

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 756 752**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 31/357 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2015 PCT/IB2015/057732**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16055976**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2015 E 15797412 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3203989**

54 Título: **Formulaciones nanoestructuradas para la administración de silibinina y otros principios activos para tratar enfermedades oculares**

30 Prioridad:

09.10.2014 IT FI20140230

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

27.04.2020

73 Titular/es:

**DISTRETTO TECNOLOGICO SICILIA MICRO E NANO SISTEMI S.C.A.R.L. (100.0%)
Ottava Strada 5, Zona Industriale
95121 Catania, IT**

72 Inventor/es:

**BLANCO, ANNA RITA;
BONDI', MARIA LUISA;
CAVALLARO, GENNARA;
CONSOLI, GRAZIA MARIA LETIZIA;
CRAPARO, EMANUELA FABIOLA;
GIAMMONA, GAETANO;
LICCIARDI, MARIANO;
PITARRESI, GIOVANNA;
GRANATA, GIUSEPPE;
SALADINO, PATRIZIA;
LA MARCA, CLARA;
DEIDDA, IRENE;
PAPASERGI, SALVATORE;
GUARNERI, PATRIZIA;
CUZZOCREA, SALVATORE;
ESPOSITO, EMANUELA y
VIOLA, SANTA**

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

ES 2 756 752 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones nanoestructuradas para la administración de silibinina y otros principios activos para tratar enfermedades oculares

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere al campo de los productos para el tratamiento de enfermedades oculares y a formulaciones que contienen las mismas.

10 **Estado de la técnica**

15 [0002] La neoangiogénesis no controlada participa en la etiología de diversas enfermedades tales como: tumores sólidos, artritis reumatoide, psoriasis y, a nivel ocular, neovascularización de la córnea, degeneración macular senil (DMAE o DMS), edema macular, retinopatía de la prematuridad (RP), neovascularización coroidea (NVC), retinopatía diabética (RD) y glaucoma neovascular.

20 [0003] La DMS, al igual que muchas otras enfermedades crónicas relacionadas con el envejecimiento, tiene un origen multifactorial y su aparición es provocada por una combinación desfavorable de factores genéticos y relacionados con el estilo de vida.

25 [0004] Los estudios realizados en anti-VEGF (originalmente desarrollado para la terapia contra el cáncer) en el tratamiento de NVC condujeron al uso de pegaptanib (Macugen®, Pfizer) y ranibizumab (Lucentis®, Genentech) en el tratamiento de NVC. Bevacizumab (Avastin®, Genentech) también se usa actualmente "extraoficialmente" en el tratamiento de DMS.

30 [0005] También se debe considerar que el tratamiento de DMS no solo se limita al tratamiento de la neovascularización coroidea (inyecciones intravítreas de anti-VEGF y terapia fotodinámica), sino que también incluye el uso de varias sustancias con antioxidante, acción antiinflamatoria y neuroprotectora capaces de actuar a diferentes niveles del proceso lo que conduce hasta la enfermedad en estado avanzado y de actuar para prevenir la aparición de la enfermedad, ralentizar su progresión hasta formas avanzadas, reducir el daño tisular y potenciar la acción de fármacos anti-VEGF.

35 [0006] La retinopatía diabética (RD) es una de las complicaciones microvasculares más graves y frecuentes de la diabetes mellitus de tipo 1 y de tipo 2, que afecta significativamente a la calidad de vida del paciente, ya que frecuentemente produce ceguera, debido a la aparición de edema macular y neovascularización vítrea retiniana secundaria.

40 [0007] Las terapias para RD actualmente disponibles tienen como objetivo contrastar los procesos angiogénicos e inflamatorios de enfermedades retinianas y como resultado, en algunos casos, ralentizan la progresión de la enfermedad.

45 [0008] El glaucoma es una neuropatía óptica que conduce a la pérdida progresiva del tejido del nervio óptico, dejando su cabeza expuesta dando como resultado la pérdida de visión. La uveítis es una inflamación de parte o de toda la túnica media (vascular) del ojo que consiste en el iris, cuerpo ciliar y coroide.

50 [0009] Las herramientas terapéuticas actualmente disponibles para tratar uveítis posterior son inyecciones intravítreas o implantes (Taylor S.R. Et al, New developments in corticosteroid therapy for uveitis, Ophthalmologica. 2010;224 Suppl 1:46-53), no sin efectos secundarios muy importantes (endoftalmitis, edema retiniano, etc.) a costa del órgano visual.

55 [0010] Durante las dos últimas décadas, las inyecciones intravítreas se han considerado muy valiosas debido a que, en comparación con otras vías de administración, normalmente permiten alcanzar concentraciones más altas en la retina y el humor vítreo. Sin embargo, la vía intravítrea está asociada a graves riesgos para el paciente, tales como desprendimiento de retina, endoftalmitis y hemorragias intravítreas. Además, esta vía de administración requiere inyecciones repetidas del fármaco para garantizar el efecto terapéutico, que frecuentemente no es bien tolerado por el paciente.

60 [0011] Por tanto, los tratamientos actualmente disponibles no son satisfactorios debido a la desproporción existente en la relación beneficios/efectos secundarios.

65 [0012] Por este motivo, se han desarrollado sistemas de liberación controlada implantables no biodegradables en el humor vítreo (Vitrasert®, Retisert®), pero incluso estos tienen los mismos riesgos asociados a las inyecciones intravítreas, así como la necesidad de cirugía para el implante y la posibilidad de rechazo.

[0013] Se obtuvo un compromiso entre riesgos y beneficios usando las vías de administración perioculares

(peribulbar, yuxtaescleral posterior, subtenoniana retrobulbar y subconjuntiva), que son más seguras aunque menos eficientes que la intravítrea.

5 [0014] Estas vías de administración explotan el uso de formulaciones inyectables tradicionales y permiten que el principio activo llegue al objetivo (el vítreo y la retina) por difusión a través del tejido fibroso escleral, que forma una barrera menos resistente a los fármacos. El fármaco inyectado es en cualquier caso limpiado a través de la vía delantera (*flujo de salida* del humor acuoso) o posterior (retina y circulación sistémica), que requiere múltiples administraciones asociadas al mal *cumplimiento* del paciente (dolor, cataratas, desprendimiento de retina, endoftalmitis y hemorragias vítreas).

10 [0015] Actualmente, por tanto, el tratamiento de enfermedades del segmento posterior del ojo tiene solo sistemas de administración de fármacos asociados a efectos no deseados.

15 [0016] También se conoce que los sistemas de administración de fármacos avanzados del tipo nanopartícula son hoy en día la vanguardia de la administración de fármacos.

20 [0017] Los sistemas de nanopartículas de naturaleza lipídica tales como nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) y sistemas lipídicos nanoestructurados (NLC) son sistemas coloidales que consisten en lípidos biocompatibles (triglicéridos puros, mezclas complejas de glicéridos, ceras) y estabilizados con tensioactivos no tóxicos tales como lecitinas y poloxámeros. Tienen entre 100 y 500 nm de tamaño. A temperatura ambiente, las partículas están en el estado sólido.

25 [0018] Ya se ha mostrado que las nanopartículas lipídicas aumentan la biodisponibilidad de varios fármacos en el ojo debido a un elevado tiempo de retención preocular en comparación con la forma farmacéutica convencional, evitando así la instilación repetida y frecuente (Int. J. Pharm., 238 241-245 (2002)).

30 [0019] La inulina es un polisacárido natural extraíble de diversas plantas y frutas. Es un hidrato de carbono que consiste en cadenas lineales de unidades de D-fructosa unidas mediante enlaces gluco-furanósido β -(2-1) que ocasionalmente se unen a una molécula de glucosa en su extremo reductor. La inulina, debido al hecho de que tiene muchas propiedades ventajosas (ausencia de toxicidad, biocompatibilidad, solubilidad en agua y efecto probiótico sobre la flora bacteriana intestinal), se usa en innumerables aplicaciones (Kolida S, Gibson GR. J Nutr 2007;137:2503S-2506S; Gocheva et al., Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 2011;391:101-104), y entre ellas, muchas en el campo biomédico.

35 [0020] Recientemente, para conseguir nuevos sistemas de administración de fármacos (DDS), tales como hidrogeles, nanopartículas, bioconjugados macromoleculares y micelas poliméricas, numerosos investigadores han centrado su atención en la modificación química de la inulina.

40 [0021] Esta se modificó químicamente en la cadena lateral con aminas primarias, que se han usado para obtener la conjugación con cadenas hidrófilas, tales como polietilenglicol (PEG), y con moléculas hidrófobas, tales como ceramida.

45 [0022] Los calixarenos son polifenoles cíclicos fáciles de sintetizar, incluso a bajo coste, que se caracterizan por una sorprendente versatilidad sintética, una predisposición hacia su funcionalización a diferentes niveles y finalmente, un bajo grado de citotoxicidad e inmunogenicidad.

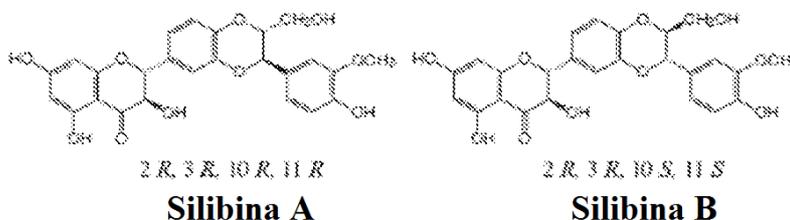
50 [0023] En los últimos años, los calix[4]arenos se han investigado ampliamente como nuevas plataformas moleculares para aplicaciones biomédicas, soportados por la baja citotoxicidad (Int. J. Pharm. 2004, 273, 57) e inmunogenicidad (Bioconjugate Chem. 1999, 10, 613) mostradas por sus derivados tanto *in vitro* como *in vivo*.

[0024] La funcionalización adecuada del esqueleto de calixareno ha proporcionado derivados con actividad antiinflamatoria, antitumoral, antimicrobiana y de mimético de vacuna (Curr. Drug Discov. Technol. 2009, 6, 306; Chem. Soc. Rev. 2013, 42, 366, documentos de patente US 2010/0056482; WO2005123660 A2).

55 [0025] Se han propuesto los calixarenos solubles en agua similares a las ciclodextrinas para la capacidad de complejación de un fármaco dentro de su cavidad hidrófoba como excipientes para la industria farmacéutica, mientras que los calixarenos anfífilos capaces de ensamblarse en sistemas nanoestructurados en un medio acuoso son sistemas de administración de fármacos prometedores (J. Sci. Ind. Res. 2012, 71, 21; Chem. Soc. Rev. 2013, 42, 366, documentos de patente EP 1 293 248 A1; US 2010/0185022 A19). Algunos de ellos han sido apropiadamente manipulados para liberar el fármaco según estímulos externos, tales como cambios en el potencial de oxidación-reducción, temperatura (ACSNANO, 2011, 5, 2880), pH (Phys. Rev. E, 2007, 73, 051904), actividad enzimática (RSC Advances, 2013, 3, 8058), etc. La capacidad de los derivados de calixareno para penetrar la membrana celular (Chem. Commun. 2012, 48,1129; J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 2892) y la capacidad para funcionalizar el esqueleto de calixareno con grupos *de migración* que reconocen y se unen a receptores complementarios presentes sobre la superficie de la célula objetivo también hace que los calixarenos sean sistemas prometedores para la *administración dirigida de fármacos* (Org. Biomol. Chem. 2015, 13, 3298).

[0026] La silibinina es una mezcla de dos diaestereoisómeros A y B en una proporción de aproximadamente 1:1 contenida en *Silybum marianum*.

5 [0027] Sus principales aplicaciones en el campo clínico son: tratamiento de enfermedades hepáticas provocadas por el alcohol, cirrosis hepática, envenenamiento por amanita, hepatitis viral y enfermedades hepáticas inducidas por fármacos.



10 [0028] Por otra parte, se conoce que la biodisponibilidad y eficacia de la silibinina está bastante limitada debido a su baja solubilidad en agua (430 mg/l).

15 [0029] Parece que la silibinina es un agente eficaz para la prevención y el tratamiento de gliomas malignos en seres humanos (Rana P. Singh, Oncogene, 2005).

[0030] Además, se ha mostrado la actividad antiangiogénica del silibinina, particularmente en DMS *in vitro* y después de la administración por vía oral de una preparación basada en silimarina. También ZHANG H-T ET AL, EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 740, 2014, páginas 233-239, desvelan la administración por vía oral de una suspensión que comprende silibina (silibinina) y CMC para tratar retinopatía diabética.

20

[0031] En vista de lo anterior, la perspectiva de tener nuevas formulaciones farmacológicas que puedan facilitar al médico el tratamiento terapéutico de enfermedades oculares, en particular enfermedades neurodegenerativas, tales como degeneración macular y retinopatía diabética, aumenta el interés hacia compuestos tales como la silibinina funcionalizada para mejorar su disponibilidad *in situ*.

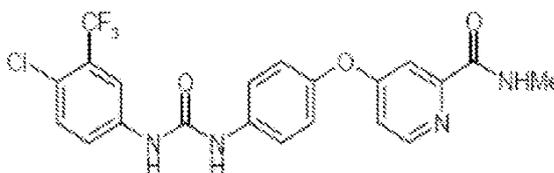
25

[0032] Además de la silibinina ampliamente estudiada con todos los sistemas nanoestructurados descritos, se investigaron otros principios activos de origen natural y caracterizados por baja solubilidad en agua, fácil degradación química y enzimática, y baja biodisponibilidad, con algunas de estas formulaciones nanoestructuradas, tales como: sorafenib, curcumina, latanoprost.

30

Sorafenib (BAY43-9006, Bayer)

35 [0033]



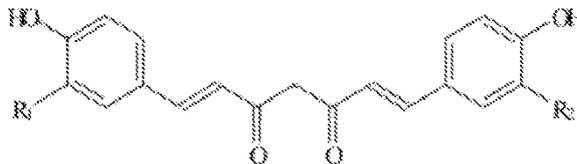
40 es una diaril urea que actúa sobre múltiples objetivos (VEGF, PDGF, EGF; se define de hecho como un inhibidor multi- cinasas) con acción anti-VEGF prevalente, provista de acción antiangiogénica demostrada en tumores (documento de patente EP 1140840B1, Bayer), y es el primer agente antitumoral autorizado en Europa para el tratamiento de carcinoma hepatocelular (comprimidos Nexavar®).

[0034] Se puede aumentar el índice terapéutico de Sorafenib en la terapia de enfermedades retinianas usando administración local, a nivel ocular: de esta forma, se puede obtener el efecto farmacológico, mientras que se limita la aparición de efectos secundarios sistémicos. Además, la administración local permite el uso de dosis limitadas en comparación con las requeridas para tener el mismo efecto por administración sistémica y así una reducción en los costes de producto terminado.

45

Curcumina

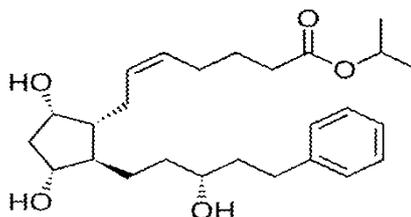
[0035]



5

es un polifenol amarillo (diferuloilmetano) extraído del rizoma de *Curcuma longa*, una planta asiática usada tanto en la industria culinaria como en la medicina por sus propiedades curativas en enfermedades biliares y en algunas afecciones inflamatorias.

10 Latanoprost



15

es un principio activo que, al igual que bimatoprost y travoprost, es parte de los análogos de la prostaglandina. Los análogos de la prostaglandina son una clase de fármacos para uso tópico que se han usado recientemente en el tratamiento de glaucoma de ángulo abierto; inicialmente, no fueron recomendados como tratamiento de primera línea debido a la falta de información sobre sus efectos a largo plazo. Entre los efectos secundarios asociados al tratamiento a largo plazo con las prostaglandinas, los principales se refieren a cambios en la pigmentación del iris, engrosamiento y alargamiento de las pestañas, aparición de edema macular (Alexander CL et al., Prostaglandin analog treatment of glaucoma and ocular hypertension; Ann Pharmacother., 2002).

20

Breve descripción de las figuras

[0036]

25

La Figura 1 muestra el porcentaje de silibinina liberada por NLS-A en PBS a pH 7,4 en función del tiempo de incubación, en comparación con la curva de disolución de silibinina libre.

La Figura 2 muestra el porcentaje de silibinina liberada por sistemas de NLC-B recubiertos con INU-DETA y quitosano en PBS a pH 7,4 en función del tiempo de incubación, y la curva de disolución de silibinina libre.

30

La Figura 3 muestra el porcentaje de silibinina liberada por las micelas poliméricas de INU-C8 y INU-C8-PEG en PBS a pH 7,4 en función del tiempo de incubación, en comparación con la curva de difusión de silibinina libre.

La Figura 4 (a y b) muestra el perfil de citocompatibilidad de micelas vacías de INU-C8 y INU-C8-PEG en la línea celular 16HBE después de 4 horas (4 a) y 24 horas (4 b) de incubación a diferentes concentraciones.

35

La Figura 5 A muestra el efecto sobre células ARPE-19 pretratadas durante 20 horas con el sistema INUC8PEG-Sorafenib, con el vehículo vacío INUC8PEG y con tosilito de Sorafenib, después, se expusieron al ataque con H₂O₂; cuantificación de la liberación de LDH en el medio. Los sistemas de Sorafenib no son según la invención.

40

La Figura 5 B muestra el efecto sobre células ARPE-19 atacadas con H₂O₂ durante tres horas y posteriormente tratadas durante 20 horas con el sistema INUC8PEG-Sorafenib (C8PEGSor), con el vehículo vacío INUC8PEG (C8PEG) y con tosilito de Sorafenib (Sor); cuantificación de la liberación de LDH en el medio. Los sistemas de Sorafenib no son según la invención.

45

La Figura 6 A muestra el efecto sobre células retinianas ARPE-19 pretratadas durante 20 horas con el sistema INUC8PEG-Sorafenib, con el vehículo vacío INUC8PEG y con silibinina, luego se expusieron al ataque con H₂O₂; cuantificación de la liberación de LDH en el medio. Los sistemas de Sorafenib no son según la invención.

La Figura 6 B muestra el efecto sobre células retinianas ARPE-19 atacadas con H₂O₂ durante tres horas y posteriormente tratadas durante 20 horas con el sistema INUC8PEG-silibinina (C8PEGSib), con el vehículo vacío INUC8PEG (C8PEG) y con silibinina (Sib); cuantificación de la liberación de LDH en el medio.

50

La Figura 7 muestra la transferencia Western representativa realizada en muestras sin (control, C) o con H₂O₂ (H), y tratadas o no con INUC8PEG (1 μM y 10 μM), con INUC8PEGSib (1 μM y 10 μM) o con Sib (1 μM y 10 μM). Se usaron anticuerpos primarios anti-PARP1 1:800 (señalización de células). Se normalizó el análisis densitométrico de las bandas (histogramas) para β-actina.

La Figura 8 muestra el porcentaje de silibinina liberada por las nanopartículas de calixareno en PBS a pH 7,4 en función del tiempo de incubación.

La Figura 9 A muestra el efecto sobre células retinianas ARPE-19 pretratadas durante 20 horas con el sistema Calixareno-Silibinina (CalixSlb), con el vehículo vacío (calix) y con silibinina sola, y después se exponen a FeSO_4 50 μM ; cuantificación de la liberación de LDH en el medio.

La Figura 9 B muestra el efecto sobre células retinianas ARPE-19 tratadas con FeSO_4 50 μM durante 5 horas y posteriormente tratadas durante 20 horas con el sistema Calixareno-Silibinina (CalixSlb), con el vehículo vacío (calix) y con silibinina (Slb) sola; cuantificación de la liberación de LDH en el medio.

La Figura 10A/B muestra la transferencia Western representativa realizada en muestras sin (CTR) o con FeSO_4 (Fe) y tratadas o no con Calix (1 μM), con CalixSlb (1 μM) o con Slb (1 μM). Se usaron anticuerpos primarios anti-VEGF 1:100 (Santa Cruz) (10 A) y la transferencia Western representativa se realizó en muestras sin (CTR) o con FeSO_4 (Fe) y tratadas o no con Calix (0,1 μM y 1 μM), con CalixSlb (0,1 μM y 1 μM) o con Slb (0,1 μM y 1 μM). Se usaron los anticuerpos primarios anti-catepsina D 1:200 (Santa Cruz). Se normalizó el análisis densitométrico de las bandas (histogramas) para β -actina (10B).

La Figura 11 muestra el efecto protector del sistema de calixareno hacia el principio activo curcumina, para el que una degradación de 90 % en 30 min en PBS 0,1 M y en medio sin suero se muestra para comparación. Los sistemas de curcumina no son según la invención.

La Figura 12 muestra los resultados de las pruebas de citotoxicidad en células de la córnea SIRC tras el tratamiento con curcumina, sistema de calixareno y sistema calixareno-curcumina. Los sistemas de curcumina no son según la invención.

La Figura 13 muestra los resultados de las pruebas de citotoxicidad del ensayo MIT en macrófagos J744 de curcumina, calixareno y calixareno-curcumina. Los sistemas de curcumina no son según la invención.

La Figura 14 muestra la vitalidad de macrófagos J744 estimulados con LPS y previamente expuestos al tratamiento con curcumina, sistema de calixareno y sistema calixareno-curcumina. Los sistemas de curcumina no son según la invención.

La Figura 15 muestra la reducción en la degradación de la proteína constituyente I κ B α en macrófagos J744 se somete a estrés de LPS en presencia de curcumina, con curcumina, sistema de calixareno y sistema calixareno-curcumina. Los sistemas de curcumina no son según la invención.

La Figura 16 muestra la reducción de NF κ B en macrófagos J744 sometidos a estrés de LPS en presencia de curcumina, calixareno 1 y calixareno-curcumina. Los sistemas de curcumina no son según la invención.

La Figura 17 muestra la expresión de iNOs y COX2 en macrófagos J744 sometidos a estrés de LPS y su reducción en presencia de tratamiento con curcumina, calixareno 1 y calixareno-curcumina. Los sistemas de curcumina no son según la invención.

La Figura 18A/B muestra los resultados de la puntuación histológica y del ensayo de proteína en humor acuoso de animales tratados con silibinina incorporada o no en el sistema de calixareno, con curcumina incorporada o no en el sistema de calixareno en un modelo de uveítis. Los sistemas de curcumina no son según la invención.

La Figura 19 A/B muestra las tendencias de la reducción en la presión intraocular en un modelo de hipertensión después de la administración única (A) y después del tratamiento crónico del sistema de calixareno-latanoprost y del producto comercial IOPIZE que contiene latanoprost. Los sistemas de latanoprost no son según la invención.

40 Sumario de la invención

[0037] Se describen formulaciones para administración tópica, que contienen silibinina incorporada en sistemas de nanopartículas lipídicas de NLS y NLC, y basados en calixarenos, posiblemente mucoadhesivos, o en sistemas micelares y de nanopartículas basados en copolímeros de inulina anfífilicos para su uso en el tratamiento de enfermedades oculares neurodegenerativas.

Descripción detallada de la invención

[0038] La presente invención vence los inconvenientes descritos anteriormente con las formulaciones que contienen el principio activo silibinina en donde dicho principio activo se incorpora en:

- (1) sistemas de nanopartículas lipídicas del tipo NLS, Nanopartículas Lipídicas Sólidas, y VLN, Vehículos Lipídicos Nanoestructurados;
- (2) sistemas nanoestructurados basados en calixareno; o
- (3) sistemas micelares y de nanopartículas basados en copolímeros de inulina anfífilicos;

para su uso en el tratamiento tópico de enfermedades oculares neurodegenerativas seleccionadas de: neovascularización coroidea (NVC), degeneración macular senil (DMS), edema macular, glaucoma neovascular, retinopatía de la prematuridad (RP), retinopatía diabética (RD), uveítis, endoftalmitis, retinitis, coroiditis, corioretinitis, y complicaciones retinianas de enfermedades sistémicas.

[0039] Se desvelan para fines de referencia ejemplos de incorporación y liberación de otros principios activos que tienen un fundamento de uso para las enfermedades oculares de interés.

[0040] Dichas formulaciones son capaces de suministrar el principio activo hasta el vítreo o hasta la retina en dosis terapéuticamente eficaces para el tratamiento de enfermedades oculares neurodegenerativas tales como

degeneración macular, retinopatía diabética y glaucoma neovascular. También se describen en lo sucesivo procesos de preparación de los sistemas de nanopartículas que incorporan silibinina como se ha definido anteriormente.

5 **[0041]** En particular, se siguió un procedimiento general descrito en lo sucesivo para la preparación de sistemas de tipo NLS y VLN.

[0042] Se funde la fase lipídica (que consiste en un lípido sólido o una mezcla de un lípido líquido con uno sólido) a aproximadamente 5-10 °C por encima de su punto de fusión.

10 **[0043]** Se solubiliza la silibinina en una alícuota de etanol y luego se añade a la mezcla de lípido fundido con agitación magnética.

15 **[0044]** Entonces se precipita la mezcla de lípido caliente que contiene la silibinina en una disolución acuosa que contiene agua, un tensioactivo o una mezcla de tensioactivos (método de precipitación), o se emulsiona con una disolución acuosa que contiene agua, un tensioactivo o una mezcla de tensioactivos, previamente calentada a la misma temperatura. En el último caso, la pre-emulsión resultante es o: dispersada en agua o un medio acuoso enfriado a una temperatura de entre 2 y 5 °C (método de microemulsión), o se somete a homogeneización a alta presión (método de homogenización en caliente a alta presión). En todos los casos, se dejó enfriar la nanoemulsión resultante hasta temperatura ambiente para luego ser purificada mediante una diálisis exhaustiva (COMW 12000-20 14000) contra agua destilada. Después, se añade el crioprotector a la nanodispersión de partículas, que se puede someter a centrifugación (4000 rpm durante 10 min a 10 °C). Finalmente, después de la liofilización, se recuperan las nanopartículas lipídicas sólidas y se almacenan en el congelador para la posterior caracterización y/o se recubren con los polímeros mucoadhesivos. En el último caso, se añaden los polímeros INU-EDA y INU-DETA y quitosano, en 0,1 % de disolución acuosa, a las suspensiones de nanopartículas y se incuban durante 30 min a 25 temperatura ambiente y con agitación magnética.

30 **[0045]** La fase lipídica anterior consiste en lípidos, por ejemplo, seleccionados de: triglicéridos, tales como triestearina, tripalmitina, triglicéridos de ácido caprílico/cáprico (Mygliol); diglicéridos tales como Precirol ATO 5 (diestearato de glicerilo); monoglicéridos tales como monoesterato de glicerilo; alcoholes alifáticos, tales como alcohol cetílico; ácidos grasos (C10-C22); ésteres de ácidos grasos con alcoholes grasos, tales como palmitato de cetilo; mezclas de mono-, di- y triglicéridos de ácido behénico PEGilado tales como Compritol HD-5-ATO (behenato de PEG-8 y tribehenina) y Compritol 888ATO (mezcla de mono-, di- y tribehenato); y mono-, di- y triglicéridos de ácido caprílico y caproico PEGilado tal como Accocon CC-6.

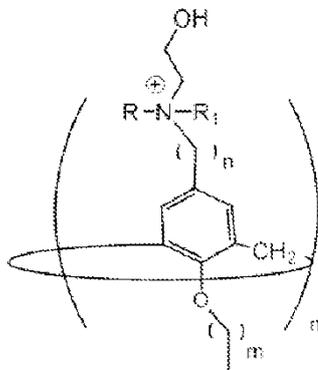
35 **[0046]** Las sustancias usadas como tensioactivos/co-tensioactivos en el proceso pueden ser, por ejemplo, seleccionadas de: tensioactivos no iónicos que incluyen lecitinas tales como Epikuron 200; copolímeros de bloque de polietilenglicol y polipropilenglicol tales como Pluronic; derivados de sorbitano PEGilados, tales como Tween; éteres de alcoholes grasos con polietilenglicol tales como Brij; tensioactivos iónicos que incluyen sales biliares tales como taurocolato de sodio; aminas cuaternarias que incluyen cloruro de cetilpiridinio y bromuro de dioctadecildimetilamonio.

[0047] Las sustancias usadas como crioprotectores en el proceso se pueden seleccionar de, por ejemplo: azúcares tales como lactosa y trehalosa; y polímeros tales como polivinilpirrolidona (PVP).

45 **[0048]** Las sustancias usadas para conferir mucoadhesión en el proceso se seleccionan, por ejemplo, de: polímeros de inulina que llevan grupos amina (INU-EDA y INU-DETA), polímeros de bajo peso molecular (quitosano) y tensioactivos catiónicos (CCP y DDAB).

50 **[0049]** Según una realización adicional, la invención se refiere a formulaciones como se definen en la reivindicación 1 que contienen copolímeros basados en inulina de la siguiente fórmula (I) o (II), en donde R es $-(CH_2)_p-CH_3$; donde p está en el intervalo entre 0 y 19;

[0055] En particular, la presente invención se refiere a formulaciones como se definen en la reivindicación 1 que comprenden macromoléculas catiónicas que consisten en derivados de calix[4]areno funcionalizados con alcoxiaminas, que incluyen colina, para obtener nuevos vehículos de la fórmula general (A)



(A)

5

en donde:

10 R = CH₃, (CH₂)_xCH₃, (CH₂)_xOH
 R₁ = CH₃, (CH₂)_xCH₃, (CH₂)_xOH

en donde

15 x= 1-3
 n= 4, 6, 8
 m= 2-15

y en donde cuando R = R₁ = CH₃ m es diferente de 2 - 9

que, además de suministrar principios activos conocidos, también se proporcionan con su propia bioactividad que puede potenciar la del principio activo.

20

[0056] Como se puede apreciar, la fórmula A representa derivados de calixareno que se diferencian en el número de unidades fenólicas que forman el macrociclo (n = 4, 6, 8), en la longitud de las colas hidrófobas (m = 2-15, indica el número de grupos CH₂), en la estructura del grupo polar presente en el borde superior de calixareno (R y R₁ = CH₃, (CH₂)_xCH₃, (CH₂)_xOH, donde x = 1-3 y combinaciones de los mismos).

25

[0057] Los compuestos de calixareno como se han descrito anteriormente son nuevos y también se describen en el presente documento; estos compuestos han mostrado gran versatilidad en la carga y liberación de principios activos caracterizada por baja solubilidad en agua, fácil degradación química y enzimática, y baja biodisponibilidad, o de origen natural o no, que se van a usar en el tratamiento de enfermedades oculares.

30

[0058] La colina como molécula dirigida guía y promueve el cruce del epitelio corneal, de la barrera hematorretiniana y del epitelio retiniano (Adv. Drug Deliv. Rev. 2006, 58, 1136) donde están presentes vehículos de colina.

35

[0059] También en este caso, en cuanto a los copolímeros basados en inulina descritos anteriormente, se encontró que los sistemas de calixareno han mostrado la capacidad de formar nanoagregados capaces de incorporar y liberar silibinina u otros principios activos tales como: curcumina/latanoprost. Las formulaciones de curcumina y latanoprost no son según la invención.

40

[0060] La biocompatibilidad y facilidad de la preparación caracterizan la formulación que se obtiene por la simple disolución del derivado de calixareno en PBS (pH 7,4), la adición de un exceso de principio activo (método de solubilidad de fases), sonicación durante 15 minutos, agitación a 25 °C durante 2-3 días, centrifugación y filtración sobre filtro de 0,2 µm de GHP.

45

[0061] Los sistemas de nanopartículas obtenidos en la presente invención tienen un diámetro medio en el intervalo entre 50 y 200 nm con un índice de polidispersidad inferior a 0,5. Se incorpora una cantidad farmacológicamente eficaz de principio activo en las nanopartículas descritas. En particular, los sistemas de nanopartículas obtenidos en la presente invención tienen una carga de fármaco en el intervalo entre 1 y 15 % p/p.

50

[0062] Las características y ventajas adicionales de la presente invención resultarán más claras de la siguiente descripción de algunas realizaciones de la misma, hecha a modo de ejemplo no limitante.

- 5 **[0063]** Las formulaciones descritas en el presente documento que contienen un principio activo seleccionado de: silibinina o sorafenib o curcumina o latanoprost en sistemas de nanopartículas lipídicas del tipo NLS (Nanopartículas Lipídicas Sólidas) y VLN (Vehículos Lipídicos Nanoestructurados), o en sistemas nanoestructurados basados en calixarenos, o mucoadhesivos o no, o en sistemas micelares y de nanopartículas basados en copolímeros de inulina anfífilicos, permiten la administración tópica de los principios activos para el tratamiento de enfermedades oculares neurodegenerativas tales como: NVC, DMS, edema macular, glaucoma neovascular, retinopatía de la prematuridad (RP), retinopatía diabética (RD), uveítis, endoftalmitis, retinitis, coroiditis, coriorretinitis, y complicaciones retinianas de enfermedades sistémicas. Las formulaciones de sorafenib, curcumina y latanoprost no son según la invención.
- 10 **[0064]** Las formulaciones normalmente están en forma de productos sólidos liofilizados y pueden contener, además del principio activo incorporado en la nanoestructura de lípido, polímero o calixareno como se ha descrito anteriormente, también componentes tales como tensioactivos y/o crioprotectores, y otros excipientes comúnmente usados en preparaciones oftálmicas.
- 15 **[0065]** En los siguientes ejemplos, las formulaciones que comprenden sorafenib, curcumina y latanoprost no son según la invención y se desvelan simplemente para fines de referencia.

Ejemplo 1

- 20 Preparación de silibinina que contiene NLS (NLS-A)

[0066] Se describen en lo sucesivo el procedimiento y los datos experimentales obtenidos con el objeto de NLS de la invención preparados con Compritol HD-5-ATO, cargados con silibinina.

- 25 Preparación de NLS-A

30 **[0067]** Se prepararon NLS-A con el método de homogeneización a alta presión. Se fundieron doscientos miligramos de Compritol HD5ATO a aproximadamente 5-10 °C por encima de su punto de fusión (65-70 °C). Se solubilizó el fármaco (68 mg) en una alícuota de etanol (0,5 ml) y luego se añadió a la mezcla de lípidos fundida con agitación magnética. Entonces se emulsionó la mezcla de lípidos caliente que contenía el fármaco en una disolución acuosa del tensioactivo Pluronic F68 (60 mg en 100 ml), previamente calentada a la misma temperatura. La pre-emulsión resultante se somete a homogeneización a alta presión (4 ciclos a 7500 ± 2500 psi) usando el equipo Emulsiflex-C5 (Avestin), dispuesto en un baño de agua caliente a una temperatura de 65-70 °C. Se dejó enfriar la nanoemulsión resultante hasta temperatura ambiente para luego purificar por diálisis (COMW 12000-14000) contra agua destilada. Después, se añade el crioprotector trehalosa (relación ponderal lípidos:crioprotector = 1:1 p/p) a la nanodispersión de partículas, que se sometió a centrifugación (4000 rpm durante 10 min a 10 °C). Finalmente, después de la liofilización usando un liofilizador Modulyo, se recuperan las NLS y se almacenan en el congelador para la posterior caracterización. Determinación de tamaño y medición del potencial zeta de sistemas de NLS-A

40 **[0068]** Se determinaron el diámetro medio y el índice de polidispersidad (PDI) de los sistemas NLS-A preparados por espectroscopía de correlación de fotones (PCS) usando un Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instrument). Cada muestra se diluyó adecuadamente para el análisis con una disolución acuosa de NaCl 0,9 % p/p, se filtró a través de filtros de 0,2 µm y la lectura se hizo a un ángulo de 173° con respecto al rayo incidente y se analizaron por triplicado.

45 **[0069]** Se midió el potencial zeta según los principios de la velocimetría por láser doppler y del análisis de dispersión de la luz (técnica M3-PALS) usando un Zetasizer Nano ZSP (Malvern) con un láser de He-Ne, potencia = 4,0 mW, longitud de onda = 633 nm. Los resultados obtenidos para el diámetro medio, PDI y potencial zeta se dan en la Tabla 1.

50

Tabla 1

Diámetro medio hidrodinámico, índice de polidispersidad (PDI), potencial zeta de sistemas NLS-A			
Tabla 1			
DLS (en NaCl 0,9 % p/p)			
	Z-promedio (nm)	PDI	Potencial ζ (mV±DE)
PRE-liofilización	189,0	0,22	-9,4±1,2
POST-liofilización	171,5	0,31	-6,5±3,5

Determinación de la *carga de fármaco* (% de DL) de NLS-A

55 **[0070]** Para determinar la cantidad de silibinina cargada en la muestra de NLS-A, se solubilizaron en tetrahidrofurano (THF) 10 mg de la composición previamente sometida a liofilización. Entonces se trató la disolución orgánica con metanol para precipitar los lípidos y extraer el principio activo. Entonces se filtró la suspensión resultante a través de filtros de 0,45 µm y se analizó por HPLC. Se encontró que el resultado obtenido en términos de % de DL (expresado como un porcentaje del principio activo cargado en NLS, considerando que 100 mg de material se someten a liofilización, que consiste en lípidos + principio activo) era 8,5 % p/p.

Liberaciones a pH 7,4 de silibinina de NLS-A

5 **[0071]** Se sometió el sistema descrito en la presente invención a estudios de liberación *in vitro* a 37 °C usando un tampón fosfato a pH 7,4 con tiempos de incubación en el intervalo entre 0 y 12 horas. Los resultados obtenidos han mostrado que el sistema de la presente invención libera lentamente el fármaco hasta un máximo de 7,8 % p/p en el plazo de 12 horas. Los perfiles de liberación y disolución del fármaco después de la incubación a pH 7,4 y a 37 °C se muestran en la Figura 1.

10 **[0072]** El sistema descrito es estable, es decir, libera el fármaco muy lentamente en el medio externo a pH 7,4 y esto puede ser ventajoso para optimizar la administración del principio activo en el sitio patológico por la nanopartícula que lo contiene.

Ejemplo 2

15 Preparación de VLN que contiene silibinina (VLN-B)

[0073] A modo de ejemplo no limitante, se describen en lo sucesivo el procedimiento y los datos experimentales obtenidos con el objeto de VLN de la invención preparado con Compritol HD-5-ATO, Gelucire 44/14 y Acconon CC-6, cargado con silibinina.

Preparación de VLN-B

25 **[0074]** Se prepararon VLN-B con el método de precipitación- evaporación de disolvente. Se fundió Compritol HD5ATO (250 mg) a aproximadamente 5-10 °C por encima de su punto de fusión (65-70 °C) y se añadió el fármaco (30 mg) al lípido fundido. Se solubilizaron Gelucire 44/14 (100 mg) y Acconon CC-6 (100 mg) en etanol (2,0 ml) y luego se añadieron a la mezcla de lípido fundido con agitación magnética. Entonces se precipitó la mezcla de lípidos caliente que contenía el fármaco y los tensioactivos en una disolución acuosa caliente que contenía el tensioactivo taurocolato de sodio (100 mg en 100 ml), previamente calentado a la misma temperatura y se sometió a
30 homogenización usando Ultra-Turrax (13,500 rpm). La suspensión de nanopartículas caliente, todavía con agitación, se pone en un baño de hielo hasta que su temperatura alcance el valor de 10 °C. Entonces se purifican las nanopartículas resultantes por diálisis (COMW 12000-14000) contra agua destilada durante 3 días y luego se añade la trehalosa crioprotectora (relación ponderal lípido:crioprotector = 1:2 p/p). Finalmente, después de la liofilización usando un liofilizador Modulyo, se recuperan las VLN y se guardan en el congelador para el posterior recubrimiento
35 con un derivado de inulina (INU-DETA) y quitosano. En caso de recubrimiento con INU-DETA, se incubaron 9 ml de suspensión dializada de nanopartículas (conc. de 4,3 mg/ml) con 1 ml de 0,1 % de INU-DETA durante 1 h con agitación magnética. En el caso de recubrimiento con quitosano de bajo peso molecular (5000 Mw), se incubaron 9 ml de nanopartículas dializadas y liofilizadas (conc. de 0,165 mg/ml) con adición de trehalosa con 1 ml de 0,1 % de quitosano durante 30 min con agitación magnética. Entonces se liofilizaron las nanopartículas recubiertas y se
40 almacenaron como un polvo para la posterior caracterización.

Determinación de tamaño y medición del potencial zeta de sistemas VLN-B

45 **[0075]** Se determinaron el diámetro promedio y el índice de polidispersidad (PDI) de los sistemas VLN-B recubiertos con INU-EDA y quitosano preparados por espectroscopía de correlación de fotones (PCS) usando un Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instrument). Cada muestra se diluyó adecuadamente para el análisis con una disolución acuosa de NaCl 0,9 % p/p, se filtró a través de filtros de 0,2 µm y la lectura se hizo a un ángulo de 173° con respecto al rayo incidente y se analizaron por triplicado.

50 **[0076]** Se midió el potencial zeta según los principios de la velocimetría por láser doppler y del análisis de dispersión de la luz (técnica M3-PALS) usando un Zetasizer Nano ZSP (Malvern) con un láser de He-Ne, potencia = 4,0 mW, longitud de onda = 633 nm. Los resultados obtenidos para el diámetro medio, PDI y potencial zeta se dan en la Tabla 2.

55 Tabla 2

Diámetro medio hidrodinámico, índice de polidispersidad (PDI), potencial zeta de VLN-B recubiertos con INU-DETA y quitosano.			
DLS (en NaCl 0,9 %)			
	Z-promedio (nm)	PDI	Potencial ζ (mV±DE)
VLN-B INU-DETA	236,8	0,45	-1,1
VLN-B quitosano	69,1	0,45	+18,2

Determinación del % de DL de VLN-B recubiertos con INU-DETA y quitosano

[0077] Para determinar la cantidad de silibinina cargada en las muestras de VLN-B recubiertas con INU-DETA y quitosano, se solubilizaron en caliente 2 mg de las composiciones previamente sometidas a liofilización en 8 ml de etanol (EtOH) y se sonicaron durante 3 min. Entonces se filtraron las disoluciones resultantes con 5,00 µm de filtros de celulosa regenerados y se analizaron con HPLC.

[0078] Se encontró que los resultados obtenidos en términos de % de DL (expresado como un porcentaje del principio activo cargado en VLN, considerando 100 mg del material sometido a liofilización, que consiste en lípidos + principio activo) eran 6,05 % p/p para VLN-B recubiertos con INU-DETA y 3,07 % p/p para VLN-B recubiertos con quitosano.

Liberaciones a pH 7,4 de los principios activos de VLN-B recubiertos con INU-DETA y quitosano

[0079] Se sometieron los sistemas de VLN-B recubiertos con INU-DETA y quitosano descritos en la presente invención a estudios de liberación *in vitro* a 37 °C usando un tampón fosfato a pH 7,4 con tiempos de incubación en el intervalo entre 0 y 12 horas. Los resultados obtenidos han mostrado que ambos sistemas de la presente invención liberan lentamente el fármaco hasta un máximo de 50 % p/p en el plazo de 12 horas para los VLN-B recubiertos con INU-DETA y hasta un máximo de 30 % p/p en el plazo de 12 horas para VLN-B recubiertos con quitosano. Los perfiles de liberación y disolución del fármaco silibinina de los 2 sistemas recubiertos después de la incubación a pH 7,4 y a 37 °C se muestran en la Figura 2.

Preparación de micelas poliméricas basadas en INU-C₈ y INU-C₈-PEG₂₀₀₀ (las formulaciones que comprenden sorafenib, curcumina y latanoprost no son según la invención y se desvelan simplemente para fines de referencia)

[0080] A modo de ejemplo no limitante, se describen en lo sucesivo el procedimiento y los datos experimentales obtenidos con el objeto de micelas poliméricas de la invención basándose en INU-C₈ y INU-C₈-PEG₂₀₀₀, cargadas con silibinina o sorafenib.

Determinación de la concentración de agregación crítica (CAC) de copolímeros de INU-C₈ y INU-C₈-PEG₂₀₀₀

[0081] Se llevó a cabo la producción de copolímeros de INU-C₈ y INU-C₈-PEG₂₀₀₀, con un buen rendimiento, siguiendo los procedimientos ya existentes en la bibliografía.

[0082] Se determinó la CAC de copolímeros de INU-C₈ y INU-C₈-PEG₂₀₀₀ por análisis espectrofluorimétrico, usando pireno como sonda fluorescente. Se dispusieron 20 µl de una disolución de pireno en acetona ($6,0 \times 10^{-5}$ M) en viales y se evaporaron a 37 °C en un agitador orbital hasta sequedad. Después, se añadieron 2 ml de una disolución acuosa de copolímero a concentración creciente y en el intervalo entre 1×10^{-5} y 5 mg/ml en los viales que contienen el residuo de pireno para obtener una concentración final de pireno igual a $6,0 \times 10^{-7}$ M. La dispersión así obtenida se mantuvo a 37 °C durante 24 horas con agitación constante para equilibrar la sonda con las micelas. Se registraron los espectros de emisión y excitación de pireno usando las siguientes longitudes de onda, respectivamente: 373 nm y 333 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3
CAC de algunos copolímeros preparados

COPOLÍMERO	CAC (mg/ml)
INU-C ₈	0,3
INU-C ₈ -PEG	1,2

Preparación de micelas poliméricas de INU-C₈ y INU-C₈-PEG cargadas con silibinina o sorafenib (las formulaciones que comprenden sorafenib, curcumina y latanoprost no son según la invención y se desvelan simplemente para fines referencia fines).

[0083] Se prepararon las micelas poliméricas cargadas con silibinina y sorafenib mediante el método de complejación en seco (amasado). Con detalle, se mezclaron en seco 200 mg de INU-C₈ o INU-C₈-PEG con el fármaco (50 mg) usando un mortero y pistilo y se molieron en presencia de etanol (5 ml). Después, se dispersó la matriz seca formada por el polímero en donde el fármaco se dispersó uniformemente, obtenido después de la evaporación de etanol, se hidrató lentamente y con agitación mecánica para promover la auto-agregación de unímeros y la incorporación del fármaco dentro del núcleo hidrófobo de las micelas resultantes.

[0084] Se sometió la dispersión resultante a ciclos de sonicación y agitación (3 ciclos de 10 minutos). Después, la dispersión se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos y se filtró sobre filtros de jeringa con 5 µm de corte para retirar el fármaco no incorporado. Finalmente, se congeló en nitrógeno líquido la dispersión resultante y se liofilizó.

[0085] Determinación del % de DL de las micelas poliméricas de INU-C₈ y INU-C₈-PEG₂₀₀₀ se dispersaron 3 mg de micelas cargadas con silibinina o cargadas con sorafenib en metanol (5 ml); se sonicó la dispersión durante 10

minutos y luego se dejó con agitación vigorosa durante 4 horas. Después de ese tiempo, la dispersión se filtró usando un filtro de jeringa con 0,2 µm de corte, y finalmente se lavaron los filtros con metanol (5 ml) para obtener un volumen final de 10 ml. Para la determinación de silibinina a 600 µl de la disolución en metanol obtenida del procedimiento de extracción, se añadieron 400 µl de 1 % de ácido acético (v/v) para cumplir la composición de la mezcla de eluyentes usada para el análisis de HPLC. Por tanto, la cantidad de fármaco extraída de las micelas se determinó mediante análisis de HPLC, usando una columna de C6-fenilmetanol:ácido acético a 1 % (v/v) (60:40) como fase eluyente. El caudal se estableció a 0,65 ml/min y el eluato se monitorizó a 288 nm.

[0086] Para la determinación de sorafenib, se analizó directamente por HPLC 1 ml de la disolución en metanol obtenida del procedimiento de extracción para determinar la cantidad de fármaco incorporada por las micelas. El análisis de HPLC se realizó usando una columna de C6-fenilmetanol:agua (v/v) (90:10) como fase de eluyente. El caudal se estableció a 1 ml/min y el eluato se monitorizó a 266 nm.

Los resultados se muestran en la Tabla 4. Determinación del tamaño medio y del potencial zeta de micelas poliméricas de INU-C8 y INU-C8-PEG

[0087] Se determinó la distribución de tamaño de micelas mediante mediciones de dispersión dinámica de la luz usando Malvern Zetasizer Nano ZS. Estas mediciones se realizaron a un ángulo fijo de 173° y a una temperatura de 25 °C. Se analizaron las disoluciones acuosas de micelas (2 mg/ml) después de la filtración a través de filtros de membrana de celulosa con 5 µm de corte. Se obtuvieron el diámetro hidrodinámico promedio y el índice de polidispersidad (PDI) usando análisis acumulados de la función de correlación. Se calculó el potencial zeta (mV) por la movilidad electroforética y usando la relación de Smoluchowsky, suponiendo que $K \cdot a \gg 1$ (donde K y a son el parámetro de Debye-Hückel y el radio de partícula, respectivamente). Los resultados se muestran en la Tabla 4. Como se puede apreciar, todos los copolímeros son capaces de incorporar los fármacos hidrófobos sorafenib y silibinina.

Tabla 4

Micelas	Diámetro promedio (nm)	DI	Potencial zeta (mV)	Carga de fármaco ^a (%)
INU-C ₈ -Silibinina	164,9	0,27	+21,9±3,82	1,7±0,5
INU-C ₈ -PEG-Silibinina	166,7	0,46	+18,5±3,5	1,8±0,1
INU-C ₈ -Sorafenib	150,4	0,16	+19,9±4	18,45
INU-C ₈ -PEG-Sorafenib	179,7	0,18	+26,5±3,7	11,41

^a La carga de fármaco se refiere a sorafenib y silibinina

Estudios de liberación

[0088] Para evaluar la capacidad de los sistemas obtenidos para liberar el fármaco incorporado, se dispersaron cantidades apropiadas de micelas poliméricas de INU-C8 y INU-C8-PEG (15 mg) en PBS, pH 7,4 (5 ml) y se transfirieron en una membrana de diálisis de flotación Spectra/Por con corte nominal (MWCO) de 1 kDa. Se sumergieron en PBS a pH 7,4 (50 ml) las membranas de diálisis que contienen las dispersiones de micelas cargadas con fármaco y el fármaco solo y se incubaron a 37 °C durante 24 horas con agitación continua (100 rpm) en una estufa de incubación Benchtop 808C Orbital Shaker modelo 420. A intervalos de tiempo programados, se tomaron alícuotas de medio externo (1 ml) del exterior de la membrana de diálisis y se sustituyeron con una cantidad igual de medio fresco. Las muestras tomadas se liofilizaron, se suspendieron en metanol:ácido acético 1 % (v/v) y se analizaron por HPLC para determinar la cantidad de fármaco liberada. A modo de ejemplo, se muestra el gráfico de liberación del principio activo silibinina incorporado en los sistemas. Todos los datos de liberación obtenidos se compararon con el perfil de difusión de silibinina sola (0,25 mg), obtenido usando el mismo procedimiento (Figura 3). Los datos se corrigieron teniendo en cuenta el proceso de dilución. Cada experimento se realizó por triplicado y se encontró que los resultados estaban en conformidad con el error estándar ± 5 %. Como se puede apreciar del gráfico, las micelas poliméricas de INU-C8 y INU-C8-PEG cargadas con silibinina muestran una cinética de liberación muy lenta en comparación con la difusión de silibinina libre (menos de 5 % p/p de silibinina es liberada después de 12 h de incubación). También se obtuvieron perfiles de liberación similares para el principio activo sorafenib.

Estudios de estabilidad

[0089] Se evaluó la estabilidad de micelas de INU-C8 y INU-C8-PEG cargadas con silibinina o sorafenib incubando los sistemas recién liofilizados durante 1, 2 y 3 meses a 4 °C y 25 °C. En particular, las muestras recién preparadas y liofilizadas se almacenaron a una temperatura controlada durante 1, 2 y 3 meses. Después del periodo de incubación, las muestras se dispersaron en agua bidestilada (2 mg/ml) y se analizaron por mediciones de dispersión dinámica de la luz para evaluar el diámetro medio, índice de polidispersidad y potencial zeta de las mismas. Por separado, se dispersaron 3 mg de muestra en metanol (5 ml); la dispersión se sonicó primero durante 10 minutos y

se agitó durante 2 h y finalmente se filtró a través de filtros de jeringa con 5 µm de corte y se diluyó con 5 ml adicionales de metanol. Se determinó la cantidad de principio activo extraído mediante análisis de HPLC, usando el mismo procedimiento descrito para la determinación de la carga de fármaco.

5 **[0090]** Los resultados obtenidos muestran que tanto las micelas preparadas como el fármaco cargado tienen buena estabilidad física durante largos periodos de almacenamiento. Como un ejemplo, la Tabla 5 muestra los datos de estabilidad relacionados con micelas INU-C8 cargadas con silibinina o sorafenib obtenidas mediante mediciones de dispersión dinámica de la luz para evaluar los cambios en el diámetro medio, en el PDI y en el potencial zeta, y el análisis de HPLC para evaluar la carga de fármaco y la estabilidad del fármaco cargado.

10

Tabla 5
Estabilidad de micelas INU-C8 cargadas con silibinina/sorafenib, después de 1, 2 y 3 meses de almacenamiento a 4 y 25 °C.

Micelas de INU-C ₈				
Tiempo de incubación	Diámetro medio (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Carga de fármaco (%)
Tiempo 0	164,9	0,27	+21,9±3,82	1,7±0,5
1 mes 4 °C	153,3	0,37	+10,9±4,3	1,9±0,9
1 mes 25 °C	188,2	0,26	+10,9±4,2	1,7±0,9
2 meses 4 °C	195,8	0,39	+7,38±3,4	1,7±0,3
2 meses 25 °C	185,6	0,44	+6,37±3,9	1,7±0,7
3 meses 4 °C	137,8	0,32	+8,76±4,5	1,7±0,3
3 meses 25 °C	151,6	0,38	+7,88±3,3	1,7±0,7

Micelas de INU-C ₈ -Sorafenib				
Tiempo de incubación	Diámetro medio (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Carga de fármaco (%)
Tiempo 0	150,4	0,16	+19,9±4	18,4±0,5
1 mes 4 °C	153,8	0,15	+23,82±4,72	19±0,9
1 mes 25 °C	198,5	0,098	+29,9±5,39	17±0,9
2 meses 4 °C	160,8	0,15	+31,6±5,46	17,5±0,3
2 meses 25 °C	431,8	0,29	-0,644±3,33	18,3±0,7
3 meses 4 °C	250,3	0,22	+15,7±5,5	18,1±0,3
3 meses 25 °C	318	0,273	+17,1±3,4	17,3±0,7

Estudios de citocompatibilidad *in vitro*

15 **[0091]** Se evaluó la biocompatibilidad de micelas vacías de INU-C8 y INU-C8-PEG en la línea celular de epitelio bronquial humano (16HBE) mediante ensayo de MTS, usando un kit comercial (ensayo Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation, Promega). Se sembraron las células en placas de 96 pocillos con una densidad de 2·10⁴ células por pocillo, y se suspendieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), enriquecido con 10 % vol/vol de suero bovino fetal (FBS), 1 % vol/vol de antibióticos (10 mg/ml de estreptomycin 10000 U-1 ml de penicilina), y se incubaron en condiciones estándar (95 % de HR y 5 % de CO₂ a 37 °C). Después de 24 horas de incubación, se retiró el medio y se sustituyó con 200 µl de medio fresco que contenía las micelas vacías de INU-C8 y 20 **[0091]** INU-C8-PEG a una concentración igual a 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 y 1 mg/ml. Después de 4 y 24 horas de incubación, se retiró la dispersión de micelas en DMEM, se lavaron las células 1 vez con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) y se incubaron durante 2 horas a 37 °C con 100 µl de medio fresco y 20 µl de disolución de MTS. Se usaron las células incubadas con DMEM solo como controles negativos. Los resultados se 25 expresaron como el porcentaje de reducción de la viabilidad celular en comparación con las células de control (Figura 4a y 4b). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

30 **[0092]** Los estudios realizados muestran que las micelas poliméricas probadas tienen una buena citocompatibilidad y no presentan efectos citotóxicos *in vitro* en la línea celular de epitelio bronquial humano. Este resultado hace que estos sistemas sean posiblemente utilizables como sistemas eficientes para la administración *in vivo* de fármacos. También se confirmó la biocompatibilidad de los sistemas vacíos y cargados con los principios activos estudiados en células retinianas ARPE-19 y en células epiteliales de la córnea SIRC.

35 **[0093]** Se evaluaron los vehículos micelares INU-C8 y INU-C8-PEG conjugados con silibinina o con tosilato de sorafenib para el efecto protector sobre las células retinianas expuestas a un pretratamiento de 20 h y luego se atacaron con H₂O₂ para inducir un estrés oxidativo. El vehículo vacío y INUC8PEG conjugado muestra una acción protectora superior al vehículo sin PEG, sin embargo solo el vehículo INUC8PEG conjugado con silibinina o con sorafenib es capaz de provocar una disminución en la liberación de LDH a mayores concentraciones debido a la presencia de PEG. A modo de ejemplo, las Fig. 5A y Fig. 6 muestran los datos de ensayo experimentales del 40 sistema conjugado con el principio activo sorafenib o silibinina, respectivamente.

[0094] En un protocolo post-tratamiento, las células retinianas atacadas durante tres horas con H₂O₂ y

posteriormente expuestas a tratamiento con los sistemas INU-C8 y INU-C8-PEG conjugados con silibinina o sorafenib muestran una buena capacidad de ambos vehículos para revertir el daño inducido por el ataque. Sin embargo, el sistema INUC8PEG conjugado con cualquier principio activo es más eficaz en inhibir el estrés inducido por H₂O₂. A modo de ejemplo, las Fig. 5B y Fig. 6B muestran los datos de ensayo experimentales del sistema conjugado con el principio activo sorafenib o silibinina, respectivamente.

[0095] Se analizaron lisados de células retinianas expuestas a post-tratamiento con el sistema INUC8PEG, vacío o conjugado con silibinina, por transferencia Western para la expresión de la proteína PARP-1, una poli(ADP-ribosa) polimerasa de 116 kDa implicada en la reparación de ADN en respuesta a estrés medioambiental (Calcium Overload Is A Critical Step In Programmed Necrosis Of Arpe-19 Cells Induced By High-Concentration H₂O₂ Guang-Yu Li et al., (2010) Biomedical And Environmental Sciences). *In vivo* e *in vitro*, PARP-1 se procesa por caspasa 3 y caspasa 7 con formación de un dominio de unión a ADN de 24 kDa y un dominio catalítico de 89 kDa que participa en la apoptosis (*Importance of Poly (ADP-ribose) Polymerase and Its Cleavage in Apoptosis* F.J Oliver et al., (1998) J. Biol. Chem.). La Fig. 7 muestra una reducción en la proteína PARP-1 tras el tratamiento con H₂O₂ que confirma el estado de célula apoptótica. En cambio, en las muestras tratadas con el vehículo conjugado, se observa mayor expresión de PARP-1 en comparación con el vehículo libre y el propio Slb. La capacidad de INUC8PEG conjugado con Slb para inhibir la apoptosis inducida por el daño oxidativo se confirma de un modo dependiente de la dosis en las muestras tratadas con H₂O₂. El post-tratamiento con Slb libre reduce el proceso apoptótico, sin embargo con menos eficiencia que el vehículo conjugado.

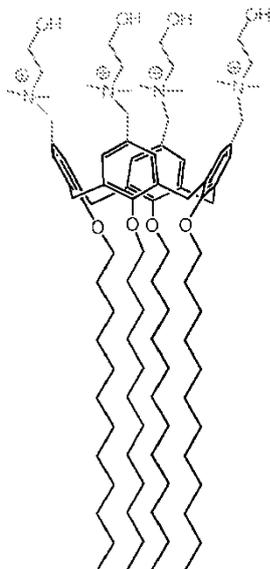
Ejemplo 4 (Formulaciones que comprenden sorafenib, curcumina y latanoprost no son según la invención y se desvelan simplemente para fines de referencia)

Preparación de nanopartículas de calixareno

[0096] Como un ejemplo, se describe en lo sucesivo el procedimiento y los datos experimentales obtenidos con el derivado de calix[4]areno (compuesto 1) - cargado con silibinina, curcumina o latanoprost.

Preparación

[0097] Se sintetizó derivado de calix[4]areno anfifílico que lleva cuatro cadenas alifáticas de dodecilo en el borde inferior del macrociclo y cuatro cabezas polares de colina en el borde superior (compuesto 1), con buen rendimiento, adaptando a un procedimiento descrito en la bibliografía para derivados similares. El compuesto se caracterizó por espectroscopía de RMN y espectrometría de masas.



Compuesto 1

[0098] El ensamblaje del derivado de calixareno en nanoagregados ocurre espontáneamente. La simple disolución en PBS (pH 7,4) proporciona una disolución coloidal que contiene nanoagregados con el tamaño, índice de polidispersidad y potencial zeta mostrados en la Tabla 6. Se llevó a cabo la carga de fármaco añadiendo un exceso de fármaco (relación molar 1:5) a la disolución coloidal como cuerpo inferior. Se expuso la mezcla a ultrasonidos durante 15 minutos y se agitó en un agitador a 25 °C, 200 rpm, durante 2-3 días. La posterior centrifugación a 4000 rpm durante 30 minutos y la filtración sobre filtro GHP Acrodisc 0,2 μm proporciona una disolución coloidal de nanopartículas cargadas con silibinina. La liofilización de esta disolución, sin la adición de crioprotectores y usando un liofilizador estándar, proporciona un polvo blanco que resuspendido en agua restaura la disolución coloidal de

nanopartículas cargadas con fármaco. La re-filtración de la disolución coloidal sobre el filtro GHP Acrodisc 0,2 µm y el posterior análisis de HPLC para determinar el % de DL muestra que, tras la liofilización, el sistema retiene la carga de fármaco incorporada (Tabla 6).

5 Determinación de tamaño y medición del potencial zeta

[0099] Se midieron el diámetro promedio, índice de polidispersidad (PDI) y potencial zeta de nanopartículas de calixareno cargadas y no con silibinina usando un Zetasizer Nano ZS-90 (Malvern Instrument), la lectura se hizo a un ángulo de 90° con respecto al rayo incidente y se analizó por triplicado. Los resultados obtenidos para el diámetro medio, PDI y potencial zeta se dan en la Tabla 6.

Tabla 6

Diámetro medio hidrodinámico, índice de polidispersidad (PDI), potencial zeta de los nanoagregados de calixareno.			
DLS (en PBS, pH 7,4)			
	Z-promedio (nm)	PDI	Potencial ζ (mV±DE)
Nanopartícula de calixareno (NP)	44,3	0,29	24
Nanopartícula de calixareno-silibinina	77,8	0,3	23,4
NP-silibinina POST-liofilización	81,5	0,35	23

15 Determinación de la carga de fármaco (% de DL) de la nanopartícula de calixareno

[0100] Para determinar la cantidad de silibinina cargada en una disolución coloidal que contiene 1 mg/ml de nanopartícula de calixareno, se diluyó una alícuota de la disolución con metanol y se analizó por HPLC. Se midió la cantidad de fármaco considerando la banda de absorción de silibinina a 288 nm. La cantidad de fármaco también se midió en el espectro de UV considerando la banda de 327 nm de silibinina en PBS.

[0101] Se encontró que el resultado obtenido en términos de % de DL (expresado como un porcentaje de la relación entre el peso del principio activo cargado y el peso del principio activo cargado + peso de la nanopartícula) era igual a 10-11 %.

25 Liberación de silibinina de NP de calixareno en PBS a pH 7,4

[0102] Se investigó la liberación de silibinina en tampón fosfato a pH 7,4 *in vitro* a 37 °C con tiempos de incubación en el intervalo entre 0 y 12 horas por diálisis. Los resultados obtenidos han mostrado que el sistema libera lentamente el fármaco hasta un máximo de 6,5 % p/p en el plazo de 12 horas (Figura 7). La lenta liberación podría ser ventajosa con el fin de la administración de fármaco en el sitio patológico.

Estudio de estabilidad de la nanopartícula de calixareno cargada con silibinina en PBS a pH 7,4

[0103] Se evaluó la estabilidad de nanopartículas de calixareno cargadas con silibinina manteniendo las disoluciones coloidales en PBS a 25 °C. Los controles a 7 y 14 días desde la preparación muestran valores de tamaño, PDI y % de DL prácticamente invariables (Tabla 10). La estabilidad de la formulación es un requisito farmacológico importante (por ejemplo, logro de los sitios patológicos en la parte posterior del ojo) y de industrialización.

Tabla 10

Estabilidad de la disolución coloidal de nanopartícula de calixareno-silibinina después de 7 y 14 días a 25 °C.

Tiempo de incubación	Diámetro promedio (nm)	PDI
Tiempo 0	77,8	0,3
7 d	78,8	0,3
14 d	80,6	0,3

[0104] Tras las investigaciones preliminares del vehículo de calixareno-colina conjugado con silibinina en células ARPE-19, se determinó que las concentraciones del vehículo, o libre o conjugado con Slb, incluidas en el intervalo 0,01-1 µM e incubadas durante 20 horas no causaron toxicidad. Entonces, se probaron los efectos del sistema conjugado y vacío usando el compuesto FeSO₄ como ataque oxidativo, con cambios en el estado celular de oxidación-reducción. Durante las 24 horas de incubación, las células se pretratan durante 20 h y luego se exponen al ataque con FeSO₄ 50 µM durante tres horas ["Pretratamiento" 20 h de fármaco + 3 h de ataque]. La prueba de viabilidad realizada para evaluar la toxicidad y la capacidad de protección del daño del vehículo en cuestión es para evaluar la liberación de LDH en el medio de cultivo. La Fig. 8A muestra una curva de dosis del vehículo conjugado con Slb (CalixSlb), del vehículo vacío (Calix) y de silibinina sola (Slb) en células ARPE sometidas o no al ataque con FeSO₄ 50 µM. Se observa que Slb reduce la liberación de LDH, mientras que Calix Slb y Calix vacío no cambian significativamente la liberación de LDH de células ARPE-19. En cambio, cuando las células se exponen a FeSO₄

(50 μM), Calix Slb muestra buen potencial en reducir la liberación de LDH, un efecto no observado en las muestras tratadas con Calix y Slb individualmente. Estos resultados sugieren que calix y Slb pueden preparar juntos las células hacia una protección contra cambios en el estado de oxidación-reducción. En experimentos posteriores, se probaron los efectos del post-tratamiento con compuestos basados en calixareno. Por tanto, se trataron células con

5 FeSO_4 50 μM durante 5 horas y se incubaron durante 20 horas con los diversos compuestos. Como se muestra en la Fig. 8B, CalixSlb protege contra el ataque incluso en condiciones post-tratamiento y el efecto se confirma como una acción sinérgica de los dos compuestos que son individualmente capaces de proteger de la alteración del estado de oxidación-reducción.

10 **[0105]** La Fig. 9A muestra el análisis de transferencia Western de VEGF que muestra una reducción en los niveles de expresión de VEGF soluble después del ataque con FeSO_4 , esta reducción se anula por Calix vacío, por Slb y por Calix Slb a la concentración 1 μM de Calix Slb. En realidad, Calix Slb en sí mismo es capaz de aumentar los niveles de VEGF. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones informadas por Lin et al. (Silibinin inhibits VEGF secretion and age-related macular degeneration in a hypoxia-dependent manner through the PI-3 kinase/Akt/mTOR pathway CH Lin et al., (2013) British Journal of Pharmacology) sobre la inhibición de la secreción de VEGF en condiciones hipóxicas de células ARPRES y pretratamiento con el fármaco. La ausencia de secreción conduce a la ausencia de VEGF libre, que no puede actuar de auto-regulador de (señalización autocrina) con disminución concomitante del proceso angiogénico.

20 **[0106]** La catepsina D es una aspartil proteasa intracelular, sintetizada en el retículo endoplásmico como pre-proenzima que se procesa para generar fragmentos activos. Según el entorno celular en el que reside, puede inducir o inhibir la apoptosis mediante diferentes mecanismos. El fragmento de 48 kDa es una forma intermedia activa de la que se generan dos fragmentos activos adicionales; por tanto, su reducción está asociada con la activación del proceso proteolítico, viceversa, su aumento es indicativo de una inhibición de la apoptosis. En presencia de estrés oxidativo, la activación de catepsina D puede activar la caspasa 8, que a su vez activa la caspasa 3, que conduce a muerte celular (Regulatory role of cathepsin D in apoptosis, A. Minarowska et al., (2007) Folia Histochemica et Cytobiologica) (Caspase-8-mediated apoptosis induced by oxidative stress is independent of the intrinsic pathway and dependent on cathepsins H.K. Baumgartner et al., (2007) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.). Como se muestra en la Fig. 9B, la exposición de células a FeSO_4 da como resultado una reducción de la banda de 48 kDa de catepsina D. El post-tratamiento con Calix o Slb aumenta los niveles de expresión de catepsina D, pero el mayor aumento en la proteína se observa en muestras tratadas con Calix Slb, confirmando el efecto potenciador del conjugado en términos de actividad protectora, que se detecta como la inhibición del proceso apoptótico en el que participa la catepsina D.

35 **[0107]** El compuesto de vehículo de calixareno (1) tiende él mismo a cargar una variedad de moléculas hidrófobas. En el presente documento, como un ejemplo, se cargó con curcumina y latanoprost, además de silibinina. Los principios activos anteriores se caracterizan por la baja solubilidad en agua, fácil degradación química y enzimática, y baja biodisponibilidad. La curcumina y la silibinina son sustancias naturales que se usan en una variedad de condiciones que varían desde inflamación hasta cáncer, latanoprost es un análogo de prostaglandina F2 α usado en el tratamiento de glaucoma, una afección que es todavía la principal causa de ceguera irreversible en el mundo.

40 **[0108]** También para estos principios activos, la carga de principio activo en el compuesto de nanoagregado (1) ocurre mediante el método de solubilidad de fase con carga de fármaco $\geq 10\%$. La dosificación del principio activo se realizó por análisis de HPLC y espectroscopía UV.

45 **[0109]** El nanoagregado (compuesto 1) cargado con principio activo se caracterizó por mediciones de DLS y potencial zeta, que mostraron que las nanodimensiones, el índice de polidispersidad y la carga superficial son todavía adecuados para *sistemas de administración de fármacos* (Tabla 11)

50 **Tabla 11**
Características químicas y fisicoquímicos del agregado 1 cargado con el principio activo curcumina o latanoprost

Requisitos químico-físicos	Vehículo-Curcumina	Vehículo-Latanoprost
Dimensiones ≤ 100 nm	Z promedio 82 nm, D _H 113 nm	Z= 65,7 nm
Polidispersidad $\leq 0,5$	0,2	PDI= 0,26
Potencial zeta $\neq 0$	23 mV	
Estabilidad en PBS a temperatura ambiente	DLS estable, [fármaco], LC durante 15 días	DLS estable, [fármaco], LC después de 4 meses
Esterilizabilidad	Filtración 0,2 μm	Filtración 0,2 μm
% de carga de fármaco	10 %	45 %
% de liberación de fármaco	20-30 % de EtOH/PBS 1-27 % 24 h	

[0110] El calixareno 1 aumenta la solubilidad de curcumina, así como de silibinina, en medio acuoso en al menos diez veces.

55 **[0111]** El calixareno 1 protege la curcumina en PBS como disolvente, que muestra una degradación de 80-90 % en 30 min con PBS 0,1 M y en medio sin suero (Fig. 10).

[0112] El calixareno 1 protege latanoprost de la degradación (Tabla 12) en PBS como disolvente a temperatura ambiente durante más de 6 meses. Esto es un resultado interesante, debido a que permite la producción de una formulación innovadora que, a diferencia de la actualmente a la venta, se libera de la cadena del frío y está libre de conservantes.

5

Tabla 12
Estabilidad de la disolución coloidal de calixareno-latanoprost hasta 4 meses desde la preparación en PBS a temperatura ambiente: tamaño, PDI, concentración de latanoprost

días	Z promedio		PDI		[fármaco]	
	TA	4 °C	TA	4 °C	TA	4 °C
0	69,2	69,2	0,26	0,26	52	54
6	72,0	72,3	0,30	0,29	54	56
14	69,0	68,2	0,30	0,32	54	57
34	72,6	69,6	0,34	0,33	55	56
48	66,9	66,3	0,35	0,31	52	54
92	76,8	78,0	0,39	0,37	53	58
130	65,3	68,9	0,31	0,29	50	53

[0113] Se probaron las disoluciones coloidales de calixareno 1, calixareno cargado con principio activo y principio activo solo para citotoxicidad: células de la córnea SIRC (Fig. 11), macrófagos J774 (Fig. 12) y células retinianas ARPE. Los resultados mostraron buena biocompatibilidad de calixareno y de la combinación de calixareno-principio activo en todos los tipos de células probadas.

10

[0114] Se probó la actividad antiinflamatoria de las disoluciones coloidales de calixareno 1, calixareno-curcumina y curcumina sola *in vitro* en células J774 sometidas a estrés inflamatorio por el ataque con LPS. En particular, se estimularon células J774 con lipopolisacárido (LPS) a una concentración de 10 µg/ml durante 24 horas, la estimulación con LPS induce la activación de procesos inflamatorios tales como la translocalización nuclear de NFκB y la producción de citocinas, pero también la liberación de nitritos y el estrés nitrosativo. Entonces se evaluó la viabilidad celular tras la estimulación con LPS (10 µg/ml durante 24 horas) y el pretratamiento de 2 horas de los sistemas de administración que se estudiaron a las diferentes concentraciones. La viabilidad celular tras la estimulación con LPS se redujo en 50 %, el tratamiento con las sustancias que se examinaron, tales como curcumina, vehículo y vehículo asociado a curcumina, fue capaz de restaurar la viabilidad celular, casi devolviéndola a los niveles de control, excepto por las mayores concentraciones que ya parecieron ser tóxicas para las células atacadas (Fig. 13). Entonces se evaluó la actividad antiinflamatoria de los sistemas de administración mediante el análisis de transferencia Western. En primer lugar, se observaron la degradación de IκBα (Fig. 14) y la consecuente translocalización de NFκB al núcleo (Fig. 15), que conduce a la producción y activación de genes pro-inflamatorios tales como los que codifican citocinas. Los resultados muestran que la estimulación con LPS (10 µg/ml durante 30 min) aumenta significativamente la degradación de IκBα y la posterior translocalización de NFκB al núcleo (cuyos niveles son significativamente elevados, como se puede apreciar en la Figura 15). Por el contrario, el pretratamiento con los sistemas de administración es capaz de reducir significativamente la degradación de translocalización de IκBα y NFκB (Figura 15). La activación de NFκB implica la producción de proteínas y mediadores inflamatorios tales como ciclooxigenasa 2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y el consecuente aumento en la producción de nitritos. Mediante el análisis de transferencia Western, se observó que la estimulación con LPS (10 µg/ml durante 24 horas) aumenta significativamente tanto el nivel de iNOS y de COX-2. El pre-tratamiento con curcumina, vehículo y vehículo asociado a curcumina reduce significativamente y de un modo dependiente de la dosis los niveles de iNOS y COX-2 (Fig. 16)

15

20

25

30

35

[0115] El derivado de calixareno no solo lleva a cabo su actividad como vehículo, sino que también tiene actividad antiinflamatoria sobre los macrófagos sometidos a estrés inflamatorio con LPS. Las pruebas realizadas mostraron una actividad antiinflamatoria de calixareno cargado con curcumina >> calixareno >> curcumina sola.

40

45

50

[0116] Con el objetivo de verificar la eficacia del sistema de calixareno cargado con el principio activo al sitio de interés del ojo, se realizó un experimento *in vivo* con un modelo de uveítis. Se indujo la uveítis en ratas Lewis de 160-180 g por una única inyección subcutánea en la pata trasera de 200 µg de la endotoxina LPS de *Salmonella minnesota* diluida en 0,2 ml de PBS, pH 7,4. El grupo de control recibió solo 0,2 ml de PBS en la pata trasera. Las ratas se dividieron en grupos de tratamiento (sistema de calixareno, calixareno-silibinina, silibinina sola, calixareno-curcumina y curcumina sola); se pretrataron por administración tópica durante tres días antes de la inducción de uveítis, y después hasta el momento del sacrificio, que ocurrió para algunos animales a las 16 y para otros a las 72 horas después de la inyección de la endotoxina. Se enuclearon los ojos para análisis histológicos e inmunohistoquímicos. También se tomó el humor acuoso para la dosificación de proteína. El análisis histológico de los tejidos oculares de animales inyectados con LPS mostró signos de uveítis grave con una fuerte infiltración de neutrófilos. En animales tratados con vehículo solo, no se redujo el grado de inflamación. El tratamiento con silibinina mostró una inflamación ocular reducida pero no significativa, mientras que la asociación del sistema calixareno+silibinina redujo el daño.

50

[0117] Sin embargo, el tratamiento con curcumina y en particular con la combinación de calixareno+curcumina

disminuyó significativamente el daño histológico. No se observó inflamación ocular en el grupo de referencia.

5 **[0118]** Además, no se observó diferencia significativa entre los grupos a las 16 h y 72 h. A modo de ejemplo, se muestra el gráfico que resume la puntuación histológica registrada para los diversos grupos en el tiempo 72 h (Fig. 17A). A las 16 y 72 horas después de la inyección de LPS, se observaron elevados niveles de proteína en el humor acuoso de animales inyectados con LPS. El tratamiento con el vehículo solo no dio como resultado una reducción en los niveles de proteína en el tejido del ojo. Los animales tratados con silibinina mostraron una tendencia pero no significativa, mientras que la combinación del sistema calixareno+silibinina redujo significativamente el nivel de proteínas en el humor acuoso. Sin embargo, la combinación de curcumina y el sistema calixareno+silibinina determinó más eficazmente la reducción de proteínas en el tejido ocular. Las muestras tomadas a las 16 h y a 72 h mostraron una tendencia similar en todos los grupos experimentales, a modo de ejemplo, se muestra el gráfico con la dosificación de proteína encontrada en el tiempo 72 h para los diversos grupos de tratamiento (Figura 17B).

10 **[0119]** Para verificar la eficacia del sistema de calixareno cargado con latanoprost, se estableció un experimento *in vivo* con un modelo de hipertensión ocular inducida en ratas Brown Norway por cauterización de la vena episcleral (EVC).

15 **[0120]** Los tratamientos se llevaron a cabo una vez al día por instilación de 12 µl/ojo (ojo izquierdo); el protocolo ejecutivo implicó un tratamiento de administración única durante la evolución temporal del sistema de vehículo con el principio activo, durante el que se tomaron mediciones de la presión intraocular (IOP) después de 1 h, 3 h, 5 h, 7 h, 20 24 h, 30 h y 48 h; y una administración crónica durante siete días consecutivos durante los que se evaluó la medición de IOP cada 24 h antes de la siguiente instilación.

25 **[0121]** Para cada tratamiento se hicieron grupos, cada uno de los cuales consistió en diez animales; se compararon las mediciones medias de IOP registradas en los diferentes puntos de tiempo con el valor medio del nivel inicial, previamente calculado. Los gráficos (Figura 18 A/B) muestran la tendencia de reducir la presión intraocular (IOP) tras el tratamiento con Calix+latanoprost en comparación con el producto comercial (IOPIZE), ambos después de la administración única siguiendo la evolución temporal en diferentes momentos de tiempo (Figura 18 A), y tras el tratamiento crónico durante siete días (Figura 18 B).

30 **[0122]** La tendencia de variación de presión para los dos tratamientos es bastante similar, tanto en el caso del sistema calixareno-latanoprost como en el caso del producto IOPIZE se observa un efecto paradójico de latanoprost durante las primeras horas inmediatamente tras la administración y que consiste en un marcado aumento en la IOP, este efecto conocido en la bibliografía es típico en ratas (Latanoprost-induced changes in rat intraocular pressure: direct or indirect? Husain S et al. J Ocul Pharmacol Ther. (2008); Effects of latanoprost on rodent intraocular pressure. Husain S et al. Exp Eye Res. (2006)), luego ocurre una reducción gradual de la presión que alcanza su pico solo después de 24 h hasta luego tender a aumentar. El tratamiento crónico con la administración cada 24 h permitió una reducción de IOP que alcanzaba su mayor punto de flexión alrededor del cuarto día con el sistema calixareno-latanoprost. El sistema de calixareno en comparación con los productos comerciales ofrece la ventaja de liberar el producto de la cadena del frío, de formular el producto sin conservantes mientras se mantiene la eficacia del principio activo.

REIVINDICACIONES

1. Formulaciones que contienen el principio activo silibinina en donde dicho principio activo se incorpora en:

- 5 (1) sistemas de nanopartículas lipídicas del tipo NLS, Nanopartículas Lipídicas Sólidas, y VLN, Vehículos Lipídicos Nanoestructurados;
- (2) sistemas nanoestructurados basados en calixareno; o
- 10 (3) sistemas micelares y de nanopartículas basados en copolímeros de inulina anfifílicos; para su uso en el tratamiento tópico de enfermedades oculares neurodegenerativas seleccionadas de: neovascularización coroidea (NVC), degeneración macular senil (DMS), edema macular, glaucoma neovascular, retinopatía de la prematuridad (RP), retinopatía diabética (RD), uveítis, endoftalmítis, retinitis, coroiditis, corioretinitis, y complicaciones retinianas de enfermedades sistémicas.
- 15 2. Formulaciones para el uso según la reivindicación 1, en donde dichos sistemas de nanopartículas lipídicas consisten en lípidos seleccionados de: triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, alcoholes alifáticos, ácidos grasos (C10-C22); ésteres de ácidos grasos con alcoholes grasos, mezclas de mono-, di- y triglicéridos de ácido behénico pegilado, y mono-, di- y triglicéridos de ácidos caprílicos y caproicos pegilados.
- 20 3. Formulaciones para el uso según la reivindicación 1 que comprende además mucoadhesivos.
4. Formulaciones para el uso según la reivindicación 3, en donde dichos mucoadhesivos se seleccionan de: polímeros de inulina que llevan grupos amino, polímeros de bajo peso molecular y tensioactivos catiónicos.
- 25 5. Formulaciones para su uso según las reivindicaciones 1-4, en donde dichos sistemas de nanopartículas tienen un diámetro medio en el intervalo entre 50 y 200 nm con un índice de polidispersidad inferior a 0,5.
6. Formulaciones para el uso según la reivindicación 1, en donde dichos sistemas incorporan una cantidad del principio activo silibinina en el intervalo entre 1 y 15 %p/p.

Figura 1

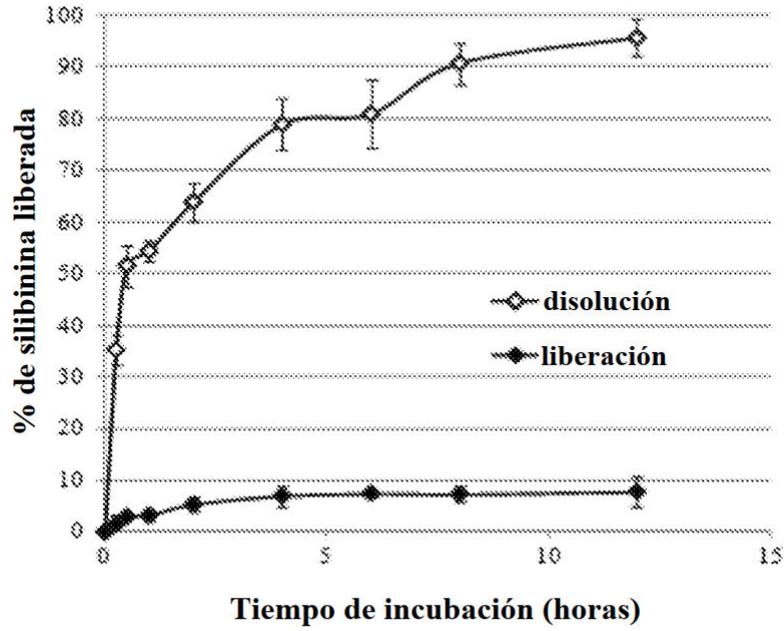


Figura 2

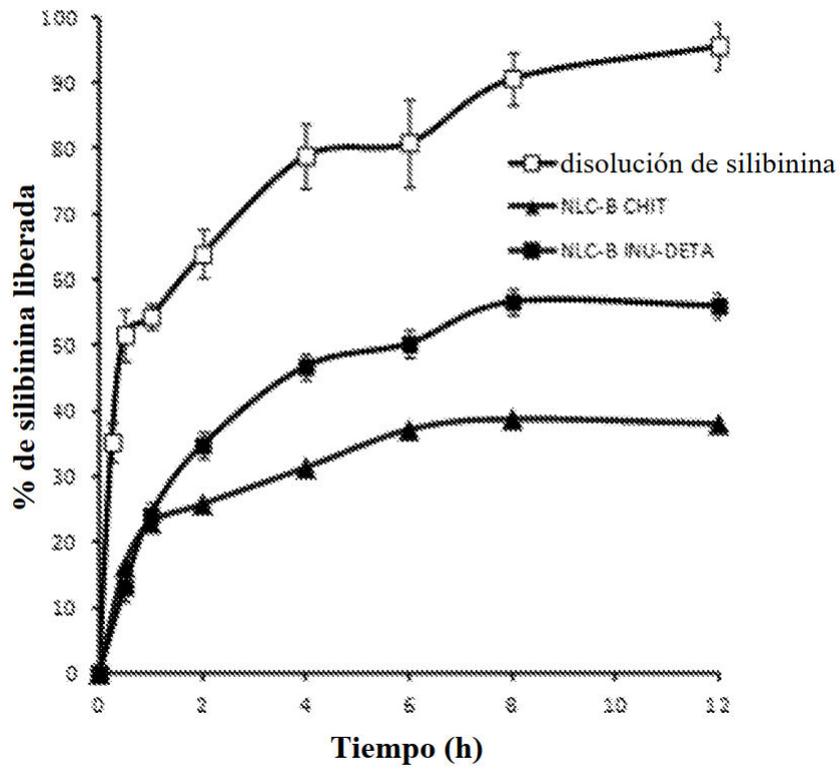


Figura 3

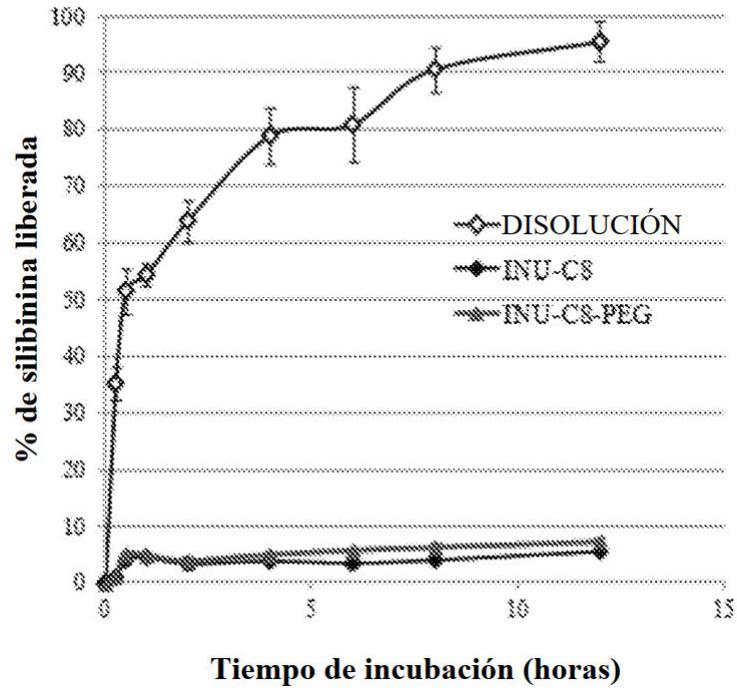


Figura 4a

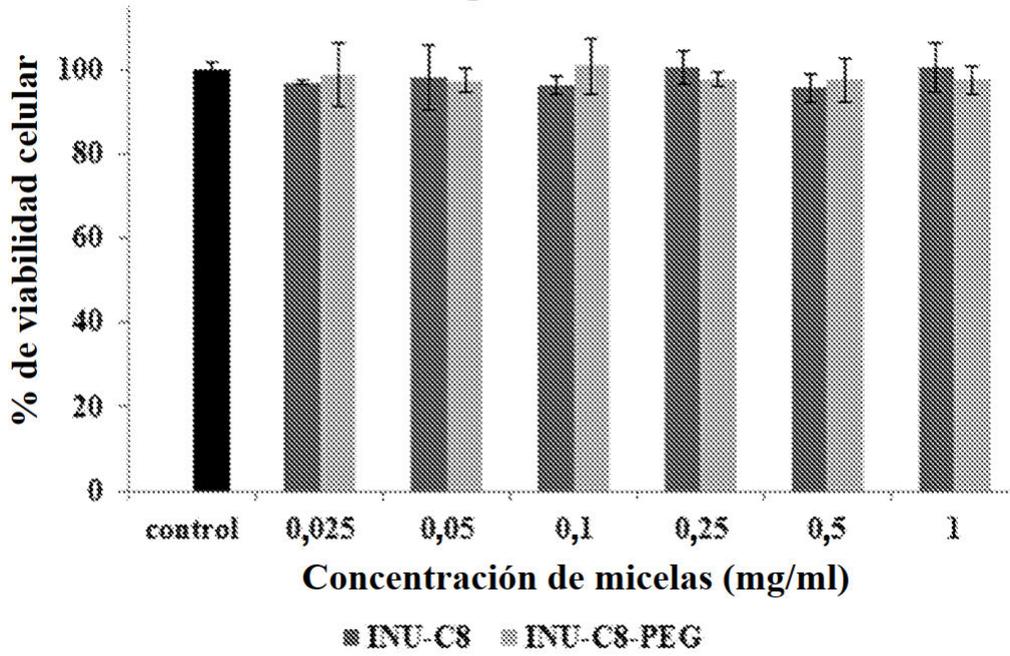
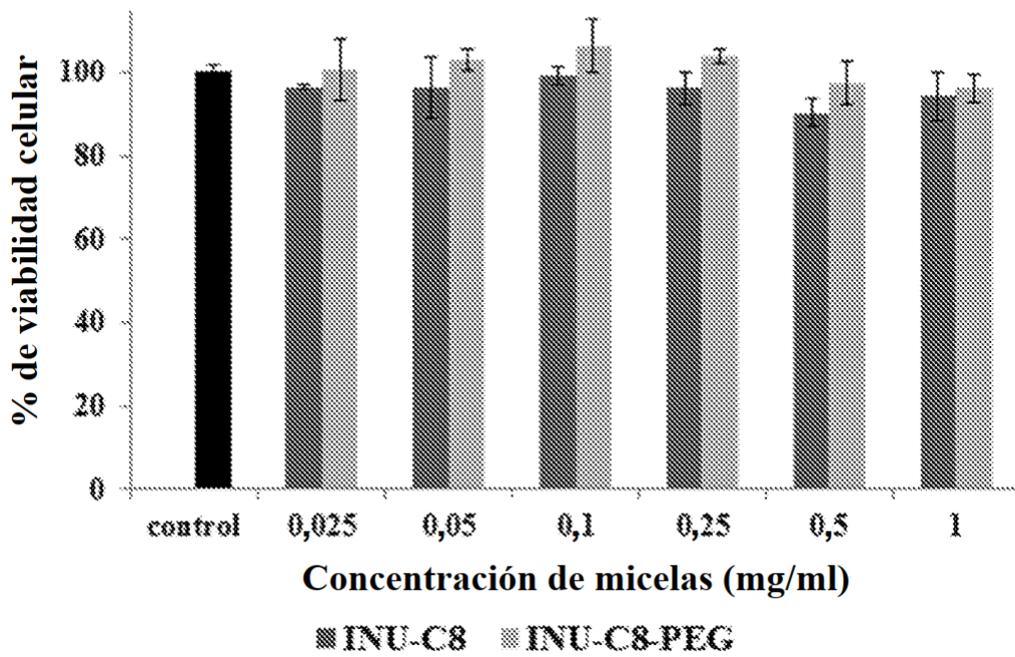


Figura 4b



PRETRATAMIENTO INUC8PEG conjugado con sorafenib
INUC8PEGSor +/- H₂O₂

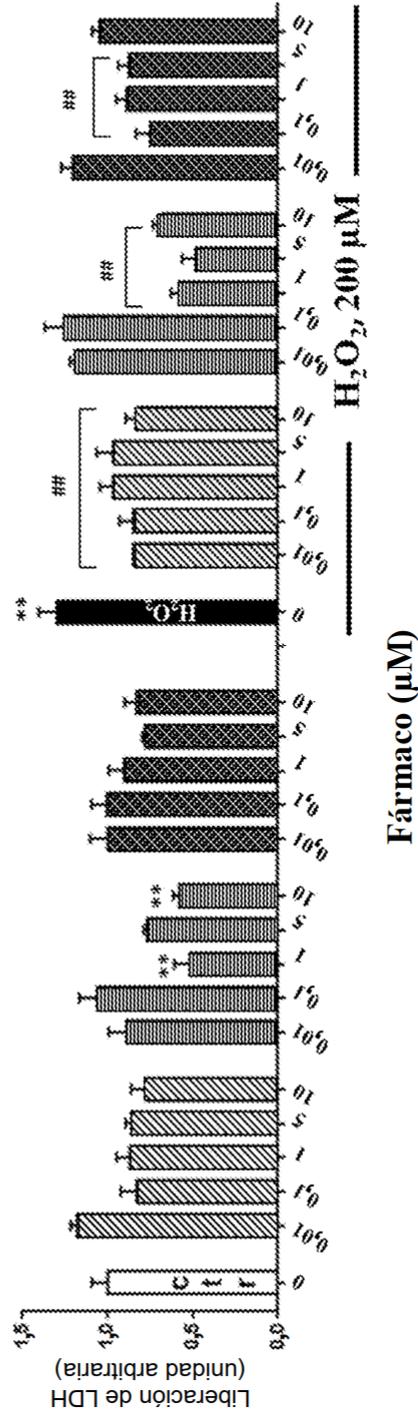
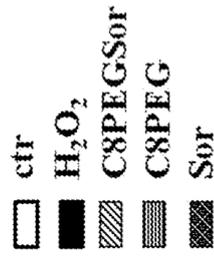


Figura 5 A

La evaluación estadística de los datos se realizó por análisis unilaterial de la varianza (ANOVA), seguido por comparaciones múltiples de Bonferroni. **p<0,01 frente a muestras de control (ctr); ## p < 0,01 frente a H₂O₂

POSTRATAMIENTO INUC8PEG conjugado con sorafenib

H₂O₂ +/- INUC8PEGSor

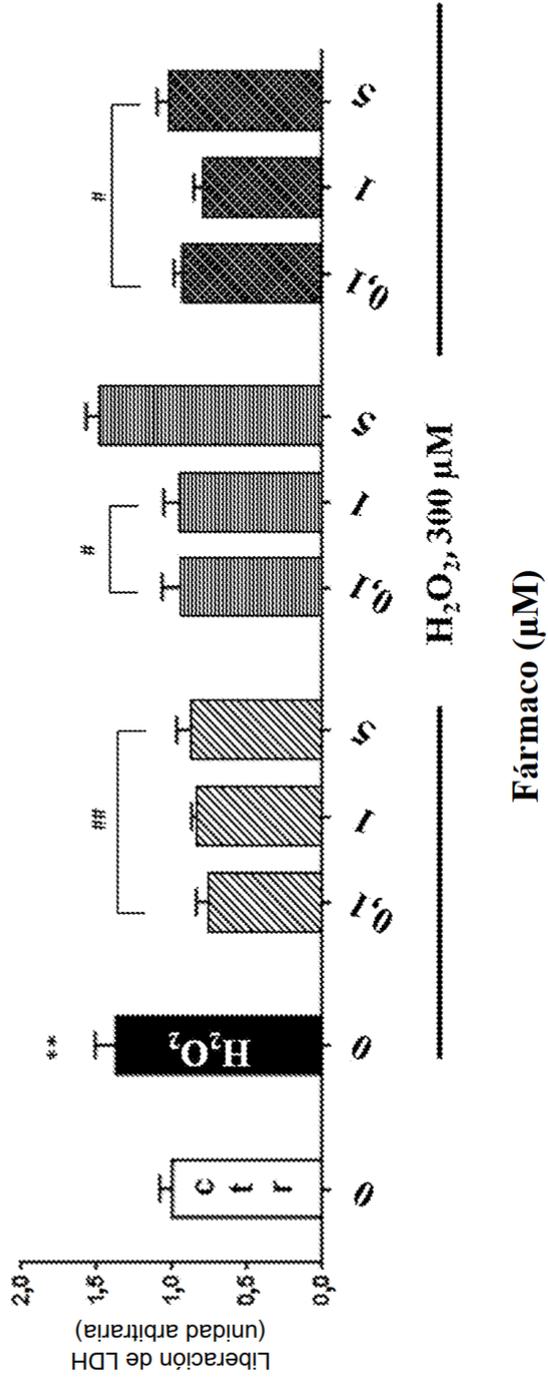
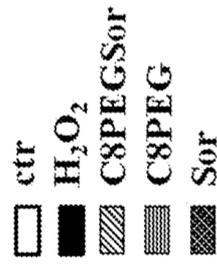


Figura 5 B

La evaluación estadística de los datos se realizó por análisis unilaterial de la varianza (ANOVA), seguido por comparaciones múltiples de Bonferroni. **p<0,01 frente a muestras de control (ctr); # p < 0,05, ## p < 0,01 frente a H₂O₂

PRETRATAMIENTO INUC8PEG conjugado con silibina

INUC8PEGSib +/- H₂O₂

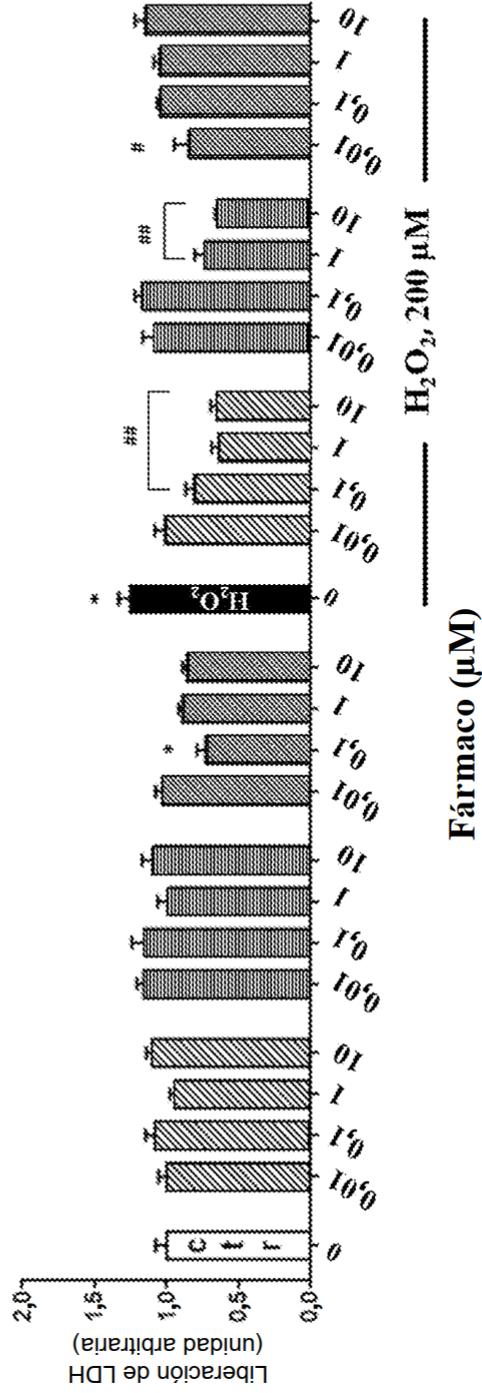
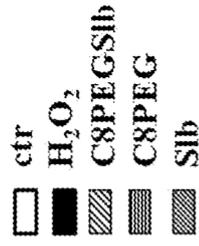


Figura 6 A

La evaluación estadística de los datos se realizó por análisis unilateral de la varianza (ANOVA), seguido por comparaciones múltiples de Bonferroni. *p<0,05 frente a muestras de control (ctr); # p < 0,05, ## p < 0,01 frente a H₂O₂

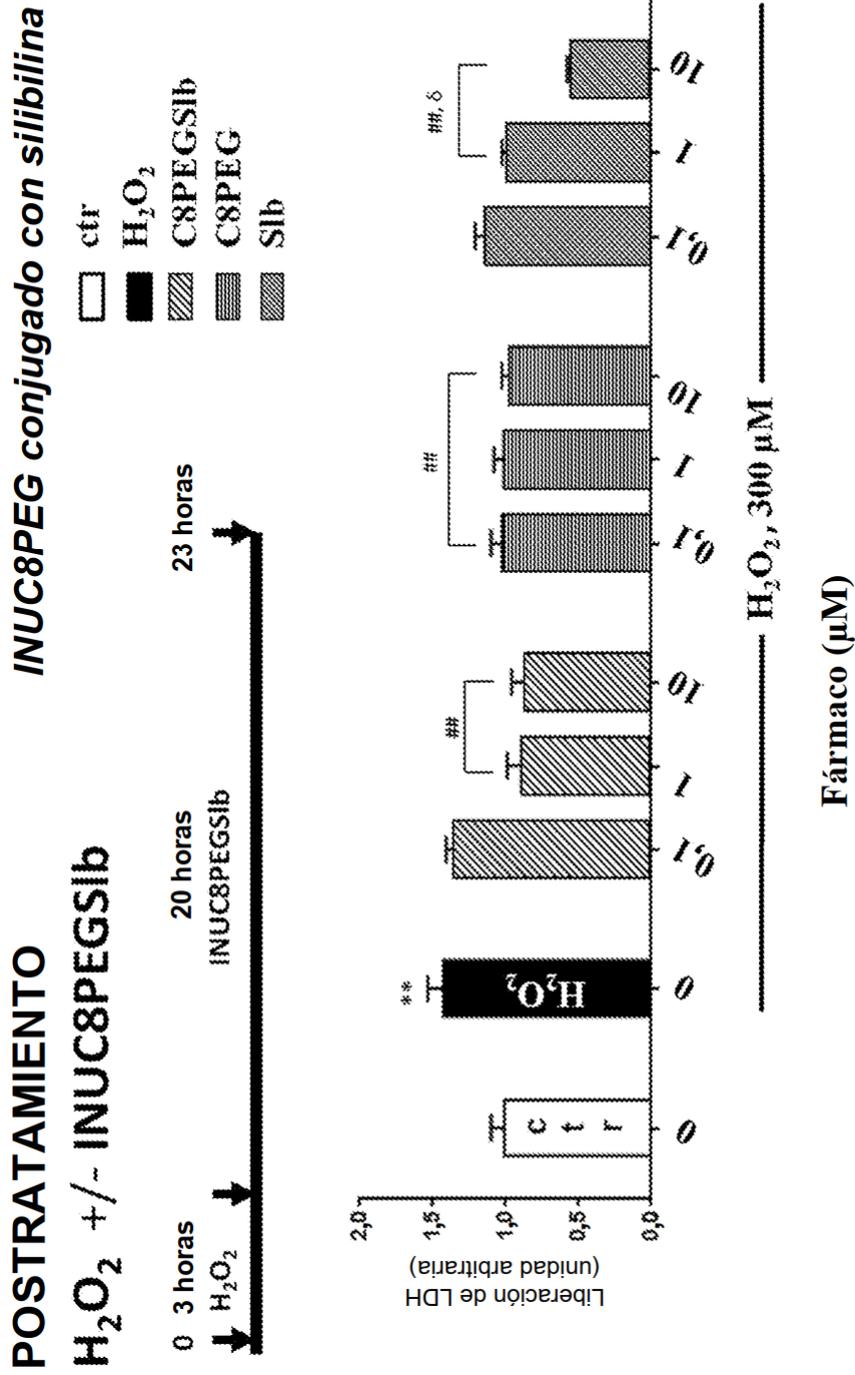


Figura 6 B

La evaluación estadística de los datos se realizó por análisis unilaterial de la varianza (ANOVA), seguido por comparaciones múltiples de Bonferroni. **p<0,01 frente a muestras de control (ctr); ## p < 0,01 frente a H₂O₂; δ p < 0,05 frente a muestras tratadas C8PEGSib 10 μM.

Figura 7

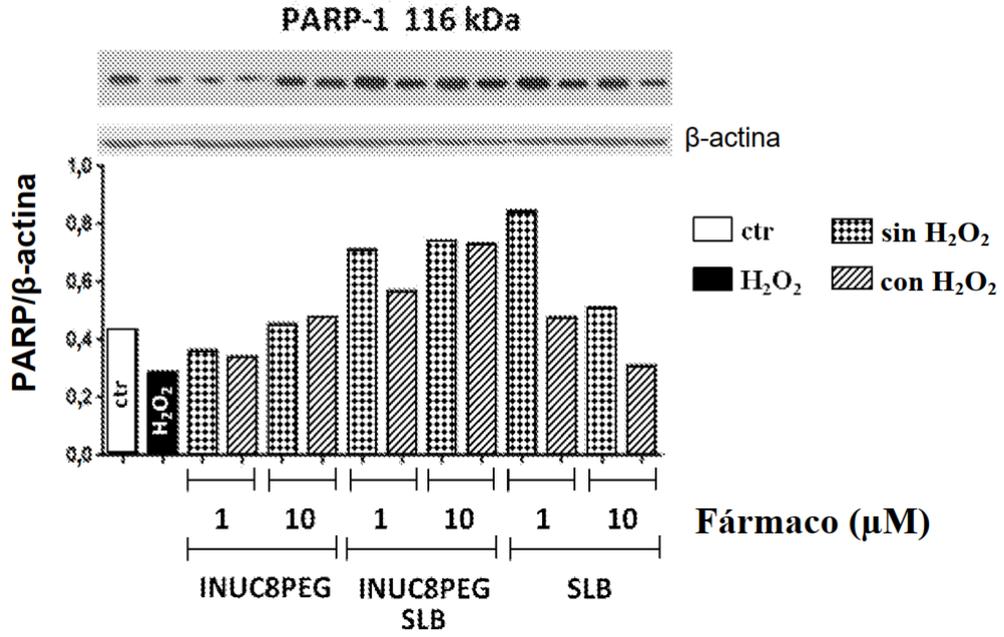
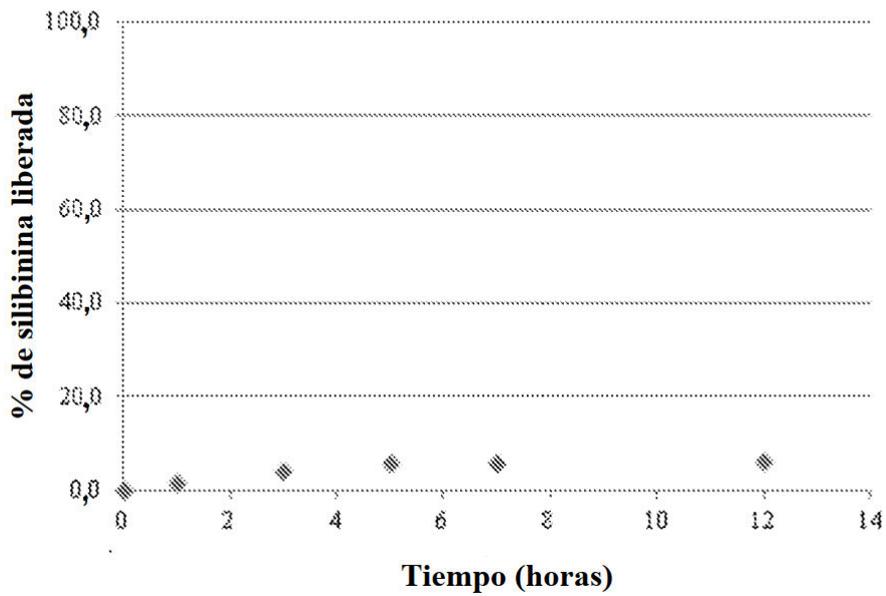


Figura 8



Calix conjugado con silibilina

PRETRATAMIENTO

CalixSib +/- FeSO₄

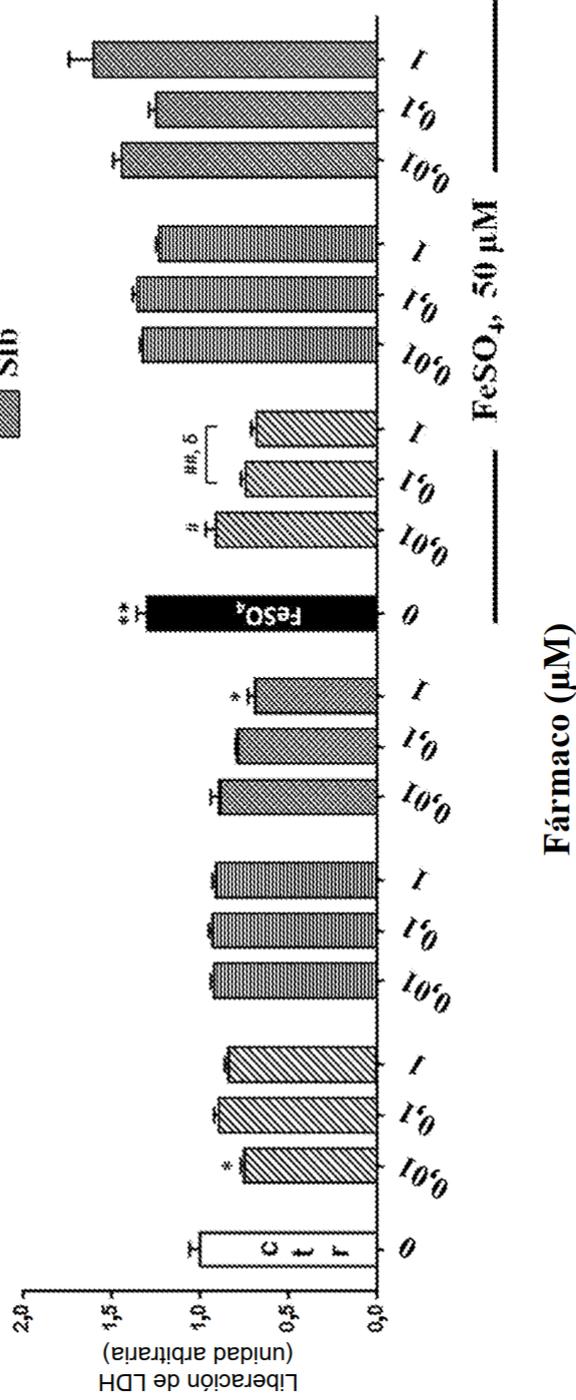
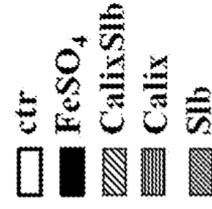


Figura 9 A

La evaluación estadística de los datos se realizó por análisis unilaterial de la varianza (ANOVA), seguido por comparaciones múltiples de Bonferroni. *p<0,05, **p<0,01 frente a muestras de control (ctr); # p < 0,05, ## p < 0,01 frente a FeSO₄; δ p < 0,05 frente a muestras tratadas con CalixSib 0,1 y 1 μM.

Calix conjugado con silibilina

**POSTRATAMIENTO
FeSO₄ +/- CalixSib**

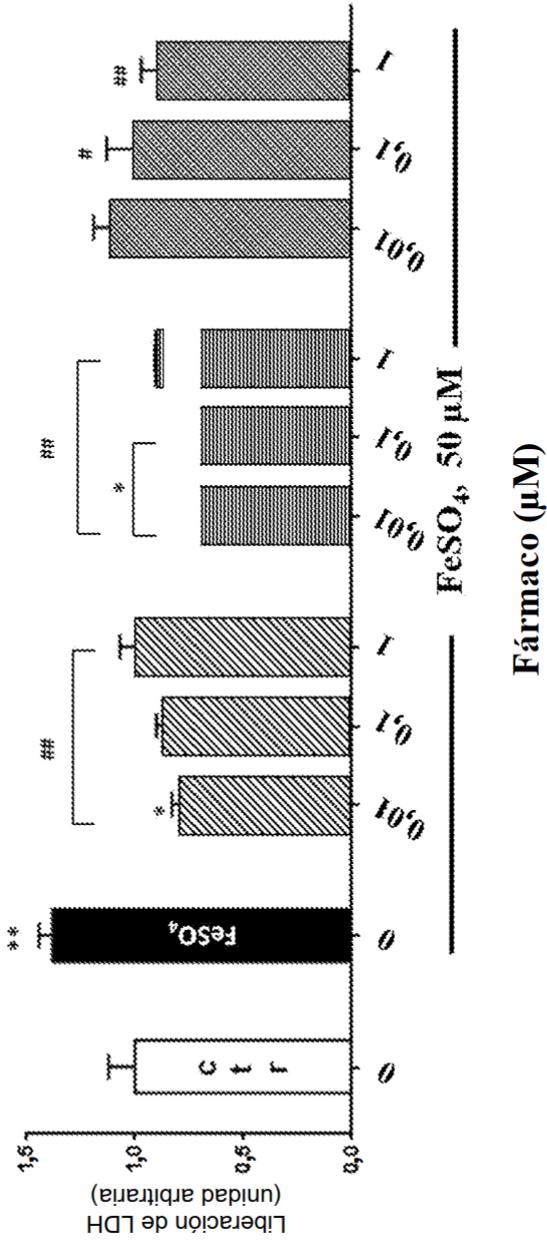
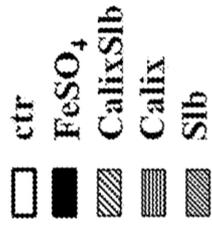


Figura 9 B

La evaluación estadística de los datos se realizó por análisis unilateral de la varianza (ANOVA), seguido por comparaciones múltiples de Bonferroni. *p<0,05, **p<0,01 frente a muestras de control (ctr); # p < 0,05, ## p < 0,01 frente a FeSO₄.

Lisados obtenidos de 5 h de FeSO₄ + 20 h de CALIX POSTRATAMIENTO

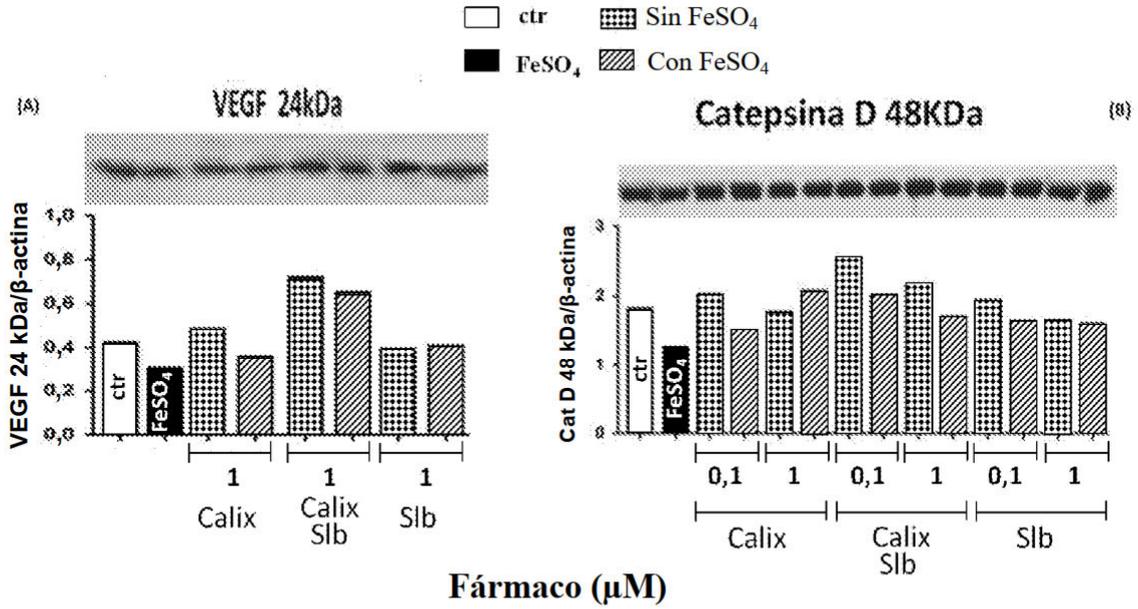


Figura 10 A

Figura 10B

Figura 11

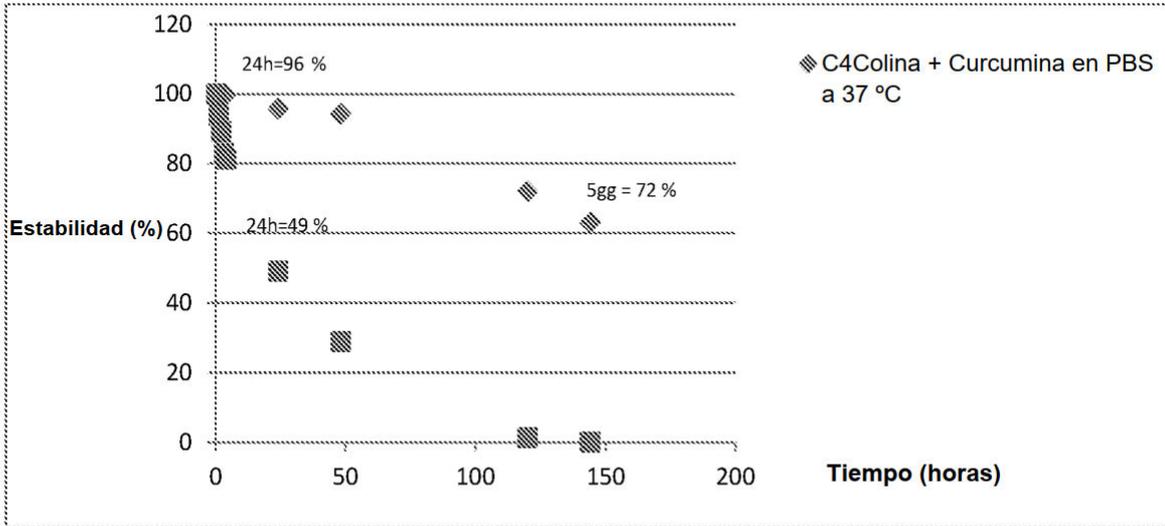


Figura 12

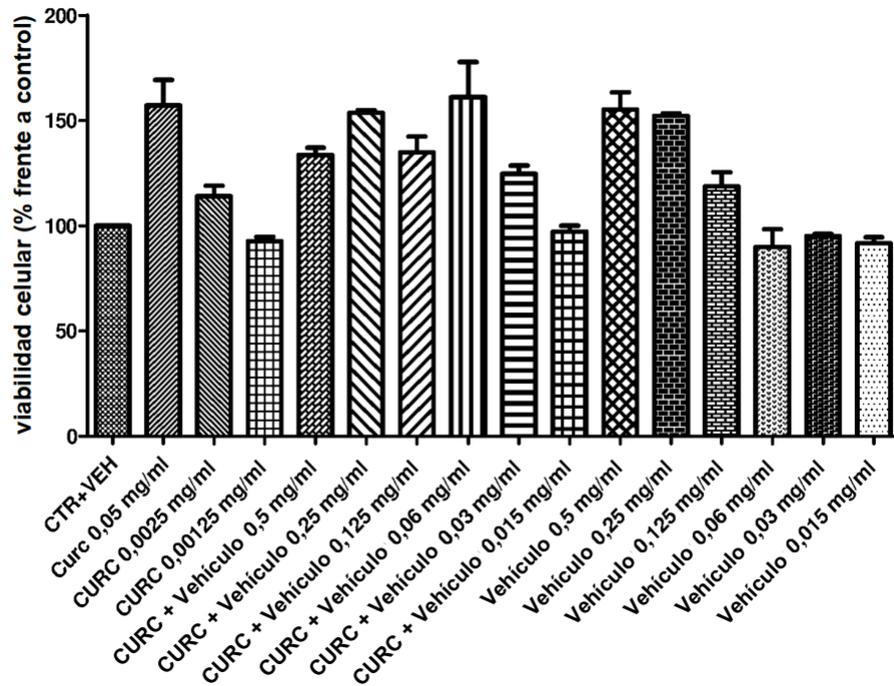


Figura 13

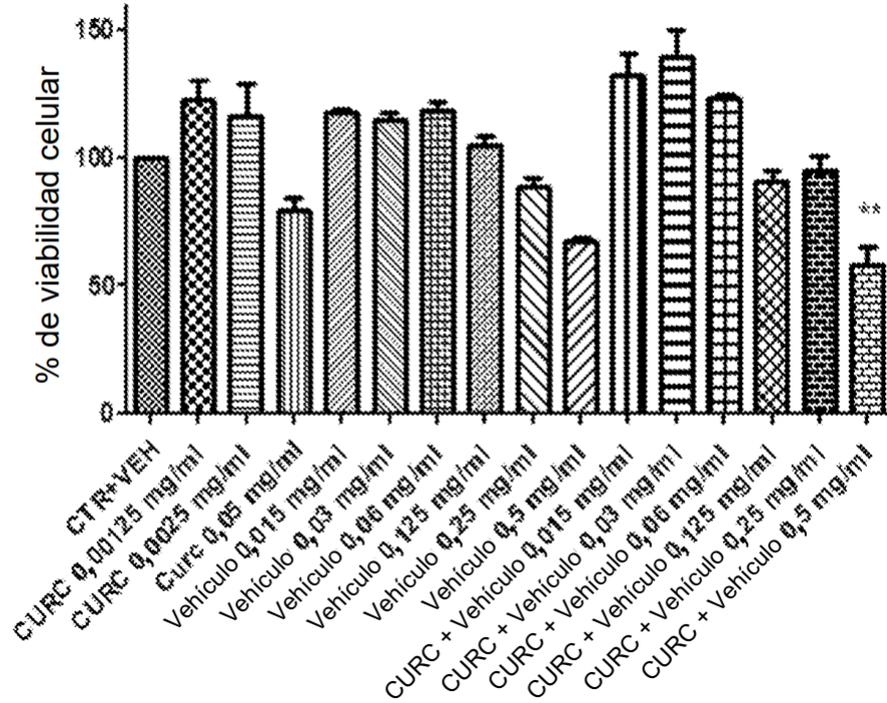


Figura 14

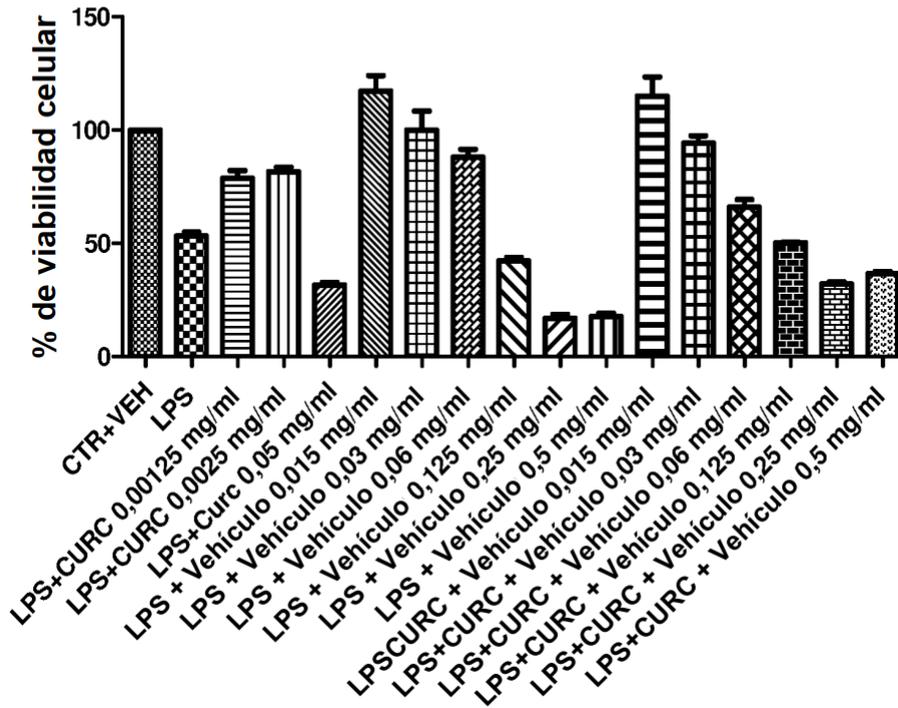


Figura 15

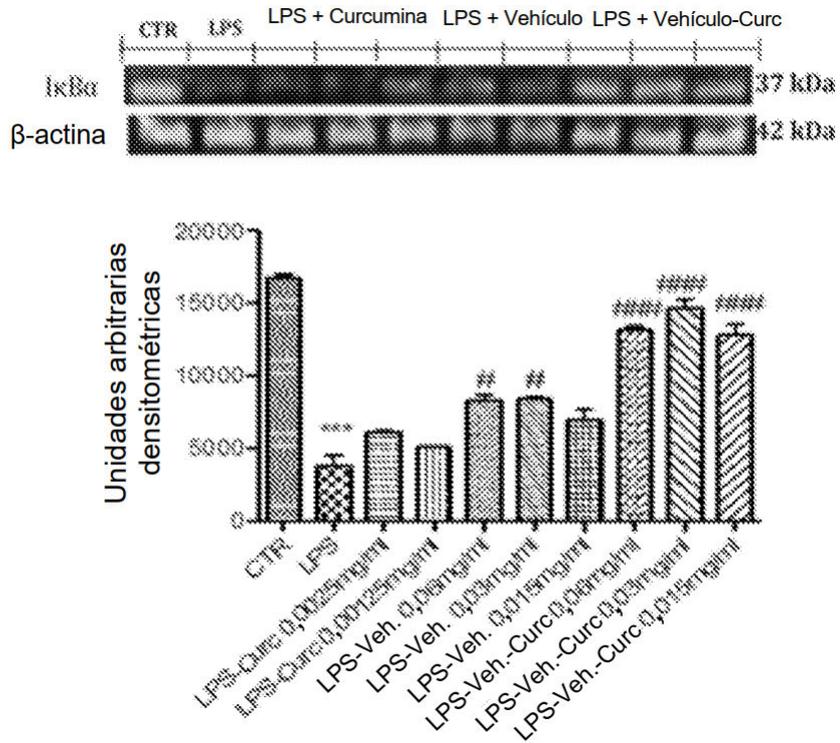


Figura 16

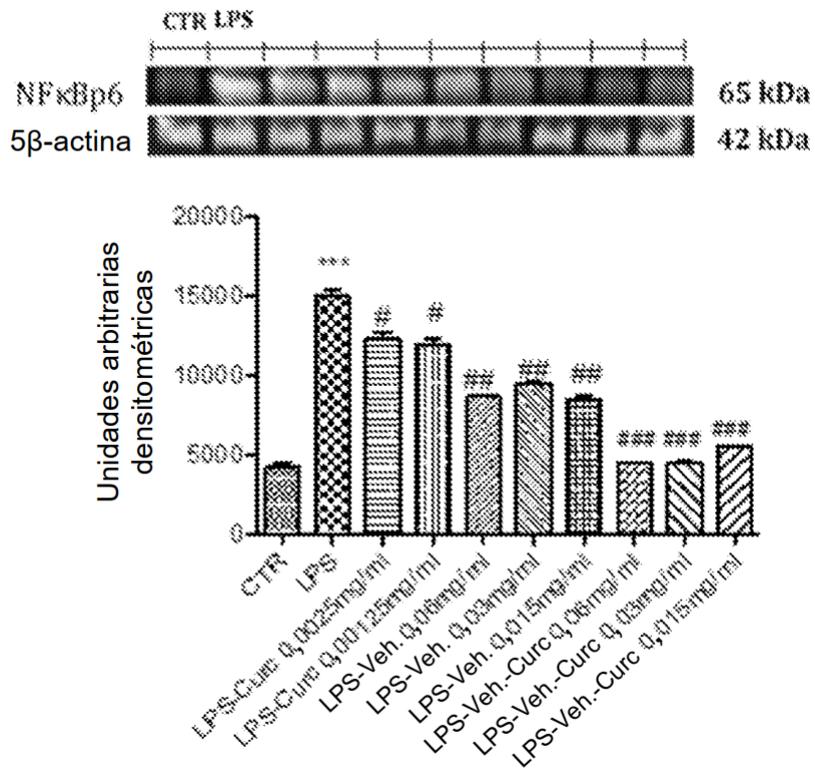


Figura 17

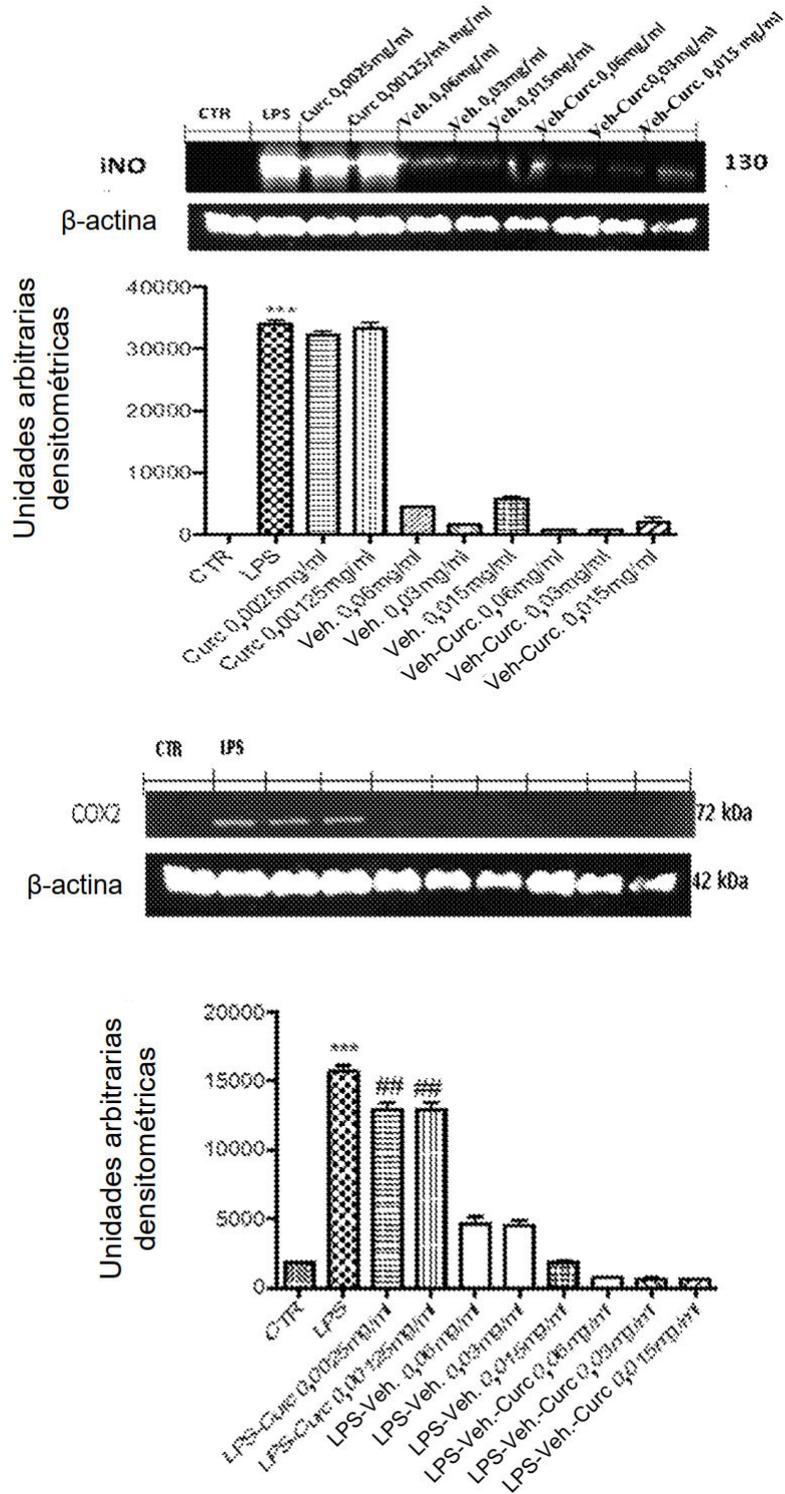
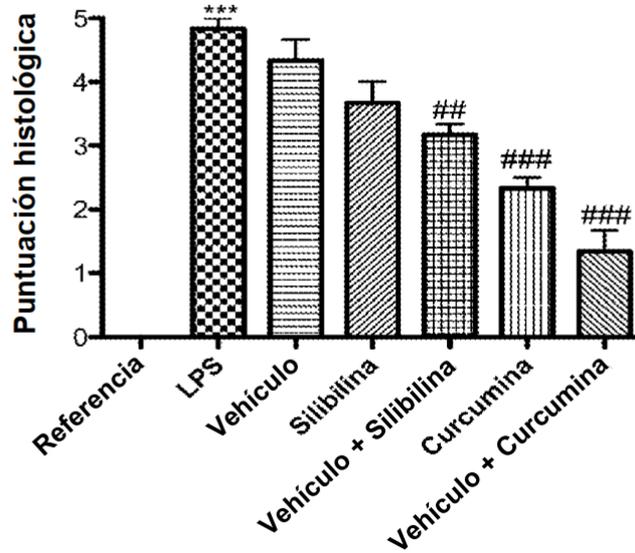
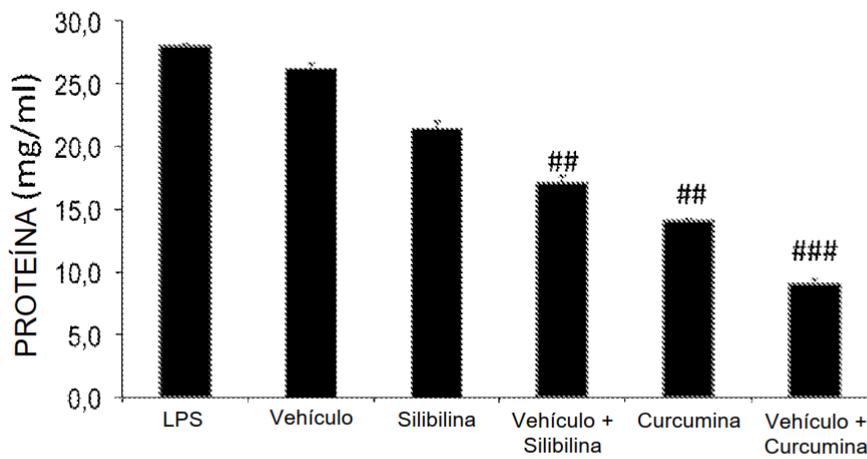


Figura 18 A



*** p<0,001 frente a referencia; ## p<0,01 frente a LPS; ### p<0,001 frente a LPS

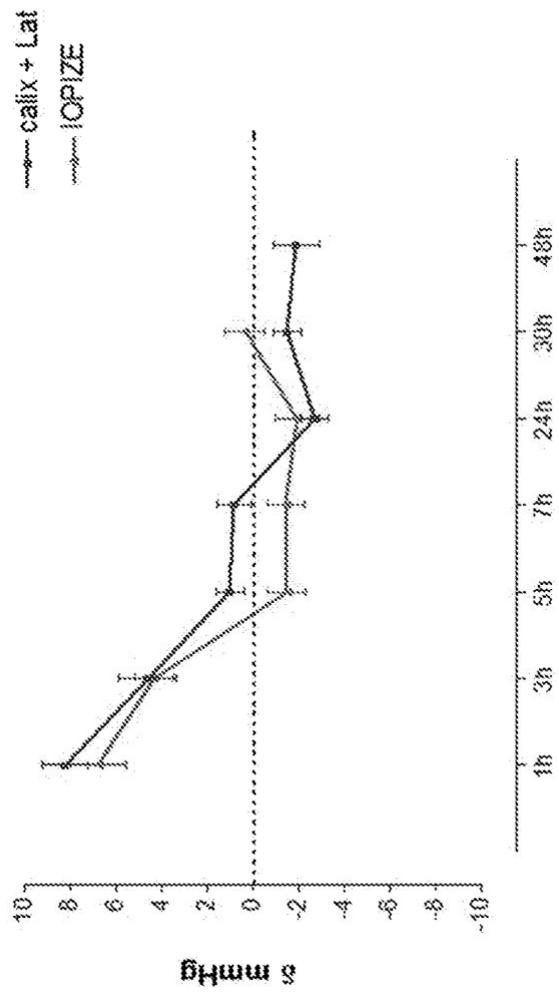
Figura 18 B



p<0,01 frente a LPS; ### p<0,001 frente a LPS

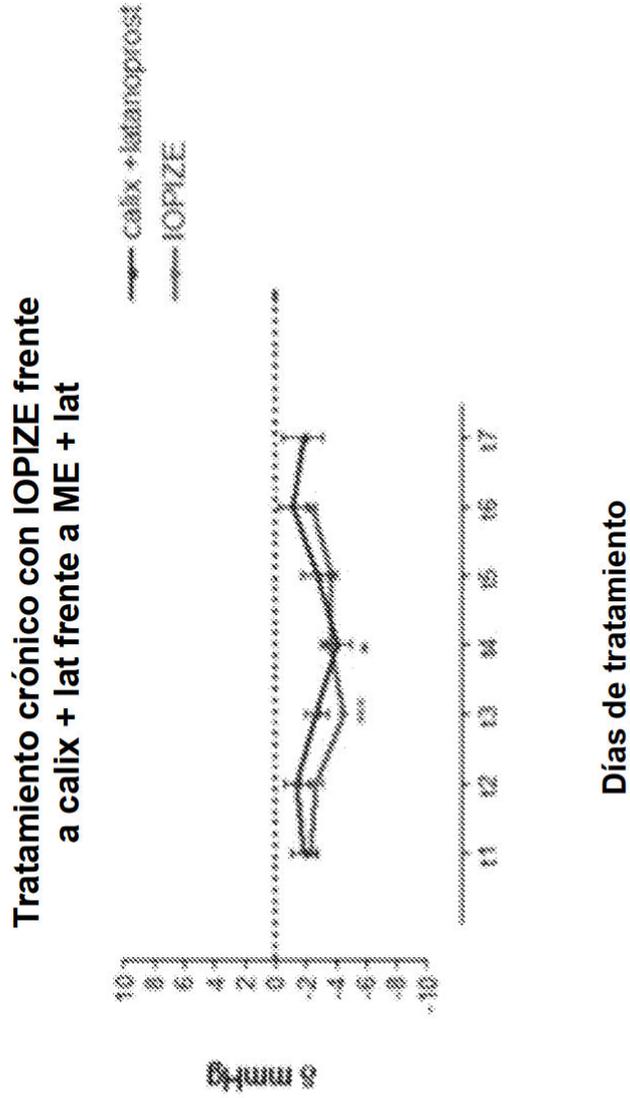
Figura 19 A

Evolución de tiempo IOPIZE frente a calix + lat frente a ME + lat



evolución de tiempo (h) después de la administración

Figura 19 B



* $p \leq 0,05$ frente a nivel inicial
 *** $p \leq 0,001$ frente a nivel inicial

Análisis unilateral ANOVA más prueba a posteriori de Dunnett