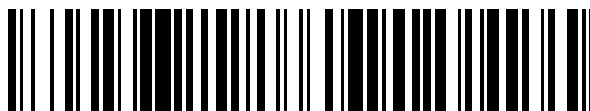


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 641**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 31/536 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2012 PCT/GB2012/052209**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13034926**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2012 E 12758882 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2753307**

54 Título: **Composiciones de lopinavir**

30 Prioridad:

09.09.2011 GB 201115634

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

06.02.2020

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF LIVERPOOL (100.0%)
Foundation Building 765 Brownlow Hill
Liverpool, L69 7ZX, GB**

72 Inventor/es:

**GIARDIELLO, MARCO NORMAN;
MCDONALD, THOMAS OLIVER;
OWEN, ANDREW;
RANNARD, STEVEN PAUL;
LONG, JAMES;
MARTIN, PHILIP JOHN y
SMITH, DARREN LEE**

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 740 641 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

Composiciones de lopinavir

5 **INTRODUCCIÓN**

La presente invención hace referencia a composiciones del fármaco anti-VIH lopinavir, adecuadas para uso farmacéutico. De forma más específica, la presente invención hace referencia a una composición sólida de lopinavir. La presente invención también hace referencia a procesos para la elaboración de la composición sólida, así como a su uso en terapia para el tratamiento y/o la prevención de infecciones retrovirales, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

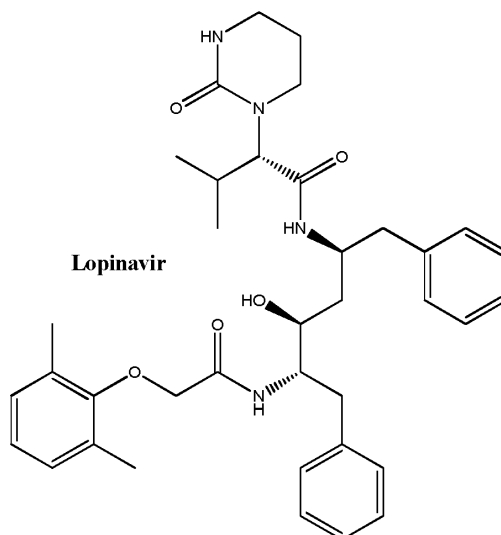
ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, tanto en el mundo desarrollado como en vías de desarrollo. El VIH es un retrovirus que provoca síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en seres humanos, el cual a su vez permite el desarrollo de cánceres e infecciones potencialmente fatales, debido a fallas progresivas del sistema inmunológico.

La infección por VIH suele producirse a través de la transferencia de fluidos corporales entre individuos, como sangre, semen, fluido vaginal, líquido preseminal o leche materna. El VIH puede estar presente en estos fluidos corporales como virus libre o como virus presente en las células inmunitarias infectadas. El VIH-1 suele ser la forma más virulenta de VIH y se transmite como virus de ARN con envoltura de cadena simple que, al ingresar en una célula objetivo, se convierte en ADN de cadena doble mediante transcripción inversa. Este ADN luego puede pasar a integrar el ADN del hospedador, en donde puede residir en forma latente y evitar su detección por parte del sistema inmunológico. De forma alternativa, este ADN puede volver a experimentar transcripción en genomas del ARN y someterse a traducción para formar proteínas virales que se liberan desde las células como nuevas partículas virales, las cuales luego se dispersan adicionalmente.

En el tratamiento del VIH y, en particular, del VIH-1, se utiliza habitualmente el inhibidor de proteasa lopinavir (LPV). Lopinavir se vende a nivel comercial como comprimidos recubiertos por películas o como una solución oral, ambos con el nombre comercial Kaletra®. Ambas formas de Kaletra® son terapias de combinación que comprenden ritonavir junto con lopinavir. El ritonavir actúa como inhibidor de la isoforma 3A4 del citocromo P450 (CYP3A4) y disminuye la depuración hepática del lopinavir.

A continuación se muestra la estructura del lopinavir.



35

Si bien el lopinavir es eficaz en cuanto a la prolongación de la expectativa de vida en quienes padecen VIH, existen diversas desventajas asociadas con las formulaciones de lopinavir actualmente disponibles.

El lopinavir actúa sobre un objetivo intracelular, por lo cual un prerrequisito para lograr un tratamiento eficaz es la capacidad del lopinavir de penetrar en las células y acumularse en ellas (Owen y Khoo, Journal of HIV Therapy, 2004, 9(4), 53-57). Un problema particular de las formulaciones actuales de lopinavir es que la penetración del fármaco en las células es variable e inadecuada tanto en los pacientes como entre pacientes. Dado que se

40

requiere la penetración y acumulación celular del fármaco para tratar de forma eficaz las células infectadas con VIH, existe una necesidad de contar con formulaciones de lopinavir con buenos niveles de acumulación celular, en particular en células inmunitarias (p. ej., macrófagos y linfocitos CD4+).

5 Asimismo, las formulaciones actuales de lopinavir tampoco presentan una distribución uniforme del lopinavir en el cuerpo y algunos puntos «santuario» y tejidos objetivo, como el cerebro y los testículos, pueden experimentar una baja exposición al fármaco. Esto puede conducir a niveles subterapéuticos del fármaco en ciertos tejidos, con el efecto consiguiente de que las células infectadas con el VIH en estos tejidos pueden no recibir el tratamiento adecuado. Asimismo, la resistencia al lopinavir es un problema cada vez mayor (Delaugerre et ál.,
10 Antimicrob Agents Chemother. 2009, 53(7); 2934-2939) y la exposición a niveles subterapéuticos de lopinavir en estos tejidos aumenta el riesgo de aparición y repoblación de la sangre con cepas de VIH resistentes al lopinavir. Las cepas de VIH resistentes también permiten su transmisión, lo cual significa que los individuos pueden verse nuevamente infectados con virus resistentes. Por lo tanto, existe la necesidad de contar con formulaciones que brinden una mejor distribución de lopinavir en el cuerpo y, en particular, en puntos «santuario» del virus.

15 Un problema adicional de las formulaciones actuales de lopinavir es la necesidad de administrar grandes dosis del fármaco cada día (en general, la dosis en adultos es de 800 mg dos veces al día), junto con otros múltiples fármacos contra el VIH. Por consiguiente, es necesario que el paciente ingiera un gran comprimido o una gran cápsula de lopinavir o múltiples comprimidos o cápsulas de dosificación más pequeños, para obtener la dosis
20 necesaria. Esto puede conducir inevitablemente a problemas en relación con el cumplimiento del paciente. Además, el tratamiento con lopinavir también se encuentra asociado con diversos efectos secundarios adversos, los cuales representan uno de los principales problemas para los pacientes, en especial en períodos prolongados (Perez-Molina et ál., J Antimicrob Chemother., 2008, 62(2), 234-245). Por estos motivos, existe la necesidad de contar con formulaciones más eficaces de lopinavir que, a su vez, permitan disminuir la dosis necesaria de
25 lopinavir. Dosis más bajas podrían tener un efecto sobre la cantidad y/o el tamaño de los comprimidos/las cápsulas que debe ingerir el paciente, así como sobre la prevalencia de efectos secundarios adversos.

También existe la necesidad de contar con formas de dosificación que permitan variar fácilmente la dosis según el paciente, dependiendo de factores como la edad (incluida la dosificación pediátrica) y el peso del paciente, así
30 como la gravedad y la etapa de la infección.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar mejores formulaciones de lopinavir que aborden una o más de las desventajas asociadas con las formulaciones actuales de lopinavir.

35 En particular, un objeto de la invención es proporcionar formulaciones de lopinavir con buena penetración celular y una distribución más óptima y eficaz en todo el cuerpo.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar formulaciones de lopinavir con carga de fármaco elevada.

40 Otro objeto de la presente invención es proporcionar formulaciones de lopinavir que permitan una menor dosis general de lopinavir en los tratamientos contra el VIH.

COMPENDIO DE LA INVENCION

45 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición sólida de lopinavir que comprende nanopartículas de lopinavir dispersas en una mezcla de al menos un polímero hidrofílico y al menos un tensioactivo; en donde el polímero hidrofílico es alcohol polivinílico (PVA, por su sigla en inglés) y el tensioactivo es vitamina-E-polietilenglicol-succinato (Vit-E-PEG-succinato) y en donde la composición comprende:

50 40 a 80 % de lopinavir,
10 a 40 % en peso de PVA y
2 a 20 % en peso de vitamina -E-polietilenglicol-succinato (Vit-E-PEG-succinato).

También se describe una dispersión acuosa que comprende múltiples nanopartículas dispersas en un medio acuoso, en donde las nanopartículas comprenden un núcleo de lopinavir y un recubrimiento de al menos un
55 polímero hidrofílico y al menos un tensioactivo, en donde el polímero hidrofílico se selecciona de alcohol polivinílico (PVA), un copolímero de alcohol y polietilenglicol, un copolímero en bloque de polioxietileno y polioxipropileno, polietilenglicol, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y polivinilpirrolidona o una combinación de los mismos y en donde el tensioactivo se selecciona de vitamina-E-polietilenglicol-succinato (Vit-E-PEG-succinato), un éster de
60 ácido graso de polioxietileno sorbitán, cloruro de *N*-alquildimetilbencilamonio, desoxicolato de sodio, sulfosuccinato sódico de dioctilo, polietilenglicol-12-hidroxiestearato, alcohol polivinílico (PVA) y un copolímero en bloque de polioxietileno y polioxipropileno, o una combinación de los mismos.

Tanto la composición sólida de lopinavir de la presente invención como la dispersión acuosa descrita comprenden la sustancia de fármaco de lopinavir en forma de nanopartículas. Las nanopartículas de lopinavir de la presente invención proporcionan mejores formas de dosificación de lopinavir, en particular con respecto a la estabilidad y eficacia. La composición sólida de lopinavir de la presente invención y la dispersión acuosa que se describe también proporcionan una buena acumulación y penetración celular, en especial en las células inmunitarias. En determinadas realizaciones, el nivel de penetración celular mejora considerablemente con respecto a las formulaciones de lopinavir convencionales. La composición sólida de lopinavir de la presente invención y la dispersión acuosa que se describe también proporcionan una mejor distribución del fármaco en todo el cuerpo y brindan mayores niveles de fármaco en determinados tejidos objetivo, como los testículos y el cerebro. Estas ventajas brindan la oportunidad de contar con un tratamiento más eficaz para el VIH, además de permitir una reducción en la dosis necesaria de lopinavir.

Las nanopartículas de lopinavir también poseen una baja citotoxicidad y se permite la elaboración de composiciones con cargas de fármaco elevadas.

El suministro de nanopartículas en una composición sólida también puede resultar ventajoso, ya que brinda una forma del fármaco más estable, adecuada para almacenamiento a largo plazo. Asimismo, la composición sólida puede ingerirse como forma de dosificación sólida cuando lo requieran determinadas realizaciones de la invención o, de forma alternativa, se pueden dispersar en un diluyente acuoso adecuado cuando sea necesario para formar una dispersión acuosa de nanopartículas para administración.

Además, las composiciones sólidas de la presente invención permiten mayores cargas de fármaco que las formulaciones de lopinavir conocidas, lo cual permite una reducción en las dosis de excipiente (p. ej., tensioactivos) y el tamaño de la forma de dosificación.

Por último, las composiciones sólidas de la presente invención son ideales para regímenes médicos personalizados, dado que dichas composiciones sólidas son sustancialmente homogéneas, lo cual significa que es posible medir con exactitud dosis parciales. Adicionalmente, las composiciones sólidas de la presente invención se pueden dispersar fácilmente en un medio acuoso para proporcionar dispersiones acuosas estables. Dichas dispersiones acuosas estables pueden separarse a su vez de una forma predeterminada para brindar una dosis líquida correcta de lopinavir. Estos métodos de suministro de dosis personalizadas se pueden aplicar en particular en la administración pediátrica, dado que los niños requieren menores dosis de lopinavir. Además, las dosis de lopinavir pueden adaptarse de forma acorde según el peso, la edad y otras circunstancias del paciente (como el estado o la gravedad de la infección por VIH).

También se describe una dispersión acuosa que se puede obtener, que se obtiene o que se obtiene directamente mediante dispersión de la composición sólida del primer aspecto en un medio acuoso.

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporcionan procesos para la elaboración de una composición sólida tal como se define en la presente.

También se describe una composición sólida que se puede obtener, que se obtiene o que se obtiene directamente mediante el proceso según el segundo aspecto.

Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una composición sólida del primer aspecto de la invención o una composición sólida que se puede obtener, que se obtiene o que se obtiene directamente mediante el proceso según el segundo aspecto de la presente invención y, opcionalmente, otro excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Según un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona una composición sólida o composición farmacéutica tal como se define en la presente, para uso como medicamento.

Según un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona una composición sólida o composición farmacéutica tal como se define en la presente, para uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones retrovirales (p. ej., VIH).

También se describe un uso de una composición sólida o una dispersión acuosa tal como se define en la presente en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones retrovirales (p. ej., VIH).

Según un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona una composición sólida del primer aspecto de la invención o una composición sólida que se puede obtener, que se obtiene o que se obtiene directamente mediante el proceso según el segundo aspecto de la presente invención, o una composición farmacéutica según el tercer aspecto de la presente invención, para uso en el tratamiento o la prevención de una infección por

retrovirus, como VIH, en donde la composición sólida o la composición farmacéutica se administran en combinación con uno o más agentes antirretrovirales adicionales.

5 También se describe un kit de partes que comprende una composición sólida tal como se define en la presente o una composición farmacéutica que comprende la composición sólida tal como se define en la presente y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 Salvo que se indique lo contrario, los elementos de cualquier aspecto de la invención, incluidos elementos opcionales, adecuados y preferidos, también son elementos de cualquier otro aspecto de la invención, incluidos elementos opcionales, adecuados y preferidos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

En la sección de ejemplos se hace referencia a las siguientes figuras:

15 La figura 1 muestra un diagrama de barras 3D que representa los resultados del estudio descrito en el ejemplo 4 en la presente, en el cual los «aciertos» claros (es decir, composiciones que cumplen con los criterios de evaluación de nanodispersiones, remitirse al ejemplo 1) se muestran como barras de color gris, los cuasifallos se muestran como barras de color blanco con puntos, los fallos más claros se muestran como barras transparentes y los fallos absolutos se muestran sin barras. El tamaño de partícula promedio z de cada uno de los aciertos, cuasifallos y fallos más claros se indican en el eje vertical.

20 La figura 2 muestra un análisis de los 7 aciertos del ejemplo 4 en la presente con proporciones variables de polímero/tensioactivo, como se describe en el ejemplo 5 (los «aciertos» claros (es decir, composiciones que cumplen con los criterios de evaluación de nanodispersiones, indicados en el ejemplo 1) se muestran como barras de color gris, los cuasifallos (es decir, nanopartículas dispersas que no alcanzaron los criterios de selección de nanodispersiones) se muestran como barras transparentes y los fallos absolutos se muestran sin barras).

30 La figura 3 muestra (a) el tamaño de partícula z (nm) de las muestras original y repetida de cada una de las 4 muestras repetidas exitosas y (b) el potencial promedio zeta (mV) de cada una de las 4 muestras repetidas exitosas (remitirse al ejemplo 5).

35 La figura 4 muestra (a) el tamaño de partícula z (nm) de las muestras con bajo contenido de tensioactivo (5 %) y contenido elevado de tensioactivo (10 %) indicadas en la tabla 5C y (b) el potencial promedio zeta (mV) de las muestras con bajo contenido de tensioactivo (5 %) y contenido elevado de tensioactivo (10 %) indicadas en la tabla 5C (remitirse al ejemplo 5).

40 Las figuras 5A a 5C demuestran la estabilidad de las nanodispersiones de lopinavir e la presente invención durante períodos de tiempo prolongados (remitirse al ejemplo 6). La figura 5A muestra mediciones en el tiempo realizadas con respecto a las nanodispersiones de las muestras frías de PVA/Vit-E (para muestras de tensioactivo al 5 % y al 10 %) en relación (a) a su tamaño de partícula promedio z (nm), (b) a la polidispersión del tamaño de partícula, y (c) al potencial promedio zeta (mV), cada uno para muestras de PVA/Vit-E con contenido de tensioactivo del 5 % (izquierda) y 10 % (derecha). La figura 5B muestra mediciones en el tiempo realizadas con respecto a las nanodispersiones de las muestras frías de PVA/T-20 (para muestras de tensioactivo al 5 % y al 10 %) en relación (a) a su tamaño de partícula promedio z (nm), (b) a la polidispersión del tamaño de partícula, y (c) al potencial promedio zeta (mV), cada uno para muestras de PVA/T-20 con contenido de tensioactivo del 5 % (izquierda) y 10 % (derecha). La figura 5C muestra mediciones en el tiempo realizadas con respecto a las nanodispersiones de las muestras frías de PVA/NDC (para muestras de tensioactivo al 5 % y al 10 %) en relación (a) a su tamaño de partícula promedio z (nm), (b) a la polidispersión del tamaño de partícula, y (c) al potencial promedio zeta (mV), cada uno para muestras de PVA/NDC con contenido de tensioactivo del 5 % (izquierda) y 10 % (derecha).

55 La figura 6 muestra la citotoxicidad de nanodispersiones cargadas con lopinavir al 10 % en diversas líneas celulares. Los datos del lopinavir acuoso se brindan como líneas punteadas horizontales. Los datos se proporcionan como IC_{50} en μM .

La figura 7 muestra la actividad de nanodispersiones con 10 % de carga de lopinavir con respecto a la proteasa recombinante del VIH. Los datos del lopinavir acuoso se brindan como una línea punteada horizontal. Los datos se proporcionan como IC_{50} en nM.

60 La figura 8 muestra la actividad de nanodispersiones con 10 % de carga de lopinavir con respecto al VIH III_B. Los datos del lopinavir acuoso se brindan como una línea punteada horizontal. Los datos se proporcionan como IC_{50} en nM.

La figura 9 muestra la acumulación celular de nanodispersiones con 10 % de carga de lopinavir en diversas líneas celulares. Los datos del lopinavir acuoso se brindan como líneas punteadas horizontales.

5 La figura 10 muestra la acumulación celular de nanodispersiones con 70 % de carga de lopinavir en diversas líneas celulares. Los datos del lopinavir acuoso se brindan como líneas punteadas horizontales. (A) HepG2, (B) Caco-2, (C) THP-1, (D) A-THP-1, (E) CEM.

10 La figura 11 muestra la permeabilidad transcelular de nanodispersiones con 10 % de carga de lopinavir en monocapas de células Caco-2. Los datos del lopinavir acuoso se brindan como líneas punteadas horizontales.

15 La figura 12 muestra la permeabilidad transcelular de nanodispersiones con 70 % de carga de lopinavir en monocapas de células Caco-2, con respecto al lopinavir acuoso. Se brindan datos sobre el pasaje de fármaco de apical (lado intestinal) a basolateral (lado sanguíneo).

20 La figura 13 muestra la farmacocinética de nanodispersiones con 70 % de carga de lopinavir tras la administración oral a ratas, con respecto a ratas que recibieron por vía oral formulaciones convencionales de lopinavir solo o lopinavir/ritonavir. La figura muestra los niveles de lopinavir en plasma en el tiempo con lopinavir acuoso (cuadrados), lopinavir acuoso potenciado con ritonavir (triángulos) y nanopartículas de lopinavir (círculos).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

25 El término «nanopartícula» o «de nanopartículas» se utiliza en la presente para hacer referencia a una partícula con un tamaño igual o inferior a 1 micrón (µm).

30 El término «lopinavir» se utiliza en la presente para hacer referencia a lopinavir, el cual se utiliza habitualmente en tratamientos contra el VIH, e incluye sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de este, así como cualquier forma amorfa o polimórfica de este.

35 Se debe observar que las referencias a «prevenir» o «prevención» hacen referencia al tratamiento profiláctico e incluyen la prevención o el retraso en la aparición de síntomas clínicos de la afección o el trastorno que se desarrolla en un ser humano que padezca o presente predisposición a padecer el trastorno o la afección, pero que aún no experimente o no presente síntomas clínicos o subclínicos de dicho trastorno o dicha afección.

40 Se debe observar que las referencias a «tratamiento» o «tratar» una afección o un trastorno incluyen: (1) inhibir el trastorno o la afección, es decir, detener, reducir o retrasar el desarrollo de la enfermedad o una recidiva de esta (en el caso de un tratamiento de mantenimiento) o al menos un síntoma clínico o subclínico de esta, o (2) aliviar o atenuar la enfermedad, es decir, lograr una regresión del trastorno o la afección o al menos uno de uno de sus síntomas clínicos o subclínicos.

45 Una «cantidad terapéuticamente eficaz» significa la cantidad de un compuesto que, al administrarse a un mamífero para tratar una enfermedad, resulta suficiente para lograr dicho tratamiento de la enfermedad. La «cantidad terapéuticamente eficaz» varía según el compuesto, la enfermedad y su gravedad, así como la edad, el peso, etc. del paciente que se desee tratar.

Composición sólida de liponavir

50 La presente invención proporciona una composición sólida de lopinavir que comprende nanopartículas de lopinavir dispersas en una mezcla de al menos un polímero hidrofílico y al menos un tensioactivo; en donde el polímero hidrofílico es alcohol polivinílico (PVA, por su sigla en inglés) y el tensioactivo es vitamina-E-polietilenglicol-succinato (Vit-E-PEG-succinato), en donde la composición comprende:

55 40 a 80 % de lopinavir,
10 a 40 % en peso de PVA y
2 a 20 % en peso de vitamina -E-polietilenglicol-succinato (Vit-E-PEG-succinato).

Las nanopartículas de la sustancia de fármaco lopinavir se dispersan en una mezcla de excipientes sólidos que comprende el polímero hidrofílico y el tensioactivo.

60 La composición sólida de la presente invención puede administrarse tal como se encuentra a un paciente o

formularse adicionalmente para brindar una composición farmacéutica, por ejemplo, en forma de un comprimido, una cápsula, una gragea o una formulación de gránulos o polvo dispersable.

Las nanopartículas de lopinavir tienen un tamaño de partícula promedio inferior o igual a 1 micrón (μm). En una realización particular, las nanopartículas de lopinavir tienen un tamaño de partícula promedio de entre 100 y 1000 nm. En otra realización, las nanopartículas de lopinavir tienen un tamaño de partícula promedio de entre 100 y 800 nm. En otra realización, las nanopartículas de lopinavir tienen un tamaño de partícula promedio de entre 100 y 700 nm. En incluso otra realización, las nanopartículas de lopinavir tienen un tamaño de partícula promedio de entre 100 y 600 nm.

El tamaño de partícula de las nanopartículas puede evaluarse utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica (p. ej., difracción láser, dispersión láser, microscopía electrónica). En una realización de la invención, el tamaño de partícula se evalúa mediante dispersión de la composición sólida en un medio acuoso y determinación del tamaño de partícula con un Zetasizer (Malvern Instruments Ltd).

En una realización, la polidispersión de las nanopartículas de lopinavir es inferior o igual a 0.8, de forma adecuada inferior o igual a 0.6 y de forma más adecuada inferior o igual a 0.5. La polidispersión hace referencia al tamaño de las nanopartículas de lopinavir y puede determinarse a través de métodos adecuados que se conocen en la técnica (p. ej., difracción láser, dispersión láser, microscopía electrónica). En una realización de la presente invención, la polidispersión de tamaños de partícula de las nanopartículas de lopinavir puede evaluarse de manera adecuada con un Malvern Zetasizer (Malvern Instruments Ltd).

En una realización particular, el potencial zeta promedio de las nanopartículas de lopinavir al dispersarse en un medio acuoso es de entre -100 y +100 mV. En otra realización, el potencial zeta de las nanopartículas de lopinavir es de entre -25 y +25 mV. En otra realización, el potencial zeta de las nanopartículas de lopinavir es de entre -20 y +20 mV. En incluso otra realización, el potencial zeta de las nanopartículas de lopinavir es de entre -25 y 0 mV. En general, se ha descubierto que los potenciales zeta de magnitud relativamente pequeña (ya sean positivos o negativos) permiten una mejor penetración de las nanopartículas en las células y su acumulación en ellas. Según la presente invención, los potenciales zeta pueden promedio medirse utilizando métodos conocidos en la técnica, como mediante el uso de un Zetasizer (Malvern Instruments Ltd).

La composición sólida puede comprender partículas o gránulos de mayor tamaño, por ejemplo, con un tamaño de 5 a 30 micrones (μm), pero cada partícula o gránulo puede contener múltiples nanopartículas de lopinavir dispersas en una mezcla del tensioactivo y polímero hidrofílico. Adicionalmente, estas partículas o gránulos de mayor tamaño se dispersan al mezclar la composición sólida con un medio acuoso para formar nanopartículas separadas de lopinavir.

En una realización, la composición sólida comprende un único polímero hidrofílico y un único tensioactivo seleccionado de los indicados en la presente. En una realización alternativa, la composición sólida comprende dos o más polímeros hidrofílicos y/o dos o más tensioactivos seleccionados de los indicados en la presente.

Polímero hidrofílico

En las formulaciones farmacéuticas se puede utilizar un amplio espectro de polímeros hidrofílicos. Los ejemplos de dichos polímeros incluyen:

- (a) homo o copolímeros de monómeros seleccionados de: alcohol vinílico, ácido acrílico, ácido metacrílico, acrilamida, metacrilamida, aminoalquilacrilatos de acrilamida, aminoalquil-metacrilatos, hidroxietilacrilato, sulfonatos de metilpropano, hidroxietilmetilacrilato, vinil pirrolidona, vinil imidazol, vinil aminas, vinil piridina, etilenglicol, propilenglicol, óxidos de etileno, óxidos de propileno, etilenimina, estirenosulfonatos, etilenglicolacrilatos y metacrilato de etilenglicol,
- (b) alcohol polivinílico (PVA), un copolímero de alcohol y polietilenglicol, un copolímero en bloque de polioxietileno y polioxipropileno, polietilenglicol y polivinilpirrolidona o una combinación de los mismos,
- (c) derivados de celulosa, por ejemplo, acetato de celulosa, metilcelulosa, metil-etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilmetil-celulosa, hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilbutilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, carboxi-metilcelulosa y sus sales (p. ej., la sal de sodio - SCMC) o carboxi-metilhidroxietilcelulosa y sus sales (por ejemplo, la sal de sodio),
- (d) gomas, como goma guar, alginato, goma de algarrobo y goma xantana,
- (e) polisacáridos, como dextrano, xiloglucano y gelatina (o gelatina hidrolizada),
- (f) ciclodextrinas como *beta*-ciclodextrina,
- (g) mezclas de los mismos.

Los copolímeros pueden ser copolímeros estadísticos (también conocidos como copolímeros aleatorios), un copolímero en bloque, un copolímero de injerto o un copolímero hiperramificado. También puede haber otros

comonómeros presentes, siempre que su presencia no afecte la solubilidad en agua del material polimérico resultante.

5 Los ejemplos particulares de homopolímeros incluyen poli-vinilalcohol (PVA), ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, poliacrilamidas (como poli-N-isopropilacrilamida), polimetacrilamida; poliacrilaminas, poli-metil-acrilaminas (como polidimetilaminoetilmacetato y poli-N-morfolinoetilmacetato), polivinilpirrolidona (PVP), poliestirenosulfonato, polivinilimidazol, polivinilpiridina, poli-2-etil-oxazolona poli-etilenimina y derivados etoxilados de los mismos.

10 En la presente invención, el polímero hidrofílico se selecciona de los polímeros hidrofílicos con capacidad de estabilizar nanopartículas de lopinavir en una dispersión acuosa, junto con un tensioactivo tal como se define en la presente, y adecuados también para uso farmacéutico (p. ej., aprobados para uso por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos).

15 Por lo tanto, el polímero hidrofílico es alcohol polivinílico (PVA).

El polímero hidrofílico es un polímero hidrofílico farmacéuticamente aceptable.

20 Se debe observar que cualquier valor de peso molecular (Mw, por su sigla en inglés) o número molecular (Mn, por su sigla en inglés) que se indique en la presente abarca el intervalo de valores de Mw y Mn que pueden estar presentes en el polímero.

25 En una realización particular, el alcohol polivinílico tiene un peso molecular promedio de entre 5000 y 200000 Da, de forma adecuada con un nivel de hidrólisis del 75 al 90 % (es decir, % de hidroxilos libres). En una realización particular, el alcohol polivinílico tiene un nivel de hidrólisis del 75 al 90 %. En otra realización, el alcohol polivinílico tiene un nivel de hidrólisis del 75 al 85 %. En una realización particular, el alcohol polivinílico tiene un peso molecular promedio de entre 9000 y 10000 Da, de forma adecuada con un nivel de hidrólisis del 80 %. En una realización particular, el alcohol polivinílico tiene un nivel de hidrólisis del 75 al 90 %, de forma adecuada, con un nivel de hidrólisis del 75 al 85 %.

30 En una realización particular, el polímero hidrofílico es PVA.

Tensioactivo

Los tensioactivos adecuados para uso farmacéutico pueden ser:

- 35
- no iónicos (p. ej., triglicéridos etoxilados, etoxilados de alcohol graso, etoxilados de alquilfenol, etoxilados de ácidos grasos, etoxilados de amida grasa, etoxilados de amina grasa, alcanosatos de sorbitán, alcanosatos de sorbitán etilado, etoxilatos de alquilo, Pluronic™, poliglucósidos de alquilo, etoxilatos de estearol, poliglucósidos de alquilo, ésteres de ácidos grasos de sacarosa, aniónicos, catiónicos, anfotéricos o zwitteriónicos),
- 40
- aniónicos (p. ej., sulfatos de alquiléter, carboxilatos de alquiléter, sulfonatos de alquilbenceno, fosfatos de alquiléter, sulfosuccinatos de dialquilo, sarcosinatos, alquilsulfonatos, jabones, alquilsulfatos, carboxilatos de alquilo, alquilsulfatos, sulfonatos de parafina, sulfonatos de n-alcano secundarios, sulfonatos de alfa-olefina, sulfonatos de isetionato, alginatos),
- 45
- catiónicos (p. ej., sales de aminas grasas, sales de diaminas grasas, compuestos de amonio cuaternario, tensioactivos de fosfonio, tensioactivos de sulfonio, tensioactivos de sulfonxonio) o
 - zwitteriónicos (p. ej., derivados de N-alquilo de aminoácidos (como glicina, betaína, ácido aminopropiónico), tensioactivos de imidazolona, óxidos de amina, amidobetaínas).

50 Los tensioactivos particularmente adecuados son los no iónicos alcoxilados (en especial, los materiales de PEG/PPG Pluronic™), fenol-etoxilatos (en especial, materiales TRITON™), alquilsulfonatos (en especial, SDS), tensioactivos de éster (preferiblemente, ésteres de sorbitán de tipo Span™ y Tween™) y catiónicos (en especial, bromuro de cetiltrimetilamonio - CTAB).

55 En la presente invención, el tensioactivo se selecciona de forma adecuada de los tensioactivos con capacidad de estabilizar nanopartículas de lopinavir con un polímero hidrofílico como se define en la presente y que también cuentan con aprobación para uso farmacéutico (p. ej., aprobados para uso por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos).

60 En una realización particular, el tensioactivo es vitamina -E-polietilenglicol-succinato (Vit-E-PEG-succinato).

Combinaciones particulares de tensioactivo y polímero hidrofílico

El PVA es un polímero hidrofílico particularmente adecuado cuando el tensioactivo es vitamina -E-polietilenglicol-succinato (Vit-E-PEG-succinato).

5 Las combinaciones de PVA antedichas son particularmente beneficiosas cuando el PVA tiene un peso molecular promedio de entre 9000 y 10000 Da, de forma adecuada con un nivel de hidrólisis del 75 al 85 %.

Formulación de la composición sólida

10 En una realización particular, la composición sólida tal como se define en la presente comprende 50 a 75 % en peso de lopinavir. En otra realización, la composición sólida comprende 60 a 70 % en peso de lopinavir.

Por lo tanto, las composiciones sólidas de la presente invención permiten cargas de fármaco elevadas, lo cual mantiene al mínimo los excipientes potencialmente tóxicos (p. ej., tensioactivos).

15 De forma adecuada, la composición sólida comprende 20 a 60 % en peso del tensioactivo y polímero hidrofílico en combinación, de forma más adecuada entre 25 y 50 % en peso. En una realización particular, la composición sólida comprende 25 a 35 % en peso del tensioactivo y polímero hidrofílico en combinación.

20 En una realización, la composición sólida comprende 10 a 40 % en peso de polímero hidrofílico. En otra realización, la composición sólida comprende 15 a 30 % en peso de polímero hidrofílico. En una realización particular, la composición sólida comprende 15 a 25 % en peso de polímero hidrofílico.

En otra realización, la composición sólida comprende 2 a 20 % en peso de tensioactivo. En otra realización, la composición sólida comprende 3 a 10 % en peso de tensioactivo.

25 En una realización particular, la composición sólida comprende:

- 40 a 80 % en peso de lopinavir,
- 10 a 40 % en peso de polímero hidrofílico y
- 2 a 20 % en peso de tensioactivo.

30 En una realización particular, la composición sólida comprende 15 a 25 % en peso de PVA como polímero hidrofílico y 5 a 15 % en peso de vitamina-E-polietilenglicol-succinato (Vit-E-PEG-succinato) como tensioactivo. En otra realización, la composición sólida comprende 20 a 25 % en peso de PVA como polímero hidrofílico y 5 a 10 % en peso de vitamina-E-polietilenglicol-succinato (Vit-E-PEG-succinato) como tensioactivo. En una
35 realización particularmente preferida, la composición sólida comprende 18 a 22 % en peso de PVA como polímero hidrofílico y 8 a 12 % en peso de vitamina-E-polietilenglicol-succinato (Vit-E-PEG-succinato) como tensioactivo. De forma adecuada, dichas composiciones comprenden 25 a 35 % en peso del tensioactivo y polímero hidrofílico en combinación, de forma más adecuada entre 28 y 32 % en peso. En dichas realizaciones, la composición sólida comprende de forma adecuada nanopartículas de lopinavir con un tamaño de partícula promedio de entre 500 y 650 nm y un potencial promedio de zeta al dispersarse en un medio acuoso de entre -5
40 mV y -15 mV.

Salvo que se indique lo contrario, los porcentajes en peso antedichos hacen referencia al % en peso de un componente particular en proporción al peso total de la composición sólida.

45 La composición sólida puede comprender uno o más excipientes adicionales, por ejemplo, para facilitar adicionalmente la dispersión o estabilización de dispersiones de las nanopartículas en un diluyente farmacéuticamente aceptable o *in vivo*.

Procesos para elaborar la composición sólida

50 Las composiciones sólidas de la presente invención pueden elaborarse utilizando diversos métodos conocidos en la técnica. Las técnicas adecuadas para formar dichas composiciones se encuentran descritas, en términos generales, en Horn y Reiger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, 4330-4361.

55 Por ejemplo, la composición sólida puede elaborarse moliendo una forma sólida de lopinavir. La molienda puede tener lugar en presencia del tensioactivo y polímero hidrofílico o, de forma alternativa, estos pueden mezclarse con el fármaco molido tras la etapa de molienda.

60 No obstante, generalmente se prefiere la elaboración de las composiciones sólidas de lopinavir de la presente invención mediante una técnica de emulsión de aceite en agua, en la cual el lopinavir se disuelve en la fase oleosa y el tensioactivo y polímero hidrofílico se encuentran presentes en la fase acuosa. Los solventes acuoso y oleoso luego se retiran mediante secado por congelamiento, secado por aspersión o granulación por aspersión,

para proporcionar una composición sólida según la invención.

Por lo tanto, según la presente invención, se proporciona un proceso para elaborar una composición sólida tal como se define en la presente, en donde el proceso comprende:

- 5 (a) elaborar una emulsión de aceite en agua que comprenda:
 - una fase oleosa con lopinavir y
 - una fase acuosa con un polímero hidrofílico y un tensioactivo, cada uno de ellos tal como se define en la presente, y
 10 (b) retirar el agua y el aceite para formar la composición sólida.

Un beneficio del proceso de la presente invención es que las emulsiones que se forman en la etapa (a) son suficientemente homogéneas y estables para permitir un secado eficaz y uniforme en la etapa (b). Asimismo, las nanopartículas que se forman son sustancialmente uniformes en su forma física (tamaño, forma, etc.).

- 15 La etapa (a) puede realizarse utilizando métodos conocidos en la técnica. Por lo tanto, se puede utilizar cualquier método adecuado para la formación de la emulsión de aceite en agua según la definición en la etapa (a). En particular, la mezcla de las fases acuosa y oleosa para formar la emulsión de aceite en agua puede realizarse utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la mezcla puede implicar agitación, homogeneización con ultrasonido, homogeneización o una combinación de estas. En una realización particular, la mezcla se facilita a través de homogeneización y/u homogeneización con ultrasonido.

Por ejemplo, la etapa (a) puede realizarse utilizando los métodos que se describen en WO 2004/011537 A1 (COOPER et ál.), que se incorpora debidamente en la presente memoria por referencia.

- 25 En una realización particular, la etapa (a) comprende:

- (i) proporcionar una fase oleosa con lopinavir,
 (ii) proporcionar una fase acuosa con el polímero hidrofílico y el tensioactivo y
 (iii) mezclar la fase oleosa y la fase acuosa para producir la emulsión de aceite en agua.

- 30 De forma adecuada, la fase oleosa se proporciona disolviendo lopinavir en un solvente orgánico adecuado.

De manera adecuada, la fase acuosa se proporciona disolviendo el polímero hidrofílico y el tensioactivo en un medio acuoso, preferiblemente en agua. De forma alternativa, la fase acuosa puede proporcionarse mezclando dos soluciones acuosas del tensioactivo y el polímero hidrofílico, elaboradas por separado.

- 35 En una realización particular, se agrega medio acuoso (p. ej., agua) o solvente orgánico adicionales antes de la etapa de mezcla (iii) o durante esta.

- 40 La concentración de lopinavir en la emulsión de aceite en agua es lo más elevada posible, dentro de lo adecuado, para facilitar un aumento eficaz del proceso. Por ejemplo y de forma adecuada, la concentración de lopinavir en la fase oleosa es de 5 a 75 mg/ml, de forma más adecuada de 10 a 70 mg/ml.

De forma adecuada, la concentración del polímero hidrofílico en la fase acuosa/de agua es de 0.5 a 50 mg/mL, de forma más adecuada de 10 a 30 mg/ml.

- 45 De forma adecuada, la concentración del tensioactivo en la emulsión de fase acuosa/de agua es de 0.5 a 50 mg/mL, de forma más adecuada de 10 a 30 mg/ml.

- 50 El solvente orgánico que forma la fase oleosa es (sustancialmente) no miscible en agua. De forma adecuada, el solvente orgánico es aprótico. De forma adecuada, el solvente orgánico tiene un punto de ebullición inferior a 120 °C, de manera adecuada inferior a 100 °C, de forma adecuada inferior a 90 °C.

- 55 En una realización particular, el solvente orgánico es uno seleccionado de los solventes de clase 2 o 3 indicados en las pautas de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH, por su sigla en inglés) sobre solventes residuales.

- 60 En una realización particular, el solvente orgánico se selecciona de cloroformo, diclorometano, dicloroetano, tetracloroetano, ciclohexano, hexano/s, isooctano, dodecano, decano, metilbutilcetona (MBK), metilciclohexano, tetrahidrofurano, tolueno, xileno, acetato de butilo, aceite mineral, éter *terc*-butilmetílico, heptano/s, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo, acetato de metilo, metiletilcetona, acetato de etilo, éter etílico, pentano y acetato de propilo o cualquier combinación adecuada de los mismos.

En una realización particular, el solvente orgánico se selecciona de cloroformo, diclorometano, metiletilcetona (MEK), metilbutilcetona (MBK) y acetato de etilo.

5 De forma adecuada, la proporción de volumen de la fase acuosa a la fase oleosa en la etapa de mezcla (iii) es de entre 20:1 y 1:4, de forma más adecuada entre 10:1 y 1:1, de forma aun más adecuada entre 6:1 y 2:1.

10 La etapa de mezcla (iii) produce de forma adecuada una emulsión de aceite en agua sustancialmente uniforme. Tal como se indicó previamente, la mezcla puede realizarse utilizando métodos conocidos en la técnica. De manera adecuada, la etapa de mezcla (iii) implica agitación, homogeneización con ultrasonido, homogeneización o una combinación de estas. En una realización particular, la etapa de mezcla (iii) implica homogeneización y/u homogeneización con ultrasonido.

15 La etapa (b) puede realizarse utilizando métodos conocidos en la técnica. De manera adecuada, la etapa (b) implica secado por congelamiento, secado por aspersión o granulación por aspersión.

La etapa (b) puede realizarse utilizando métodos descritos en WO 2004/011537 A1 (COOPER et ál.), cuyo contenido se incorpora en la presente memoria en su totalidad por referencia.

20 En una realización particular, la etapa (b) implica secado por congelamiento de la emulsión de aceite en agua. De tal forma, la etapa (b) puede comprender, de forma adecuada, congelamiento de la emulsión de aceite en agua y luego retiro de los solventes al vacío.

25 Preferiblemente, el congelamiento de la emulsión de aceite en agua puede realizarse mediante enfriamiento externo de la emulsión de aceite en agua. Por ejemplo, se puede enfriar de forma externa un recipiente con la emulsión de aceite en agua sumergiendo el recipiente en un medio de enfriamiento, como nitrógeno líquido. De manera alternativa, el recipiente con la emulsión de aceite en agua puede contar con una «camisa» externa a través de la cual se hace circular el refrigerante para congelar la emulsión de aceite en agua. De manera alternativa, el recipiente puede comprender un elemento interno a través del cual se hace circular el refrigerante para congelar la emulsión de aceite en agua.

30 En una alternativa adicional, la emulsión de aceite en agua se congela mediante contacto directo con un medio de enfriamiento a una temperatura eficaz para congelar la emulsión. En dichos casos, se puede agregar el medio de enfriamiento (p. ej., nitrógeno líquido) a la emulsión de aceite en agua o la emulsión de aceite en agua puede agregarse al medio de enfriamiento.

35 En una realización particular, la emulsión de aceite en agua se agrega al medio fluido (p. ej., nitrógeno líquido), de manera adecuada por goteo. Este orden de adición brinda una mayor pureza del producto final. Por lo tanto, se pueden formar de manera adecuada gotitas congeladas de la emulsión de aceite en agua. Dichas gotitas congeladas pueden aislarse de manera adecuada (p. ej., al vacío para retirar el medio de fluido/nitrógeno líquido). Luego se retira el solvente de manera adecuada de las gotitas congeladas al vacío. Posteriormente, se aísla la composición sólida resultante.

En un aspecto alternativo, la presente invención proporciona un proceso para elaborar una composición sólida tal como se define en la presente, en donde el proceso comprende:

45 elaborar una solución de fase única con lopinavir, un polímero hidrofílico tal como se define en la presente y un tensioactivo tal como se define en la presente, en uno o más solventes, y
 secar la mezcla por aspersión para retirar el o los solventes y así formar la composición sólida.

50 En este aspecto de la invención, la solución de fase única que comprende el lopinavir, el polímero hidrofílico y el tensioactivo se disuelven en un solvente de dos o más solventes miscibles. Dichos procesos se encuentran correctamente descritos en WO 2008/006712, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria en su totalidad por referencia WO 2008/006712 también incluye listas de solventes adecuados y combinaciones de los mismos para formar la solución de fase única. En una realización, la solución de fase única comprende dos o más solventes (p. ej., etanol y agua), que en su conjunto solubilizan el lopinavir, el polímero hidrofílico y el
55 tensioactivo. En otra realización, la fase única comprende un único solvente, por ejemplo, etanol o agua. El retiro del o de los solventes de la mezcla de fluidos de fase única implica secado por aspersión (nuevamente, WO 2008/006712 presenta detalles sobre las condiciones adecuadas del secado por aspersión).

60 La presente invención también proporciona una composición sólida que se puede obtener, que se obtiene o que se obtiene directamente a través de cualquiera de los procesos que se describen en la presente.

Dispersión acuosa

En la presente también se describe una dispersión acuosa que comprende múltiples nanopartículas dispersas en un medio acuoso, en donde las nanopartículas comprenden un núcleo de lopinavir y un recubrimiento de al menos un polímero hidrofílico y al menos un tensioactivo,

5 en donde el polímero hidrofílico se selecciona de alcohol polivinílico (PVA), un copolímero de alcohol y polietilenglicol, un copolímero en bloque de polioxietileno y polioxipropileno, polietilenglicol, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y polivinilpirrolidona o una combinación de los mismos y
 10 en donde el tensioactivo se selecciona de vitamina-E-polietilenglicol-succinato (Vit-E-PEG-succinato), un éster de ácido graso de polioxietileno sorbitán, cloruro de *N*-alquildimetilbencilamonio, desoxicolato de sodio, sulfosuccinato sódico de dioctilo, polietilenglicol-12-hidroxiestearato, alcohol polivinílico (PVA) y un copolímero en bloque de polioxietileno y polioxipropileno, o una combinación de los mismos.

En la presente también se describe una dispersión acuosa que se puede obtener, que se obtiene o que se obtiene directamente mediante dispersión de la composición sólida tal como se define en la presente en un medio acuoso. De manera adecuada, se elabora una dispersión acuosa inmediatamente antes del uso.

15 Cuando la composición sólida se dispersa en el medio acuoso, el tensioactivo y/o polímero hidrofílico se disuelven en el medio acuoso para liberar las nanopartículas de lopinavir en forma dispersa. Las nanopartículas de lopinavir, las cuales ya se encuentran dispersas en una mezcla sólida del tensioactivo y polímero hidrofílico, luego se dispersan en el medio acuoso en forma recubierta, con lo cual se recubre el núcleo de lopinavir con el
 20 tensioactivo y polímero hidrofílico. Se cree que dicho recubrimiento les imparte estabilidad a las nanopartículas, lo cual previene una coagulación y acumulación prematuras.

De manera adecuada, las cantidades relativas (incluidas las proporciones) de lopinavir, tensioactivo y polímero hidrofílico son iguales a lo definido en relación con la composición sólida. No obstante, es necesario ajustar sus
 25 valores de % en peso respectivos en la dispersión acuosa en total para incluir el medio acuoso. En una realización particular, el medio acuoso comprende 20 a 99.5 % en peso de la dispersión acuosa total. En una realización particular, el medio acuoso comprende 50 a 98 % en peso de la dispersión acuosa total. En una realización particular, el medio acuoso comprende 70 a 95 % en peso de la dispersión acuosa total. De manera adecuada, la parte restante de la dispersión acuosa consiste esencialmente en lopinavir, tensioactivo y polímero
 30 hidrofílico, cuyas proporciones en la dispersión acuosa en total se calculan (y ponderan) de manera acorde por referencia a las proporciones mencionadas con respecto a la composición sólida.

Según una descripción, el medio acuoso es agua. En una descripción alternativa, el medio acuoso comprende agua y uno o más excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables adicionales.

35 De manera beneficiosa, las dispersiones acuosas que se describen en la presente son estables durante periodos prolongados, tanto en cuanto a la estabilidad química como a la estabilidad de las partículas en sí mismas (es decir, con respecto a la acumulación, coagulación, etc.).

40 Las dispersiones acuosas que se describen en la presente pueden considerarse composiciones farmacéuticas.

Las dispersiones acuosas que se describen en la presente permiten tomar una alícuota medida de estas para una dosificación exacta en un régimen médico personalizado.

45 El tamaño de partícula, la polidispersión y el potencial zeta de las nanopartículas de lopinavir en la dispersión acuosa son tal como se definieron en lo precedente con respecto a la composición sólida. Por supuesto, se debe observar que el tamaño de partícula, la polidispersión y el potencial zeta de las nanopartículas de lopinavir presentes en la composición sólida se miden dispersando la composición sólida en un medio acuoso, para así formar una dispersión acuosa de la presente invención.

50 En una descripción, la dispersión acuosa comprende un único polímero hidrofílico y un único tensioactivo seleccionado de los indicados en la presente. En una descripción alternativa, la dispersión acuosa comprende dos o más polímeros hidrofílicos y/o dos o más tensioactivos seleccionados de los indicados en la presente.

55 **Proceso para elaborar una dispersión acuosa**

La dispersión acuosa puede formarse utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el lopinavir puede someterse a molienda en presencia de una mezcla acuosa del tensioactivo y polímero hidrofílico.

60 No obstante, en una descripción se proporciona un proceso para elaborar una dispersión acuosa, que comprende dispersar una composición sólida de lopinavir como se define en la presente en un medio acuoso.

En una descripción particular, el medio acuoso es agua. En una descripción alternativa, el medio acuoso comprende agua y uno o más excipientes adicionales.

La dispersión de la composición sólida en el medio acuoso puede comprender la adición de la composición sólida en un medio acuoso y agitación adecuada de la mezcla resultante (p. ej., mediante agitación, homogeneización, homogeneización por ultrasonido, batido, etc.).

5 **Composiciones farmacéuticas**

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una composición sólida tal como se define en la presente. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales.

10 Las composiciones sólidas de lopinavir de la invención pueden formularse en una forma adecuada para uso oral (por ejemplo, como comprimidos, grajeas, cápsulas duras o blandas o gránulos o polvos dispersables) utilizando métodos conocidos en la técnica. De esta forma, las composiciones sólidas de la invención pueden mezclarse con uno o más excipientes farmacéuticos adicionales durante este proceso, como antiadherentes, aglutinantes, recubrimientos, entéricos, desintegrantes, rellenos, diluyentes, saborizantes, colorantes, lubricantes, emolientes, conservantes, absorbentes y edulcorantes.

15 En una realización particular, la composición farmacéutica es un comprimido o una cápsula que comprende la composición sólida de lopinavir.

20 La dispersión acuosa que se describe en la presente puede administrarse tal como se encuentra o puede formularse adicionalmente con uno o más excipientes adicionales para brindar una dispersión, un elixir o un jarabe adecuados para uso oral, o una dispersión adecuada para administración parenteral (por ejemplo, una dispersión acuosa estéril para dosificación intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intramuscular).

25 En una descripción particular, la composición farmacéutica es una dispersión acuosa tal como se describe en la presente memoria. Dichas formulaciones dispersas pueden utilizarse para medir correctamente dosis más pequeñas, como las adecuadas para administración a niños.

30 En una realización particular, la composición farmacéutica se encuentra en una forma adecuada para suministro parenteral, ya sea suministro por vía intravenosa o intramuscular.

Se observará que se pueden obtener diferentes composiciones farmacéuticas de la invención mediante procedimientos convencionales, con excipientes farmacéuticos convencionales conocidos en la técnica.

35 Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de lopinavir. El experto en la técnica sabrá determinar y seleccionar una cantidad terapéuticamente eficaz de lopinavir para inclusión en las composiciones farmacéuticas de la invención.

40 **Usos de la formulación de nanopartículas y la composición farmacéutica**

La presente invención proporciona una composición sólida tal como se define en la presente para uso como medicamento.

45 En principio, la composición sólida que se define en la presente puede utilizarse para el tratamiento de cualquier virus que comprenda una enzima proteasa.

En un aspecto particular, la presente invención proporciona además una composición sólida tal como se define en la presente para uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones retrovirales (p. ej., VIH).

50 La presente invención proporciona adicionalmente un uso de una composición sólida tal como se define en la presente en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones retrovirales (p. ej., VIH).

55 También se describe un método para el tratamiento y/o la prevención de una infección retroviral (p. ej., VIH), en donde el método comprende administrarle una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición sólida, una dispersión acuosa o una composición farmacéutica tal como se define en la presente a un paciente que padezca una infección retroviral o se encuentre en riesgo de padecerla.

60 El término «retrovirus» hace referencia, en términos generales, a un virus de ARN con capacidad de autoduplicarse en una célula hospedadora mediante la enzima de transcriptasa inversa, para transcribir su genoma de ARN en ADN. El ADN luego se puede incorporar en el genoma del hospedador, de modo tal que el virus pueda replicarse posteriormente como parte del ADN del hospedador.

La infección retroviral que se puede tratar o prevenir se selecciona de forma adecuada de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) alfarretrovirus, betarretrovirus, gemmarretrovirus, deltarretrovirus, epsilonretrovirus, lentivirus, espumavirus, metavirus, errantivirus, pseudovirus, hepadnavirus y caulimovirus.

5

En una realización particular de la presente invención, la infección retroviral que se puede tratar o prevenir es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), de forma más adecuada, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) de tipo 1.

10

Las composiciones sólidas y las composiciones farmacéuticas de la presente invención, así como las dispersiones acuosas que se describen en la presente, también se utilizan de forma adecuada para prevenir o reducir el riesgo de infección por VIH en sujetos expuestos a un riesgo de desarrollo de infección por VIH.

15

Lopinavir, el agente activo en las composiciones sólidas y las composiciones farmacéuticas de la presente invención, así como las dispersiones acuosas que se describen en la presente, es un fármaco antirretroviral que actúa como inhibidor de proteasa. Por lo tanto, la composición sólida y las composiciones farmacéuticas de la presente invención, así como las dispersiones acuosas que se describen en la presente, tienen la capacidad de inhibir la actividad de la proteasa. Adicionalmente, las nanopartículas y las composiciones farmacéuticas de la presente invención son adecuadas para uso en terapias antirretrovirales y tratamientos profilácticos.

20

También se describe un método para inhibir la actividad de la proteasa en una célula (*in vivo* o *in vitro*), en donde el método comprende administrarle a dicha célula una composición sólida, una dispersión acuosa o una composición farmacéutica tal como se describen en la presente memoria.

25

También se describe un método para inhibir la actividad de la proteasa en un sujeto humano o animal que necesite dicha inhibición, en donde el método comprende administrarle a dicho sujeto una cantidad eficaz de una composición sólida, una dispersión acuosa o una composición farmacéutica tal como se definen en la presente.

30

También se describen una composición sólida, una dispersión acuosa o una composición farmacéutica tal como se definen en la presente para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociadas con la actividad de la proteasa.

35

Asimismo, se describe el uso de una composición sólida, una dispersión acuosa o una composición farmacéutica tal como se definen en la presente en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociadas con la actividad de la proteasa.

40

También se ha demostrado que lopinavir posee cierta actividad contra la malaria. Por lo tanto, en incluso otra descripción, la composición sólida o dispersión acuosa que se definen en la presente se pueden utilizar para el tratamiento de la malaria.

Vías de administración

45

Las composiciones sólidas y composiciones farmacéuticas de la invención, así como las dispersiones acuosas que se describen en la presente, pueden administrarse a un sujeto mediante cualquier vía de administración conveniente.

50

Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, oral (p. ej., por ingesta), bucal, sublingual, transdérmica (incluidos, p. ej., mediante un parche, yeso, etc.), transmucosa (incluidos, p. ej., mediante un parche, yeso, etc.), intranasal (p. ej., mediante aerosol nasal), ocular (p. ej., mediante gotas oftálmicas), pulmonar (p. ej., a través de terapia de inhalación o insuflación, p. ej., con un aerosol, p. ej., a través de la boca o nariz), rectal (p. ej., mediante supositorio o enema), vaginal (p. ej., mediante pesario), parenteral, por ejemplo, mediante inyección, incluidas subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intratecal, intraespinal, intracapsular, subcapsular, intraorbital, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea e intraesternal, o mediante implante de un depósito o reservorio, por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular.

55

En una descripción particular (p. ej., en tratamientos para el VIH), la vía de administración es oral o mediante implante de una formulación de depósito o reservorio.

Terapia de combinación

60

Si bien existe la posibilidad de utilizar las composiciones sólidas, las dispersiones acuosas y las composiciones farmacéuticas de la invención como único medicamento en el tratamiento y/o la prevención de una infección por retrovirus, como el VIH, lo más habitual es el uso de este agente en combinación con uno o más agentes antirretrovirales y/o antimicrobianos adicionales.

Otros agentes antirretrovirales adecuados en tratamientos de combinación con las formulaciones y composiciones de la presente invención incluyen Zidovudina, Zalcitabina, Didanosina, Estavudina, Lamivudina, Abacavir, Combivir (zidovudina + lamivudina), Trizivir (zidovudina + lamivudina + abacavir), Tenofovir, Emtricitabina, Truvada (Tenofovir + Emtricitabina), Epzicom/Kivexa (abacavir + lamivudina), Hidroxiurea, Nevirapina, Delavirdina, Etravirina, Rilpivirina, Atripla (lopinavir + emtricitabina + tenofovir), Indinavir, Ritonavir, Saquinavir, Nelfinavir, Amprenavir, Kaletra (lopinavir + ritonavir), Atazanavir, Fosamprenavir, Tipranavir, Darunavir, Enfuvirtida, Maraviroc, Raltegravir, Nevirapina, Efavirenz, Delavirdina, Etravirina, Rilprivirina, Artipla o combinaciones de los mismos.

En una realización particular, los otros agentes antirretrovirales adecuados para uso en tratamientos de combinación con las formulaciones y composiciones de la presente invención incluyen Tenofovir, Lamivudina, Abacavir, Emtricitabina, Zidovudina, Combivir (zidovudina + lamivudina), Truvada (Tenofovir + Emtricitabina), Epzicom/Kivexa (abacavir + lamivudina) y Ritonavir o combinaciones de los mismos.

En una realización preferida, los otros agentes antirretrovirales adecuados para uso en tratamientos de combinación con las formulaciones y composiciones de la presente invención incluyen dos de los siguientes: Tenofovir, Lamivudina, Abacavir, Emtricitabina, Didanosina, Zidovudina.

En realizaciones particulares, los otros agentes antirretrovirales adecuados en combinación con las formulaciones y composiciones de la presente invención se proporcionan en sí mismos como combinaciones, tales como:

- Emtricitabina + Tenofovir disoproxil fumarato
- Lamivudina + Estavudina
- Lamivudina + Tenofovir disoproxil fumarato
- Lamivudina + Zidovudina
- Lamivudina + Didanosina.

En una realización particular, el otro agente antirretroviral adecuado para uso en tratamientos de combinación con las formulaciones y composiciones de la presente invención es Ritonavir.

Por consiguiente, una descripción proporciona una combinación adecuada para uso en el tratamiento o la prevención de una infección por retrovirus, como el VIH, que comprende una composición sólida, una dispersión acuosa o una composición farmacéutica tal como se definen en la presente y uno o más agentes antirretrovirales adicionales.

La presente invención también proporciona una composición sólida o una composición farmacéutica tal como se definen en la presente para uso en el tratamiento o la prevención de una infección por retrovirus, como el VIH en donde la composición sólida, la dispersión acuosa o la composición farmacéutica se administran en combinación con uno o más agentes antirretrovirales adicionales.

En la presente también se describe una composición farmacéutica que comprende una composición sólida de lopinavir tal como se define en la presente y uno o más agentes antirretrovirales adicionales.

En la presente también se describe una composición farmacéutica que comprende una dispersión acuosa tal como se define en la presente, la cual comprende además uno o más agentes antirretrovirales adicionales.

Cuando se utiliza el término «combinación» en la presente, se debe comprender que esto hace referencia a administración simultánea, separada o en secuencia. En un aspecto de la invención, «combinación» hace referencia a administración simultánea. En otro aspecto de la invención, «combinación» hace referencia a administración separada. En un aspecto adicional de la invención, «combinación» hace referencia a administración en secuencia. Cuando la administración es separada o en secuencia, el retraso en la administración del segundo componente no debería permitir una pérdida del efecto beneficioso de la combinación.

Dicho tratamiento en conjunto puede lograrse a través de dosis simultáneas, separadas o en secuencia de los componentes individuales del tratamiento. Los productos combinados utilizan las formulaciones o composiciones de la presente invención dentro del intervalo de dosificación descrito en lo precedente y el otro agente farmacéuticamente activo dentro del intervalo de dosificación aprobado.

En una descripción adicional, se presenta una composición farmacéutica que comprende una composición sólida o una dispersión acuosa tal como se definen en la presente y uno o más agentes antirretrovirales adicionales. En una descripción particular, la composición farmacéutica se encuentra en una forma de dosificación única.

Kit de partes

También se describe un kit de partes que comprende una composición sólida tal como se define en la presente o una composición farmacéutica que comprende la composición sólida tal como se define en la presente y un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable.

La composición sólida o composición farmacéutica que comprende la composición sólida tal como se definen en la presente pueden dispersarse en el diluyente para proporcionar una dispersión acuosa tal como se define en la presente. Luego se puede administrar la dispersión completa o se puede medir una parte de esta y luego administrarse (con lo cual se suministra un medio para administrarle diferentes dosis a pacientes individuales).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos describen la elaboración de realizaciones de formulaciones de liponavir según la presente invención, junto con diversos datos analíticos.

Materiales

Todos los materiales se adquirieron a través de Sigma-Aldrich y se utilizaron sin purificación adicional, salvo que se indique lo contrario.

Ejemplo 1: evaluación de nanoformulaciones - 10 polímeros hidrofílicos, 16 tensioactivos

Se elaboraron muestras utilizando una solución madre de 10 mgml⁻¹ de lopinavir (A) en cloroformo, 22.5 mgml⁻¹ de polímero (P) y una solución madre de 22.5 mgml⁻¹ de tensioactivo (S). Se agregaron soluciones madre en las siguientes proporciones: 100 µl de (A), 267 µl de (P) y 133 µl de (S), por lo cual la relación de masa sólida fue la siguiente: 10 % d (A), 60 % de (P) y 30 % de (S) en una mezcla 1:4 de aceite a agua (O/W, por su sigla en inglés). Luego se emulsionaron las mezclas utilizando un homogeneizador por ultrasonido con sonda (UP400S, fabricado por Hielscher (Alemania)), con una sonda de titanio H3), a una amplitud del 20 % durante 7 segundos, seguido por congelamiento criogénico inmediato.

Se elaboró una matriz de 160 muestras (con 10 polímeros diferentes y 16 tensioactivos). Luego de la elaboración de las 160 muestras, estas se sometieron a liofilización (Virtis benchtop K) durante 42 horas para lograr un producto poroso seco, tras lo cual se cerraron las muestras en matraces individuales hasta el análisis.

Los polímeros y tensioactivos utilizados en este análisis se especifican en la tabla 1A y tabla 1B a continuación.

TABLA 1A: lista de polímeros hidrofílicos inicialmente analizados

Polímero	MW	m/dm ³ (22.5 mg/ml)
PEG 1k	1000	0.00225
F68	8400	0.000267857
F127	12600	0.000178571
Kollicoat	45000	0.00005
PVA	9500	0.000236842
PVP k30	30000	0.000075
HPC	80000	0.000028125
HPMC	10000	0.000225
Gelatina hidrolizada	1982	0.001135217
NaCMC	90000	0.000025

TABLA 1B: lista de 16 tensioactivos inicialmente analizados

Tensioactivo	MW	m/dm ³ (22.5 mg/ml)
Alginato de Na	155000	1.45161E-05
Miristato de Na	250.35	0.008987418
Desoxicolato de Na	414.55	0.005427572
Caprilato de Na	166.19	0.013538721
Vit E-peg-succinato	1000	0.00225

Tensioactivo	MW	m/dm ³ (22.5 mg/ml)
Sisterna 11	650	0.003461538
Sisterna 16	650	0.003461538
SDS	288.38	0.007802205
AOT	444.56	0.005061184
Cremofor EL	2500	0.0009
Solutol HS	344.53	0.006530636
Tween 20	1227	0.001833741
Tween 80	1300	0.001730769
Brij 58	1123.52	0.002002635
Hiamina	448.08	0.005021425
CTAB	364.46	0.006173517

Análisis preliminar

- 5 Las muestras se dispersaron inmediatamente antes del análisis mediante adición de 1 ml de agua. Luego se midió el tamaño de partícula de la dispersión de nanopartículas orgánicas y activas mediante dispersión de luz dinámica (DLS, por su sigla en inglés), utilizando un Malvern Zetasizer Nano ZS. Para el análisis de datos se utilizaron 3 mediciones con optimización de medición automática, software Malvern Zetasizer versión 6.20. Las partículas se consideraron aciertos si se cumplían los criterios posteriores.

Criterios de evaluación de la calidad de la nanodispersión

- 10 Se determinó una partícula como un acierto si cumplía con los siguientes criterios: dispersión completa de la muestra sin partículas de gran tamaño visibles, un promedio Z de partícula <1000 nm, un índice de polidispersión (PDI, por su sigla en inglés) <0.5, un desvío estándar entre las tres lecturas <10 % con respecto al promedio Z promedio y dos de las tres lecturas de DLS que satisfagan el informe de calidad de tamaño. El informe de calidad de tamaño incorpora 12 pruebas sobre la confiabilidad de los datos registrados y se aplica de forma automática a cada medición a través del software Malvern Zetasizer. Estas pruebas garantizan que la muestra se encuentre dentro de un intervalo de tamaño adecuado para la DLS, que presente un PDI inferior a 1, que se encuentre dentro del intervalo de concentración correcto y que el ajuste de distribución y acumulativo sean buenos (es decir, que los errores en los datos no superen 0.005).
- 15
- 20 La tabla 1C posterior brinda una lista de los aciertos en relación con los tensioactivos y polímeros hidrofílicos adecuados.

Tabla 1C: aciertos de tensioactivos y polímeros hidrofílicos adecuados (74 aciertos en total)

Polímero hidrofílico	Tensioactivo
PEG 1K	Vit E-peg-succinato
PEG 1K	Cremofor EL
PEG 1K	Solutol HS
PEG 1K	Tween 80
PEG 1K	Brij 58
Pluronic F68	Caprilato de Na
Pluronic F68	Vit E-peg-succinato
Pluronic F68	AOT
Pluronic F68	Cremofor EL
Pluronic F68	Tween 20
Pluronic F68	Tween 80
Pluronic F68	Brij 58
Pluronic F127	Alginato de Na
Pluronic F127	Desoxicolato de Na

ES 2 740 641 T3

Polímero hidrofílico	Tensioactivo
Pluronic F127	Caprilato de Na
Pluronic F127	Sistema 11
Pluronic F127	AOT
Pluronic F127	Solutol HS
Pluronic F127	Tween 20
Pluronic F127	Tween 80
Pluronic F127	Brij 58
Pluronic F127	Hiamina
Kollicoat	Alginato de Na
Kollicoat	Desoxicolato de Na
Kollicoat	Caprilato de Na
Kollicoat	Vit E-peg-succinato
Kollicoat	AOT
Kollicoat	Cremofor EL
Kollicoat	Solutol HS
Kollicoat	Tween 20
Kollicoat	Tween 80
Kollicoat	Brij 58
Kollicoat	Hiamina
PVA	Alginato de Na
PVA	Desoxicolato de Na
PVA	Caprilato de Na
PVA	Vit E-peg-succinato
PVA	Sistema 11
PVA	Sistema 16
PVA	Cremofor EL
PVA	Solutol HS
PVA	Tween 20
PVA	Tween 80
PVA	Brij 58
PVA	Hiamina
PVP 30K	Vit E-peg-succinato
PVP 30K	AOT
PVP 30K	Cremofor EL
PVP 30K	Solutol HS
PVP 30K	Tween 80
PVP 30K	Hiamina
HPC	Caprilato de Na
HPC	AOT
HPC	Tween 20
HPC	Tween 80
HPMC	Miristato de Na
HPMC	Vit E-peg-succinato
HPMC	SDS

Polímero hidrofílico	Tensioactivo
HPMC	AOT
HPMC	Cremonfor EL
HPMC	Solutol HS
HPMC	Tween 20
HPMC	Tween 80
HPMC	Brij 58
HPMC	Hiamina
Gelatina hidrolizada	Desoxicolato de Na
Gelatina hidrolizada	AOT
Gelatina hidrolizada	Cremonfor EL
Gelatina hidrolizada	Tween 80
Gelatina hidrolizada	Brij 58
Gelatina hidrolizada	Hiamina
NaCMC	Cremonfor EL
NaCMC	Brij 58
NaCMC	Hiamina

Ejemplo 2: nanoformulaciones evaluadas en los análisis biológicos

Se volvieron a realizar los «aciertos» (es decir, los indicados en el ejemplo 1, en la tabla 1C) de la evaluación anterior según los procedimientos descritos en el ejemplo 1 en réplica (una muestra caracterizada mediante DLS y análisis de potencial zeta, con realización de una muestra adicional para cada análisis biológico).

Ejemplo 3: nanoformulaciones radiomarcadas para análisis biológicos

Se elaboraron muestras de efavirenz radiomarcadas con ¹⁴C, a los efectos de realizar estudios farmacológicos y de acumulación celular y transpocillo (es decir, permeabilidad transcelular). La elaboración de las muestras se basó en los aciertos de las dos evaluaciones anteriores (es decir, ejemplo 1 y 2), es decir, 74 aciertos de 60 % de (P) : 30 % de (S), y 77 aciertos de 75 % de (P) : 15 % de (S). Las muestras se elaboraron en triplicado, un lote frío para análisis de DLS y dos lotes calientes para el estudio farmacológico. Tanto las muestras frías como calientes se elaboraron siguiendo la misma elaboración de muestras previamente indicada. No obstante, para elaborar activos calientes, se midieron 25 µC de LPV etiquetado con ¹⁴C en etanol. Se permitió la evaporación del solvente y se agregó la solución madre de LPV frío al sólido restante, es decir, 286 mg en 28.6 ml de cloroformo ((2x74)+(2x77) en 286 x 100 µl de cloroformo). Luego se estudiaron los lotes fríos mediante DLS para determinar tanto el potencial zeta como el promedio z.

Ejemplo 4: elaboración de nanoformulaciones de carga superior (7 polímeros hidrofílicos, 7 tensioactivos)

Se elaboraron muestras con una carga superior de lopinavir utilizando los tensioactivos y polímeros hidrofílicos que se indican posteriormente en la tabla 4A.

Tabla 4A: tensioactivos y polímeros hidrofílicos utilizados

Polímero hidrofílico	Tensioactivo
PEG 1k	Desoxicolato de Na
F68	Vit E-peg-succinato
F127	AOT
Kollicoat	Solutol HS
PVA	Tween 20
PVP k30	Tween 80
HPMC	Hiamina

Los tensioactivos y polímeros hidrofílicos se seleccionaron en función de los aciertos de las evaluaciones previas, con particular énfasis en los excipientes aprobados que figuran en la lista actual de CDER de la FDA. Los 7 polímeros hidrofílicos y los 7 tensioactivos hidrofílicos también se seleccionaron en función de su capacidad de brindar formulaciones exitosas de lopinavir.

5 Se elaboraron muestras utilizando una solución madre de 70 mgml⁻¹ de lopinavir (A) en cloroformo, 22.5 mgml⁻¹ de polímero (P) y una solución madre de 22.5 mgml⁻¹ de tensioactivo (S). Se agregaron soluciones madre en las siguientes proporciones: 100 µl de (A), 90 µl de (P), 45 µl de (S) y 265 µl de agua, por lo cual la relación de masa sólida fue la siguiente: 70 % d (A), 20 % de (P) y 10 % de (S) en una mezcla 1:4 de aceite a agua (O/W). Las mezclas se emulsionaron utilizando un Covaris S2x durante 30 segundos con un ciclo de trabajo de 20, intensidad de 10 y 500 ciclos/ráfaga en modo de barrido de frecuencia. Posteriormente, se sometieron inmediatamente las muestras a congelamiento criogénico. Se elaboró una matriz de 49 muestras (con 7 polímeros diferentes y 7 tensioactivos). Luego de la elaboración de las 49 muestras, estas se sometieron a liofilización (Virtis benchtop K) durante 42 horas para lograr un producto poroso seco, tras lo cual se cerraron las muestras en matraces individuales hasta el análisis.

Análisis de carga elevada (70 % de activo)

Las muestras se dispersaron inmediatamente antes del análisis mediante adición de 3.5 ml de agua. El análisis se realizó en su totalidad de la misma forma descrita anteriormente en el ejemplo 1.

20 La figura 1 muestra una gráfica de barras 3D que representa los aciertos claros en color gris, los cuasifallos en color blanco con puntos, los fallos más claros en transparente y los fallos absolutos sin barras. El tamaño de partícula promedio z de cada uno de los aciertos, cuasifallos y fallos más claros se indican en el eje vertical.

Ejemplo 5: variación de formulación de carga elevada (70 % de activo)

Se investigó adicionalmente el espacio de formulación alrededor de los «aciertos» (es decir, barras de color gris) de la evaluación de carga elevada del ejemplo 4. En este caso, se varió la proporción de tensioactivo a polímero en los cuatro niveles ilustrados en la tabla 5A posterior.

30 **Tabla 5A: tabla que ilustra la variación en la proporción de polímero/tensioactivo**

Polímero (%)	Tensioactivo (%)	Volumen de solución de polímero (µl)	Volumen de solución de tensioactivo (µl)
25	5	112.5	22.5
20	10	90	45
15	15	67.5	67.5
10	20	45	90

35 Se elaboraron muestras utilizando una solución madre de 70 mgml⁻¹ de lopinavir (A) en cloroformo, 22.5 mgml⁻¹ de polímero (P) y una solución madre de 22.5 mgml⁻¹ de tensioactivo (S). Se agregaron soluciones madre en las siguientes proporciones: 100 µl de (A), 265 µl de agua, con los volúmenes de soluciones de tensioactivo y polímero ilustrados en la tabla precedente. Todas las demás preparaciones fueron iguales a lo descrito en el ejemplo 4. Las muestras luego se analizaron de la misma forma que en el ejemplo 4 y los aciertos se brindan nuevamente en color gris en la figura 2.

40 La figura 2 muestra una evaluación de los 7 aciertos del ejemplo 4, utilizando proporciones variables de polímero/tensioactivo.

La tabla 5B posterior brinda más detalles sobre la evaluación, con un acierto para cada una de las otras combinaciones a una carga de tensioactivo al 5 % (dado que, en cuanto a la toxicidad, se desean cantidades inferiores de tensioactivo).

45 **Tabla 5B: detalles de los 7 aciertos de los experimentos de evaluación del ejemplo 5**

	% de tensioactivo	prom. z original	prom. z repetición	prom. z prom.	% de SD con respecto a AV	Nueva realización
PVA / Vit E	5 %	608.7	570.4	589.6	4.6	10 % de S
PVA / T-20	5 %	621.6	579.0	600.3	5.0	10 % de S
PVA / T-80	10 %	523.3	602.6	562.9	10.0	15 % de S
HPMC / T-80	20 %	739.9	N	-	-	-

	% de tensioactivo	prom. z original	prom. z repetición	prom. z prom.	% de SD con respecto a AV	Nueva realización
PVA/NDC	5 %	617.5	672.5	645.0	6.0	10 % de S
HPMC / NDC	10 %	891.6	1135.0	1013.3	17.0	-
HPMC / Solutol HS	10 %	485.1	N	-	-	-
[N = muestra sin dispersión, no se obtuvieron datos del tamaño]						

Tal como puede observarse en la tabla 5B, dos de las muestras de repetición, a saber, HPMC / T-80, HPMC / NDC y HPMC/Solutol HS, no lograron cumplir completamente con los criterios de evaluación antedichos y, por lo tanto, solamente se utilizaron 4 de las repeticiones exitosas para experimentación adicional.

5

La figura 3 muestra (a) el tamaño de partícula z (nm) de las muestras original y repetida de cada una de las 4 muestras repetidas exitosas y (b) el potencial promedio zeta (mV) de cada una de las 4 muestras repetidas exitosas.

10

La tabla 5C muestra datos analíticos de las 4 muestras de repetición exitosas, de forma específica, el bajo % de tensioactivo presente (5 % en todos los casos), el tamaño de partícula promedio z de la muestra original, el tamaño de partícula promedio z de la muestra de repetición, el tamaño de partícula promedio z promedio de original y repetición, el % de desvío estándar (SD, por su sigla en inglés) con respecto al promedio, el % de tensioactivo en una muestra adicional de nueva realización con un % elevado de tensioactivo (10 % en todos los casos) y el tamaño de partícula promedio z de las 10 muestras adicionales con contenido elevado de tensioactivo.

15

Tabla 5C: datos analíticos de las 4 muestras de repetición exitosas

	Bajo % de tensioactivo	prom. z original	prom. z repetición	prom. z prom.	% de SD con respecto a AV	% elevado de tensioactivo	prom. Z
PVA / Vit E	5 %	608.7	570.4	589.6	4.6	10 % de S	585.1333
PVA / T-20	5 %	621.6	579.0	600.3	5.0	10 % de S	967.6
PVA / T-80	10 %	523.3	602.6	562.9	10.0	15 % de S	591
PVA/NDC	5 %	617.5	672.5	645.0	6.0	10 % de S	667.5667

20

La figura 4 muestra (a) el tamaño de partícula z (nm) de las muestras con tensioactivo bajo (5 %) y tensioactivo elevado (10 %) que se indica en la tabla 5C y (b) el potencial promedio zeta (mV) de las muestras con tensioactivo bajo (5 %) y tensioactivo elevado (10 %) indicadas en la tabla 5C.

Ejemplo 6: nanoformulaciones de carga elevada para análisis biológicos

25

A partir de los datos previos del ejemplo 5, se seleccionaron 3 combinaciones particulares de polímero/tensioactivo para estudio adicional. Las tres muestras se seleccionaron en función de su demostración de buena capacidad de reproducción entre muestras (es decir, desvíos estándar por debajo del 10 %). Se elaboraron muestras radiomarcadas adicionales para las combinaciones de particular interés, a saber PVA / Vit-E, PVA / T-80 y PVA / NDC.

30

Las muestras de lopinavir radiomarcadas se elaboraron según el ejemplo 3. No obstante, también se dosificó la solución de cloroformo que contenía el lopinavir con el activo radiomarcado para brindar una concentración rastreadora de radioactividad en las muestras de efavirenz. Luego, se utilizaron las muestras para todos los estudios de acumulación celular y permeabilidad transcelular.

35

La tabla 6A muestra los datos de tamaño de partícula promedio z (nm) y potencial zeta (mV), en relación con las muestras no radiomarcadas originales con concentraciones baja (5 %) y elevada (10 %) de tensioactivo, así como muestras radiomarcadas con concentraciones baja (5 %) y elevada (10 %) de tensioactivo.

40

Tabla 6A: datos analíticos de muestras no radiomarcadas (originales) y radiomarcadas

LPV	Muestras originales				Muestras radiomarcadas			
	5 % de tensioactivo		10 % de tensioactivo		5 % de tensioactivo		10 % de tensioactivo	
	prom. Z	zeta	prom. Z	zeta	prom. Z	zeta	prom. Z	zeta
PVA / Vit-E	589.6	-16.0	585.1333	-12.6	597.7667	-11.6	548.0667	-11
PVA / T-20	600.3	-20.5	967.6	-17.3	599.4667	-19.3	999.6667	-21.8
PVA/NDC	645.0	-13.6	667.5667	-12.3	682.0667	-14.8	733.8333	-13.5

Luego se analizaron nanodispersiones de las muestras frías (es decir, no radiomarcadas) en el tiempo con respecto a su tamaño de partícula promedio z, la polidispersión por tamaño de partícula (es decir, diversidad de tamaños de partícula) y el potencial zeta.

La figura 5A muestra mediciones en el tiempo realizadas con respecto a las nanodispersiones de las muestras frías de PVA/Vit-E (para muestras de tensioactivo al 5 % y al 10 %) en relación (a) a su tamaño de partícula promedio z (nm), (b) a la polidispersión del tamaño de partícula, y (c) al potencial promedio zeta (mV), cada uno para muestras de PVA/Vit-E con contenido de tensioactivo del 5 % (izquierda) y 10 % (derecha).

La figura 5B muestra mediciones en el tiempo realizadas con respecto a las nanodispersiones de las muestras frías de PVA/T-20 (para muestras de tensioactivo al 5 % y al 10 %) en relación (a) a su tamaño de partícula promedio z (nm), (b) a la polidispersión del tamaño de partícula, y (c) al potencial promedio zeta (mV), cada uno para muestras de PVA/T-20 con contenido de tensioactivo del 5 % (izquierda) y 10 % (derecha).

La figura 5C muestra mediciones en el tiempo realizadas con respecto a las nanodispersiones de las muestras frías de PVA/NDC (para muestras de tensioactivo al 5 % y al 10 %) en relación (a) a su tamaño de partícula promedio z (nm), (b) a la polidispersión del tamaño de partícula, y (c) al potencial promedio zeta (mV), cada uno para muestras de PVA/NDC con contenido de tensioactivo del 5 % (izquierda) y 10 % (derecha).

Las figuras 5A a 5C demuestran la estabilidad de las nanodispersiones de lopinavir de la presente invención durante períodos de tiempo prolongados.

Ejemplo 7: citotoxicidad de nanodispersiones de lopinavir en líneas celulares de monocitos, macrófagos, linfocitos, intestinales y hepáticas

Mantenimiento celular/cultivo celular de rutina

Se adquirieron células HepG2 (hepáticas) y Caco-2 (intestinales) a través del Cultivo Americano de Tejidos Tipo (ATCC, por su sigla en inglés, EUA) y se conservaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por su sigla en inglés; Sigma; Dorest, Reino Unido) complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS; Bio-Whittaker, Berkshire, Reino Unido) para HepG2 y FBS al 15 % para Caco-2. Se adquirieron células CEM (linfocitos) y THP-1 (monocitos) a través de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC; Porton Down, Reino Unido) y se cultivaron en RPMI-1640 (Sigma; Dorest, Reino Unido) complementado con FBS al 10 %. Se incubaron todas las líneas celulares a 37 °C y CO₂ al 5 % y las células adherentes (HepG2 y Caco-2) se subcultivaron de la forma habitual cada 4 días al lograr una confluencia del 95 %. Las células de la suspensión (CEM y THP-1) se subcultivaron de la forma habitual al lograr una densidad de 1 x 10⁶ células/ml. La viabilidad y el conteo celular se determinaron mediante el ensayo de exclusión con azul de tripan.

Macrófagos derivados de monocitos (MDM, por su sigla en inglés)

Se activaron células THP-1 en células tipo macrófagos (A-THP-1) mediante adición de acetato de Phorbol 12-miristato 13 (PMA, por su sigla en inglés: Sigma; Dorest, Reino Unido) hasta una concentración final de 10 nM en medio de cultivo de THP-1 (RPMI-1640 complementado con FBS al 10 %). Las células luego se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 7 días antes del uso, para permitir la diferenciación de monocitos a células tipo macrófagos.

Las células HepG2, Caco-2, THP-1, CEM y A-THP-1 se sembraron por separado a una densidad de 2.5 x 10⁴ / 100 µl en sus medios adecuados en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc™, Dinamarca) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %. Luego se aspiró el medio y se reemplazó con medio que contenía 0.1, 1, 10, 100, 500 o 1000 µM de cada dispersión de lopinavir, calculado en función de la molaridad de lopinavir (145 muestras), y se incubó durante otras 24 horas. Se siguió el mismo procedimiento para cada excipiente individual (23 muestras) con un intervalo de concentración de 1 µM a 1 M. En la tabla 7 a continuación se presentan las dispersiones de lopinavir en cuestión.

Tabla 7: seis formulaciones de lopinavir en nanodispersión

Denominación	Formulación
Nanodispersión 1	PVA al 25 %/Vit-E-PEG-succinato al 5 %
Nanodispersión 2	PVA al 25 %/Tween 80 al 5 %
Nanodispersión 3	PVA al 25 %/desoxilato de sodio al 5 %
Nanodispersión 4	PVA al 20 %/Vit-E-PEG-succinato al 10 %
Nanodispersión 5	PVA al 20 %/Tween 80 al 10 %
Nanodispersión 6	PVA al 20 %/desoxilato de sodio al 10 %

Ensayo de viabilidad celular ATP (Promega: CellTiter-Glo® luminiscente)

5 Antes de comenzar los análisis de viabilidad, se realizaron los reactivos en versiones nuevas según las instrucciones de los fabricantes y se dejaron equilibrar hasta temperatura ambiente inmediatamente antes del uso. Tras 24 horas de incubación, se retiraron las placas de 96 pocillos de la incubadora y se permitió el equilibrio de la placa y su contenido hasta temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Tras 30 minutos, se aspiraron 80 µl de medio de cada pocillo individual y se agregaron 20 µl de reactivo CellTiter-Glo® (Promega, Reino Unido) al medio restante y las células. Luego, se mezcló el contenido durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular. Posteriormente, se incubó la placa de forma adicional a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal luminiscente. Luego se midió la luminiscencia con un lector de placas Tecan Genios (Tecan, Austria).

15 La figura 6 brinda datos en relación con la citotoxicidad de las diversas formulaciones de lopinavir con 10 % de carga de fármaco en cuanto a la IC₅₀ (µM). La tabla 8 brinda datos en relación con la citotoxicidad de las diversas formulaciones de lopinavir con 70 % de carga de fármaco en cuanto a la IC₅₀ (µM).

Tabla 8: citotoxicidad de nanodispersiones con 70 % de carga de lopinavir y lopinavir acuoso en diversas líneas celulares. Los datos se proporcionan como IC₅₀ en µM

Denominación	Línea celular				
	HepG2	Caco-2	THP-1	A-THP-1	CEM
Nanodispersión 1	124.7	209.1	104.4	219.0	458.1
Nanodispersión 2	185.3	252.6	77.2	173.5	239.9
Nanodispersión 3	114.1	168.4	114.3	207.0	154.2
Nanodispersión 4	90.7	186.2	81.9	189.1	457.4
Nanodispersión 5	142.6	205.5	45.1	123.0	197.6
Nanodispersión 6	75.3	145.5	86.7	158.4	128.4
Solución acuosa	35.8	52.5	28.3	84.3	100.4

20 En resumen, la gran mayoría de las nanodispersiones con 10 % de carga fue menos citotóxica que las concentraciones equivalentes de lopinavir acuoso. En las nanodispersiones con 70 % de carga de lopinavir, todas fueron menos citotóxicas que lopinavir acuoso en los sistemas celulares estudiados.

25 Ejemplo 8: inhibición de proteasa en VIH-1 recombinante mediante lopinavir acuoso y en nanodispersión

30 Se realizó una evaluación de la inhibición de proteasa en VIH-1 según las instrucciones de los fabricantes (Roche Diagnostics GmbH; Alemania). En resumen, para cada formulación de lopinavir en nanodispersión individual, se agregaron 20 µl de solución madre 1 nM stock a cada pocillo de la fila B de una placa de 96 pocillos ((Nuncclon™, Dinamarca). Luego se formaron previamente diluciones dobles utilizando H₂O desionizada, para brindar un intervalo de concentraciones de 1 nM a 0.0078 nM para cada muestra. Posteriormente, se agregaron a cada pocillo 20 µl de 0.2 ng/µl de proteasa de HIV-1 diluidos en amortiguador de lisis. Se agregaron a cada pocillo 20 µl de mezcla de reacción (con: Tris-HCl 46 mM, cloruro de potasio 266 mM, cloruro de magnesio 27.5 mM, DTT 9.2 mM, dUTP/dTTP 10 µM, plantilla/híbrido cebador, 750 mA_{260nm}/ml) con la muestra de lopinavir y se incubó la placa durante 60 minutos a 37 °C. Posteriormente, se transfirió toda la muestra (60 µl) a módulos de microplacas y se incubó durante otros 60 minutos a 37 °C, tras lo cual se aspiraron las muestras y se lavaron x5 con 250 µl de amortiguador de lavado. Tras la aspiración final, se agregaron 200 µl a todos los pocillos de anticuerpo policlonal anti-digoxigenina-peroxidasa (anti-DIG-POD) (concentración final de 200 mU/ml) y se devolvió la placa a la incubadora durante otros 60 minutos a 37 °C. Las muestras se aspiraron y lavaron x5 con amortiguador de lavado. Por último, tras la aspiración del amortiguador de lavado final, se agregaron a cada

pocillo 200 µl de sustrato ABTS y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se midió la absorbancia a 405 nm utilizando un lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG Labtech, Reino Unido).

- 5 El procedimiento anterior permitió determinar la actividad de las nanodispersiones con 10 % de carga de lopinavir de fármaco (remitirse a la figura 7) y 70 % de carga de fármaco (remitirse a la tabla 9), con respecto a la proteína objetivo, proteasa.

10 **Tabla 9: actividad de nanodispersiones con 70 % de carga de lopinavir con respecto a la proteasa recombinante del VIH. Los datos se proporcionan como IC₅₀ en nM**

Denominación	IC ₅₀ (nM)
Nanodispersión 1	28
Nanodispersión 2	34
Nanodispersión 3	60
Nanodispersión 4	20
Nanodispersión 5	29
Nanodispersión 6	47
Solución acuosa	32

- 15 En resumen, la mayoría de las nanodispersiones con 10 % de carga presentaron una actividad equivalente al lopinavir acuoso con respecto a la inhibición de la proteasa recombinante del VIH. En el caso de las nanodispersiones con 70 % de carga de lopinavir, todas lograron inhibir la proteasa recombinante dentro del intervalo de nM. 3 de las 6 nanodispersiones con 70 % de carga presentaron una actividad superior o equivalente contra la proteasa recombinante del VIH. Los datos deberían interpretarse en virtud de este ensayo como libre de células.

Ejemplo 9: inhibición de VIH IIB cultivado mediante lopinavir acuoso y en nanodispersión en células MT4

20 Propagación/cultivo celular de rutina de MT4/VIH III_B

- 25 El VIH III_B y la línea de linfocitos T humanos, MT4, fueron suministrados por el Instituto Nacional de Estándares y Control Biológico (NIBSC, por su sigla en inglés) a través del Centro de reactivos de SIDA (CFAR, por su sigla en inglés, Hertfordshire, Reino Unido). Las células MT4 se cultivaron y conservaron de la forma habitual en RPMI-1640 (Sigma; Dorest, Reino Unido) complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS; Bio-Whittaker, Berkshire, Reino Unido) a 37 °C y CO₂ al 5 % y se subcultivaron cada 3 días. Los conteos celulares y la viabilidad se determinaron mediante exclusión con azul de tripán con un hemocitómetro plástico desechable (Labtech International Ltd., Reino Unido). El VIH III_B se propagó mediante pasaje a través de células MT4 en RPMI-1640 y FBS al 10 % durante 12 días y se determinó una multiplicidad de infección (MOI, por su sigla en inglés) posterior a través de un ensayo MTT.

30 Tratamiento de VIH III_B con LOPINAVIR en nanodispersión

- 35 Las células MT4 se repartieron en tubos falcon de 50 ml y se centrifugaron a 2000 rpm y 4 °C durante 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se volvieron a suspender los gránulos resultantes hasta una densidad celular de 1×10^5 / ml en RPMI 1640 complementado con FBS al 10 % y 1 ml de aislado viral (M.O.I 0.001). Tras 5 minutos de centrifugado adicional a 2000 rpm, se incubaron los gránulos de MT4/VIH III_B A 37 °C y CO₂ al 5 % durante 2 horas. Tras la incubación, se volvió a centrifugar la suspensión de MT4/VIH III_B a 2000 rpm y 4 °C durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante y se volvieron a suspender los gránulos en RPMI 1640 complementado con FBS al 10 % hasta una densidad celular de 1×10^5 / ml.

- 40 Luego se agregaron 100 µl de suspensión de MT4/VIH III_B a cada pocillo de una placa de fondo plano, de 96 pocillos (Nunc™, Dinamarca), con cada una de las formulaciones individuales de Lopinavir en nanodispersión (LOPINAVIR), para brindar un intervalo de concentraciones finales de 1 nM a 0.0078 nM. Luego se incubó la placa durante 5 días a 37 °C y CO₂ al 5 %.

45 Ensayo colorimétrico basado en tetrazolio (MTT) con células MT4 para detección de compuestos anti-VIH

Tras la incubación de MT4/VIH III_B durante 5 días con LOPINAVIR en nanoformulación a 37 °C y CO₂ al 5 %, se agregaron 20 µl de tiazolil azul de tetrazolio 5 mg (Sigma, Reino Unido) por ml de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS, por su sigla en inglés, Sigma, Reino Unido) a cada pocillo y se incubaron adicionalmente 2 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %. 100 µl de amortiguador de lisis con 50 % v/v de dimetilformamida (Sigma, Reino Unido) y

20 % v/v de dodecilsulfato sódico (Sigma, Reino Unido) y se realizó nuevamente incubación durante 24 horas. La absorbancia se leyó a 570 nm en un lector de placas (Tecan Magellan, Austria).

5 Los procedimientos anteriores permitieron determinar la actividad de las nanodispersiones de lopinavir con 10 % de carga de fármaco (figura 8) y 70 % de carga de fármaco (tabla 10) con respecto al virus de VIH cultivado.

Tabla 10: actividad de nanodispersiones con 70 % de carga de lopinavir con respecto a la proteasa recombinante del VIH. Se proporcionan datos como

Denominación	IC ₅₀ (nM)
Nanodispersión 1	16
Nanodispersión 2	27
Nanodispersión 3	46
Nanodispersión 4	12
Nanodispersión 5	22
Nanodispersión 6	29
Solución acuosa	56

10 En resumen, la mayoría de las nanodispersiones con 10 % de carga presentaron una actividad equivalente superior al lopinavir acuoso con respecto a la inhibición del VIH III_B. En el caso de las nanodispersiones de lopinavir con 70 % de carga, todas lograron inhibir la proteasa recombinante dentro del intervalo de nM y todas presentaron una actividad superior o equivalente con respecto al VIH III_B. Los datos deberían interpretarse considerando este ensayo como basado en células (remitirse al ejemplo 13 para más información sobre el
15 impacto de la nanoformulación en la acumulación celular).

Ejemplo 10: acumulación celular de lopinavir en nanodispersión en comparación con sus compuestos acuosos originales

20 Acumulación celular de LOPINAVIR en nanodispersión en comparación con sus compuestos acuosos originales en líneas celulares adherentes; Caco-2, HepG2 y ATHP-1

Se cuantificó la acumulación celular de LOPINAVIR en nanodispersión en las líneas celulares adherentes Caco-2, HepG2 y ATHP-1, tal como se indica a continuación. Se propagó Caco-2/HepG2 hasta una densidad celular de $\sim 5 \times 10^6$ células por pocillo, en una placa de 6 pocillos (37 °C y CO₂ al 5 %). Las células se lavaron x2 con HBSS previamente calentado (37 °C). Se incubaron las células 1 h en presencia de 1 ml de HBSS con LOPINAVIR 10 µM con 0.1 µCi de fármaco marcado con H³/ C¹⁴/ H³, respectivamente. Tras 1 h, se tomó una muestra extracelular de sobrenadante (100 µl) y se agregó a un matraz de centelleo de 5 ml (Meridian Biotechnologies Ltd; Reino Unido). Se aspiró el sobrenadante con fármaco del pocillo y se lavaron las células x2 en HBSS helado. Se aspiró el HBSS helado y se agregaron 500 µl de agua corriente para lisar las células. Las placas con restos de células (6 pocillos) se almacenaron durante la noche a -20 °C, para ayudar a la lisis. Luego se utilizaron los 500 µl de agua corriente para retirar los restos de células con una pipeta de la base del pocillo y agregarlos a un matraz de centelleo de 5 ml (Meridian Biotechnologies Ltd; Reino Unido). A cada matraz de 5 ml, se le agregaron 4 ml de fluido de centelleo Ultima Gold y se cuantificó el nivel de centelleo utilizando un contador de centelleo Perkin Elmer 3100TS. Se analizó cada nanodispersión en duplicado y se tomaron mediciones de centelleo en triplicado.

35 Este método de cultivo se alteró para la línea celular ATHP-1, dado que, si bien el procedimiento experimental para acumulación no se encuentra alterado, la diferenciación de monocito a células MDM (ATHP-1) debe producirse antes del uso del protocolo. En resumen, se sembraron células THP-1 con acetato de forbol-12-miristato 13 (PMA, por su sigla en inglés; Sigma, Dorset, Reino Unido), hasta una concentración final de 10 nM en medio (RPMI-1640 complementado con FBS al 10 %), a una densidad de aproximadamente 4×10^6 células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Las células luego se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 7 días antes del uso, para permitir la diferenciación con respecto a células tipo macrófagos. La acumulación celular de fármaco en nanodispersión se cuantificó tal como se describió anteriormente para las líneas celulares Caco-2 y HepG2.

45 Acumulación celular de lopinavir en nanodispersión en comparación con sus compuestos acuosos originales en células no adherentes; THP-1 y CEM

Se determinó la acumulación celular para cada nanodispersión en las líneas celulares THP-1 y CEM de la forma que se indica a continuación. En resumen, se cosecharon las células a una densidad de 5×10^6 células por pocillo. Cada pocillo se lavó x2 con HBSS previamente calentado (37 °C). En cada pocillo había 600 µl de HBSS

con lopinavir 10 μM , cada uno con 0.1 μCi de fármaco marcado con $^3\text{H}/^{14}\text{C}/^3\text{H}$, respectivamente. Tras 1 h de incubación, se granularon las células mediante centrifugado (2 K rpm, 5 min). Tras 1 h, se tomó una muestra extracelular de sobrenadante (100 μl) y se agregó a un matraz de centelleo de 5 ml (Meridian Biotechnologies Ltd; Reino Unido). Se aspiró el sobrenadante con fármaco del pocillo y se lavaron las células x2 en HBSS helado. Se aspiró el HBSS helado y se agregaron 100 μl de agua corriente para lisar las células. Los 100 μl de lisado celular luego se transfirieron a un matraz de centelleo de 5 ml (Meridian Biotechnologies Ltd; Reino Unido) y a cada uno se le agregaron 4 ml de fluido de centelleo Ultima Gold y se cuantificó el nivel de centelleo con un contador de centelleo Perkin Elmer 3100TS. Se analizó cada nanodispersión en duplicado y se tomaron mediciones de centelleo en triplicado.

La figura 9 muestra la proporción de acumulación celular (fármaco asociado con célula dividido entre el fármaco extracelular) de todas las nanodispersiones de lopinavir con 10 % de carga en las líneas celulares del estudio. La figura 10 muestra la proporción de acumulación celular (fármaco asociado con célula dividido entre el fármaco extracelular) de las nanodispersiones de lopinavir con 70 % de carga en las líneas celulares del estudio, con respecto a las seis formulaciones de lopinavir en nanodispersión (indicadas en la tabla 7 anterior) y la muestra de fármaco acuoso original (es decir, no en nanodispersión) descrita en este ejemplo.

En resumen, se sintetizaron y caracterizaron las nanodispersiones con 10 % de carga que presentan una mayor penetración celular en todos los tipos de células estudiados. Asimismo, se identificaron las nanodispersiones con 70 % de carga con penetración favorable en estos tipos de células (en particular, células inmunitarias).

Ejemplo 11: permeabilidad transcelular de nanodispersiones de lopinavir en monocapas de células Caco-2

En los estudios de permeabilidad transcelular para la identificación de candidatos de nanodispersión con carga de fármaco del 10 % y el 70 %, con realización de modelos de captación en circulación sistémica, se propagaron células Caco-2 en una monocapa durante un período de 21 días, lo cual brindó valores de resistencia eléctrica transepitelial (TER, por su sigla en inglés) de $\sim 1300 \Omega$. Para la evaluación de nanopartículas con 10 % de carga, se agregaron 10 μM de fármaco original o en nanoformulación (con 0.1 μCi de fármaco radiomarcado) a la cámara apical y se tomaron muestras a 1 y 2 h desde la cámara basolateral. Cada fármaco en nanodispersión se analizó en duplicado. Para la evaluación de nanodispersiones con 70 % de carga, se agregaron 10 μM de fármaco original o en nanodispersión (con 0.1 μCi de fármaco radiomarcado) a la cámara apical de 4 pocillos y la cámara basolateral de 4 pocillos, para cuantificar el transporte tanto en el sentido apical a basolateral como el basolateral a lateral y se tomaron muestras cada hora durante un período de 4 h. El coeficiente de permeabilidad aparente se determinó a través de la cantidad de compuesto transportado, mediante la siguiente ecuación: $P_{ap} = (dQ/dt) (1/(AC_0))$. En ella, (dQ/dt) es la cantidad por tiempo ($\text{nmol} \cdot \text{seg}^{-1}$), A es el área de superficie del filtro y C_0 es la concentración inicial de la cámara de donante (10 μM).

La figura 11 muestra la permeabilidad transcelular apical (compartimiento intestinal) a basolateral (compartimiento sanguíneo) de nanodispersiones de lopinavir con 10 % de carga en las líneas celulares del estudio. La figura 12 muestra la permeabilidad apical a basolateral de nanodispersiones de lopinavir con 70 % de carga.

Ejemplo 12: farmacocinética de lopinavir en roedores que recibieron una nanodispersión en relación con una formulación convencional

Se les administró anestesia terminal a ratas Wistar macho adultas (250 a 350 g) con uretano al 14 % en solución salina al 0.9 % (1 ml/ 100 g de peso corporal i.p) y se les colocó una cánula en la tráquea y la arteria carótida. Se extrajo una muestra de sangre de 0.1 ml antes de la dosis en un matraz Eppendorf con heparina y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos, tras lo cual se retiró la capa de plasma y se almacenó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Luego se les administró a las ratas por vía oral lopinavir, lopinavir/ritonavir o una nanodispersión de lopinavir con una aguja de sonda curva de 7 cm y se extrajeron muestras de sangre de 0.1 ml a través de la cánula en la carótida en los siguientes momentos: 20', 30', 45', 60', 90', 120', 180', 240', 300'. Al final del experimento, se sacrificó a los animales utilizando un exceso de anestesia. Se agregaron 200 μl de una solución de peróxido de hidrógeno al 30 % (Sigma Aldrich, Reino Unido) a cada muestra y se dejaron durante 60 minutos. Por último, se agregaron 30 μl de ácido acético glacial y se incubó la muestra completa durante otros 15 minutos a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Se agregaron 4 ml de fluido de centelleo Ultima Gold (PerkinElmer, Reino Unido), se mezcló la muestra de forma vigorosa y se contó el dpm utilizando un contador de centelleo líquido 3100 TR (IsoTech, Reino Unido). Posteriormente, se calcularon las concentraciones de lopinavir en plasma a partir del dpm.

La figura 13 muestra la farmacocinética de lopinavir, lopinavir/ritonavir y nanodispersión de lopinavir con 70 % de carga (sin ritonavir) en ratas. Se observó una concentración demostrablemente superior de lopinavir en plasma con la nanodispersión que con el lopinavir solo o lopinavir/ritonavir.

CONCLUSIÓN

5 En la presente se muestra que las formulaciones de lopinavir de la presente invención forman nanodispersiones estables con diversas propiedades farmacológicas favorables. Se sintetizaron nanodispersiones con menor toxicidad, con inhibición más potente de la proteasa del VIH, con inhibición más potente de la replicación del VIH, con mayor grado de acumulación en células objetivo del VIH y que atraviesan las células epiteliales intestinales con mayor rapidez y completitud con respecto a las soluciones acuosas de lopinavir. Adicionalmente, se generaron nanodispersiones de lopinavir con propiedades farmacocinéticas favorables con respecto a la formulación convencionales.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición sólida de lopinavir que comprende nanopartículas de lopinavir dispersas en una mezcla sólida de al menos un polímero hidrofílico y al menos un tensioactivo; en donde el polímero hidrofílico es PVA y el tensioactivo es vitamina-E-polietilenglicol-succinato (Vit-E-PEG-succinato) y en donde la composición comprende:
- 40 a 80 % de lopinavir,
10 a 40 % en peso de PVA y
2 a 20 % en peso de vitamina -E-polietilenglicol-succinato (Vit-E-PEG-succinato).
- 10 **2.** Una composición sólida de lopinavir según la reivindicación 1, en donde la composición comprende:
- 60 a 80 % de lopinavir,
15 a 25 % en peso de PVA y
5 a 15 % en peso de vitamina -E-polietilenglicol-succinato (Vit-E-PEG-succinato).
- 15 **3.** Una composición sólida de lopinavir según la reivindicación 1 o la reivindicación 2:
- (a) en donde las nanopartículas de lopinavir tienen un tamaño de partícula promedio inferior o igual a 1 micrón (μm), opcionalmente entre 100 y 800 nm, y/o
(b) en donde la polidispersión de las nanopartículas de lopinavir es inferior o igual a 0.8.
- 20 **4.** Una composición farmacéutica en una forma de dosificación sólida que comprende una composición sólida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y, opcionalmente, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales.
- 25 **5.** Un proceso para la elaboración de una composición sólida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el proceso comprende:
- (a) elaborar una emulsión de aceite en agua que comprenda:
- una fase oleosa con lopinavir y
- una fase acuosa con PVA y un Vit-E-PEG-succinato,
- (b) retirar el agua y el aceite para formar la composición sólida.
- 30 **6.** Un proceso para la elaboración de una composición sólida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el proceso comprende:
- elaborar una solución de fase única que comprenda lopinavir, PVA y Vit-E-PEG-succinato en uno o más solventes, y
35 secar la mezcla por aspersion para retirar el o los solventes y así formar la composición sólida.
- 7.** Una composición sólida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición farmacéutica según la reivindicación 4 para uso como un medicamento.
- 40 **8.** Una composición sólida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición farmacéutica según la reivindicación 4 para uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones retrovirales (p. ej., VIH).
- 45 **9.** Una composición sólida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición farmacéutica según la reivindicación 4 para uso en el tratamiento o la prevención de una infección por retrovirus, como el VIH en donde la composición sólida o la composición farmacéutica se administran en combinación con uno o más agentes antirretrovirales adicionales.

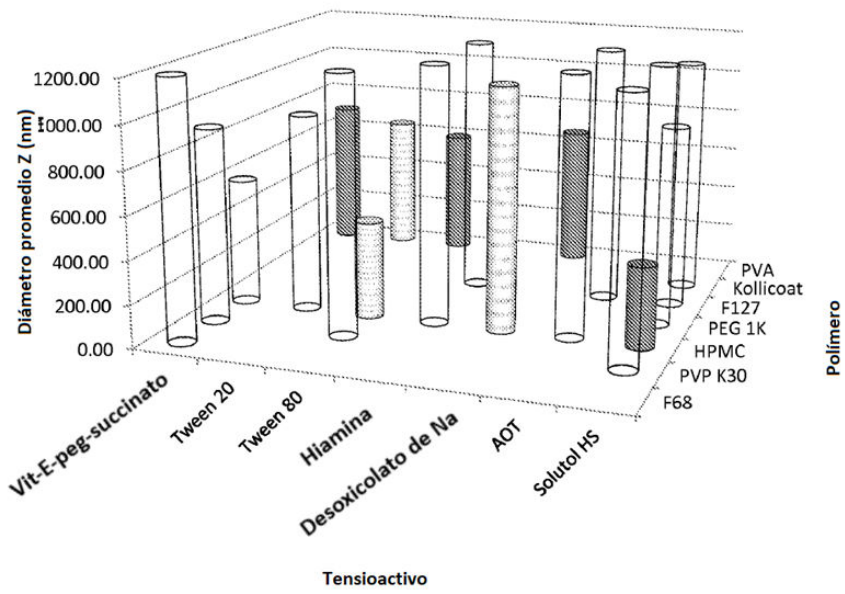


Figura 1

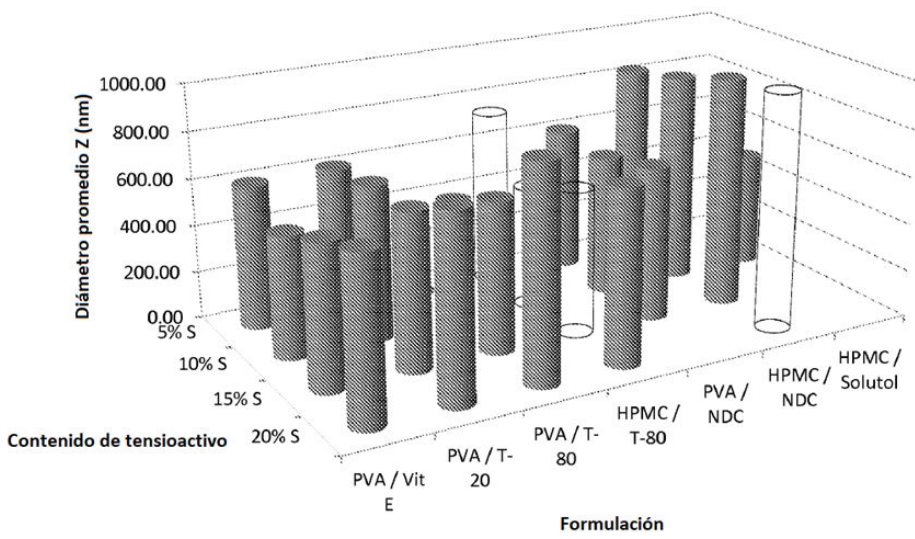


Figura 2

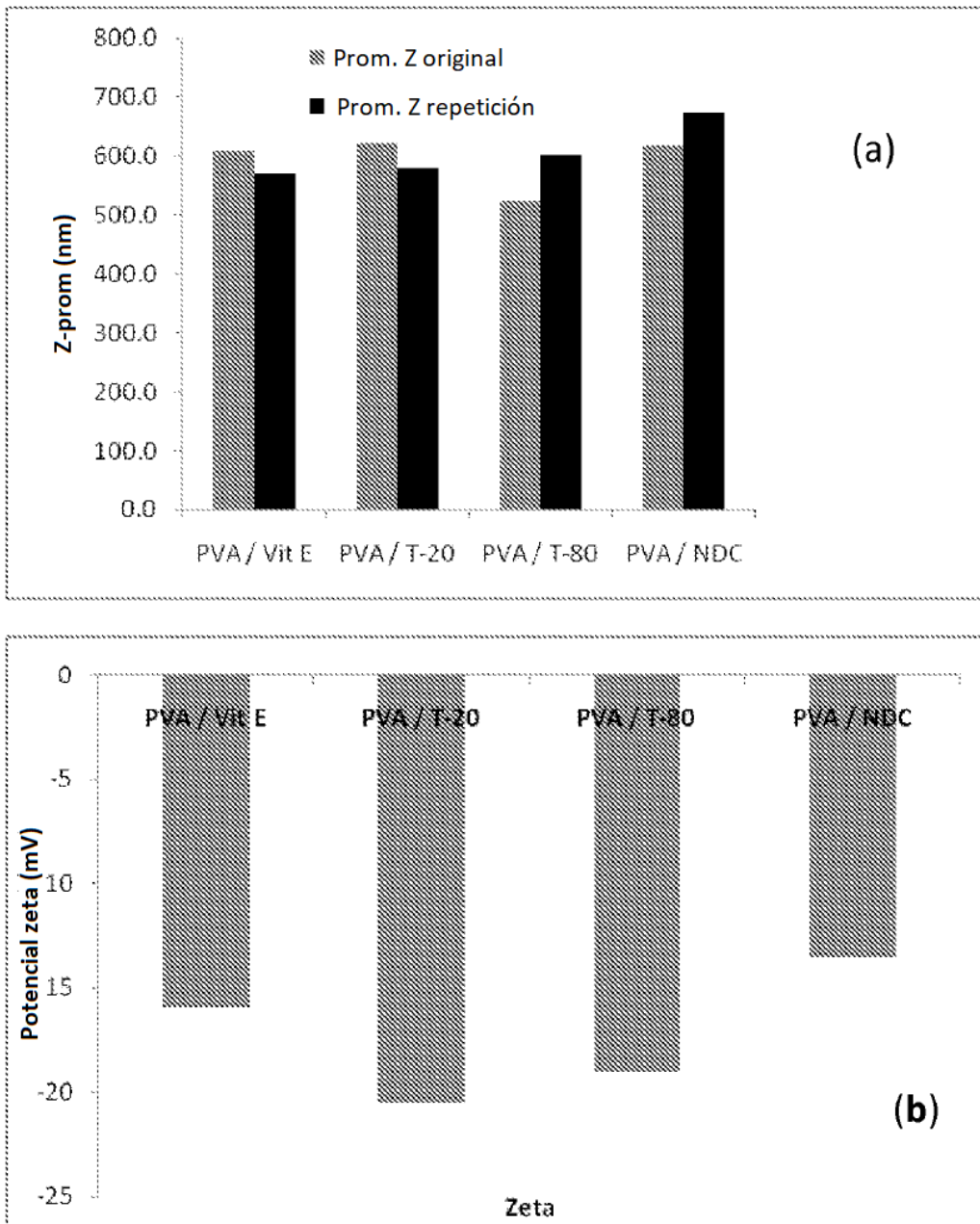


Figura 3

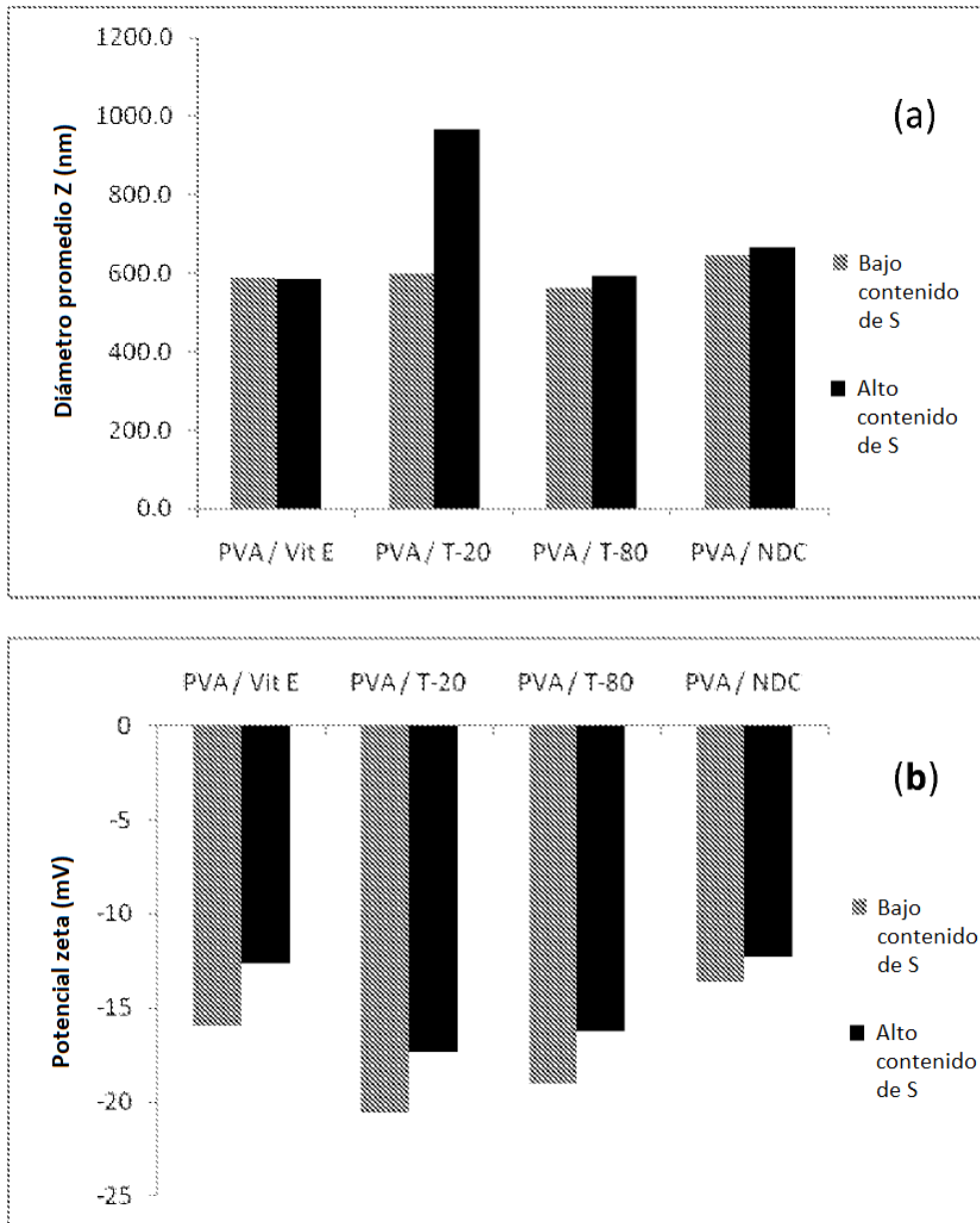


Figura 4

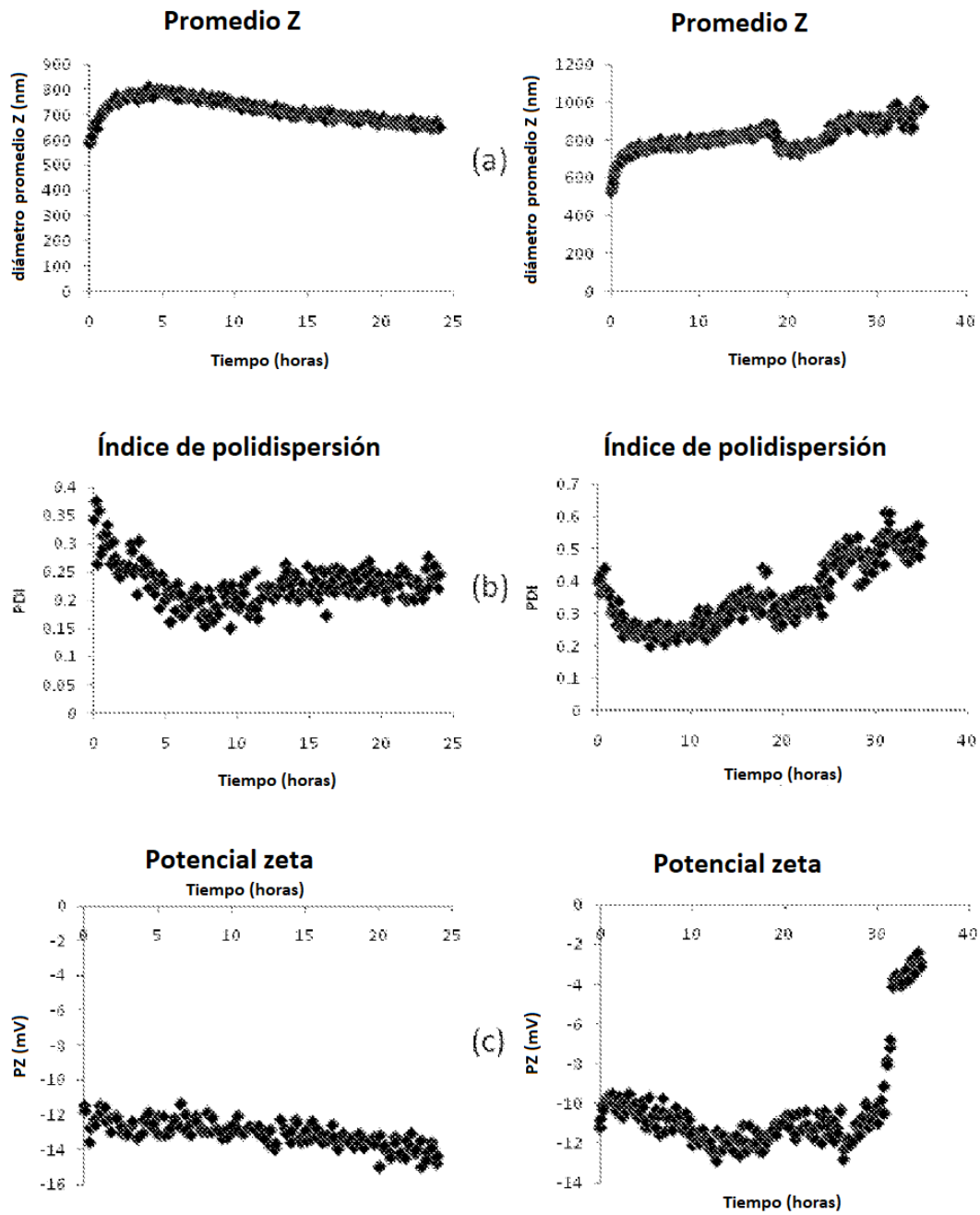


Figura 5A

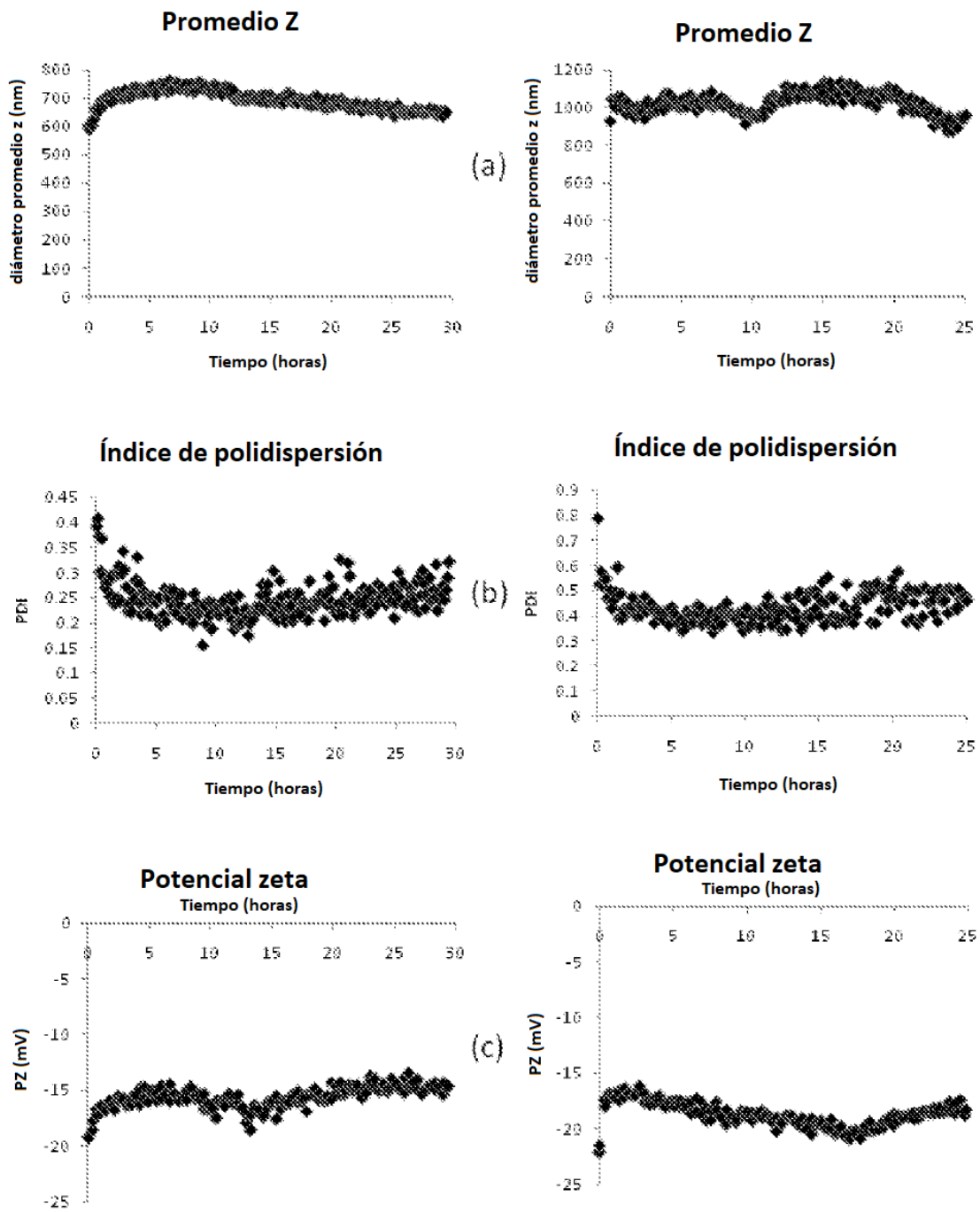


Figura 5B

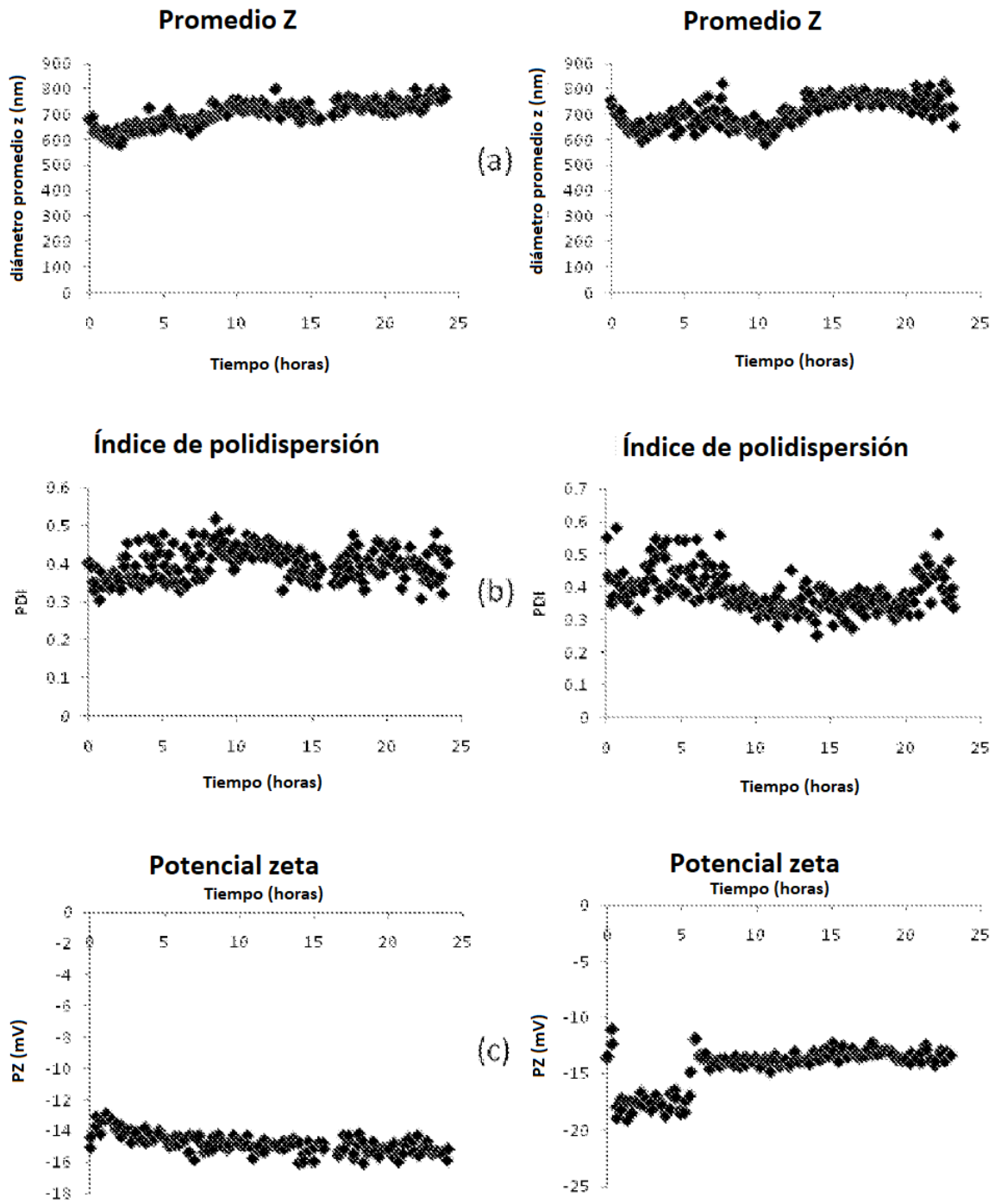


Figura 5C

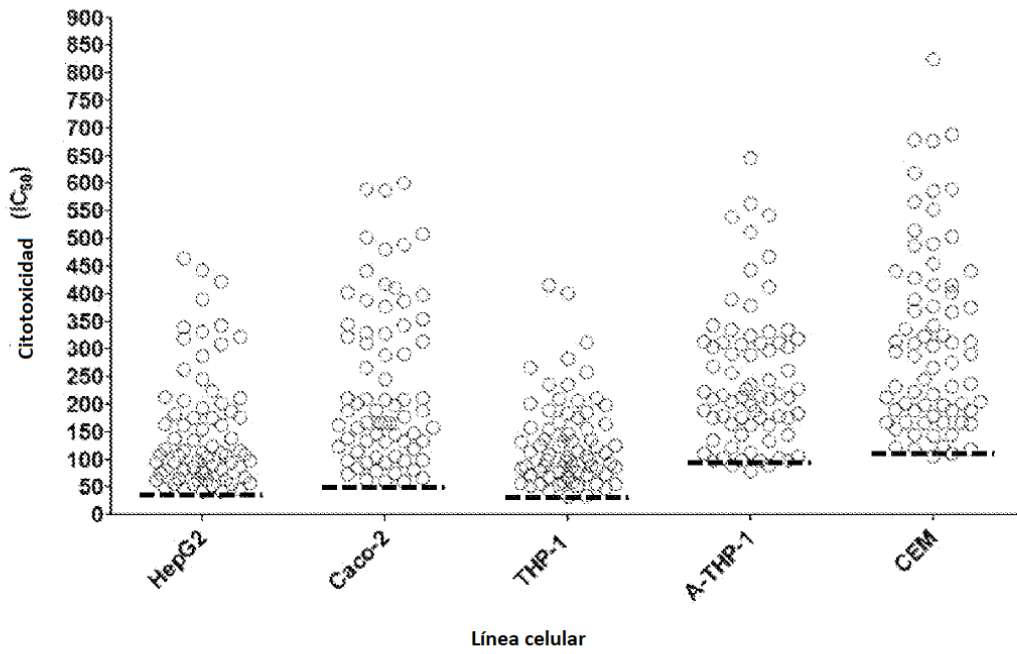


Figura 6

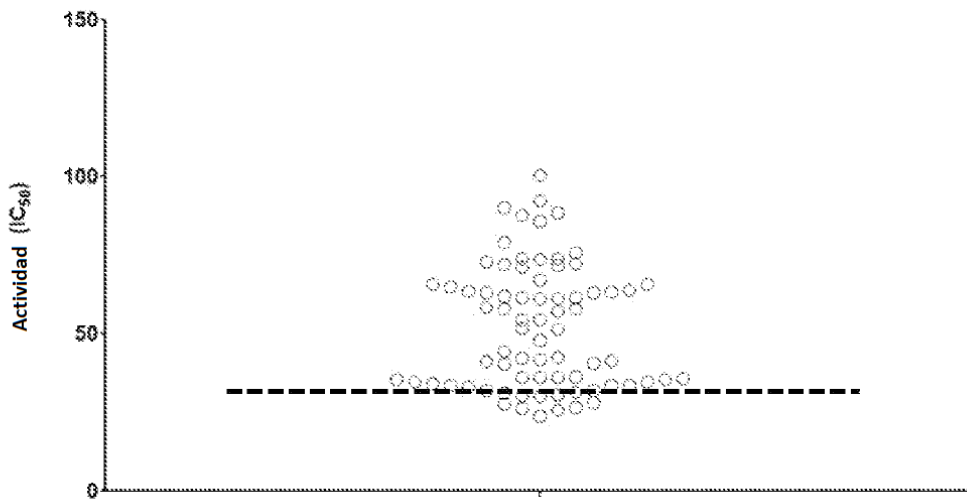


Figura 7

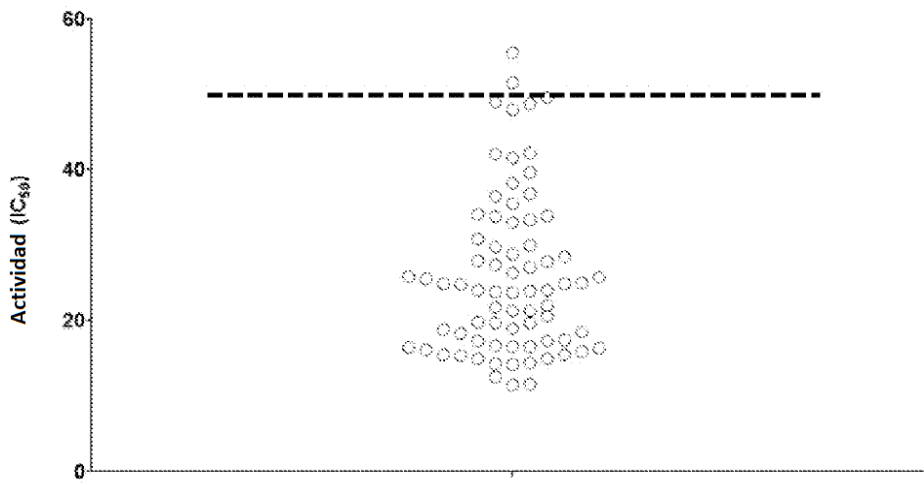


Figura 8

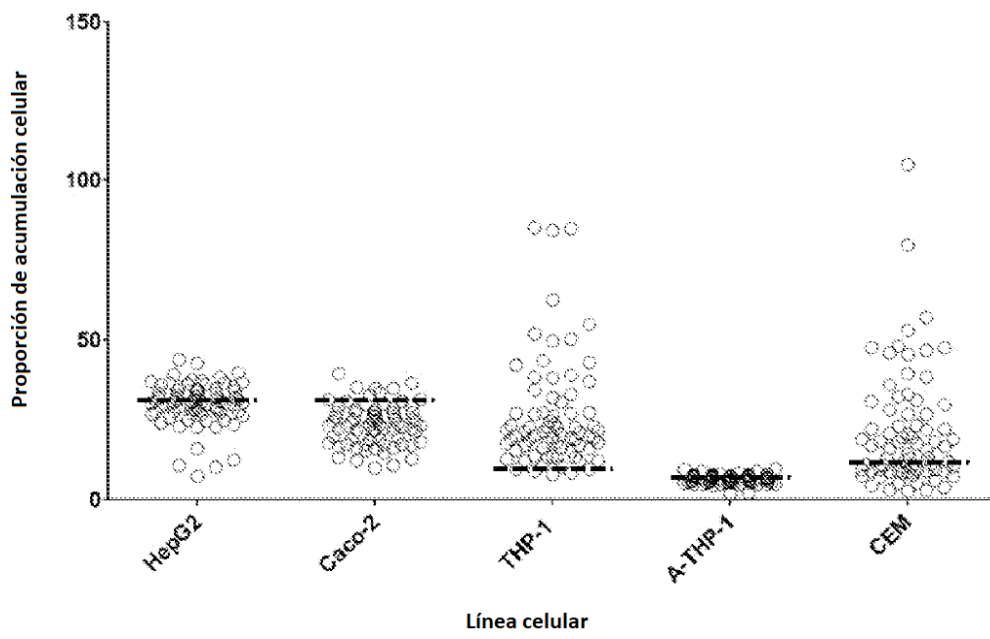


Figura 9

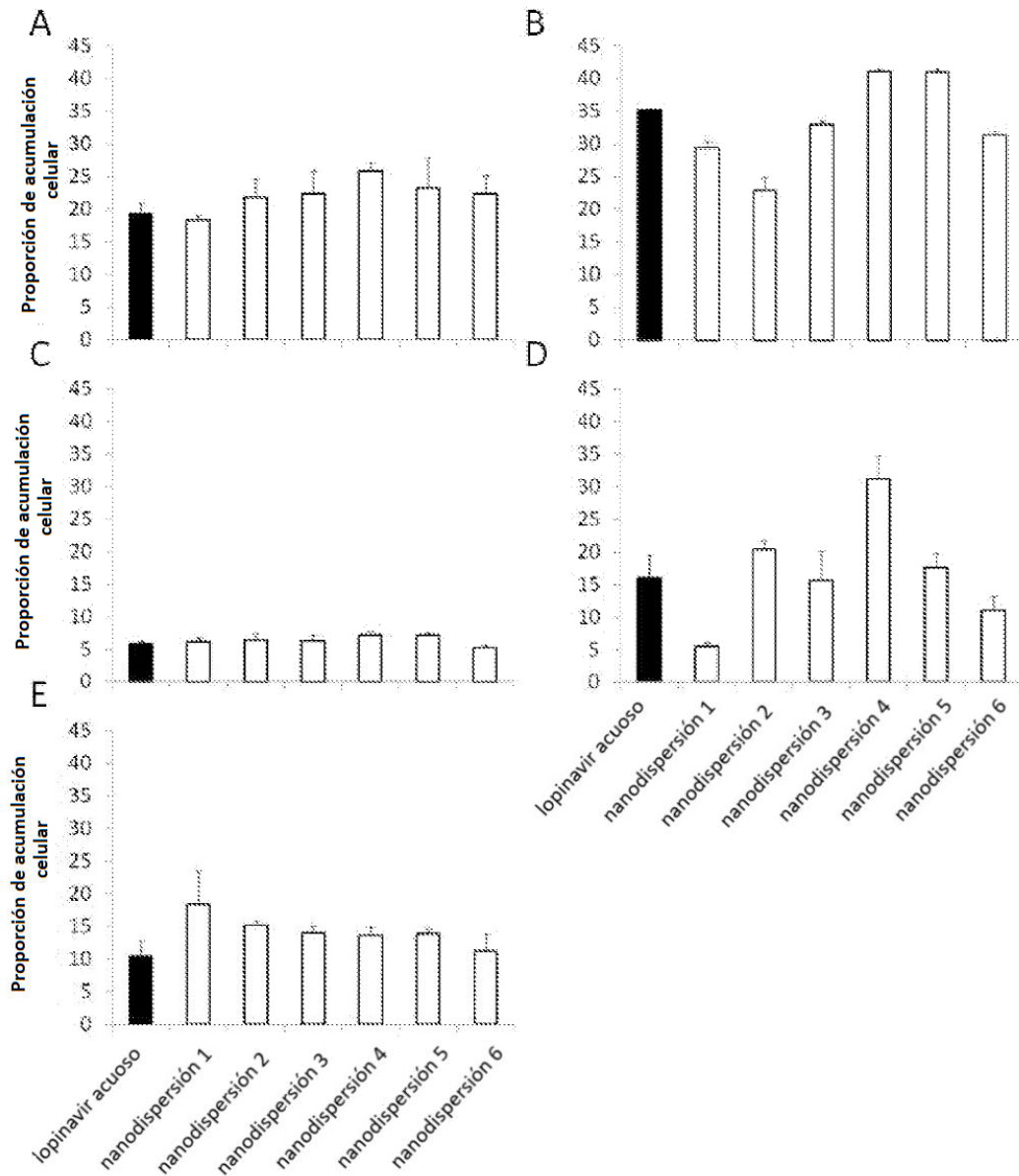


Figura 10

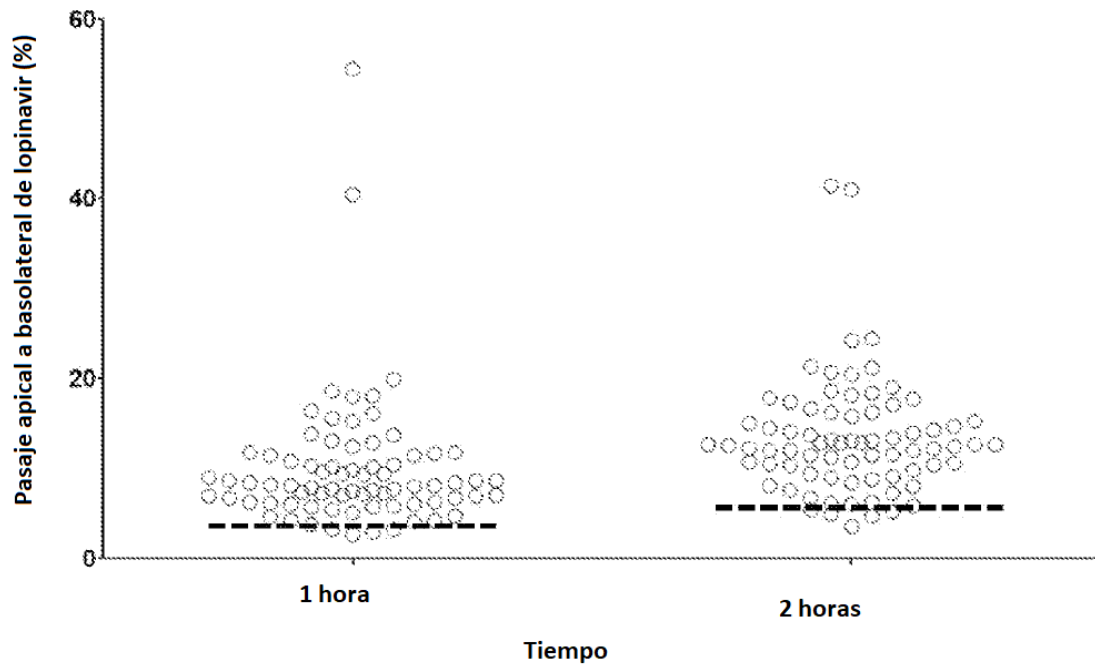


Figura 11

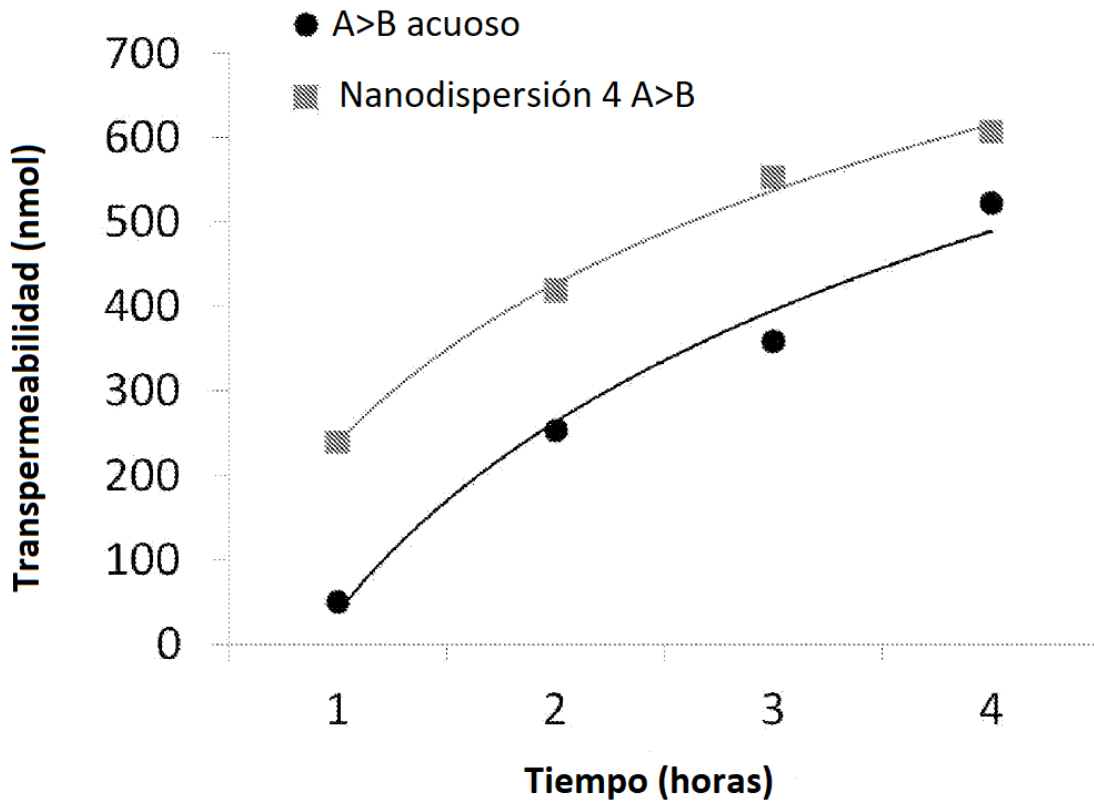


Figura 12

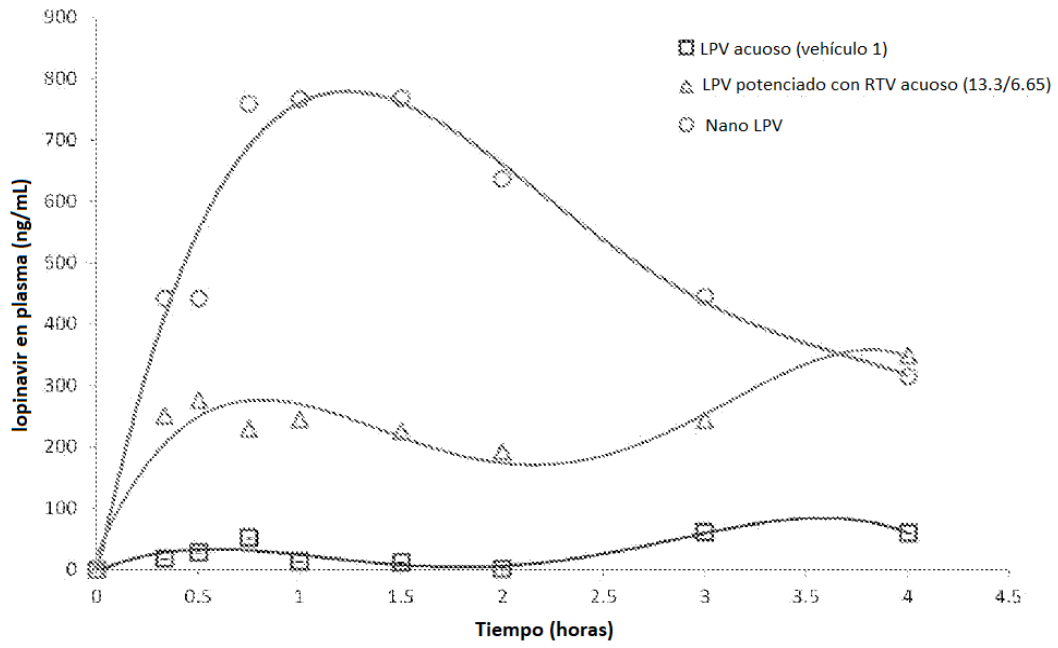


Figura 13