular convencionales. Las células Caco-2 exhiben similitudes morfológicas, así como bioquímicas, a los enterocitos intestinales (absortivos). Las células forman uniones intercelulares fuertes y microvellosidades, expresan varios transportadores (p.ej. soporte de azúcares, soporte de ácidos biliares, soporte de aminoácidos neutros grandes, y P-gp) y enzimas metabólicas (p.ej. enzimas aminopeptidasas, esterases, sulfatasas y citocromo P450). El inusualmente alto grado de diferenciación, estructura morfológica y funcional que se asemeja a los enterocitos ha dado como resultado que Caco-2 ha llegado a ser uno de los modelos celulares más populares para estudiar la integridad epitelial intestinal y el transporte de fármacos.

Para la determinación de la capacidad de las nanolipoesferas de inhibir las bombas de eflujo P-gp intestinal, se realizó un estudio de transporte de Caco-2 usando talinolol como molécula modelo. Como se indicó previamente, el talinolol es un conocido sustrato de P-gp y no es metabolizado por las enzimas CYP intraenterocitos. En este caso, el compartimento donador de los transpocillos contenían 10 µg/ml de talinolol, o bien 10 µg/ml de talinolol con nanolipoesferas de blanco (cantidad equivalente a 100 µg/ml de nanolipoesferas de AM). En puntos de tiempo fijados (0, 30, 60, 90, 120 y 150 min), se extrajeron muestras de 150 µl del lado receptor, y se añadieron volúmenes similares de tampón de blanco para mantener un volumen constante. Se usó C14-manitol, un marcador usado habitualmente para la permeabilidad paracelular pasiva, para una evaluación adicional de la realización apropiada de cada estudio.

Los estudios de permeabilidad in vitro de talinolol a través de monocapas de Caco-2 dieron como resultado valores de coeficientes de permeabilidad significativamente más altos ($p < 0,001$) de talinolol + nanoesferas de blanco frente a talinolol ($1,73 \times 10^{-6}$ y $7,66 \times 10^{-7}$ respectivamente) en dirección A a B. Como se espera para un sustrato de P-gp, los valores Papp tanto de talinolol como talinolol + nanolipoesferas de blanco obtenidos en la dirección B a A son más altos que los valores Papp correspondientes obtenidos en la dirección A a B. La permeabilidad de B a A dio como resultado una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en los valores Papp obtenidos para talinolol + nanolipoesferas de blanco frente a talinolol ($7,36 \times 10^{-6}$ y $1,77 \times 10^{-5}$ respectivamente), como se espera para un sustrato de P-gp cuando la actividad de P-gp es inhibida (Fig. 11).

Debe recalarse que el talinolol no se incorporó en nanolipoesferas, sino que se administró simultáneamente. Estos resultados sugieren que las nanolipoesferas poseen la capacidad de inhibir el eflujo de P-gp y por tanto aumentar la biodisponibilidad oral de compuestos sometidos a un eflujo intraenterocitos extenso. Además, las nanolipoesferas pueden inhibir la P-gp no solo por la incorporación del compuesto en este sistema de administración sino también cuando se administran simultáneamente nanolipoesferas, p.ej. nanolipoesferas de blanco, con el compuesto activo. Como se espera para un sustrato de P-gp, ambos valores obtenidos en la dirección basal a apical son más altos que el Papp obtenido en la dirección apical a basal. De manera interesante, la permeabilidad basal a apical dio como resultado una reducción significativa en los valores Papp obtenidos para talinolol-nanolipoesferas frente a talinolol. Este patrón es típico para sustratos de P-gp en presencia de un inhibidor de P-gp; mientras que el eflujo apical a basal aumenta debido a la inhibición de P-gp, el transporte en la dirección opuesta disminuye como resultado de una contribución de la P-gp reducida al transporte del fármaco desde el enterocito hasta el lumen.

Para comprender los efectos de las nanolipoesferas sobre la actividad metabólica intraenterocitos, los autores de la invención ensayaron su efecto sobre el metabolismo de AM y testosterona mediado por CYP3A4 (sustrato de CYP3A4 de control) en microsomas CYP 3A4 de rata aislados (Fig. 12). Se encontró una diferencia significativa ($p < 0,01$) entre concentraciones de AM intacta que permanece después de 120 min de incubación de nanolipoesferas de AM frente a AM ($102,4 \pm 5,61\%$ y $68,57 \pm 1,17\%$ respectivamente). A fin de distinguir entre la protección mecánica de las nanolipoesferas frente a la degradación enzimática y el efecto de los ingredientes de las nanolipoesferas sobre la actividad enzimática, se añadieron nanolipoesferas de blanco a testosterona y se incubaron en microsomas. Se encontró una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la testosterona con nanolipoesferas frente a testosterona en solitario incubada en las mismas condiciones ($91,26 \pm 5,31\%$ y $75,39 \pm 8,82\%$ respectivamente).

Estos resultados implican que la biodisponibilidad aumentada conseguida por las nanolipoesferas resulta parcialmente de un metabolismo intraenterocitos de primer paso reducido. Además, de manera similar a los resultados in vivo de los autores de la invención, la incorporación del fármaco en nanolipoesferas no fue necesaria para obtener el efecto de biodisponibilidad aumentada o metabolismo de primer paso reducido, y la co-administración del fármaco con las nanolipoesferas de blanco dio como resultado efectos comparables.

Estudios de seguridad y toxicidad

Estudios de transporte paracelular in vitro:

Se realizaron estudios de permeabilidad en células Caco-2 con el marcador de transporte celular C14-manitol (2 µCi/ml). Se extrajeron muestras (200 µl) del lado basolateral en los mismos puntos de tiempo fijados descritos anteriormente, y se añadieron volúmenes similares de tampón blanco después de cada extracción.

Estudios de resistencia eléctrica transepitelial (TEER):

Se sembraron células Caco-2 en una placa de 12 transpocillos y se cultivaron durante 21 días. El tampón apical se reemplazó por 0,6 ml de tampón apical precalentado (37°C) que contenía nanolipoesferas de blanco (cantidad equivalente a 100 µg/ml de nanolipoesferas de AM). A fin de evaluar el efecto de las nanolipoesferas sobre el

transporte paracelular a través de las células (es decir, el grado al que las uniones fuertes se abren), se midieron valores de TEER en los puntos de tiempo anteriores y se compararon con los valores de TEER medidos en células de control que contenían solo tampón.

5 En la Fig. 13, la línea exterior representa los valores de TEER de monocapas de Caco-2 en presencia de nanolipoesferas de blanco o control. No hubo diferencia en los valores de TEER medidos en todo el experimento, tanto en presencia como ausencia de nanolipoesferas de blanco ($p=0,19$), indicando que la integridad de la monocapa permaneció. El diagrama insertado representa los valores Papp de manitol (un marcador de transporte paracelular) después de la incubación con nanolipoesferas de blanco o control en el modelo Caco-2. No hubo diferencia significativa en la permeabilidad del manitol en presencia de nanolipoesferas de blanco comparado con el tampón ($p=0,51$). Estas observaciones indican que las nanolipoesferas ni afectan a la permeabilidad paracelular ni interrumpen la integridad de la monocapa de enterocitos.

Estudios de toxicidad celular:

15 La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplásmica que es liberada en el sobrenadante del cultivo cuando la membrana plasmática es dañada. La toxicidad de las nanolipoesferas se evaluó sobre un intervalo de concentraciones (0,1, 1, 5 y 10% en el medio) en células Caco-2 cultivadas como se describió anteriormente usando un kit de detección de citotoxicidad de LDH, después de la incubación del cultivo celular con un medio que contenía nanolipoesferas de blanco durante 2 h. El porcentaje de daño celular se calcula de tal modo que el control bajo fue la liberación espontánea de LDH medida en medio con células no tratadas y el control alto fue 100% de liberación de LDH medida en células incubadas con medio que contenía Triton X-100 al 1%.

20 Como se muestra en la Fig. 14, las nanolipoesferas aumentaron la liberación de LDH de una manera dependiente de la concentración, con la toxicidad más alta obtenida a una concentración de nanolipoesferas de 10% (7,27%), y una toxicidad despreciable ($<1\%$) producida por una concentración de nanolipoesferas de 1% y menos en comparado con el estándar de 100% de toxicidad. Estos resultados sugieren que no se causa un daño significativo a la membrana celular apical del enterocito por la administración de nanolipoesferas. Además, podría obtenerse una sobreestimación de citotoxicidad en el modelo de Caco-2, dado que carece de los mecanismos de reparación y recuperación presentes en el tejido intacto.

30 Por tanto, se muestra que las nanolipoesferas mejoran la biodisponibilidad oral de compuestos de Clase II mediante un mecanismo multiproceso: solubilización en el entorno GI aumentada, metabolismo intraenterocito reducido y actividad del eflujo de P-gp reducida. Además de una biodisponibilidad aumentada, las nanolipoesferas reducen la alta variabilidad típica para los compuestos de Clase II. Las nanolipoesferas no causan daño a los tejidos o a la membrana celular. Por lo tanto, la presente descripción se refiere además a una composición que es la nanolipoformulación descrita anteriormente, pero desprovista de un fármaco (composición vacía) para administración oral para aumentar la absorción de un fármaco con baja biodisponibilidad debido al metabolismo intestinal de primer paso o al sustrato de transportadores de eflujo intestinal (p.ej. P-gp) administrado simultáneamente, o en una ventana de tiempo estrecha, a la nanolipoformulación.

En base a estos hallazgos se concluye que la nanoformulación sirve como plataforma para la administración de fármacos que son sustratos de P-gp y CYP3A4 que se caracterizan por una baja biodisponibilidad oral y absorción errática. Los ejemplos de sustratos de P-gp y CYP3A4 que son candidatos adecuados para la administración en nanolipoesferas se enumeran en la Tabla 12.

40 Tabla 12. Ejemplos de sustratos de P-gp y CYP3A4 en la pared intestinal y el hígado, que son candidatos adecuados para la administración en nanolipoesferas

Amlodipina	Bloqueadores del canal del calcio
Diltiazem	
Felodipina	
Nicardipina	
Nifedipina	
Nimodipina	
Nisoldipina	
Verapamilo	
Ciclosporina, cuando se administra con una formulación de liponanoesferas "vacía"	Inmunosupresores

Sirolimus	
Tacrolimus	
Atorvastatina	Estatinas
Lovastatina	
Simvastatina	
Fexofenadina	Antihistaminas
Buspirona	Fármacos CNS
Carbamazepina	
Pimozida	
Midazolam	
Triazolam	
Albendazol	Antifúngicos/antibióticos
Itraconazol	
Eritromicina	
Amiodarona	Miscelánea
Cisaprida	
Colchicina	
Sildenafil	

Además, las nanolipoesferas de la presente descripción afectan a la enzima CYP3A4 intestinal de una manera reversible y no selectiva, de tal modo que es posible que las nanolipoesferas de la presente descripción inhiban otras enzimas metabólicas en el intestino, p.ej. CYP2C19 y CYP2C9.

- 5 Formación de nanolipoesferas de cannabidiol y cannabidiol-piperina (CBD-PNL y CBD-piperina-PNL, respectivamente)

Se preparó una formulación de nanolipoesferas de CBD por el método de preparación de preconcentrados. La composición de nanolipoesferas final estaba basada en estudios preliminares de optimización de formulaciones, y se seleccionó según la capacidad de solubilización óptima del ingrediente activo. Inicialmente se pusieron un co-disolvente anfifílico (lactato de etilo) y un fosfolípido (lecitina) en la relación de 8:1, respectivamente, en un tubo de escintilación limpio y se calentaron a 40°C hasta que la lecitina se disolvió completamente. Después se añadieron un triglicérido (tricaprina), aceite de ricino polioxilo 40-hidroxi, Tween 20 y Span 80 en la relación de 1:1:1:1; la mezcla se agitó suavemente y se calentó a 40°C hasta que se formó una disolución homogénea. Además, se añadió polvo de CBD, formando el preconcentrado de CBD que contenía 3% de CBD. Este preconcentrado se agitó suavemente y se calentó a 40°C hasta que se formó una disolución homogénea. Tras una agitación suave en fase acuosa, este preconcentrado forma espontáneamente una nanodispersión de fármaco encapsulado. Para la preparación de CBD-Piperina-PNL se añadió polvo de piperina con polvo de CBD para formar el CBD-Piperina-PNL. Se usó una disolución de CBD en propilenglicol/EtOH/agua 30/30/40 respectivamente como control en todos los estudios in vivo.

Estudios farmacocinéticos in vivo

- 20 Animales: Se usaron ratas Wistar macho que pesaban 300-350 g para los estudios in vivo. El proyecto estaba adherido a los principios del Cuidado Animal en Laboratorio (publicación NIH nº 85-23, revisado en 1985). Todos los animales fueron privados de comida pero no de agua 12 h antes de los experimentos. Todos los procedimientos quirúrgicos y experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética en la Experimentación con Animales de la Escuela Médica Hadassah de la Universidad Hebrea, Jerusalén. Se puso una cánula permanente en la vena yugular derecha de cada animal para el muestreo de sangre sistémica.

Estudios de biodisponibilidad oral relativa de CBD: se prepararon nanolipoesferas nuevas 30 min antes de cada experimento, por mezcla en vórtex del preconcentrado (CBD-PNL y CBD-Piperina-PNL) en agua (1:9) precalentado

a 37°C durante 30 s. Las concentraciones de CBD y piperina obtenidas fueron 3 mg/ml y 2 mg/ml, respectivamente. Se administró CBD-Piperina-PNL (15mg/kg de CBD y 10 mg/kg de piperina) a los animales por alimentación forzada oral (n=6). Los grupos de control recibieron una disolución (15 mg/kg) de CBD en propilenglicol/EtOH/agua 30/30/40 respectivamente (1 mg/ml) (n=6) o CBD-PNL (15 mg/kg de CBD).

5 Se tomaron muestras de sangre sistémica (0,35 ml) a 5 min predosis, 20 min, 40 min, 1 h, 1,3 h, 1,6 h, 2 h, 3 h y 4 h postdosis.

Resultados:

10 1.1 Los resultados indican que en las ratas la Piperina-PNL elevó la biodisponibilidad de CBD en 6 veces (Tabla 13, Fig. 15). La contribución del componente piperina aumentó 2 veces la biodisponibilidad debido a su inhibición del metabolismo de fase II.

Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos (media ± S.E.M.) derivados de la administración PO de CBD, CBD-PNL y CBD-Piperina-PNL 15 mg/kg; Piperina 10 mg/kg (n = 6 para cada grupo). (*) Se encuentra una diferencia significativa (p<0,05) del valor correspondiente de CBD. † Se encuentra una diferencia significativa (p<0,05) del valor correspondiente de (CBD) y (CBD-PNL).

AUC (h*ng/ml)	Cmax (ng/ml)	
90±21	39±8	CBD
300±95 (*)	137±43 (*)	CBD-PNL
570±23 (*†)	170±3 (*)	CBD-Piperina-PNL

15 Actualmente, hay soluciones farmacéuticas limitadas en el marco clínico para vencer las barreras para la absorción que representan una disponibilidad oral del fármaco escasa. Como se mencionó anteriormente, el “metabolismo de primer paso” (tanto por enzimas de Fase I como de Fase II al nivel de los enterocitos) y los transportadores de eflujo como P-gp obstaculizan la administración oral de muchos fármacos. Las PNL desarrolladas previamente por el grupo de los autores de la invención se ha utilizado con éxito para potenciar la absorción oral de fármacos sometidos al metabolismo de “primer paso” de Fase I intraenterocitos y el eflujo por P-gp. La innovación de la estrategia actual de los autores de la invención se añadir piperina a PNL.

20 La utilización de piperina además de PNL potencia sinérgicamente la biodisponibilidad y puede aumentar la absorción oral en mayor medida que la utilización de PNL en solitario. El resultado es una plataforma que puede emplearse para:

- 25
1. Fármacos que son sometidos al metabolismo intraenterocitos de Fase I y/o eflujo por P-gp.
 2. Diversos fármacos que son también eliminados por metabolismo de Fase II, p.ej. proceso de glucuronidación.

Por tanto, la presente invención aplica el concepto de Piperina-PNL a compuestos que sufren un metabolismo de primer paso de Fase I, Fase II significativo y/o eflujo por P-gp al nivel de intraenterocitos. Los candidatos adecuados para la administración en Piperina-PNL se enumeran en la Tabla 14.

30 Tabla 14. Ejemplos de sustratos de enzimas P-gp, CYP3A4 y UDP-glucuronosiltransferasa (UGT) en la pared intestinal y el hígado, que son candidatos adecuados para la administración en Piperina-PNL.

Amlodipina	Bloqueadores del canal del calcio
Diltiazem	
Felodipina	
Nicardipina	
Nifedipina	
Nimodipina	
Nisoldipina	
Verapamilo	
Fenitoína	Antiepilépticos
Ciclosporina	Inmunosupresores

Sirolimus	
Tacrolimus	
Atorvastatina	Estatinas
Lovastatina	
Simvastatina	
Fexofenadina	Antihistaminas
Buspirona	Fármacos CNS

Resultados de pro-nanolipoesferas de CBD que incorporan curcumina, resveratrol y piperina como potenciadores de la absorción

5 Los resultados en la Fig. 16 y la Tabla 15 muestran que la administración de CBD-piperina-PNL dio como resultado una biodisponibilidad oral relativa significativamente más alta en comparación con todas las formulaciones ensayadas, cuando se administra a ratas. La administración oral de CBD-piperina-PNL dio como resultado valores de AUC y C_{max} significativamente más altos en 5 veces y 15 veces, respectivamente, en comparación con el control.

10 Tabla 15. Parámetros farmacocinéticos (media ± S.E.M.) derivados de la administración PO de CBD y CBD-Piperina 2% -PNL a ratas; (n = 6 para cada grupo). *Se encuentra una diferencia significativa (p<0,05) del valor de CBD correspondiente. †Se encuentra una diferencia significativa (p<0,05) del valor de (CBD-PNL) correspondiente.

	C _{max} (ng/ml)	AUC (h*ng/ml)
CBD	39±8	90±21
CCBD-Piperina 2%-PNL	170±13 (*)	570±23 (*†)

15 Se advierte que la curcumina podría no incorporarse eficazmente en el sistema PNL. La incorporación de curcumina dio como resultado su precipitación después de la introducción del preconcentrado (que contiene piperina) en la fase acuosa in vitro. Muy probablemente ocurre el mismo efecto in vivo. Además, como la absorción de CBD que sigue a CBD-curcumina 1% o 2%-PNL es más baja en comparación con CBD-PNL, es razonable suponer que la incorporación de curcumina daña la formación apropiada de las nanolipoesferas de CBD, dando como resultado una biodisponibilidad oral más escasa de CBD.

20 Aunque la incorporación tanto de resveratrol como de piperina da como resultado un preconcentrado homogéneo y visualmente transparente, la biodisponibilidad oral de CBD es potenciada solo cuando el sistema de administración contiene piperina.

25 Se reportó en la bibliografía que la curcumina, el resveratrol y la piperina potencian con éxito la biodisponibilidad de varios compuestos lipófilos. Los mecanismos propuestos detrás de este fenómeno son: inhibición del CYP P450, reducción del flujo de p-glicoproteína (p-gp) e inhibición del metabolismo de fase 2. Debido a su escasa solubilidad en agua, la curcumina puede ser incorporada en el núcleo lipídico de los sistemas de administración de fármaco auto-nanoemulsificantes (SNEDDS). Esta incorporación aumenta la concentración de curcumina que alcanza el intestino y el hígado, e inhibe de manera competitiva el metabolismo del CBD en esos sitios metabólicos.

Por tanto, la incorporación de piperina en SNEDDS aumenta las concentraciones en plasma de THC y CBD.

Una selección de un potenciador de la absorción para el desarrollo de diversas pro-nanolipoesferas que contienen un potenciador de la absorción y varios fármacos lipófilos

30 El desarrollo de cada una de las formulaciones, en términos de una selección de los diferentes componentes, se realizó por el siguiente método. Se usó una combinación de ciertos componentes como punto de partida de referencia (según la Tabla 16). La elección de estos ciertos triglicéridos, co-disolvente orgánico anfílico y la combinación de tensoactivos en las porciones detalladas en la Tabla 16 estuvo basada en la experiencia previa de los inventores con diversos fármacos lipófilos. Por tanto, se añadió un potenciador de la absorción a esta formulación prototipo especificada para formar un preconcentrado. En caso de que esta formulación prototipo fallara en disolver eficazmente el potenciador de la absorción, o en caso de que se observara una precipitación de un potenciador de la absorción después de la introducción del preconcentrado en una fase acuosa, se realizó una sustitución del triglicérido o/y el co-disolvente orgánico.

Tabla 16. Desarrollo de pro-nanolipoesferas de curcumina

	% (en peso)		Preconcentrado 1	Preconcentrado 2	Preconcentrado 3	Preconcentrado 4	Preconcentrado 5
			curcumina	1	2	✓	✓
tween 20	12,5		✓	✓	✓	✓	✓
span 80	12,5		✓	✓	✓	✓	✓
lecitina	9		✓	✓	✓	✓	✓
HCO 40	12,5		✓	✓	✓	✓	✓
lactato de etilo	37	36	✓	✓	✓	✓	
N-metilpirrolidona							
trilaurina	12,5						✓
tripalmitina	12,5			✓			
trimiristina	12,5				✓		
tricaprina	12,5		✓			✓	

5

La incorporación de curcumina en las cinco formulaciones formó un preconcentrado en el que la curcumina se disolvió totalmente. Sin embargo, tras la dilución con fase acuosa, la curcumina a la concentración de 1% y 2% precipitó inmediatamente de los preconcentrados 2, 3, 4 y 5. Muy probablemente ocurre el mismo efecto in vivo. Solo el preconcentrado 1, después de la dilución con la fase acuosa, formó un sistema de nanodispersión que era estable, es decir, no se observó precipitación de curcumina a la concentración de 1% y 2%, durante 10 min a 37°C, dando una ventana de tiempo suficiente para realizar estudios preclínicos. Por tanto, se añadió 3% de CBD a esas formulaciones para formar dos preconcentrados; CBD-curcumina 1%-PNL y CBD-curcumina 2%-PNL. Después de la introducción de estos dos preconcentrados a una fase acuosa se formaron nanodispersiones. No se observó precipitación tanto del ingrediente activo (CBD) como del potenciador de la absorción (curcumina) durante 10 min a 37°C después de la dilución. Por tanto, se ensayaron CBD-curcumina 1% y CBD-curcumina 2% en pruebas preclínicas. La administración oral de CBD-curcumina 1% y 2%-PNL dio como resultado valores de AUC y C_{max} significativamente más bajos en comparación con la administración oral de CBD-PNL a ratas. Además, la administración oral de CBD-curcumina 1% y 2%-PNL no potenció la biodisponibilidad oral de CBD en comparación con la administración de CBD en solitario. Por tanto, es razonable suponer que la incorporación de curcumina daña la formación apropiada de las nanolipoesferas de CBD tras la introducción en la fase acuosa, es decir, los fluidos del tracto gastrointestinal, dando como resultado una biodisponibilidad oral más escasa de CBD.

20

Tabla 17. Desarrollo de pro-nanolipoesferas de resveratrol y piperina

	% (en peso)	Preconcentrado 1	Preconcentrado 2
		resveratrol	2
piperina	2		✓
tween 20	12,5	✓	✓
span 80	12,5	✓	✓
lecitina	9	✓	✓

HCO 40	12,5	✓	✓
lactato de etilo	36	✓	✓
tricaprina	12,5	✓	✓

5 La incorporación tanto de resveratrol como de piperina formó un preconcentrado homogéneo y visualmente transparente. No se observó precipitación tanto de resveratrol como de piperina tras la dilución de estos preconcentrados con agua. Por tanto, se añadió 3% de CBD a estas formulaciones para formar dos preconcentrados; CBD-resveratrol-PNL y CBD-piperina-PNL. Después de la introducción de estos dos preconcentrados a una fase acuosa se formaron nanodispersiones estables y visualmente transparentes. No se observó precipitación tanto del ingrediente activo (CBD) como de los potenciadores de la absorción (resveratrol y piperina) durante hasta dos meses después de la dilución. Por tanto, estas dos formulaciones se ensayaron en pruebas preclínicas.

10 Se reportó que todos los materiales seleccionados y ensayados, curcumina, resveratrol y piperina, potencian la biodisponibilidad oral de diversos compuestos lipófilos in vivo, por tanto, se denominan “potenciadores de la absorción”. Además, tanto CBD-resveratrol-PNL como CBD-piperina-PNL mostraron características de estabilidad favorables en comparación con CBD-curcumina 1% y 2%-PNL. Sin embargo, los resultados de estudios preclínicos indicaron que solo la administración oral de CBD-piperina-PNL dio como resultado una potenciación significativa en la biodisponibilidad de CBD en comparación con la administración de CBD-PNL y la administración de CBD en solitario.

15 Ensayo de la compatibilidad de diversos fármacos de clase II y clase IV del BCS con el preconcentrado:

A fin de determinar la compatibilidad del sistema de administración PNL desarrollado con diversos fármacos lipófilos, los autores de la invención han ensayado la capacidad de la piperina-PNL de disolver diversos fármacos de clase II y clase IV del BCS. Se determinó incompatibilidad si el preconcentrado era incapaz de disolver totalmente el fármaco ensayado o si el fármaco-piperina-PNL ensayado no podía autoemulsionarse tras una agitación suave en un entorno acuoso o daba como resultado un sistema de dispersión inestable.

20

Tabla 18. Ensayo de la compatibilidad de diversos fármacos de clase II y clase IV del BCS con el preconcentrado.

		tacrolimus	amiodarona	Anfotericina B	simvastatina	ciclosporina	Tetrahydrocannabinol (THC)
	% (en peso)						
piperina	2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
tween 20	13	✓	✓	✓	✓	✓	✓
span 80	13	✓	✓	✓	✓	✓	✓
lecitina	9	✓	✓	✓	✓	✓	✓
HCO 40	13	✓	✓	✓	✓	✓	✓
lactato de etilo	37	✓	✓	✓	✓	✓	✓
trilaurina	13	✓		✓	✓	✓	✓
tricaprina	13		✓				

25 Se encontró que la anfotericina B es incompatible con el preconcentrado. Se encontró que el resto de los fármacos son compatibles con el preconcentrado y tras una dilución con agua formaron sistemas de nanodispersión claros y transparentes con un intervalo deseable (menos que 200 nm) del tamaño de las partículas formadas. CBD// CBD-THC // tacrolimus y ciclosporina piperina-PNL formaron sistemas de nanodispersión de tamaño de partícula óptimo, <50

nm. La excepción fue el preconcentrado que incorporaba Amiodarona, que cuando se dispersó formó partículas de 276 nm (Tabla 18).

Una descripción detallada de las características de compatibilidad de los compuestos ensayados con la piperina-PNL

Anfotericina-piperina-PNL: El fármaco no se disolvió en el preconcentrado.

5 Ciclosporina-piperina-PNL: el fármaco se disolvió totalmente en el preconcentrado. Tras la disolución del preconcentrado con agua, se formó una dispersión clara y transparente.

THC-CBD-piperina-PNL: el fármaco se disolvió totalmente en el preconcentrado. Tras la disolución del preconcentrado con agua, se formó una dispersión clara y transparente.

10 Tacrolimus-piperina-PNL: el fármaco se disolvió totalmente en el preconcentrado. Tras la disolución del preconcentrado con agua, se formó una dispersión clara y transparente.

Simvastatina-piperina-PNL: el fármaco se disolvió totalmente en el preconcentrado. Tras la disolución del preconcentrado con agua, se formó una dispersión blanca ópalo clara. No se observó precipitación del fármaco hasta 2 h post-disolución.

15 Amiodarona-piperina-PNL: el fármaco se disolvió totalmente en el preconcentrado. Tras la disolución del preconcentrado con agua, se formó una dispersión blanca lechosa, implicando un tamaño medio de gotitas insuficientemente grande. No se observó precipitación del fármaco hasta 2 h post-disolución.

Tabla 19. Tamaño de partícula e índice de polidispersidad (Pdl) de las diferentes PNLs después de una dilución 1:10 con agua. El tamaño de partícula y el potencial ζ se determinaron usando Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). *** Polisorbato 20 (Tween® 20), monooleato de sorbitán 80 (Span®80), aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 40 (HCO-40).

20

formulación	Tamaño, nm (diámetro)	Pdl
CBD-piperina-PNL	30	0,23
Ciclosporina-piperina-PNL	26	0,2
Simvastatina-piperina-PNL	76	0,53
Tacrolimus-piperina-PNL	38	0,34
THC-CBD-piperina-PNL	40	0,25
Amiodarona-piperina-PNL	276	0,41
CBD-resveratrol-PNL	65	0,5

REIVINDICACIONES

1. Una composición para la administración oral de al menos un fármaco, comprendiendo dicha composición:
 - 5 a) un concentrado dispersable, caracterizado por ser capaz de formar, tras el contacto con una disolución acuosa, partículas de un diámetro medio menor que 500 nm, medido por un analizador de tamaños de partícula VLA, comprendiendo dicho concentrado dispersable:
 - (i) al menos un tensioactivo;
 - (ii) al menos un componente sólido a 25°C, seleccionado de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, aminas grasas, amidas grasas, alcoholes grasos y ésteres de alcoholes grasos; y
 - (iii) un disolvente anfifílico;
 - 10 b) una cantidad de al menos una piperina, o isómero de la misma, suficiente para aumentar la biodisponibilidad de dicha composición,

en donde la composición contiene un cannabinoide como fármaco.
2. La composición según la reivindicación 1, en donde el tensioactivo es una combinación de al menos un tensioactivo de HLB (equilibrio hidrófilo/lipófilo) alto, que tiene un HLB de al menos 8, con al menos un tensioactivo que es un
15 tensioactivo de HLB bajo que tiene un HLB menor que 5.
3. La composición según la reivindicación 1, para uso en aumentar la biodisponibilidad del fármaco contenido dentro de dicha composición.
4. La composición según la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de al menos una enfermedad o trastorno.
5. La composición según la reivindicación 1, en donde dicho fármaco es cannabidiol (CBD).

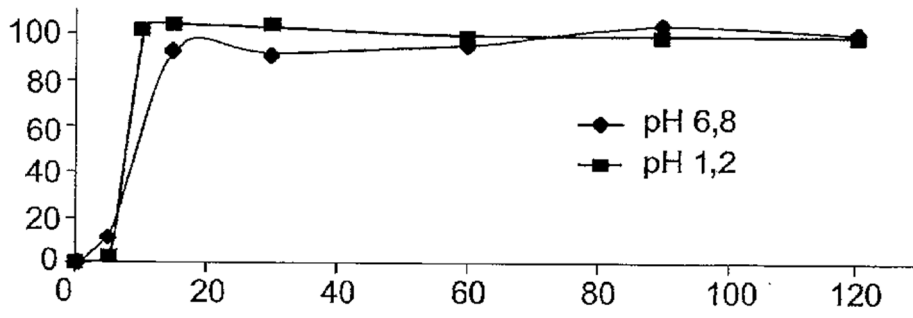


Figura 1

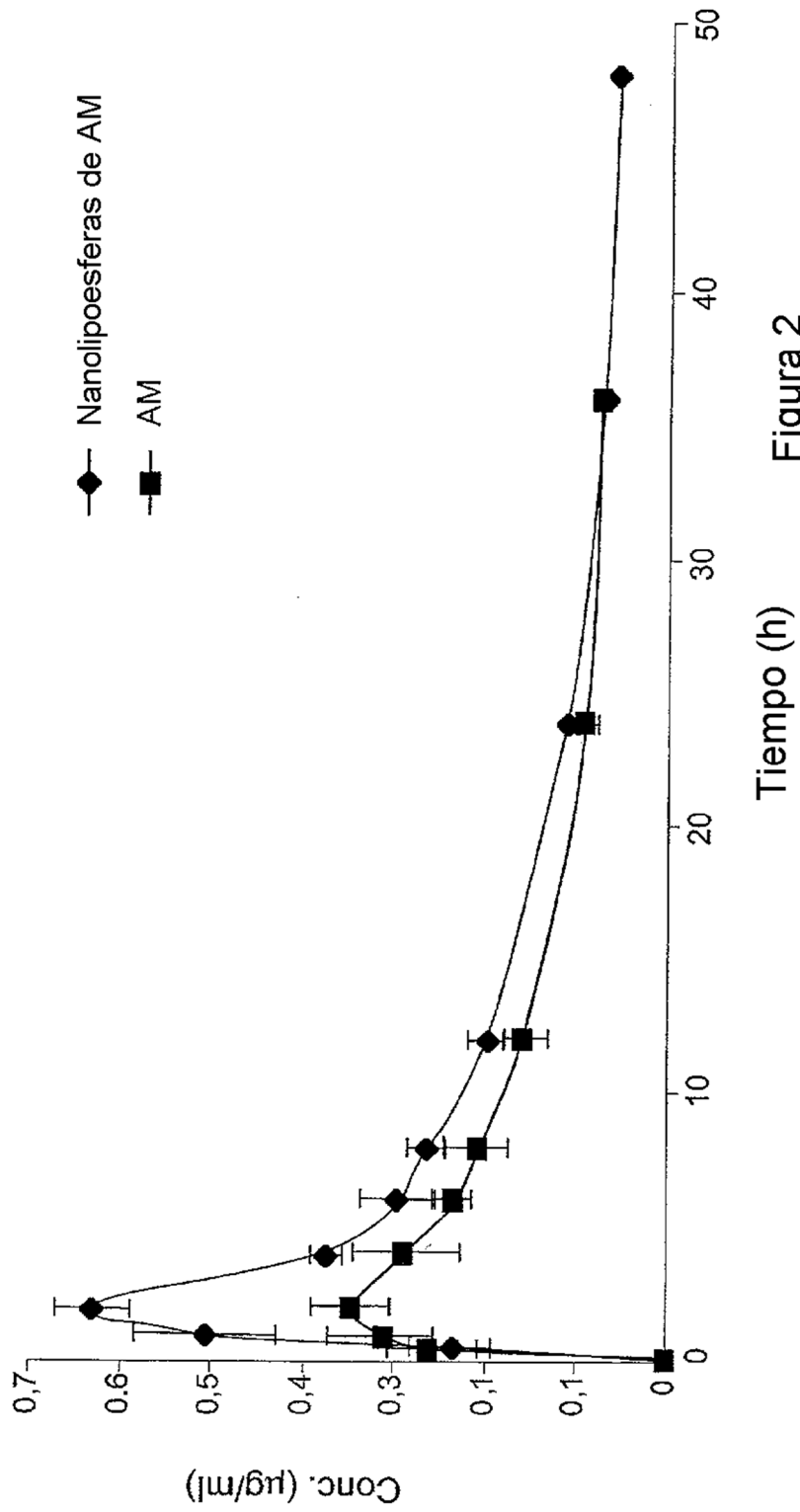


Figura 2

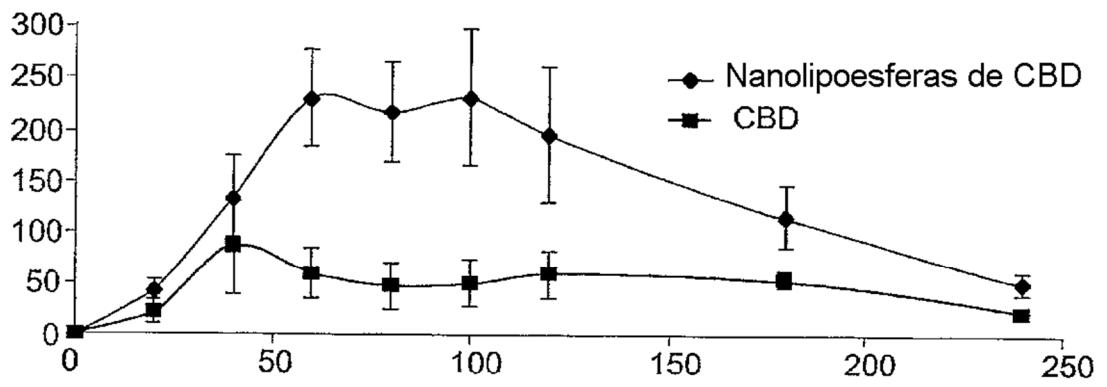


Figura 3

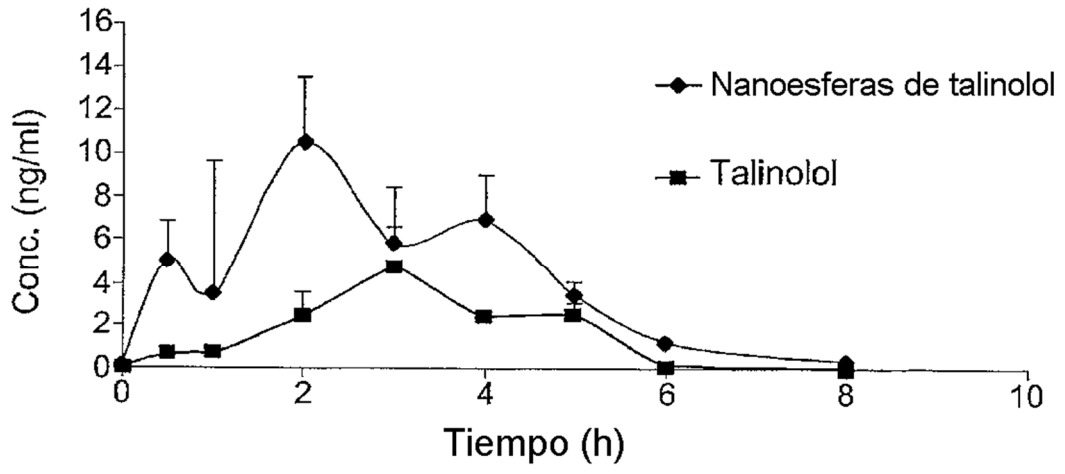


Figura 4

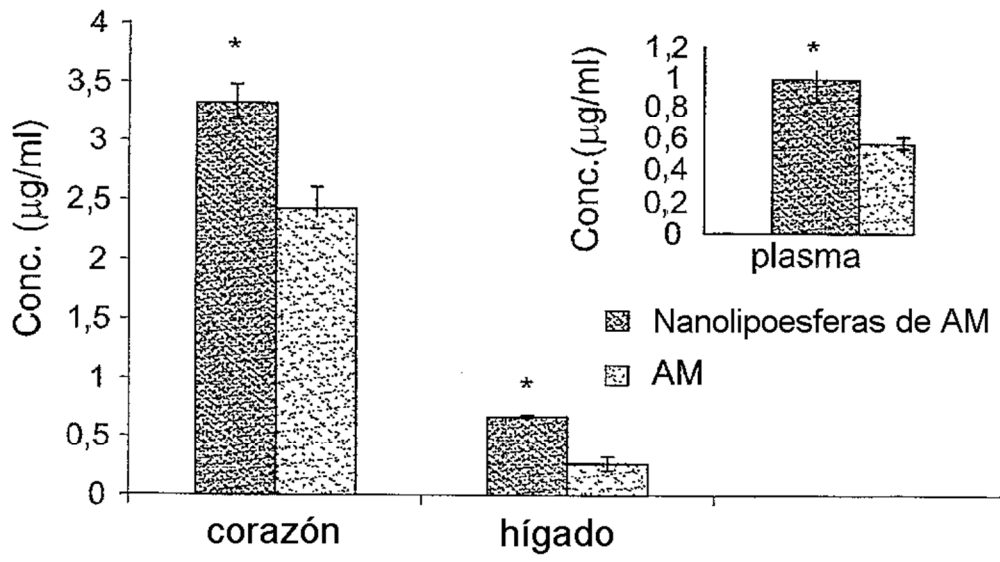


Figura 5

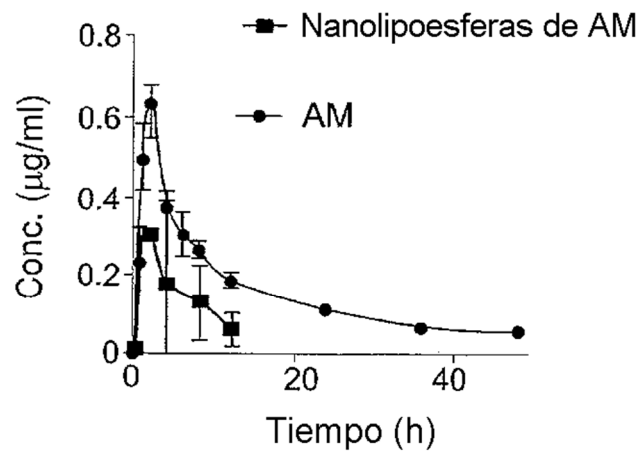


Figura 6A

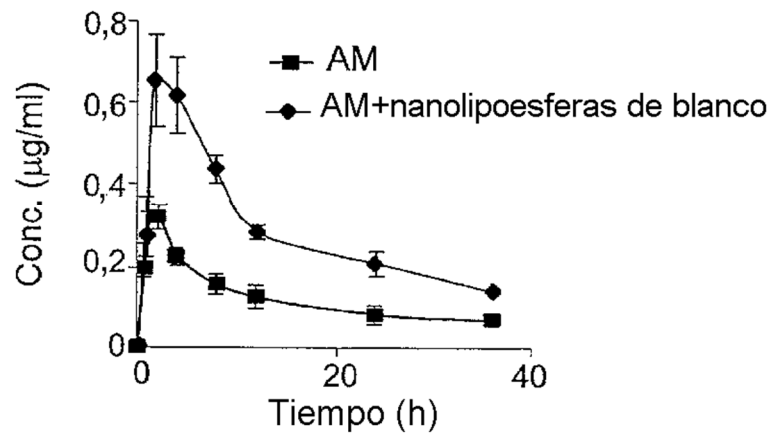


Figura 6B

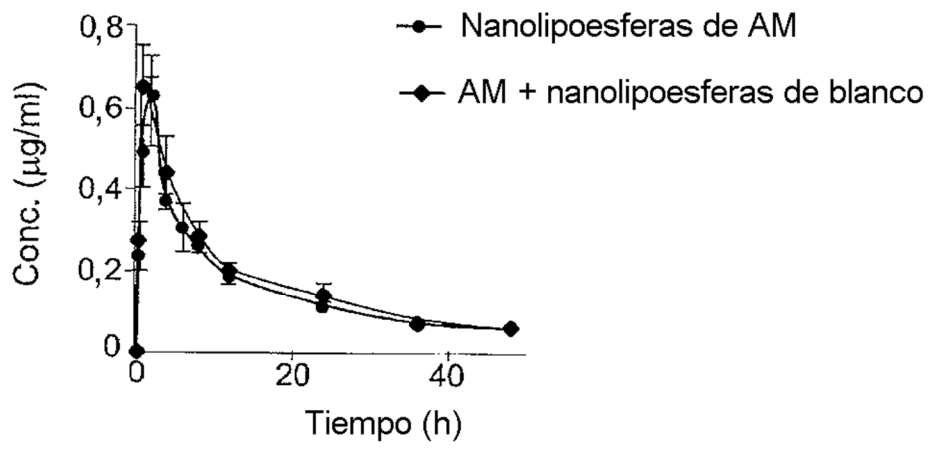


Figura 6C

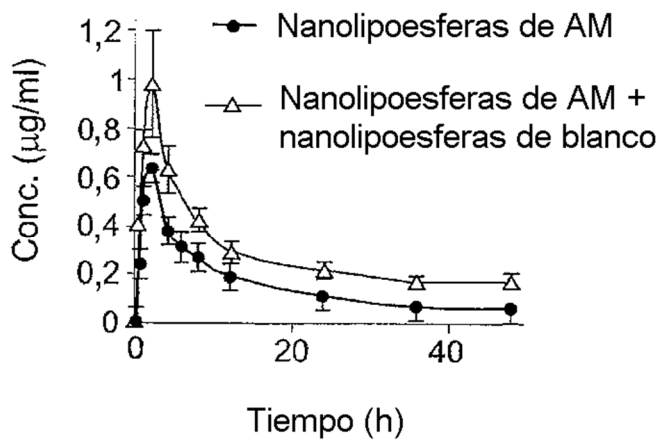


Figura 6D

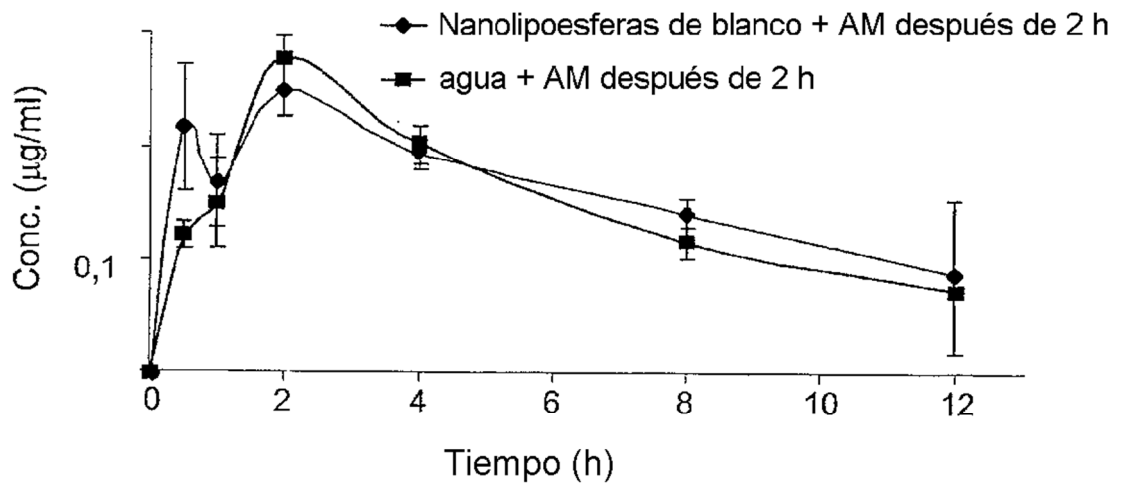


Figura 7

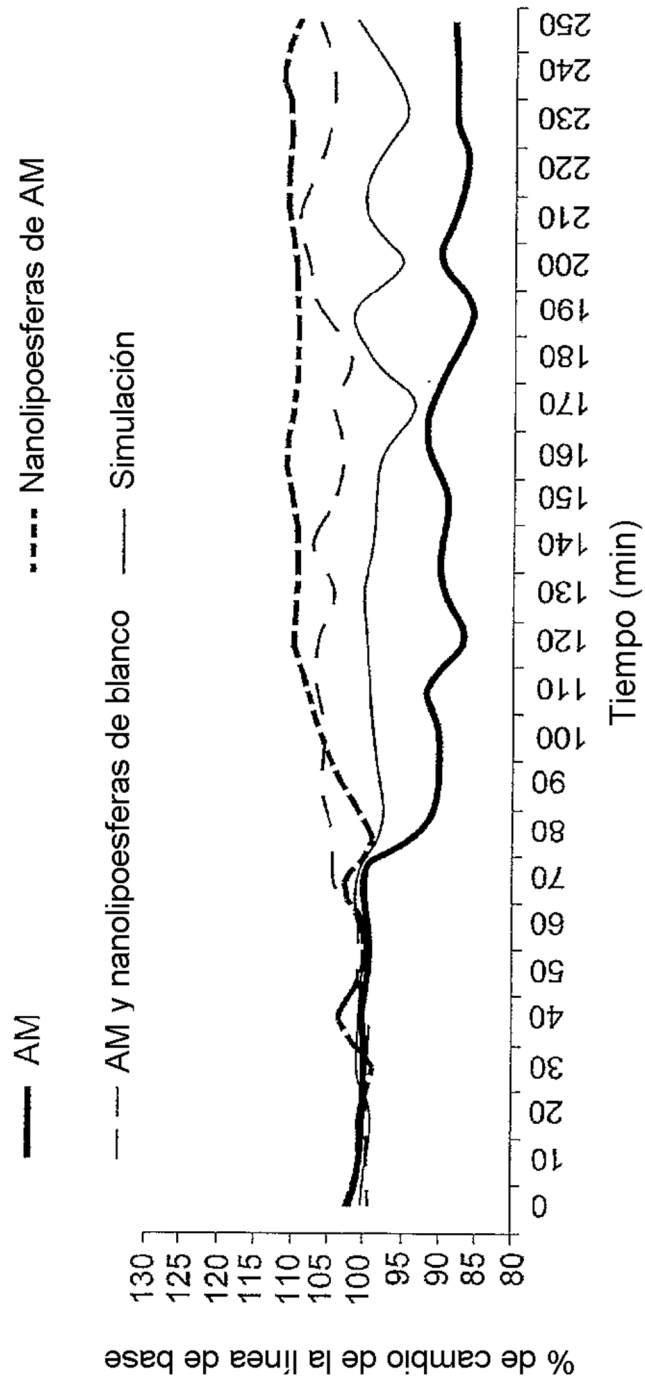


Figura 8

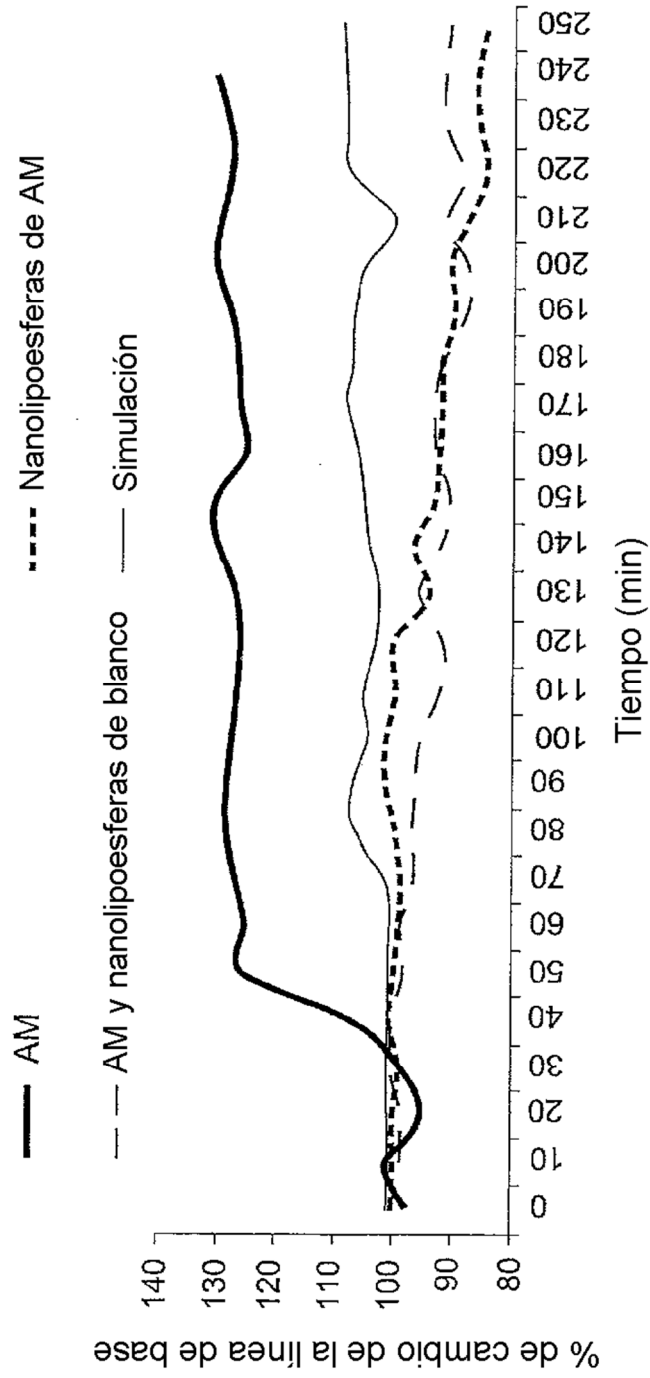


Figura 9

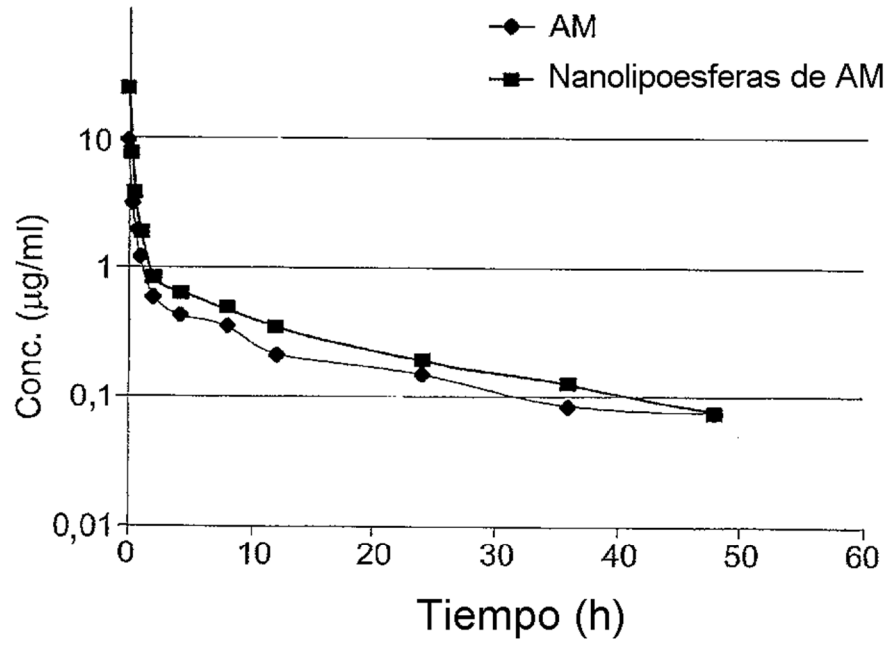


Figura 10

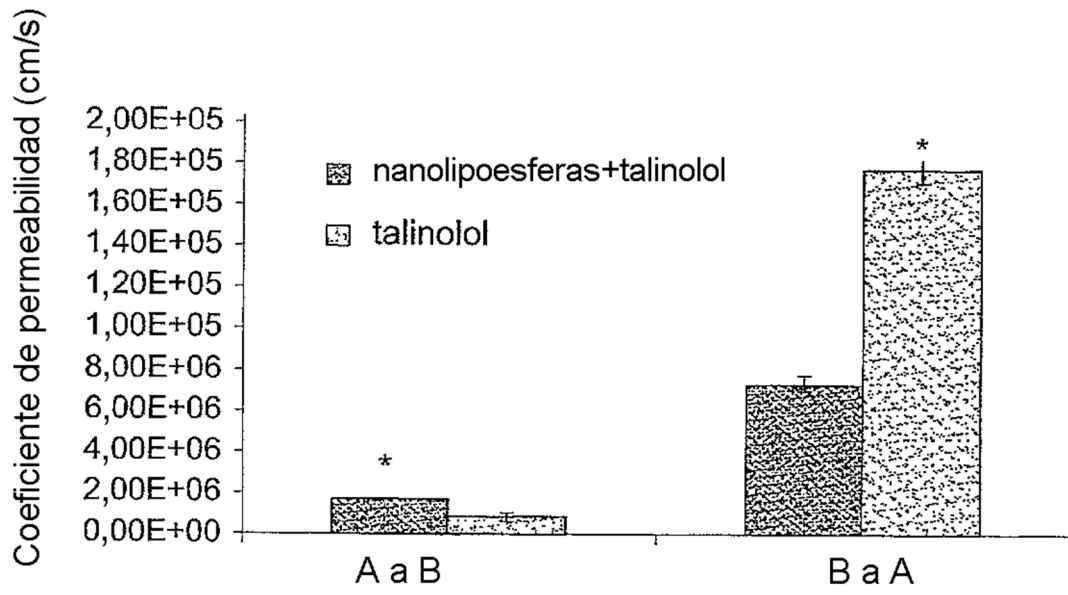


Figura 11

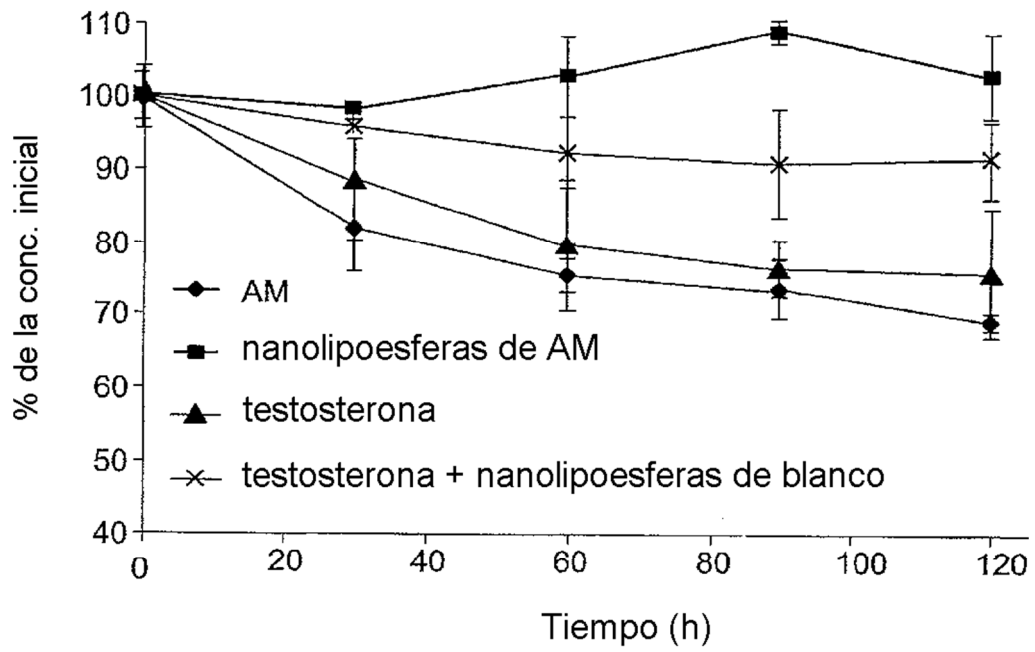


Figura 12

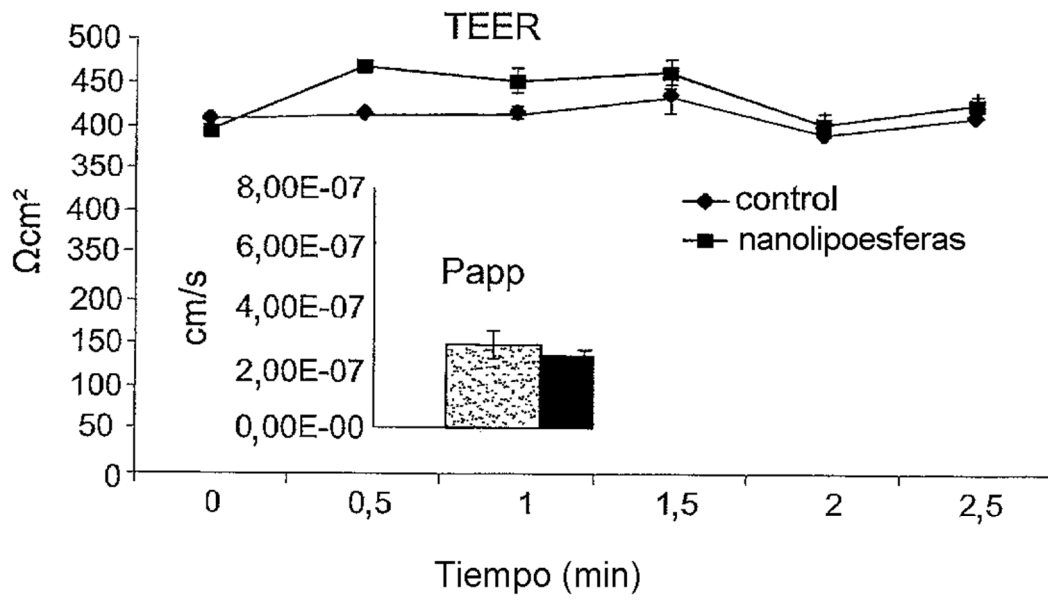


Figura 13

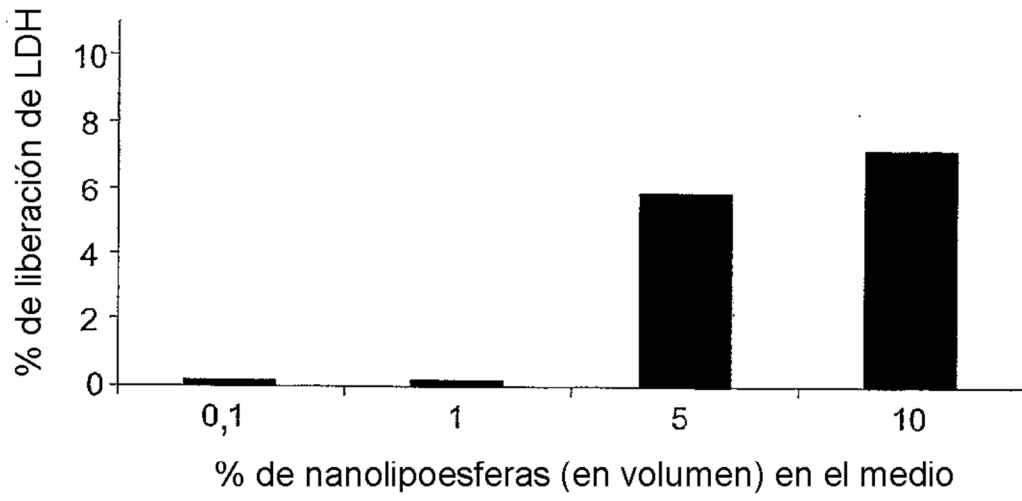


Figura 14

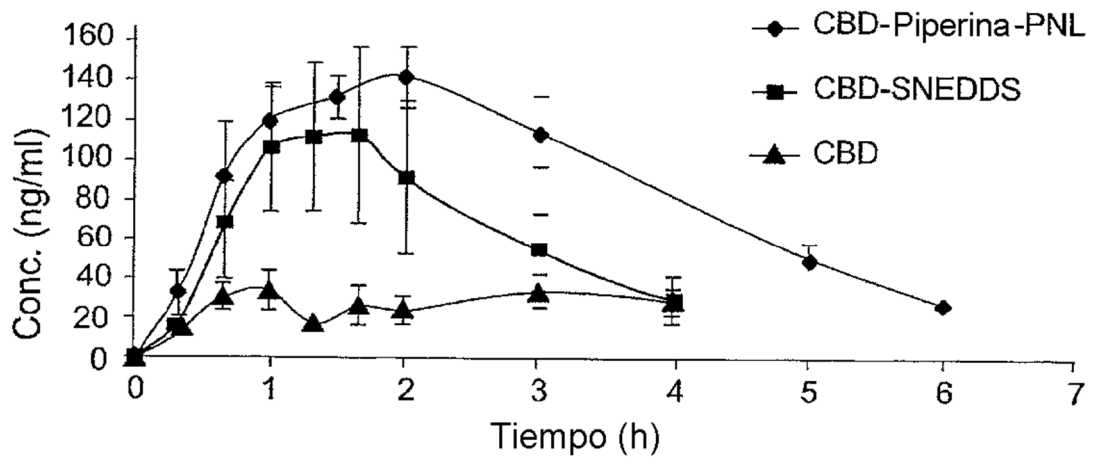


Figura 15

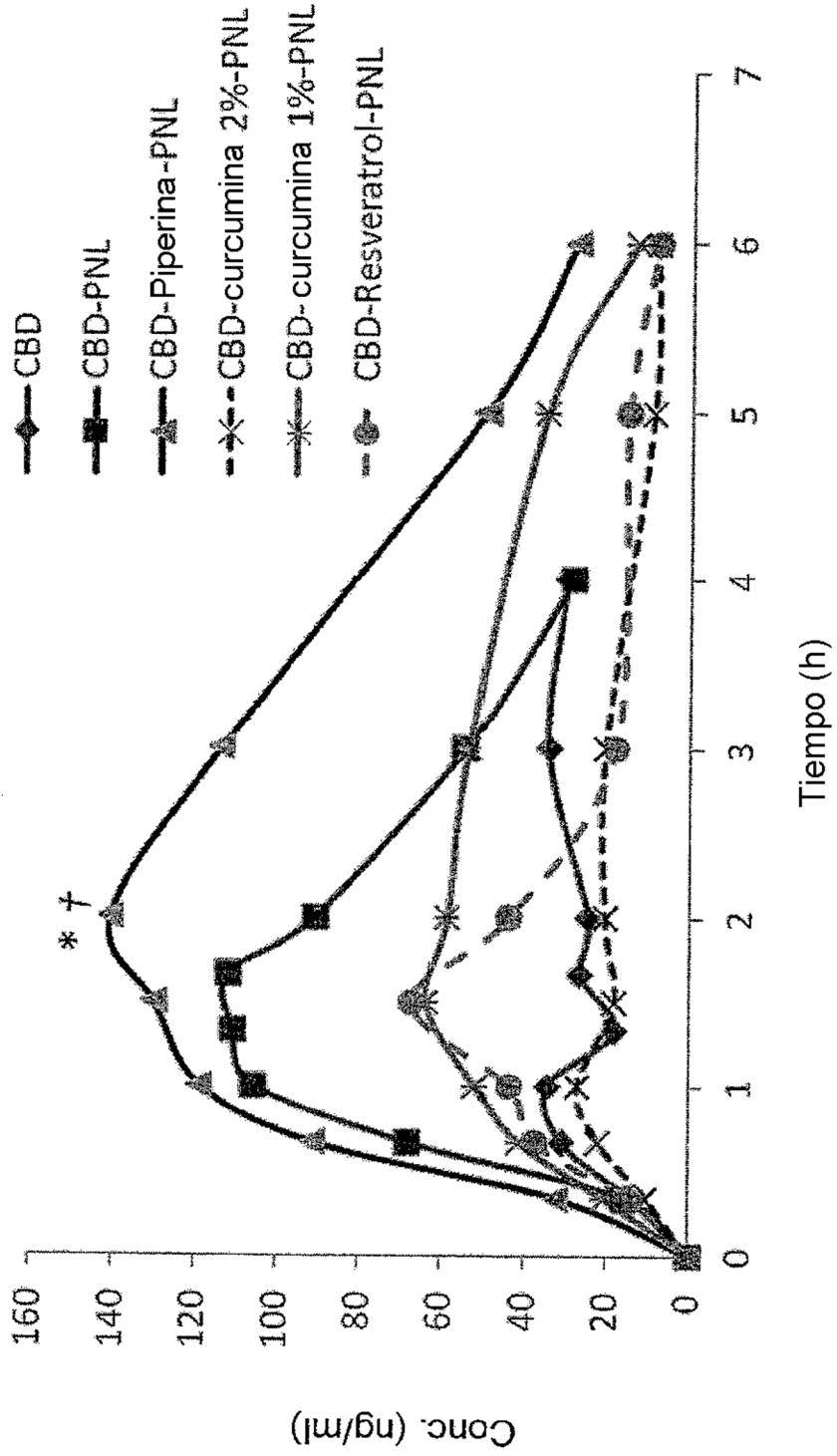


Figura 16