(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 770 733**

(51) Int. CI.:

A61K 9/51 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2015 PCT/US2015/015887**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015 WO15123562**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2015 E 15707019 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3104838**

(54) Título: **Nanopartículas terapéuticas que comprenden un agente terapéutico y procedimientos de fabricación y uso de las mismas**

(30) Prioridad:

13.02.2014 US 201461939363 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2020

(73) Titular/es:

PFIZER INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US

(72) Inventor/es:

FIGUEIREDO, MARIA;
PEEKE, ERICK;
DEWITT, DAVID;
VAN GEEN HOVEN, CHRISTINA;
TROIANO, GREG;
WRIGHT, JAMES;
SONG, YOUNG-HO y
WANG, HONG

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

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

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas terapéuticas que comprenden un agente terapéutico y procedimientos de fabricación y uso de las mismas

Antecedentes

Los sistemas que administran determinados fármacos a un paciente (por ejemplo, dirigido a un tejido particular o tipo celular o dirigido a un tejido enfermo específico pero no un tejido normal) o que controlar la liberación de fármacos se han reconocido durante mucho tiempo como ventajosos.

Por ejemplo, las sustancias terapéuticas que incluyen un fármaco activo y que, por ejemplo, se dirigen a un tejido particular o tipo celular o se dirigen a un tejido enfermo específico pero no un tejido normal, pueden reducir la cantidad de fármaco en los tejidos del cuerpo que no son objeto de actuación. Esto resulta particularmente importante cuando se trata una afección tal como cáncer en la que resulta deseable la administración de una dosis citotóxica del fármaco a células cancerígenas sin matar el tejido no canceroso circundante. La actuación dirigida eficaz del fármaco puede reducir los efectos secundarios no deseables y en ocasiones amenazadores para la vida, comunes en terapia anticáncer. Además, dichas sustancias terapéuticas permiten que el fármaco alcance determinados tejidos que, de lo contrario, resultarían imposibles de alcanzar.

Las sustancias terapéuticas que ofrecen la liberación controlada y/o la terapia dirigida también deben ser capaces de administrar una cantidad eficaz del fármaco, lo cual es una limitación conocida en otros sistemas de administración de nanopartículas. Por ejemplo, puede constituir un reto la preparación de sistemas de nanopartículas que tengan una cantidad apropiada de fármaco asociada a cada nanopartícula, al tiempo que se mantiene un tamaño de nanopartículas suficientemente pequeño para tener propiedades ventajosas de administración.

Los agentes terapéuticos que contienen al menos un átomo de nitrógeno básico (es decir, agentes terapéuticos que contienen nitrógeno protonable) representan un grupo importante de agentes terapéuticos. Sin embargo, las formulaciones de nanopartículas de esta clase de fármacos, con frecuencia, se ven impedidas por propiedades no deseadas, por ejemplo, perfiles de liberación repentina y escasa carga de fármaco.

En consecuencia, existe una demanda de sustancias terapéuticas en forma de nanopartículas y procedimientos de preparación de dichas nanopartículas que sean capaces de administrar niveles terapéuticos de agentes terapéuticos que contienen nitrógeno protonable para tratar enfermedades tales como el cáncer, al tiempo que reducen los efectos secundarios del paciente.

Sumario

En el presente documento se describen nanopartículas poliméricas que incluyen un agente terapéutico que contienen nitrógeno protonable, y procedimientos de preparación y uso de dichas nanopartículas terapéuticas.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento de preparación de una nanopartícula terapéutica.

El procedimiento comprende:

combinar una primera fase orgánica con una primera solución acuosa para formar una segunda fase;

emulsionar la segunda fase para formar una fase de emulsión, en la que la fase de emulsión comprende un primer polímero, un agente terapéutico básico que tiene un nitrógeno protonable, y ácido pamoico; e

inactivar la fase de emulsión formando de este modo una fase inactivada;

en la que la inactivación de la fase de emulsión comprende mezclar la fase de emulsión con una segunda solución acuosa que tiene un pH entre 4 y 7, y la segunda solución acuosa comprende un agente tampón de concentración suficiente para que la fase inactivada tenga un pH que difiera del pH de la segunda solución acuosa en menos de 1 unidad de pH.

En algunas realizaciones, el procedimiento además comprende filtrar la fase inactivada para recuperar las nanopartículas terapéuticas.

En algunas realizaciones, el procedimiento además comprende combinar el agente terapéutico básico y el ácido pamoico en la segunda fase antes de emulsionar la segunda fase. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente terapéutico básico y el ácido pamoico forman un par iónico hidrófobo antes de emulsionar la segunda fase. En otras realizaciones, el agente terapéutico básico y el ácido pamoico forman un par iónico hidrófobo durante el emulsionado de la segunda fase.

En algunas realizaciones, el procedimiento además comprende combinar el agente terapéutico básico y el ácido pamoico en la segunda fase de manera sustancialmente concurrente con el emulsionado de la segunda fase. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la primera fase orgánica comprende el agente terapéutico básico y la primera

solución acuosa comprende ácido pamoico.

En algunas realizaciones, el pH de la primera solución acuosa está entre 4 y 7, por ejemplo, entre 4 y 5 o entre 6 y 7.

En algunas realizaciones, el pH de la segunda solución acuosa está entre 4 y 5 o entre 6 y 7.

En algunas realizaciones, una solución acuosa contemplada comprende fosfato, citrato o una mezcla de fosfato y citrato. En algunas realizaciones, la segunda solución acuosa comprende una mezcla de borato, fosfato y acetato.

En algunas realizaciones, la fase inactivada tiene un pH sustancialmente igual al de la segunda solución acuosa. En algunas realizaciones, la fase inactivada tiene un pH entre 4 y 7, por ejemplo, entre 4 y 5 o entre 6 y 7.

La nanopartícula terapéutica puede comprender de un 0,05 a un 30 por ciento en peso de ácido pamoico; de un 0,2 a un 20 por ciento en peso de un agente terapéutico básico que tiene nitrógeno protonable; y de un 50 a un 99,75 por ciento en peso de un copolímero de poli(ácido láctico) de dibloque-poli(etilen)glicol o un copolímero de poli(ácido láctico-ácido co-glicólico) de dibloque-poli(etilen)glicol, en el que la nanopartícula terapéutica comprende de un 10 a un 30 por ciento en peso de poli(etilen)glicol.

La nanopartícula terapéutica puede comprender de un 0,2 a un 20 por ciento en peso de un agente terapéutico básico que tiene un nitrógeno protonable; ácido pamoico, en el que la proporción en peso de ácido pamoico con respecto a agente terapéutico básico es de 0,25:1 a 2:1; y de un 50 a un 99,75 por ciento en peso de un copolímero de poli(ácido láctico) de dibloque-poli(etilen)glicol o un copolímero de poli(ácido láctico-ácido co-glicólico) de dibloque-poli(etilen)glicol, en el que la nanopartícula terapéutica comprende de un 10 a un 30 por ciento en peso de poli(etilen)glicol.

En algunas realizaciones, la proporción en peso de ácido pamoico con respecto a agente terapéutico básico es de 0,5:1 a 1,5:1, por ejemplo, de 0,75:1 a 1,25:1.

En algunas realizaciones, el pK_a del agente terapéutico básico es de al menos 1,0 unidad de pK_a mayor que el pK_a de ácido pamoico, o al menos 2,0 unidades de pK_a mayor que el pK_a de ácido pamoico, o al menos 4,0 unidades de pK_a mayor que el pK_a del ácido pamoico.

La nanopartícula terapéutica puede comprender un par iónico hidrófobo que comprende ácido pamoico y un agente terapéutico que tiene al menos un resto de amina ionizable; y de un 50 a un 99,75 por ciento en peso de un copolímero de poli(ácido láctico) de dibloques-poli(etilen)glicol, en el que el copolímero de poli(ácido láctico)-poli(etilen)glicol tiene un peso molecular promedio expresado en peso de 15 kDa a 20 kDa de poli(ácido láctico) y un peso molecular promedio expresado en número de 4 kDa a 6 kDa de poli(etilen)glicol.

En algunas realizaciones, la diferencia entre el pKa del agente terapéutico básico y el ácido pamoico es de al menos 1,0 unidad de pKa o al menos 2,0 unidades de pKa o al menos 4,0 unidades de pKa.

En algunas realizaciones, la nanopartícula terapéutica contemplada comprende de un 0,05 a un 30 por ciento en peso del ácido pamoico.

En algunas realizaciones, el ácido pamoico y el agente terapéutico básico forman un par iónico hidrófobo en una nanopartícula terapéutica contemplada.

En algunas realizaciones, la nanopartícula terapéutica contemplada comprende de un 2 a un 20 por ciento en peso o de un 4 a un 20 por ciento en peso, o de un 10 a un 20 por ciento en peso, o de un 4 a un 10 por ciento en peso del agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un inhibidor de quinasa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de tirosina quinasa seleccionado entre el grupo que consiste en sunitinib, imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib, ponatinib, bafetinib y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En algunas realizaciones, el diámetro hidrodinámico de una nanopartícula terapéutica contemplada es de 60 a 150 nm, o de 90 a 140 nm, o de 90 a 120 nm.

En algunas realizaciones, la nanopartícula terapéutica contemplada conserva sustancialmente el agente terapéutico durante al menos 1 minuto cuando se coloca en una solución tampón de fosfato a 37 ºC.

En algunas realizaciones, la nanopartícula terapéutica contemplada libera de forma sustancialmente inmediata menos de un 30 % del agente terapéutico cuando se coloca en una solución tampón de fosfato a 37 ºC.

En algunas realizaciones, la nanopartícula terapéutica contemplada libera de un 10 a un 45 % del agente terapéutico durante 1 hora cuando se coloca en una solución de tampón de fosfato a 37 ºC.

En algunas realizaciones, la nanopartícula terapéutica contemplada tiene un perfil de liberación que es sustancialmente el mismo que el perfil de liberación para una nanopartícula de control que es sustancialmente la

misma que la nanopartícula terapéutica exceptuando que no contiene un ácido graso o ácido biliar.

En algunas realizaciones, el copolímero de poli(ácido láctico)-poli(etilen)glicol tiene una fracción de peso molecular promedio expresado en número de poli(ácido láctico) de 0,6 a 0,95 o de 0,6 a 0,8, o de 0,75 a 0,85, o de 0,7 a 0,9.

En algunas realizaciones, la nanopartícula terapéutica contemplada comprende de un 10 a un 25 por ciento en peso de poli(etilen)glicol, o de un 10 a un 20 por ciento en peso de poli(etilen)glicol, o de un 15 a un 25 por ciento en peso de poli(etilen)glicol, o de un 20 a un 30 por ciento en peso de poli(etilen)glicol.

En algunas realizaciones, el copolímero de poli(ácido láctico)-poli(etilen)glicol tiene un peso molecular promedio expresado en número de 15 kDa a 20 kDa de poli(ácido láctico) y un peso molecular promedio expresado en número de 4 kDa a 6 kDa de poli(etilen)glicol.

En algunas realizaciones, una nanopartícula terapéutica contemplada además comprende de un 0,2 a un 30 por ciento en peso de copolímero de poli(ácido láctico)-poli(etilen)glicol funcionalizado con un ligando de actuación dirigida. En algunas realizaciones, una nanopartícula terapéutica contemplada además comprende de un 0,2 a un 30 por ciento en peso de copolímero de poli(ácido láctico)-poli(ácido-co-(glicólico)-poli(etilen)glicol funcionalizado con un ligando de actuación dirigida. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ligando de actuación dirigida está covalentemente unido al poli(etilen)glicol.

Una composición farmacéuticamente aceptable puede comprender una pluralidad de nanopartículas terapéuticas contempladas y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la composición contemplada farmacéuticamente aceptable además comprende un sacárido, por ejemplo, sacarosa, trehalosa o una mezcla de los mismos.

En algunas realizaciones, la composición contemplada farmacéuticamente aceptable además comprende una ciclodextrina, por ejemplo, α-ciclodextrina, β-ciclodextrina, γ-ciclodextrina, heptaquis-(2,3,6-tri-O-bencil)-β-ciclodextrina y mezclas de las mismas.

Una composición que comprende una nanopartícula terapéutica contemplada se puede usar en un procedimiento de tratamiento de cáncer en un paciente que lo necesita.

En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia mielógena crónica. En algunas realizaciones, el cáncer está seleccionado entre el grupo que consiste en leucemia mielomonocítica crónica, síndrome hipereosinofílico, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, leucemia linfoblástica aguda de cromosoma de Filadelfia positivo, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas, cáncer de mama, tumor sólido y linfoma de células de corteza cerebral.

Una composición que comprende una nanopartícula terapéutica contemplada se puede usar en un procedimiento de tratamiento de tumor estromal gastrointestinal en un paciente que lo necesita.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de flujo para un procedimiento de emulsión para la formación de una nanopartícula desvelada.

Las Figuras 2A y 2B muestran diagramas de flujo para un procedimiento de emulsión desvelado.

La Figura 3 muestra perfiles de liberación in vitro para formulaciones de nanopartículas que contienen sunitinib.

La Figura 4 muestra perfiles de liberación in vitro para formulaciones de nanopartículas que contienen imatinib.

La Figura 5 muestra perfiles de liberación in vitro para formulaciones de nanopartículas que contienen imatinib.

La Figura 6 muestra perfiles de liberación in vitro para formulaciones de nanopartículas que contienen imatinib.

La Figura 7 muestra perfiles de liberación in vitro para formulaciones de nanopartículas que contienen dasatinib.

La Figura 8 muestra perfiles de liberación in vitro para formulaciones de nanopartículas que contienen dasatinib.

La Figura 9 muestra perfiles de liberación in vitro para formulaciones de nanopartículas que contienen dasatinib.

Descripción detallada

En el presente documento, se describen nanopartículas poliméricas que incluyen un agente terapéutico básico que tiene nitrógeno protonable y procedimientos de preparación y uso de dichas nanopartículas terapéuticas. La inclusión (es decir, la impurificación) del ácido pamoico sustancialmente hidrófobo en la nanopartícula desvelada y/o el procedimiento de preparación puede tener como resultado nanopartículas que incluyan una carga de fármaco mejorada. Asimismo, en determinadas realizaciones, las nanopartículas que incluyen y/o se preparan en presencia

del ácido hidrófobo pueden exhibir propiedades mejoradas de liberación controlada. Por ejemplo, las nanopartículas desveladas pueden liberar más lentamente el agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable en comparación con las nanopartículas preparadas en ausencia del ácido hidrófobo.

Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, se piensa que las formulaciones de nanopartículas desveladas que incluyen ácido pamoico tienen propiedades de formulación significativamente mejoradas (por ejemplo, carga de fármaco y/o perfil de liberación) a través de la formación de un par iónico hidrófobo (HIP), entre un agente terapéutico que tiene, por ejemplo, aminas y un ácido. Tal como se usa en el presente documento, un HIP es un par de iones con carga opuesta que se mantienen juntos por medio de atracción culómbica. También sin pretender quedar ligado a teoría alguna, en algunas realizaciones, HIP se puede usar para aumentar la naturaleza hidrófoba del agente terapéutico que contiene grupos ionizables (por ejemplo, aminas). En algunas realizaciones, el agente terapéutico con mayor naturaleza hidrófoba puede resultar beneficioso para las formulaciones de nanopartículas y tener como resultado una formación de HIP que puede proporcionar mayor solubilidad del agente terapéutico en disolventes orgánicos. La formación de HIP, como se contempla en el presente documento, puede tener como resultado nanopartículas que tienen por ejemplo, mayor carga de fármaco. También puede tener lugar la liberación lenta del agente terapéutico a partir de las nanopartículas, por ejemplo en algunas realizaciones, debido a una disminución de la solubilidad del agente terapéutico en solución acuosa. Asimismo, la formación de complejos del agente terapéutico con contra iones hidrófobos grandes puede ralentizar la difusión del agente terapéutico con la matriz polimérica. Ventajosamente, la formación de HIP tiene lugar sin necesidad de conjugación covalente del grupo hidrófobo al agente terapéutico.

Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, se piensa que la fuerza de HIP afecta a la carga de fármaco y la velocidad de liberación de las nanopartículas contempladas. Por ejemplo, la fuerza de HIP puede aumentar por medio del aumento de la magnitud de la diferencia entre el pKa del agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable y el pKa del ácido hidrófobo, como se comenta con más detalle a continuación. También sin pretender quedar ligado a teoría alguna, se piensa que las condiciones de formación del par iónico afectan a la carga de fármaco y la velocidad de liberación de las nanopartículas contempladas.

Las nanopartículas desveladas en el presente documento incluyen uno, dos, tres o más polímeros biocompatibles y/o biodegradables. Por ejemplo, una nanopartícula contemplada puede incluir de un 35 a un 99,75 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 50 a un 99,75 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 50 a un 99,5 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 50 a un 99 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 50 a un 98 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 50 a un 97 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 50 a un 96 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 50 a un 95 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 50 a un 94 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 50 a un 93 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 50 a un 92 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 50 a un 91 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 50 a un 90 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 50 a un 85 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 60 a un 85 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 65 a un 85 por ciento en peso, y en algunas realizaciones de un 50 a un 80 por ciento en peso de uno o más copolímeros de bloques que incluyen un polímero biodegradable y un poli(etilen)glicol (PEG) y de un 0 a un 50 por ciento en peso de un homopolímero biodegradable.

Las nanopartículas desveladas incluyen un agente terapéutico que contienen nitrógeno protonable. Tal como se usa en el presente documento, un "agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable" incluye cualquier principio farmacéuticamente activo que contenga al menos un grupo funcional que contiene nitrógeno protonable. El agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable puede contener uno, dos, tres o más grupos funcionales que contienen nitrógeno protonable. Los ejemplos no limitantes de grupos funcionales que contienen nitrógeno protonable incluyen grupos amino alifáticos (por ejemplo, aminas primarias, aminas secundarias y aminas terciarias), grupos heteroarilo que contienen nitrógeno (por ejemplo, piridina, imidazol, triazol y tetrazol) y grupos guanidino.

En algunas realizaciones, las nanopartículas desveladas pueden incluir de un 0,2 a un 35 por ciento en peso, de un 0,2 a un 20 por ciento en peso, de un 0,2 a un 10 por ciento en peso, de un 0,2 a un 5 por ciento en peso, de un 0,5 a un 5 por ciento en peso, de un 0,75 a un 5 por ciento en peso, de un 1 a un 5 por ciento en peso, de un 2 a un 5 por ciento en peso, de un 3 a un 5 por ciento en peso, de un 1 a un 20 por ciento en peso, de un 2 a un 20 por ciento en peso, de un 4 a un 20 por ciento en peso, de un 5 a un 20 por ciento en peso, de un 10 a un 20 por ciento en peso, de un 1 a un 15 por ciento en peso, de un 2 a un 15 por ciento en peso, de un 3 a un 15 por ciento en peso, de un 4 a un 15 por ciento en peso, de un 5 a un 15 por ciento en peso, de un 1 a un 10 por ciento en peso, de un 2 a un 10 por ciento en peso, de un 3 a un 10 por ciento en peso, de un 4 a un 10 por ciento en peso, de un 5 a un 10 por ciento en peso, de un 10 a un 30 por ciento en peso o de un 15 a un 25 por ciento en peso de un agente terapéutico que contienen nitrógeno protonable.

Las nanopartículas desveladas comprenden el ácido pamoico hidrófobo y se preparan por medio de un procedimiento que incluye ácido pamoico. Dichas nanopartículas pueden tener una carga de fármaco más elevada que las nanopartículas preparadas por medio de un procedimiento sin un ácido hidrófobo. Por ejemplo, la carga de fármaco (por ejemplo, en peso) de las nanopartículas desveladas preparadas por medio de un procedimiento que comprende el ácido hidrófobo puede estar entre 2 veces y 10 veces mayor, o incluso más, que las nanopartículas desveladas preparadas por medio de un procedimiento sin el ácido hidrófobo. En algunas realizaciones, la carga de fármaco (en

peso) de las nanopartículas desveladas preparadas por medio de un primer procedimiento que comprende el ácido hidrófobo puede ser al menos 2 veces mayor, al menos 3 veces mayor, al menos 4 veces mayor, al menos 5 veces mayor, o al menos 10 veces mayor que las nanopartículas desveladas preparadas por medio de un segundo procedimiento, en el que el segundo procedimiento es idéntico al primer procedimiento exceptuando que el segundo procedimiento no incluye el ácido hidrófobo.

En algunos casos, la concentración de ácido pamoico en la solución de fármaco (es decir, una solución de agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable) puede estar entre un 1 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 2 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 3 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 4 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 5 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 6 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 8 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 10 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 12 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 14 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 16 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 1 por ciento en peso y un 5 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 3 por ciento en peso y un 9 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 6 por ciento en peso y un 12 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 9 por ciento en peso y un 15 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 12 por ciento en peso y un 18 por ciento en peso, y en algunas realizaciones entre un 15 por ciento en peso y un 21 por ciento en peso. En determinadas realizaciones, la concentración de ácido hidrófobo en la solución de fármaco puede ser al menos un 1 por ciento en peso, en algunas realizaciones al menos un 2 por ciento en peso, en algunas realizaciones al menos un 3 por ciento en peso, en algunas realizaciones al menos un 5 por ciento en peso, en algunas realizaciones al menos un 10 por ciento en peso, en algunas realizaciones al menos un 15 por ciento en peso, y en algunas realizaciones al menos un 20 por ciento en peso.

En determinadas realizaciones, la proporción molar de ácido pamoico con respecto a agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable (por ejemplo, inicialmente durante la formulación de las nanopartículas y/o en las nanopartículas) puede estar entre 0,25:1 y 6:1, en algunas realizaciones entre 0,25:1 y 5:1, en algunas realizaciones entre 0,25:1 y 4:1, en algunas realizaciones entre 0,25:1 y 3:1, en algunas realizaciones entre 0,25:1 y 2:1, en algunas realizaciones entre 0,25:1 y 1,5:1, en algunas realizaciones entre 0,25:1 y 1:1, en algunas realizaciones entre 0,25:1 y 0,5:1, en algunas realizaciones entre 0,5:1 y 6:1, en algunas realizaciones entre 0,5:1 y 5:1, en algunas realizaciones entre 0,5:1 y 4:1, en algunas realizaciones entre 0,5:1 y 3:1, en algunas realizaciones entre 0,5:1 y 2:1, en algunas realizaciones entre 0,5:1 y 1,5:1, en algunas realizaciones entre 0,5:1 y 1:1, en algunas realizaciones entre 0,5:1 y 0,75:1, en algunas realizaciones entre 0,75:1 y 2:1, en algunas realizaciones entre 0,75:1 y 1,5:1, en algunas realizaciones entre 0,75:1 y 1,25:1, en algunas realizaciones entre 0,9:1 y 1,1:1, en algunas realizaciones entre 0,95:1 y 1,05:1, en algunas realizaciones 1:1, en algunas realizaciones entre 0,75:1 y 1:1, en algunas realizaciones entre 1:1 y 6:1, en algunas realizaciones entre 1:1 y 5:1, en algunas realizaciones entre 1:1 y 4:1, en algunas realizaciones entre 1:1 y 3:1, en algunas realizaciones entre 1:1 y 2: 1, en algunas realizaciones entre 1:1 y 1,5:1, en algunas realizaciones entre 1,5:1 y 6:1, en algunas realizaciones entre 1,5:1 y 5:1, en algunas realizaciones entre 1,5:1 y 4:1, en algunas realizaciones entre 1,5:1 y 3:1, en algunas realizaciones entre 2:1 y 6:1, en algunas realizaciones entre 2:1 y 4:1, en algunas realizaciones entre 3:1 y 6:1, en algunas realizaciones entre 3:1 y 5:1 y en algunas realizaciones entre 4:1 y 6:1.

En algunos casos, la proporción molar inicial de ácido pamoico con respecto a agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable (es decir, durante la formulación de las nanopartículas) puede ser diferente de la proporción molar de ácido pamoico con respecto a agente terapéutico que contienen nitrógeno protonable en las nanopartículas (es decir, tras la retirada del ácido hidrófobo no encapsulado y el agente terapéutico que contienen nitrógeno protonable). En otros casos, la proporción molar inicial de ácido pamoico con respecto a agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable (es decir, durante la formulación de las nanopartículas) puede ser esencialmente la misma que la proporción molar de ácido pamoico con respecto a agente terapéutico que contienen nitrógeno protonable en las nanopartículas (es decir, tras la retirada del ácido hidrófobo no encapsulado y el agente terapéutico que contienen nitrógeno protonable).

En algunos casos, se puede preparar una solución que contenga un agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable por separado de una solución que contenga el polímero y las dos soluciones se pueden combinar posteriormente antes de la formulación de nanopartículas. Por ejemplo, en una realización, una primera solución contiene el agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable y el ácido pamoico, y una segunda solución contiene el polímero y opcionalmente el ácido pamoico.

Las formulaciones en las que la segunda solución no contiene el ácido pamoico pueden resultar ventajosas, por ejemplo, para minimizar la cantidad de ácido pamoico usado en un procedimiento o, en algunos casos, para minimizar el tiempo de contacto entre el ácido pamoico y, por ejemplo, un polímero que puede degradarse en presencia del ácido pamoico. En otros casos, se puede preparar una solución individual que contenga el agente terapéutico que contienen nitrógeno protonable, el polímero y ácido pamoico.

En algunas realizaciones, el par iónico hidrófobo se puede formar antes de la formulación de las nanopartículas. Por ejemplo, se puede preparar una solución que contenga el par iónico hidrófobo antes de la formulación de las nanopartículas contempladas (por ejemplo, por medio de la preparación de una solución que contenga cantidades

apropiadas del agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable y el ácido pamoico). En otras realizaciones, el par iónico hidrófobo se puede formar durante de la formulación de las nanopartículas. Por ejemplo, se puede combinar una primera solución que contiene el agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable y una segunda solución que contiene el ácido pamoico durante una etapa de procedimiento para la preparación de las nanopartículas (por ejemplo, antes de la formación de la emulsión y/o durante la formulación de la emulsión). En determinadas realizaciones, el par iónico hidrófobo se puede formar antes del encapsulado del agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable y el ácido pamoico en una nanopartícula contemplada. En otras realizaciones, el par iónico hidrófobo se puede formar en la nanopartícula, por ejemplo, tras el encapsulado del agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable y ácido pamoico.

En algunas realizaciones, las nanopartículas desveladas pueden estar esencialmente libres del ácido pamoico usado durante la preparación de las nanopartículas. En otras realizaciones, las nanopartículas desveladas pueden comprender el ácido pamoico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el contenido de ácido en las nanopartículas desveladas puede estar entre un 0,05 por ciento en peso y un 35 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 0,05 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 0,5 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 1 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 2 por ciento en peso a un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 3 por ciento en peso a un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 5 por ciento en peso a un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 7 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 10 por ciento en peso a un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 15 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 20 por ciento en peso y un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 0,05 por ciento en peso y un 0,5 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 0,05 por ciento en peso y un 5 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 1 por ciento en peso a un 5 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 3 por ciento en peso y un 10 por ciento en peso, en algunas realizaciones entre un 5 por ciento en peso y un 15 por ciento en peso, y en algunas realizaciones entre un 10 por ciento en peso y un 20 por ciento en peso.

En algunas realizaciones, las nanopartículas desveladas liberan de forma sustancialmente inmediata (por ejemplo, durante 1 minuto a 30 minutos, de 1 minuto a 25 minutos, de 5 minutos a 30 minutos, de 5 minutos y 1 hora, 1 hora, o 24 horas) menos de un 2 %, menos de un 5 %, menos de un 10 %, menos de un 15 %, menos de un 20 %, menos de un 25 %, menos de un 30 % o menos de un 40 % del agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable, por ejemplo cuando se coloca en una solución de tampón de fosfato a temperatura ambiente (por ejemplo, 25 ºC) y/o 37 ºC. En determinadas realizaciones, las nanopartículas que comprenden el agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable puede liberar el agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable cuando se coloca en solución acuosa (por ejemplo, una solución tampón de fosfato), por ejemplo, a 25 ºC y/o a 37 ºC, a una tasa sustancialmente correspondiente de un 0,01 a un 50 %, en algunas realizaciones de un 0,01 a un 25 %, en algunas realizaciones de un 0,01 a un 15 %, en algunas realizaciones de un 0,01 a un 10 %, en algunas realizaciones de un 1 a un 40 %, en algunas realizaciones de un 5 a un 40 % y en algunas realizaciones de un 10 a un 40 % del agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable liberado en 1 hora. En algunas realizaciones, las nanopartículas que comprenden el agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable puede liberar el agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable cuando se coloca en solución acuosa (por ejemplo, una solución tampón de fosfato), por ejemplo, a 25 ºC y/o a 37 ºC, a una tasa sustancialmente correspondiente de un 10 a un 70 %, en algunas realizaciones de un 10 a un 45 %, en algunas realizaciones de un 10 a un 35 %, o en algunas realizaciones de un 10 a un 25 %, del agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable liberado durante 4 horas.

En algunas realizaciones, Las nanopartículas desveladas pueden conservar sustancialmente el agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable, por ejemplo, durante al menos 1 minuto, al menos 1 hora, o más, cuando se coloca en una solución tampón de fosfato a 37 ºC.

En una realización, las nanopartículas terapéuticas desveladas pueden incluir un ligando de actuación dirigida, por ejemplo, un ligando de bajo peso molecular. En determinadas realizaciones, el ligando de bajo peso molecular se conjuga con un polímero, y la nanopartícula comprende una determinada proporción de polímero con ligando conjugado (por ejemplo, PLA-PEG-ligando) con respecto a polímero no funcionalizado (por ejemplo, PLA-PEG o PLGA-PEG). La nanopartícula puede tener una proporción optimizada de estos dos polímeros de manera que se asocia una cantidad eficaz de ligando con la nanopartícula para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, tal como cáncer. Por ejemplo, una mayor densidad de ligando puede aumentar la unión de diana (unión celular/captación de diana), haciendo que la nanopartícula sea "específica para una diana". Alternativamente, una determinada concentración de polímero no funcionalizado (por ejemplo, copolímero de PLGA-PEG no funcionalizado) en la nanopartícula puede controlar la inflamación y/o el carácter inmunogénico (es decir, la capacidad de provocar una respuesta inmunológica) y permitir que la nanopartícula tenga una semivida que resulte adecuada para el tratamiento de la enfermedad o trastorno. Asimismo, el polímero no funcionalizado puede, en algunas realizaciones, rebajar la tasa de eliminación del sistema circulatorio por medio del sistema reticuloendotelial (RES). Por tanto, el polímero no funcionalizado puede proporcionar a la nanopartícula propiedades que puedan permitir que la partícula viaje a través del cuerpo tras administración. En algunas realizaciones, un polímero no funcionalizado puede equilibrar una concentración elevada de ligandos, lo cual puede acelerar la eliminación por parte del sujeto, dando como resultado una menor administración a los dianocitos.

En algunas realizaciones, las nanopartículas desveladas en el presente documento pueden incluir polímeros funcionalizados conjugados con el ligando que constituyente aproximadamente un 0,1-50, por ejemplo, 0,1 - 30, por ejemplo, 0,1 - 20, por ejemplo, 0,1-10 por ciento en moles de toda la composición polimérica de la nanopartícula (es decir, polímero funcionalizado + no funcionalizado). También se desvela en el presente documento, en otra realización, nanopartículas que incluyen un polímero conjugado (por ejemplo, covalentemente con (es decir, a través de un engarce (por ejemplo, un engarce de alquileno)) o un enlace) con uno o más ligandos de bajo peso molecular, en el que el porcentaje en peso del ligando de bajo peso molecular con respecto al polímero total está entre 0,001 y 5, por ejemplo, entre 0,001 y 2, por ejemplo, entre 0,001 y 1.

En algunas realizaciones, las nanopartículas desveladas pueden ser capaces de unirse eficazmente o asociarse a una entidad biológica, por ejemplo, un componente de membrana particular o un receptor superficial de célula. La actuación dirigida de un agente terapéutico (por ejemplo, a un tejido particular o tipo celular, a un tejido enfermo específico pero no un tejido normal, etc.) resulta deseable para el tratamiento de enfermedades específicas de tejido tales como cánceres de tumor sólido (por ejemplo, cáncer de próstata). Por ejemplo, al contrario que la administración sistémica de un agente citotóxico anti-cáncer, las nanopartículas desveladas en el presente documento puede evitar sustancialmente que el agente mate a las células sanas. Adicionalmente, las nanopartículas desveladas pueden permitir la administración de una dosis menor del agente (en comparación con la cantidad eficaz del agente administrado sin las nanopartículas o formulaciones divulgadas) que puede reducir los efectos secundarios no deseados comúnmente asociados a la quimioterapia tradicional.

En general, una "nanopartícula" se refiere a cualquier partícula que tenga un diámetro menor de 1000 nm, por ejemplo, de 10 nm a 200 nm. Las nanopartículas terapéuticas desveladas pueden incluir nanopartículas que tienen un diámetro de 60 a 120 nm, o de 70 a 120 nm, o de 80 a 120 nm, o de 90 a 120 nm, o de 100 a 120 nm, o de 60 a 130 nm, o de 70 a 130 nm, o de 80 a 130 nm, o de 90 a 130 nm, o de 100 a 130 nm, o de 110 a 130 nm, o de 60 a 140 nm, o de 70 a 140 nm, o de 80 a 140 nm, o de 90 a 140 nm, o de 100 a 140 nm, o de 110 a 140 nm, o de 60 a 150 nm, o de 70 a 150 nm, o de 80 a 150 nm, o de 90 a 150 nm, o de 100 a 150 nm, o de 110 a 150 nm, o de 120 a 150 nm.

Polímeros

Las nanopartículas comprenden una matriz de polímeros y un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el agente terapéutico y/o el resto de actuación dirigida (es decir, un ligando de bajo peso molecular) se puede asociar con al menos una parte de la matriz polimérica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un resto de actuación dirigida (por ejemplo, un ligando) se puede asociar convenientemente con la superficie de una matriz polimérica. En algunas realizaciones, la asociación covalente está mediada por un engarce. El agente terapéutico se puede asociar con la superficie de, encapsular dentro de, rodear por, y/o dispersar por toda la matriz polimérica.

Se conoce una amplia diversidad de polímeros y procedimientos para la formación de partículas a partir de los mismos en la técnica de administración de fármacos. En algunas realizaciones, la divulgación va destinada a nanopartículas con al menos dos macromoléculas, en la que la primera macromolécula comprende un primer polímero ligado a un ligando de bajo peso molecular (por ejemplo, un resto de actuación dirigida); y una segunda macromolécula que comprende un segundo polímero que no está ligado a un resto de actuación dirigida. La nanopartícula puede opcionalmente incluir uno o más polímeros adicionales, no funcionalizados.

Se puede usar cualquier polímero apropiado en las nanopartículas desveladas. Los polímeros pueden ser polímeros naturales o no naturales (sintéticos). Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros que comprenden dos o más monómeros. En términos de secuencia, los copolímeros pueden ser aleatorios, en bloques, o comprender una combinación de secuencias aleatorias o de bloques. Por lo general, los polímeros son polímeros orgánicos.

El término "polímero", tal como se usa en el presente documento, recibe su significado común como se usa en la técnica, es decir, una estructura molecular que comprende una o más unidades de repetición (monómeros), conectadas por enlaces covalentes. Las unidades de repetición pueden ser todas idénticas, o en algunos casos, puede haber más de un tipo de unidad de repetición presente dentro del polímero. En algunos casos, el polímero puede tener procedencia biológica, es decir, un biopolímero. Los ejemplos no limitantes incluyen péptidos o proteínas. En algunos casos, los restos adicionales también pueden estar presentes en el polímero, por ejemplo restos biológicos tales como los descritos a continuación. Si está presente más de un tipo de unidad de repetición dentro del polímero, entonces se dice que el polímero es un "copolímero". Se comprende que en cualquier realización que emplee un polímero, el polímero a emplear puede ser un copolímero en algunos casos. Las unidades de repetición que forman el copolímero pueden estar dispuestas de cualquier forma. Por ejemplo, las unidades de repetición pueden estar dispuestas en orden aleatorio, en orden alternativo, o como copolímero en forma de bloques, es decir, que comprende una o más regiones que comprenden cada una de ellas una primera unidad de repetición (por ejemplo, un primer bloque) y una o más regiones que comprenden cada una de ellas una segunda unidad de repetición (por ejemplo, un segundo bloque), etc. Los copolímeros de bloques pueden tener dos (un copolímero de dibloques), tres (un copolímero de tribloques) o más números de bloques distintos.

Las partículas desveladas pueden incluir copolímeros, que, en algunas realizaciones, describen dos o más polímeros (tales como los descritos en el presente documento) que se han asociado unos con otros, normalmente por medio de un enlace de dos o más polímeros de forma conjunta. Por tanto, un copolímero puede comprender un primer polímero

y un segundo polímero, que se han conjugado de forma conjunta para formar un copolímero de bloques en el que el primer polímero puede ser un primer bloque del copolímero de bloques y el segundo polímero puede ser un segundo bloque del copolímero de bloques. Por supuesto, los expertos en la técnica comprenderán que un copolímero de bloques puede, en algunos casos, contener múltiples bloques de un polímero, y que un "copolímero de bloques", tal como se usa en el presente documento, no está limitado a únicamente copolímeros de bloques que tienen únicamente un primer bloque individual y un segundo bloque individual. Por ejemplo, un copolímero de bloques puede comprender un primer bloque que comprende un primer polímero, un segundo bloque que comprende un segundo polímero, y un tercer bloque que comprende un tercer polímero o el primer polímero, etc. En algunos casos, los copolímeros de bloques pueden contener cualquier número de primeros bloques de un primer polímero y segundos bloques de un segundo polímero (y en determinados casos, terceros bloques, cuartos bloques, etc.). Además, se debería apreciar que los copolímeros de bloques también se pueden formar, en algunos casos, a partir de otros copolímeros de bloques. Por ejemplo, un primer copolímero de bloques se puede conjugar con otro polímero (que puede ser un homopolímero, un biopolímero, otro copolímero de bloques, etc.), para formar un nuevo copolímero de bloques que contiene múltiples tipos de bloques y/o a otros restos (por ejemplo, a restos no poliméricos).

En algunas realizaciones, el polímero (por ejemplo, un copolímero, por ejemplo, copolímero de bloques) puede ser anfífilo, es decir, tener una parte hidrófila y una parte hidrófoba, o una parte relativamente hidrófila y una parte relativamente hidrófoba. Un polímero hidrófilo puede ser uno que generalmente atraiga agua y un polímero hidrófobo puede ser que generalmente repela el agua. Un polímero hidrófilo o hidrófobo se pueden identificar, por ejemplo, por medio de la preparación de una muestra del polímero y midiendo su ángulo de contacto con el agua (típicamente, el polímero tiene un ángulo de contacto menor de 60º, mientras que el polímero hidrófobo tiene un ángulo de contacto de más de aproximadamente 60º). En algunos casos, la naturaleza hidrófila de los dos o más polímeros se puede medir con respecto al otro, es decir, un primer polímero puede ser más hidrófilo que un segundo polímero. Por ejemplo, el primer polímero puede tener un ángulo de contacto menor que el segundo polímero.

En un conjunto de realizaciones, un polímero (por ejemplo, un copolímero, por ejemplo, copolímero de bloques) contemplado en el presente documento incluye un polímero biocompatible, es decir, el polímero no induce típicamente una respuesta adversa cuando se inserta o inyecta en un sujeto vivo, por ejemplo, sin inflamación significativa y/o rechazo agudo del polímero por parte del sistema inmunológico, por ejemplo, por medio de respuesta de linfocito T. Por consiguiente, las partículas terapéuticas contempladas en el presente documento pueden ser no inmunogénicas. La expresión no inmunogénico tal como se usa en el presente documento, se refiere a un factor de crecimiento endógeno en su estado nativo que normalmente no induce, o induce solo niveles mínimos, de anticuerpos circulantes, linfocitos T o células reactivos inmunológicas, y que normalmente no induce una respuesta inmunológica del individuo contra sí mismo.

Típicamente, la biocompatibilidad se refiere al rechazo agudo de material por parte de al menos una parte del sistema inmunológico, es decir, un material no biocompatible implantado en un sujeto provoca una respuesta inmunológica en el sujeto que puede ser lo suficientemente grave como para que el rechazo del material por parte del sistema inmunológico no se puede controlar de manera apropiada, y con frecuencia es de un grado tal que el material se debe retirar del sujeto. Un ensayo simple para determinar la biocompatibilidad puede consistir en exponer un polímero a células in vitro; los polímeros biocompatibles con polímeros que típicamente no tienen como resultado una muerte celular significativa en concentraciones moderadas, por ejemplo, a concentraciones de 50 microgramos/10^6 células. Por ejemplo, un polímero biocompatible puede provocar menos de un 20 % de muerte celular cuando se expone a células como fibroblastos o células epiteliales, incluso si se produce la fagocitosis o la captación por parte de dichas células. Los ejemplos no limitantes de polímeros biocompatibles que pueden resultar útiles en diversas realizaciones incluyen polidioxanona (PDO), polihidroxialcanoato, polihidroxibutirato, poli(sebacato de glicerol), poliglicólido (es decir, poli(ácido glicólico)) (PGA), polilactida (es decir, poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico)-co-poli(ácido glicólico) (PLGA), policaprolactona o copolímeros o derivados que incluyen estos y/u otros copolímeros.

En determinadas realizaciones, los polímeros biocompatibles contemplados pueden ser biodegradables, es decir, el polímero es susceptible de degradación, química y/o biológica, en un entorno fisiológico, tal como dentro del cuerpo. Tal como se usa en el presente documento, los polímeros "biodegradables" son aquellos que, cuando se introducen en las células, se rompen por medio de la maquinaria celular (degradable biológicamente) y/o por medio de un procedimiento químico, tal como hidrólisis, (degradable químicamente) para dar lugar a componentes que las células pueden reutilizar o eliminar, sin efecto tóxico significativo sobre las células. En una realización, el polímero biodegradable y sus subproductos de degradación pueden ser biocompatibles.

Las partículas desveladas en el presente documento pueden o no contener PEG. Además, determinadas realizaciones pueden estar relacionadas con copolímeros que contienen poli(éster-éteres), por ejemplo, polímeros que tienen unidades repetidas unidas por medio de enlaces de éster (por ejemplo, enlaces R-C(O)-O-R´) y enlaces de éter (por ejemplo, enlaces R-O-R´). En algunas realizaciones, un polímero biodegradable, tal como un polímero hidrolizable, que contiene grupos de ácido carboxílico, se puede conjugar con unidades de repetición de poli(etilen glicol) para formar un poli(éster-éter). Un polímero (por ejemplo, un copolímero, por ejemplo, un copolímero de bloques) que contiene unidades de repetición de poli(etilen glicol) también se puede denominar como polímero "PEGilado".

Por ejemplo, un polímero contemplado puede ser uno que se hidrolice espontáneamente tras exposición al agua (por ejemplo, dentro de un sujeto) o el polímero se puede degradar tras la exposición al calor (por ejemplo, a temperaturas

de aproximadamente 37 ºC). La degradación del polímero puede suceder a varias velocidades, dependiendo del polímero o copolímero usado. Por ejemplo, la semivida del polímero (el tiempo al cual el 50 % del polímero se puede degradar para dar lugar a monómeros y/u otros restos no poliméricos) puede ser del orden de días, semanas, meses o años, dependiendo del polímero. Los polímeros se pueden degradar biológicamente, por ejemplo, por medio de actividad enzimática o maquinaria celular, en algunos casos, por ejemplo, a través de la exposición a un lisozima (por ejemplo, que tiene un pH relativamente bajo). En algunos casos, los polímeros se pueden romper para dar lugar a monómeros y/u otros restos no poliméricos que las células pueden reutilizar o eliminar, sin efecto tóxico significativo sobre las células (por ejemplo, polilactida se puede hidrolizar para formar ácido láctico, poliglicólido se puede hidrolizar para formar ácido glicólico, etc.).

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres, que incluyen copolímeros que comprenden ácido láctico y unidades de ácido glicólico, tales como poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) y poli(lactida-co-glicólido), colectivamente denominadas en el presente documento "PLGA"; y homopolímeros que comprenden unidades de ácido glicólico, denominadas en el presente documento "PGA", y unidades de ácido láctico, tales como poli-ácido L-láctico, poli-ácido D-láctico, poli-ácido D,L-láctico, poli-L-lactida, poli-D-lactida y poli-D,L-lactida, colectivamente denominadas en el presente documento "PLA". En algunas realizaciones, los poliésteres a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, polihidroxiácidos; polímeros PEGilados y copolímeros de lactida y glicólido (por ejemplo, PLA PEGilado, PGA PEGilado, PLGA PEGilado y derivados de los mismos). En algunas realizaciones, los poliésteres incluyen, por ejemplo, polianhídridos, poli(orto éster) PEGilado poli(orto éster), poli(caprolactona), poli(caprolactona) PEGilada, polilisina, polilisina PEGilada, poli(etilen imina), poli(etilen imina) PEGilada, poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster de serina), poli(4-hidroxi-éster de L-prolina), poli[ácido α-(4-aminobutil)-L-glicólico] y derivados de los mismos.

En algunas realizaciones, un polímero puede ser PLGA. PLGA es un copolímero biocompatible y biodegradable de ácido láctico y ácido glicólico, y diversas formas de PLGA se pueden caracterizar por medio de la proporción de ácido láctico:ácido glicólico. El ácido láctico puede ser ácido L-láctico, ácido D-láctico o ácido D,L-láctico. La tasa de degradación de PLGA se puede ajustar por medio de la modificación de la proporción de ácido láctico-ácido glicólico. En algunas realizaciones, PLGA se puede caracterizar por medio de una proporción de ácido láctico:ácido glicólico de aproximadamente 85:15, aproximadamente 75:25, aproximadamente 60:40, aproximadamente 50:50, aproximadamente 40:60, aproximadametne 25:75 o aproximadamente 15:85. En algunas realizaciones, la proporción de ácido láctico con respecto a monómeros de ácido glicólido en el polímero de la partícula (por ejemplo, el copolímero de bloques PLGA o el copolímero de bloques PLGA-PEG), puede estar seleccionada para optimizar los diversos parámetros tales como captación de agua, y se pueden optimizar los parámetros cinéticos de degradación de polímero y/o liberación de agente terapéutico.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser uno o más polímeros acrílicos. En determinadas realizaciones, los polímeros acrílicos incluyen, por ejemplo, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de amino alquilo, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), copolímero de alquilamida de ácido metacrílico, poli(metacrilato de metilo), poli(poliacrilamida de ácido metacrílico, copolímero de metacrilato de amino alquilo, copolímeros de metacrilato de glicidilo, policianoacrilatos, y combinaciones que comprenden uno o más de los polímeros anteriores. El polímero acrílico puede comprender copolímeros completamente polimerizados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un bajo contenido de grupos de amonio cuaternario.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser polímeros catiónicos. En general, los polímeros catiónicos son susceptibles de condensación y/o protección de hebras con carga negativa de ácido nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN o derivados de los mismos). Los polímeros que contienen amina tales como poli(lisina), polietilen imina (PEI) y dendrímeros de poli(amidoamina) se contemplan para su uso, en algunas realizaciones, en una partícula desvelada.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres degradables que portan cadenas laterales catiónicas. Los ejemplos de estos poliésteres incluyen poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster de serina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina).

Se contempla que el PEG puede tener una terminación e incluir un grupo terminal, por ejemplo, cuando PEG no está conjugado a un ligando. Por ejemplo, PEG puede terminar en un hidroxilo, un metoxi u otro grupo alcoxilo, un grupo metilo u otro grupo alquilo, un grupo arilo, un grupo carboxílico, una amina, una amida, un grupo acetilo, un grupo guanidino o un imidazol. Otros grupos terminales contemplados incluyen azida, alquino, maleimida, aldehído, hidrazida, hidroxilamina, alcoxi amina o restos tiol.

Los expertos en la técnica conocen procedimientos y técnicas para la PEGilación de un polímero, por ejemplo, mediante el uso de EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) y NHS (N-hidroxisuccinimida) para hacer reaccionar un polímero con un grupo PEG que termina en una amina, por medio de técnicas de polimerización con apertura de anillo (ROMP) o similares.

En una realización, el peso molecular (o por ejemplo, la proporción de pesos moleculares de, por ejemplo, bloques diferentes de un copolímero) de los copolímeros se puede optimizar para el tratamiento eficaz tal como se desvela en el presente documento. Por ejemplo, el peso molecular de un polímero puede afectar a la tasa de degradación de las partículas (tal como cuando es posible ajustar un polímero biodegradable), solubilidad, captación de agua, y

parámetros cinéticos de liberación de fármaco. Por ejemplo, el peso molecular del polímero (o por ejemplo, la proporción de pesos moleculares de, por ejemplo, bloques diferentes de un copolímero) se puede ajustar de manera que la partícula se biodegrade en el sujeto objeto de tratamiento en un período de tiempo razonable (que varía de una pocas horas a 1-2 semanas, 3-4 semanas, 5-6 semanas, 7-8 semanas, etc.).

Por ejemplo, una partícula desvelada puede comprender un copolímero de dibloques de PEG y PL(G)A, en el que por ejemplo, la parte de PEG puede tener un peso molecular promedio expresado en número de 1.000-20.000, por ejemplo, 2.000-20.000, por ejemplo, de 2 a 10.000 y la parte de PL(G)A puede tener un peso molecular promedio expresado en número de 5.000 a 20.000 o de 5.000-100.000, por ejemplo, 20.000-70.000, por ejemplo, 15.000-50.000.

Por ejemplo, se desvela en el presente documento una nanopartícula terapéutica a modo de ejemplo que incluye de un 10 a un 99 por ciento de copolímero de poli(ácido láctico)-poli(etilen)glicol o copolímero de poli(ácido láctico)-co-poli(ácido glicólico)-poli(etilen)glicol, o de un 20 a un 80 por ciento en peso, de un 40 a un 80 por ciento en peso, o de un 30 a un 50 por ciento en peso, o de un 70 a un 90 por ciento en peso de copolímero de poli(ácido láctico)-poli(etilen)glicol o copolímero de poli(ácido láctico)-co-poli(ácido glicólico)-poli(etilen)glicol. Los copolímeros de poli(ácido láctico)-poli(etilen)glicol pueden incluir un peso molecular promedio expresado en número de 15 a 20 kDa, o de 10 a 25 kDa de poli(ácido láctico) y un peso molecular promedio expresado en número de 4 a 6, o de 2 kDa a 10 kDa de poli(etilen)glicol.

En algunas realizaciones, el copolímero de poli(ácido láctico)-poli(etilen)glicol puede tener una fracción de peso molecular promedio expresado en número de poli(ácido láctico) de 0,6 a 0,95, en algunas realizaciones entre 0,7 y 0,9, en algunas realizaciones entre 0,6 y 0,8, en algunas realizaciones entre 0,7 y 0,8, en algunas realizaciones entre 0,75 y 0,85, en algunas realizaciones entre 0,8 y 0,9, y en algunas realizaciones entre 0,85 y 0,95. Se debería comprender que la fracción de peso molecular promedio expresada en número de poli(ácido láctico) se puede calcular dividiendo el peso molecular promedio expresado en número del componente de poli(ácido láctico) del copolímero entre la suma del peso molecular promedio expresado en número del componente de poli(ácido láctico) y el peso molecular promedio expresado en número del componente de poli(etilen)glicol.

Las nanopartículas desveladas pueden incluir opcionalmente de un 1 a un 50 por ciento en peso de poli(ácido láctico) o poli(ácido láctico)-copoli(ácido glicólico) (que no incluye PEG) o puede incluir opcionalmente de un 1 a un 50 por ciento en peso, o de un 10 a un 50 por ciento en peso o de un 30 a un 50 por ciento en peso de poli(ácido láctico) o poli(ácido láctico)-co-poli(ácido glicólico). Por ejemplo, el poli(ácido láctico) o poli(ácido láctico)-co-poli(ácido glicólico) puede tener un peso molecular promedio expresado en número de 5 a 15 kDa, o de 5 a 12 kDa. PLA a modo de ejemplo puede tener un peso molecular promedio expresado en número de 5 a 10 kDa. PLGA a modo de ejemplo puede tener un peso molecular promedio expresado en número de 8 a 12 kDa.

Una nanopartícula terapéutica puede, en algunas realizaciones, contener de un 10 a un 30 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 10 a un 25 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 10 a un 20 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 10 a un 15 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 15 a un 20 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 15 a un 25 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 20 a un 25 por ciento en peso, en algunas realizaciones de un 20 a un 30 por ciento en peso, o en algunas realizaciones de un 25 a un 30 por ciento en peso de poli(etilen)glicol, en la que el poli(etilen)glicol puede estar presente como copolímero de poli(ácido láctico)-poli(etilen)glicol, copolímero de poli(ácido láctico)-co-poli(ácido glicólico)-poli(etilen)glicol u homopolímero de poli(etilen)glicol. En determinadas realizaciones, los polímeros de las nanopartículas se pueden conjugar con un lípido. el polímero puede ser, por ejemplo, un PEG con terminación de lípido.

Restos de Actuación Dirigida

Se proporciona en el presente documento, en algunas realizaciones, nanopartículas que pueden incluir un resto opcional de actuación dirigida, es decir, un resto capaz de unirse o asociarse con una entidad biológica, por ejemplo, un componente de membrana, un receptor de superficie celular, un antígeno o similares. Un resto de actuación dirigida presente sobre la superficie de la partícula puede permitir que la partícula se localice en un sitio particular de actuación dirigida, por ejemplo, un tumor, un punto de enfermedad, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. Como tal, la nanopartícula puede a continuación ser "específica para una diana". El fármaco u otra carga a continuación, en algunos casos, se pueden liberar de la partícula y permitir la interacción local con el sitio particular de actuación dirigida.

En una realización, la nanopartícula desvelada incluye un resto de actuación dirigida que es un ligando de bajo peso molecular. El término "unir" o "unión", tal como se usa en el presente documento, hace referencia a la interacción entre un par de moléculas correspondiente o partes de las mismas que exhiben afinidad mutua o capacidad de unión, típicamente debido a una interacción o unión específica o no específica, incluyendo, aunque no de forma limitativa, interacciones bioquímicas, fisiológicas y/o químicas.

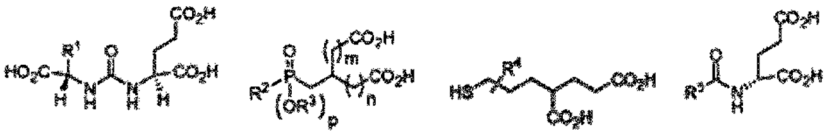
La "unión biológica" define un tipo de interacción que tiene lugar entre pares de moléculas que incluyen proteínas, ácidos nucleicos, glucoproteínas, hidratos de carbono, hormonas o similares. La expresión "pareja de unión" se refiere a una molécula que puede experimentar unión con una molécula particular. "Unión específica" se refiere a moléculas, tales como polinucleótidos, que son capaces de unirse o reconocer una pareja de unión (o un número limitado de

parejas de unión) sustancialmente en mayor grado que otras, entidades biológicas similares. En un conjunto de realizaciones, el resto de actuación dirigida tiene una afinidad (tal como se mide por medio de la constante de disociación) menor de 1 micromolar, al menos 10 micromolar o al menos 100 micromolar.

Por ejemplo, una parte de actuación dirigida puede provocar que las partículas se localicen en un tumor (por ejemplo, un tumor sólido), un punto de enfermedad, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. dentro del cuerpo del sujeto, dependiendo del resto de actuación dirigida que se use. Por ejemplo, el ligando de bajo peso molecular se puede localizar en un tumor sólido, por ejemplo, tumores de mama o próstata o células cancerígenas. El sujeto puede ser una persona o un animal no humano. Los ejemplos de sujetos incluyen, aunque sin limitación, un mamífero tal como un perro, un gato, un caballo, un burro, un conejo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, una rata, un ratón, un conejillo de indias, un hámster, un primate, una persona o similares.

Los restos de actuación dirigida contemplados pueden incluir moléculas pequeñas. En determinadas realizaciones, la expresión "molécula pequeña" se refiere a compuestos orgánicos, ya sean de origen natural o creados artificialmente (por ejemplo, por medio de síntesis química) que tienen un peso molecular relativamente bajo que no sean proteínas, polipéptidos o ácidos nucleicos. Típicamente, las moléculas pequeñas tienen múltiples enlaces carbono-carbono. En determinadas realizaciones, las moléculas pequeñas son menores de 2000 g/mol de tamaño. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas son menores de 1500 g/mol o menores de 1000 g/mol. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas son menores de 800 g/mol o menores de 500 g/mol, por ejemplo de 100 g/mol a 600 g/mol o de 200 g/mol a 500 g/mol.

En algunas realizaciones, el ligando de bajo peso molecular es de Fórmula I, II, III o IV:



I II III IV

y enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereómeros o racematos de los mismos;

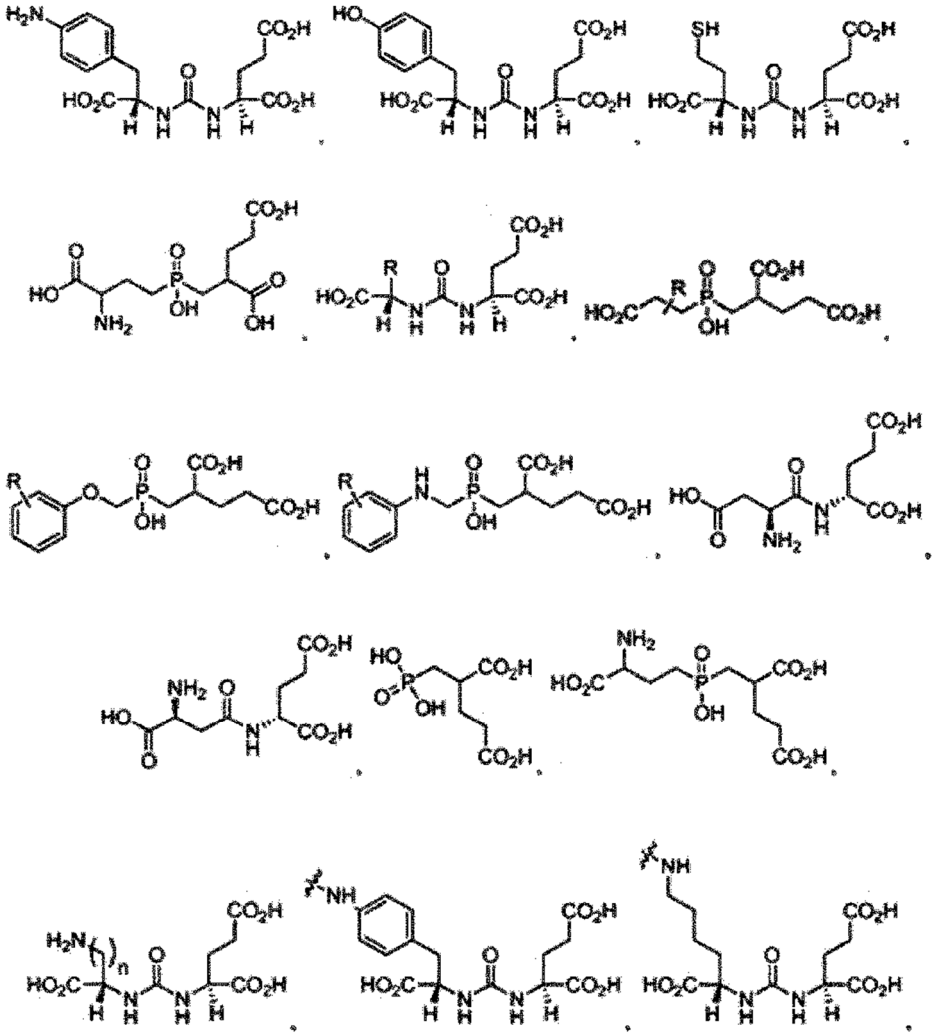
en los que m y n son cada uno de ellos, de manera independiente, 0, 1, 2 o 3; p es 0 o 1;

R^1, R^2, R^4 y R^5 cada uno, de manera independiente, están seleccionados entre el grupo que consiste en alquilo (por ejemplo, alquilo C_{1-10}, alquilo C_{1-6} o alquilo C_{1-4}), arilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, fenilo o piridinilo) y cualquier combinación de los mismos; y R^3 es H o alquilo C_{1-6} (por ejemplo, CH_3).

Para los compuestos de Fórmula I, II, III y IV, R1, R2, R4 o R5 comprenden puntos de unión a la nanopartícula, por ejemplo, un punto de unión a un polímero que forma parte de una nanopartícula desvelada, por ejemplo, PEG. El punto de unión se puede formar por medio de un enlace covalente, un enlace iónico, enlace hidrógeno, un enlace formado por medio de adsorción que incluye adsorción química y adsorción física, un enlace formado a partir de enlaces de van der Waals, o fuerzas de dispersión. Por ejemplo, si R^1, R^2, R^4 o R^5 se definen como anilina o un grupo alquil-C_{1-6}-NH_2, se podría retirar cualquier hidrógeno (por ejemplo, un hidrógeno amino) de estos grupos funcionales de manera que el ligando de bajo peso molecular se una covalentemente a la matriz polimérica (por ejemplo, el bloque PEG de la matriz polimérica) de la nanopartícula. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "enlace covalente" se refiere a un enlace entre dos átomos formados por medio de compartición de al menos un par de electrones.

En realizaciones particulares de Fórmula I, II, III o IV, R^1, R^2, R^4 y R^5 cada uno, de manera independiente, alquilo C_{1-6} o fenilo o cualquier combinación de alquilo C_{1-6} o fenilo, que están independientemente sustituidos una o más veces con OH, SH, NH_2 o CO_2H y en el que el grupo alquilo puede estar interrumpido por N(H), S u O. En otra realización, R_1, R_2, R_4 y R_5 son cada uno, de manera independiente, CH_2-Ph, $(CH_2)_2$-SH, CH_2-SH, $(CH_2)_2C(H)(NH_2)CO_2H$, $CH_2C(H)(NH_2)CO_2H$, $CH(NH_2)CH_2CO_2H$, $(CH_2)_2C(H)(SH)CO_2H$, CH_2-N(H)-Ph, O-CH_2-Ph, u O-$(CH_2)_2$-Ph, en la que cada Ph puede estar sustituido de manera independiente una o más veces con OH, NH_2, CO_2H, o SH. Para estas fórmulas, los grupos NH_2, OH o SH sirven como punto de unión covalente a la nanopartícula (por ejemplo, -H(H)-PEG, -O-PEG, o -S-PEG).

Los ligandos a modo de ejemplo incluyen:



y enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, diastereómeros o racematos de los mismos, en los que los grupos NH_2, OH o SH sirven como punto de unión covalente a la nanopartícula (por ejemplo, -H(H)-PEG, -O-PEG, o -S-PEG) o indica el punto de unión a la nanopartícula, en la que n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, y en la que R está seleccionado de forma independiente entre el grupo que consiste en NH_2, SH, OH, CO_2H, alquilo C_{1-6} que está sustituido con NH_2, SH, OH, o CO_2H y fenilo que está sustituido con NH_2, SH, OH, o CO_2H y en la que R sirve como punto de unión covalente a la nanopartícula (por ejemplo, -N(H)-PEG, -S-PEG, -O-PEG, o CO_2-PEG). Estos compuestos pueden estar sustituidos de forma adicional con NH_2, SH, OH, CO_2H, alquilo C_{1-6} que está sustituido con NH_2, SH, OH, o CO_2H o fenilo que está sustituido con NH_2, SH, OH o CO_2H, en las que estos grupos funcionales también pueden servir como punto de unión covalente a la nanopartícula.

En algunas realizaciones, los restos de actuación dirigida de molécula pequeña que se pueden usar para dianocitos asociados a tumores sólidos tales como tumores de cáncer de próstata o mama incluyen inhibidores de PSMA peptidasa tales como 2-PMPA, GPI5232, VA- 033, fenilalquilfosfonamidatos y/o análogos y derivados de los mismos. En algunas realizaciones, los restos de actuación dirigida de molécula pequeña que se pueden usar para los dianocitos asociados a tumores de cáncer de próstata incluyen derivados de tiol e indol tiol, tales como derivados de ácido 2-MPPA y 3-(2-mercaptoetil)-1H-indol-2-carboxílico. En algunas realizaciones, los restos de actuación dirigida de molécula pequeña que se pueden usar para los dianocitos asociados a tumores de cáncer de próstata incluyen derivados de hidroxamato. En algunas realizaciones, los restos de actuación dirigida de molécula pequeña que se pueden usar para los dianocitos asociados a tumores de cáncer de próstata incluyen inhibidores basados en PBDA y urea, tales como ZJ 43, ZJ 11, ZJ 17, ZJ 38 y/o análogos y derivados de los mismos, agentes de actuación dirigida de receptor de andrógeno (ARTAs), poliaminas, tales como putrescina, espermina y espermidina, inhibidores de la enzima glutamato carboxilasa II (GCPII), también conocidos como NAAG Peptidasa o NAALADasa.

En otra realización, el resto de actuación dirigida puede ser un ligando que dirige Her2, EGFR, receptor de folato o receptores de toll. En otra realización, el resto de actuación dirigida es folato, ácido fólico, o una molécula de unión de EGFR.

Por ejemplo, los restos de actuación dirigida contemplados pueden incluir un ácido nucleico, polipéptido, glucoproteína, carbohidrato o lípido. Por ejemplo, un resto de actuación dirigida puede ser un resto de actuación dirigida de ácido nucleico (por ejemplo, un aptámero, por ejemplo, el aptámero A 10) que se une a un marcador específico de tipo celular. En general, un aptámero es un oligonucleótido (por ejemplo, ADN, ARN o un análogo o derivado del mismo) que se une a una diana particular, tal como un polipéptido. En algunas realizaciones, el resto de actuación dirigida puede ser un ligando de origen natural o sintético para un receptor de superficie celular, por ejemplo, un factor de crecimiento, hormona, LDL, transferrina, etc. Un resto de actuación dirigida puede ser un anticuerpo, cuyo término se pretende que incluya fragmentos de anticuerpo. Se pueden identificar partes características de restos de actuación dirigida, de cadena individual de anticuerpos, por ejemplo, usando procedimientos tales como presentación en fagos.

Los restos de actuación dirigida pueden ser un péptido de actuación dirigida o un peptidomimético de actuación dirigida que tenga una longitud de hasta aproximadamente 50 residuos. Por ejemplo, un resto de actuación dirigida puede incluir la secuencia de amino ácidos AKERC, CREKA, ARYLQKLN, o AXYLZZLN, en la que X y Z son amino ácidos variables, o variantes de conservación o peptidomiméticos de los mismos. En realizaciones particulares, el resto de actuación dirigida es un péptido que incluye la secuencia de amino ácidos AKERC, CREKA, ARYLQKLN, o AXYLZZLN, en la que X y Z son amino ácidos disponibles, y tiene una longitud de menos de 20, 50 o 100 residuos. El péptido CREKA (Cys Arg Glu Lys Ala) o un peptidomimético del mismo del octapéptido AXYLZZLN también se contemplan como restos de actuación dirigida, así como también los péptidos, o variantes de conservación o peptidomiméticos de los mismos, que se unen o forman un complejo con colágeno IV, o que se dirigen a la membrana de basamento tisular (por ejemplo, la membrana de basamento de un vaso sanguíneo). Los restos de actuación dirigida a modo de ejemplo incluyen péptidos que se dirigen a ICAM (molécula de adhesión intracelular, por ejemplo, ICAM-1).

Los restos de actuación dirigida desvelados en el presente documento, en algunas realizaciones, se pueden conjugar a un polímero o copolímero desvelado (por ejemplo, PLA-PEG) y dicho conjugado polimérico puede formar parte de una nanopartícula divulgada.

En algunas realizaciones, la nanopartícula terapéutica puede incluir un conjugado de polímero-fármaco. Por ejemplo, se pueden conjugar un fármaco a un polímero desvelado o copolímero (por ejemplo, PLA-PEG) y dicho conjugado de polímero-fármaco puede formar parte de una nanopartícula desvelada. Por ejemplo, una nanopartícula terapéutica desvelada puede incluir opcionalmente de un 0,2 a un 30 por ciento en peso de un PLA-PEG o PLGA-PEG, en el que el PEG está funcionalizado con un fármaco (por ejemplo, un PLA-PEG-Fármaco).

Un conjugado polimérico desvelado (por ejemplo, un conjugado de polímero-ligando) se puede formar usando cualquier técnica de conjugación apropiada. Por ejemplo, se pueden conjugar dos compuestos tales como un resto de actuación dirigida o un fármaco y un polímero biocompatible (por ejemplo, un polímero biocompatible y un poli(etilen)glicol) de manera conjunta usando técnicas tales como química EDC-NHS clorhidrato de (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida) o una reacción que implica una maleimida o un ácido carboxílico, que puede estar conjugado a un extremo de un tiol, una amina o un poliéter funcionalizado de forma similar. La conjugación de un resto de actuación dirigida o fármaco y un polímero para formar un conjugado de resto de actuación dirigida-polímero o un conjugado polímero-fármaco se puede llevar a cabo en un disolvente orgánico, tal como, aunque no de forma limitativa, diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida, tetrahidrofurano, acetona o similar. Las condiciones de reacción específicas pueden determinarse por los expertos en la materia usando no más que una experimentación de rutina.

En otro conjunto de realizaciones, se puede llevar a cabo una reacción de conjugación haciendo reaccionar un polímero que comprende un grupo funcional de ácido carboxílico (por ejemplo, un compuesto de poli(éster-éter)) con un polímero u otro resto (tal como un resto de actuación dirigida o fármaco) que comprende una amina. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar un resto de dirección, tal como un ligando de bajo peso molecular o un fármaco, tal como desatinib, con una amina para formar un resto que contiene amina, que se puede conjugar posteriormente con el ácido carboxílico del polímero. Dicha reacción puede tener lugar como reacción de etapa individual, es decir, la conjugación se lleva a cabo sin usar intermedios tales como N-hidroxisuccinimida o una maleimida. En algunas realizaciones, se puede hacer reaccionar un fármaco con un engarce que contiene amina para formar un fármaco que contiene amina, que se puede conjugar posteriormente con el ácido carboxílico del polímero como se ha descrito con anterioridad. Se puede lograr la reacción de conjugación entre el resto que contiene amina y el polímero con terminación de ácido carboxílico (tal como un compuesto de poliéster-éter), en un conjunto de realizaciones, mediante la adición del resto que contiene amina, solubilizado en un disolvente orgánico tal como (pero sin limitación) diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, tetrahidrofurano, acetona, formamida, dimetilformamida, piridinas, dioxano o dimetilsulfóxido, a una solución que contiene el polímero con terminación de ácido carboxílico. El polímero con terminación de ácido carboxílico puede estar presente en un disolvente orgánico tal como, aunque no de forma limitativa, diclorometano, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida, tetrahidrofurano o acetona. La reacción entre el resto que contiene amina y el polímero con terminación de ácido carboxílico puede tener lugar de forma espontánea, en algunos casos. Los reaccionantes no conjugados se pueden lavar tras dichas reacciones, y el polímero se puede precipitar en disolventes tales como, por ejemplo, éter de etilo, hexano, metanol o etanol. En determinadas realizaciones, se puede formar un conjugado entre un resto que contiene alcohol y un grupo funcional de ácido carboxílico de un polímero, que se puede lograr similarmente a como se ha descrito para los conjugados de aminas y ácidos carboxílicos.

Preparación de Nanopartículas

Otro aspecto de la presente divulgación va destinado a sistemas y procedimientos de preparación de las nanopartículas desveladas. En algunas realizaciones, mediante el uso de dos o más polímeros diferentes (por ejemplo, copolímeros, por ejemplo, copolímeros de bloques) en diferentes proporciones y la producción de partículas a partir de los polímeros (por ejemplo, copolímeros, por ejemplo, copolímeros de bloques), es posible controlar las propiedades de las partículas. Por ejemplo, se puede escoger un polímero (por ejemplo, un copolímero, por ejemplo, un copolímero de bloques) puede incluir un ligando de bajo peso molecular, con otro polímero (por ejemplo, un copolímero, por ejemplo, un copolímero de bloques) por su biocompatibilidad y/o su capacidad para controlar el carácter inmunogénico de la partícula resultante.

El disolvente usado en el procedimiento de preparación de nanopartículas incluye el ácido hidrófobo ácido pamoico, que puede conferir propiedades ventajosas a las nanopartículas preparadas usando el procedimiento. Como se mencionó anteriormente, en algunos casos, el ácido hidrófobo puede mejorar la carga de fármaco de las nanopartículas desveladas. Asimismo, en algunos casos, las propiedades de liberación controlada de las nanopartículas desveladas se pueden mejorar por medio del uso del ácido hidrófobo. En algunos casos, el ácido hidrófobo se puede incluir en, por ejemplo, una solución orgánica o una solución acuosa usada en el procedimiento. En una realización, el fármaco se combina con una solución orgánica y el ácido hidrófobo y opcionalmente uno o más polímeros. La concentración de ácido hidrófobo en solución usada para disolver el fármaco se ha comentado anteriormente y puede ser, por ejemplo, entre un 1 por ciento y un 30 por ciento en peso, etc.

Las propiedades tales como funcionalidad superficial, carga superficial, tamaño, potencial zeta (ζ), naturaleza hidrófoba, capacidad de control de la naturaleza inmunogénica, y similares, se pueden controlar en gran medida usando el procedimiento desvelado. Por ejemplo, se puede sintetizar una biblioteca de partículas, y se pueden monitorizar para identificar las partículas que tienen una proporción molar de polímeros que permita la presencia de una densidad específica de restos (por ejemplo, ligandos de bajo peso molecular) en la superficie de la partícula. Esto permite la preparación de partículas que tengan una o más propiedades específicas, por ejemplo, un tamaño específico y una densidad superficial específica de restos, sin un grado de esfuerzo indebido. En consecuencia, determinadas realizaciones van destinadas a técnicas de monitorización que usan dichas bibliotecas, así como también a partículas identificadas dichas bibliotecas. Además, la identificación puede tener lugar por medio de cualquier procedimiento apropiado. Por ejemplo, la identificación puede ser directa o indirecta, o transcurrir cuantitativa o cualitativamente.

En algunas realizaciones, las nanopartículas ya formadas se someten a funcionalización con un resto de actuación dirigida usando procedimientos análogos con los descritos para la producción de conjugados poliméricos funcionalizados con ligando. Por ejemplo, se mezcla un primer copolímero (PLGA-PEG, poli(lactida-co-glicólido) y poli(etilen)glicol)) con el agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable para formar partículas. Posteriormente, se asocian las partículas a un ligando de bajo peso molecular para formar nanopartículas que se pueden usar para el tratamiento del cáncer. Las partículas se pueden asociar a cantidades variables de ligandos de bajo peso molecular con el fin de controlar la densidad superficial de ligando de la nanopartícula, alterando de este modo las características terapéuticas de la nanopartícula. Asimismo, por ejemplo, por medio del control de los parámetros tales como peso molecular, peso molecular de PEG, y carga superficial de la nanopartícula, se pueden obtener partículas controladas de forma muy precisa.

De acuerdo con la invención, se proporcionar un procedimiento de nanoemulsión, tal como el procedimiento representados en las Figuras 1, 2A y 2B. Por ejemplo, se pueden combinar un agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable (por ejemplo, desatinib), ácido pamoico, un primer polímero (por ejemplo, un copolímero de dibloques tal como PLA-PEG o PLGA-PEG, cualquier de los cuales puede estar opcionalmente unido a un ligando) y un segundo polímero opcional (por ejemplo, (PL(G)A-PEG o PLA), con una solución orgánica para formar una primera fase orgánica. Dicha primera fase puede incluir de un 1 a un 50 % en peso de sólidos, de un 5 a un 50 % en peso de sólidos, de un 5 a un 40 % en peso de sólidos, de un 1 a un 15 % en peso de sólidos, o de un 10 a un 30 % en peso de sólidos. La primera fase orgánica se combina con una primera solución acuosa para formar una segunda fase. La solución orgánica puede incluir, por ejemplo, tolueno, metil etil cetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetato de etilo, alcohol isopropílico, acetato de isopropilo, dimetilformamida, cloruro de metileno, diclorometano, cloroformo, acetona, alcohol bencílico, Tween 80, Span 80 o similares y combinaciones de los mismos. En una realización, la fase orgánica puede incluir alcohol bencílico, acetato de etilo y combinaciones de los mismos. La segunda fase puede ser tener entre un 0,1 y un 50 % en peso, entre un 1 a un 50 % en peso, entre un 5 y un 40 % en peso o entre un 1 y un 15 % en peso, de sólidos. La solución acuosa puede ser agua, opcionalmente en combinación con uno o más de clorato de sodio, acetato de etilo, poli(acetato de vinilo) y alcohol bencílico. En algunas realizaciones, el pH de la fase acuosa puede estar seleccionado a base del pK_a del agente terapéutico básico protonado y/o el pK_a del ácido pamoico. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el agente terapéutico básico, cuando se protona, puede tener un primer pK_a, el ácido pamoico puede tener un segundo pK_a, y la fase acuosa puede tener un pH igual a una unidad de pK_a entre el primer pK_a y el segundo pK_a. En una realización particular, el pH de la fase acuosa puede ser igual a una unidad pK_a que sea equidistante entre el primer pK_a y el segundo pK_a.

Por ejemplo, la fase oleosa o la fase orgánica pueden usar un disolvente que solo sea parcialmente miscible con la sustancia que no es disolvente (agua). Por lo tanto, cuando se mezcla en una proporción suficientemente baja y/o cuando se usa agua pre-saturada con los disolventes orgánicos, la fase oleosa permanece líquida. La fase oleosa se

puede emulsionar para dar lugar a una solución acuosa y, en forma de gotitas, se puede compartir para dar lugar a nanopartículas usando, por ejemplo, sistemas de dispersión de alta energía, tales como homogeneizadores y dispositivos de ultrasonidos. La parte acuosa de la emulsión, conocida de otro modo como "fase acuosa", puede ser una solución de tensioactivo que consiste en colato de sodio y pre-saturado con acetato de etilo y alcohol bencílico. En algunos casos, la fase orgánica (por ejemplo, la primera fase orgánica) puede incluir el agente terapéutico básico. Adicionalmente, en determinadas realizaciones, la solución acuosa (por ejemplo, la primera solución acuosa) puede incluir el ácido pamoico. En otras realizaciones, tanto el agente terapéutico básico como el ácido pamoico se pueden disolver en la fase orgánica.

El emulsionado de la segunda fase para formar una fase de emulsión se puede llevar a cabo, por ejemplo, en una o dos etapas de emulsionado. Por ejemplo, se puede preparar una emulsión principal y posteriormente se puede emulsionar para formar una emulsión fina. La emulsión principal se puede formar, por ejemplo, usando mezcla simple, un homogeneizador de alta presión, un dispositivo de ultrasonidos con sonda, una barra agitadora o un dispositivo de homogeneización de estator y rotor. La emulsión primaria se puede formar para dar lugar a una emulsión a través del uso de, por ejemplo, un dispositivo de ultrasonidos con sonda o un homogeneizador de alta presión, por ejemplo, mediante el uso de 1, 2, 3 o más pasos a través de un homogeneizador. Por ejemplo, cuando se usa un dispositivo de homogeneización de alta presión, la presión usada puede ser de 0,21 a 0,41 MPa, de 0,27 a 0,34 MPa, de 0,28 a 55,1 MPa, de 13,8 a 27,6 MPa, de 27,6 a 55,1 MPa o de 27,6 a 34,5 MPa, por ejemplo, 13,8, 17,2, 27,6 o 34,5 MPa.

En algunos casos, las condiciones de emulsión fina, que se pueden caracterizar por una proporción elevada de superficie con respecto a volumen de las gotas de la emulsión, se pueden escoger para maximizar la solubilidad del agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable y ácido pamoico y formar el HIP deseado. En determinadas realizaciones, en condiciones de emulsión fina, el equilibrado de los componentes disueltos puede tener lugar de forma muy rápida, es decir, más rápido que la solidificación de las nanopartículas. Por tanto, seleccionando el HIP basado en, por ejemplo, la diferencia de pKa entre el agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable y el ácido pamoico, o el ajuste de otros parámetros tales como el pH de la emulsión fina y/o el pH de la solución de inactivación, pueden tener un impacto significativo en la carga de fármaco y las propiedades de liberación de las nanopartículas mediante el dictado, por ejemplo, de la formación de un HIP en la nanopartícula en oposición a la difusión del agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable y/o el ácido pamoico de la nanopartícula.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico básico (agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable) y el ácido pamoico se pueden combinar en la segunda fase antes del emulsionado de la segunda fase. En algunos casos, el agente terapéutico básico y el ácido pamoico pueden formar un par iónico hidrófobo antes de emulsionar la segunda fase. En otras realizaciones, el agente terapéutico básico y el ácido pamoico pueden formar un par iónico hidrófobo durante el emulsionado de la segunda fase. Por ejemplo, el agente terapéutico básico y el ácido pamoico se pueden combinar en la segunda fase de forma sustancialmente concurrente con el emulsionado de la segunda fase, por ejemplo, el agente terapéutico básico y el ácido pamoico se pueden disolver en soluciones por separado (por ejemplo, dos soluciones sustancialmente inmisicibles), que posteriormente se combinan durante el emulsionado. En otro ejemplo, el agente terapéutico básico y el ácido pamoico se pueden disolver en soluciones miscibles por separado que posteriormente se alimentan en la segunda fase durante el emulsionado.

Para un mejor control de los parámetros cinéticos de extracción y un procedimiento más escalable, se usa dilución de disolvente por medio de inactivación acuosa. Por ejemplo, la emulsión se puede diluir en agua fría hasta una concentración suficiente para disolver todo el disolvente orgánico con el fin de formar una fase inactivada. En algunas realizaciones, la inactivación se puede llevar a cabo al menos parcialmente a una temperatura de 5 ºC o menos. Por ejemplo, el agua usada en la inactivación puede estar a una temperatura que es menor que la temperatura ambiente (por ejemplo, de 0 a 10 ºC, o de 0 a 5 ºC).

La inactivación tiene un pH entre 4 y 7. Debería comprenderse que el pH de una solución tampón puede variar en función de la temperatura. A menos que se especifique lo contrario, el pH de la solución tampón referido en el presente documento es el pH a 23 ºC.

La inactivación es una solución acuosa que comprende un agente tampón (es decir, una solución tampón). Se puede usar cualquier agente tampón. Ejemplos no limitantes de agentes tampón incluyen fosfato, citrato, acetato, borato, imidazol, MES (ácido 4-morfolinoetanosulfónico), bis-tris (bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano), ADA (ácido N-(2- acetamido)iminodiacético), ACES (ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico), PIPES (ácido 1,4-piperazindi-etanosulfónico), MOPSO (ácido 3-morfolino-2-hidroxipropanosulfónico), bis-tris propano (1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano), BES (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), TES (ácido 2-[(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)amino]etanosulfónico), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-l-etanosulfónico), DIPSO (ácido 3-(N,N-bis[2-hidroxietil]amino)-2 -hidroxipropanosulfónico), MOBS (ácido 4-(N-morfolino)butanosulfónico), TAPSO (ácido 2-hidroxi-3-[tris(hidroximetil)metilamino]-1-propanosulfónico), Trizma (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol), HEPPSO (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-(2-hidroxipropanosulfónico)), POPSO (ácido piperazin-N,N'-bis(2-hidroxipropanosulfónico)), TEA (trietilamina), EPPS (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinpropanesulfónico), tricina (N-[tris(hidroximetil)metil]glicina), Gly-Gly (Diglicina), bicina (N,N-Bis(2-hidroxietil) glicina), HEPBS (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(4-butanosulfónico)), TAPS (ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-3-aminopropanosulfónico), AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol), TABS (N-tris(hidroximetil)metil-4-aminobutanosulfónico), AMPSO (ácido N-(1,1-dimetil-2-hidroxietil)-3-amino- 2-

hidroxipropanosulfónico), CHES (ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfónico), CAPSO (ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfónico), AMP (alcohol β-aminoisobutílico), CAPS (ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico), CABS (ácido 4-(ciclohexilamino)-1-butanosulfónico) y combinaciones de los mismos. Debería comprenderse que un tampón comprende un ácido y una base en equilibrio (por ejemplo, un ácido y una base conjugada y/o una base y un ácido conjugado). Por tanto, debería comprenderse además que, por brevedad, una solución tampón o un agente ampón se puede denominar en el presente documento con el nombre de ácido libre (por ejemplo, ácido fosfórico) o su base conjugada (por ejemplo, fosfato), o el nombre de una base libre (por ejemplo, imidazol) o su ácido conjugado (por ejemplo, imidazolio), pero el experto en la técnica comprenderá que existe un equilibrio entre dos o más especies de protonación diferentes del agente tampón (por ejemplo, H_3PO_4, H_2P0_{4-}, $HP0_4^{2-}$ y $P0_4^{3-}$). En algunas realizaciones, la inactivación puede comprender dos o más agentes tampón. Por ejemplo, la inactivación puede comprender dos, tres, cuatro o cinco agentes tampón. En algunas realizaciones, la inactivación puede comprender una mezcla de fosfato y citrato. En otras realizaciones, la inactivación puede comprender una mezcla de borato, fosfato y acetato (por ejemplo, tampón de Britton-Robbinson, que comprende 0,04 M de H_3BO_3, 0,04 M de H_3PO_4 y 0,04 M de CH_3COOH valorado hasta un pH deseado).

Una solución tampón (es decir, una inactivación) puede tener una capacidad tampón apropiada en un intervalo de pH particular. Intervalos de pH no limitantes para soluciones tampón a modo de ejemplo se proporcionan en la Tabla A siguiente. Una solución tampón puede tener una concentración de agente tampón entre 0,001 M y 1 M, en algunas realizaciones entre 0,001 M y 0,5 M, en algunas realizaciones entre 0,01 M y 0,5 M, en algunas realizaciones entre 0,05 M y 0,5 M, en algunas realizaciones entre 0,1 M y 0,5 M, en algunas realizaciones entre 0,01 M y 0,2 M, en algunas realizaciones entre 0,05 M y 0,15 M y en algunas realizaciones entre 0,075 M y 0,125 M.

Tabla A. Intervalos de pH no limitantes para tampones a modo de ejemplo.

Agente tampón	**Intervalo de pH**
Fosfato	5,7-8,0
Citrato	3,0-6,2
Fosfato-citrato	2,6-7,6
Acetato	3,7-5,6
Imidazol	6,2-7,8
Agente tampón	**Intervalo de pH**
Britton-Robbinson	2-12
ADA	6,0-7,2
ACES	6,1-7,5
PIPES	6,1-7,5
MOPSO	6,2-7,6
Bis-tris Propano	6,3-9,5
BES	6,4-7,8
MOPS	6,5-7,9
Agente tampón	**Intervalo de pH**
TES	6,8-8,2
HEPES	6,8-8,2
DIPSO	7,0-8,2
MOBS	6,9-8,3

La inactivación (segunda solución acuosa) tiene una concentración de agente tampón suficiente para que la segunda fase tenga un pH que difiere del pH de la segunda solución acuosa en menos de 1 unidad de pH.

Se puede preparar fácilmente una solución tampón (por ejemplo, una inactivación) a un pH deseado por parte del experto en la técnica. Por ejemplo, se puede preparar una solución tampón a un pH deseado por medio de valoración de una solución que contiene un agente tampón con un ácido fuerte (por ejemplo, HCl) o una base fuerte (por ejemplo, NaOH). Alternativamente, se puede preparar una solución tampón a un pH deseado por medio de combinación de un ácido débil (por ejemplo, ácido cítrico) con su base conjugada (por ejemplo, citrato de sodio) o mediante combinación de una base débil (por ejemplo, imidazol) con su ácido conjugado (por ejemplo, cloruro de imidazolio). El experto en la técnica podría determinar las cantidades del ácido débil o base débil y el correspondiente conjugado para su uso en la preparación de una solución tampón mediante el uso de la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

La formación de HIP puede tener lugar durante o tras el emulsionado, por ejemplo, como resultado de las condiciones de equilibrio en la emulsión fina. Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, se piensa que los contra iones solubles en sustancia orgánica (es decir, el ácido pamoico) pueden facilitar la difusión de un agente terapéutico hidrófilo en la nanopartícula de una emulsión como resultado de la formación de HIP. Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, el HIP puede permanecer en la nanopartícula antes de la solidificación de la nanopartícula ya que la solubilidad del HIP en la nanopartícula es mayor que la solubilidad del HIP en la fase acuosa de la emulsión y/o en la inactivación. Por ejemplo, seleccionando un pH para la inactivación que esté entre el pK_a del agente terapéutico básico y el pK_a del ácido pamoico, se puede optimizar la formación del agente terapéutico básico ionizado y el ácido pamoico. Sin

embargo, la elección de un pH que sea demasiado elevado puede provocar que el ácido pamoico difunda fuera de la nanopartícula, mientras que la elección de un pH que sea demasiado bajo puede provocar que el agente terapéutico básico difunda fuera de la nanopartícula.

En algunas realizaciones, no todo el agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable está encapsulado en las partículas en esta etapa, y el agente de solubilidad de fármaco se añade a la fase inactivada para formar una fase solubilizada. El agente de solubilidad de fármaco puede ser, por ejemplo, Tween 80, Tween 20, polivinilpirrolidona, ciclodextrano, dodecil sulfato de sodio, colato de sodio, dietilnitrosamina, acetato de sodio, urea, glicerina, propilenglicol, glicofurol, poly(etilen)glicol, éter bris(poly- oxietilenglicolddodecílico, benzoato de sodio, salicilato de sodio o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, Se puede añadir Tween-80 a la suspensión de nanopartículas inactivada para solubilizar el fármaco libre y evitar la formación de cristales de fármaco. En algunas realizaciones, la proporción de agente de solubilidad de fármaco con respecto al agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable es de 200:1 a 10:1, o en algunas realizaciones de 100:1 a 10:1.

La fase solubilizada se puede filtrar para recuperar las nanopartículas. Por ejemplo, se pueden usar membranas de ultrafiltración para concentrar la suspensión de nanopartículas y sustancialmente eliminar el disolvente orgánico, fármaco libre (es decir, el agente terapéutico encapsulado), agente de solubilidad de fármaco y otros coadyuvantes de procesado (tensioactivos). La filtración a modo de ejemplo se puede llevar a cabo usando un sistema de filtración de bajo valor tangencial. Por ejemplo, mediante el uso de una membrana con un tamaño de poro apropiado para retener las nanopartículas al tiempo que permite el paso de solutos, micelas y disolvente orgánico, es posible separar selectivamente las nanopartículas. Se pueden usar membranas a modo de ejemplo con valores límite de peso molecular de aproximadamente 300-500 kDa (-5-25 nm).

Se puede llevar a cabo la diafiltración usando un enfoque de volumen constante, lo que significa que el diafiltrado (agua fría desionizada, por ejemplo, de 0 a 5 ºC o de 0 a 10 ºC) se puede añadir a la suspensión de alimentación con la misma velocidad que se retirar el filtrado de la suspensión. En algunas realizaciones, la filtración puede incluir una primera filtración usando una primera temperatura de 0 a 5 ºC, o de 0 a 10 ºC, y una segunda temperatura de 20 a 30 ºC, o de 15 a 35 ºC. En algunas realizaciones, la filtración puede incluir el procesado de 1 a 30, en algunos casos de 1 a 15 o en algunos casos de 1 a 6 diavolúmenes. Por ejemplo, la filtración puede incluir el procesado de 1 a 30, o en algunos casos de 1 a 6 diavolúmenes, a una temperatura de 0 a 5 ºC, y el procesado de al menos un diavolumen (por ejemplo, de 1 a 15, de 1 a 3, o de 1 a 2 diavolúmenes) a una temperatura de 20 a 30 ºC. En algunas realizaciones, la filtración comprender el procesado a diferentes diavolúmenes a temperaturas distintas y diferentes.

Tras la purificación y concentración de la suspensión de nanopartículas, se pueden hacer pasar las partículas a través de uno, dos o más filtros de profundidad y/o esterilización, por ejemplo, usando un pre-filtro de -0,2 µm profundidad. Por ejemplo, una etapa de filtración estéril puede implicar la filtración de las nanopartículas terapéuticas usando un tren de filtración a una tasa controlada. En algunas realizaciones, el tren de filtración puede incluir un filtro de profundidad y un filtro estéril.

Se aprecia que las cantidades de polímero, agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable y ácido pamoico que se usan en la preparación de la formulación pueden diferir de una formulación final. Por ejemplo, puede ocurrir que algún agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable no se incorpore por completo en la nanopartícula y dicho agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable, por ejemplo, se puede filtrar aparte.

Agentes Terapéuticos

El agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable puede incluir formas alternativas tales como formas de sal farmacéuticamente aceptable, formas de base libre, hidratos, isómeros y profármacos de los mismos. En algunas realizaciones, el agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable puede estar seleccionado entre un listado de agentes conocidos, por ejemplo, un listado de agentes previamente sintetizados; un listado de agentes previamente administrados a un sujeto, por ejemplo, una persona o un sujeto mamífero; un listado de agentes aprobados por FDA; o un listado histórico de agentes, por ejemplo, un listado histórico de una compañía farmacéutica, etc. Los listados apropiados de agentes conocidos se conocen bien por parte del experto común en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, el Índice Mercks y el Libro Naranja de FDA, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia. En algunos casos, se pueden usar combinaciones de dos o más agentes terapéuticos que contienen nitrógeno protonable (por ejemplo, dos, tres o más agentes terapéuticos que contienen nitrógeno protonable) en una formulación desvelada de nanopartículas.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable puede ser un inhibidor de tirosina quinasa. Por ejemplo, la tirosina quinasa puede ser un inhibidor de tirosina quinasa de receptor de acción multi-dirigida (por ejemplo, sunitinib (pK_a = 7,07)). En otro ejemplo, el agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable puede ser un inhibidor de tirosina-quinasa Bcr-Abl (por ejemplo, imatinib (pK_a = 8,38), nilotinib, dasatinib (pK_a = 7,07), bosutinib, ponatinib y bafetinib). En algunas realizaciones, un inhibidor de tirosina quinasa Bcr-Abl también puede inhibir una Src tirosina quinasa. Por tanto, en algunas realizaciones, el agente terapéutico que contienen nitrógeno protonable puede ser un inhibidor de tirosina quinasa Bcr-Abl y Src. Un ejemplo no limitante de un inhibidor de tirosina quinasa Bcr-Abl y Src es desatinib.

Otros ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos que contienen nitrógeno protonable incluyen agentes quimioterapeúticos tales como doxorrubicina (adriamicina), gemcitabina (gemzar), daunorubicina, procarbazina, mitomicina, citarabina, vinorelbina, alcaloides de vinca tales como vinblastina o vincristina (pK_a = 7,08); bleomicina, cladribina, camptotecina, CPT-1 1, 10-hidroxi-7-etilcamfotecina (SN38), dacarbazina, S-I capecitabina, UFT, desoxicitidina, 5-azacitosina, 5-aza- desoxicitosina, alopurinol, 2-cloroadenosina, trimetrexato, aminopterina, metilen-10-desazaaminopterina (MDAM), epirrubicina, 9-aminocamptotecina, 10,11-metilendioxicamptotecina, carenitecina, 9-nitrocamptotecina, TAS 103, vindesina, mostaza de L-fenilalanina, epotilonas A-E, tomudex, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, amsacrina, carenitecina, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir, amantadina, rimantadina, lamivudina y combinaciones de los mismos.

En un conjunto de realizaciones, la carga es un fármaco o una combinación de más de un fármaco. Dichas partículas pueden ser útiles, por ejemplo, en realizaciones en las que el resto de actuación dirigida se puede usar para dirigir una partícula que contiene un fármaco a una ubicación localizada particular dentro de un sujeto, por ejemplo, para permitir que tenga lugar la administración localizada del fármaco.

Formulaciones farmacéuticas

Las nanopartículas desveladas en el presente documento se pueden combinar con vehículos farmacéuticamente aceptables para formar una composición farmacéutica, de acuerdo con otro aspecto. Como apreciará el experto en la presente técnica, los vehículos se pueden escoger a base de la ruta de administración como se describe a continuación, la ubicación del tejido diana, el fármaco objeto de administración, el transcurso de tiempo de la administración del fármaco, etc.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a un paciente por cualquier medio conocido en la técnica incluyendo rutas oral y parenteral. El término "paciente", tal como se usa en el presente documento, se refiere a personas así como también seres no humanos, incluyendo, por ejemplo, mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. Por ejemplo, los seres no humanos incluyen mamíferos (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, un primate o un cerdo). En determinadas realizaciones, las rutas parenterales resultan deseables ya que evitan el contacto con las enzimas digestivas que se encuentran en el canal alimentario. De acuerdo con dichas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden administrar por medio de inyección (por ejemplo, intravenosa, inyección subcutánea o intramuscular, intraperitoneal), rectal, vaginal, tópica (en forma de polvos, cremas, pomadas o gotas) o mediante inhalación (pulverizaciones).

En una realización particular, las nanopartículas se administran a un sujeto que lo necesita de forma sistémica, por ejemplo, por medio de infusión IV o inyección.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles puede formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable estéril, suspensión o emulsión en un disolvente o diluyente parenteralmente aceptable, por ejemplo, una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes adecuados que se pueden emplear están el agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos se emplean de manera apropiada como disolvente o medio de suspensión, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo blando incluyendo mono o diglicéridos sintéticos.

Además, se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. En una realización, las nanopartículas se suspenden en un fluido de vehículo que comprende un 1 % (peso/volumen) de carboximetil celulosa de sodio y un 0,1 % (volumen/volumen) de TWEEN™ 80. Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, por medio de filtración a través de un filtro que retiene bacterias, o mediante la incorporación de agentes de esterilización en forma de composición sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de uso.

Las formas de dosificación sólida para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, las nanopartículas se mezclan con al menos un excipiente inerte, farmacéuticamente aceptable o vehículo tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o (a) materiales de relleno o expansores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, (c) humectantes tales como glicerol, (d) agentes de desintegración tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio, (e) agentes de retardo de solución tales como parafina, (f) aceleradores de absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, y (i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilen glicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación puede comprender también agentes tampón.

Se aprecia que la dosificación exacta de una nanopartícula que contiene un agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable se escoge por parte del facultativo individual a la vista del paciente objeto de tratamiento, en general, se

ajustan la dosificación y la administración para proporcionar una cantidad eficaz de la nanopartícula de agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable al paciente objeto de tratamiento. Tal como se usa en el presente documento, la "cantidad eficaz" de una nanopartícula que contiene un agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable se refiere a la cantidad necesaria para inducir la respuesta biológica deseada. Como apreciarán los expertos en la presente técnica, la cantidad eficaz de una nanopartícula que contiene un agente terapéutico que contiene nitrógeno protonable puede variar dependiendo de factores tales como el punto final biológico deseado, el fármaco objeto de administración, el tejido diana, la vía de administración, etc. Por ejemplo, la cantidad eficaz de una nanopartícula que contiene un agente terapéutico que contienen nitrógeno protonable podría ser la cantidad que tiene como resultado una reducción del tamaño tumoral en una cantidad deseada durante un período de tiempo deseado. Los factores adicionales que se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad del estado de enfermedad; la edad, el peso y el género del paciente objeto de tratamiento; la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración; combinaciones de fármacos; sensibilidades de reacción; y tolerancia/respuesta a la terapia.

Las nanopartículas se pueden formular en una forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La expresión "forma de dosificación unitaria" tal como se usa en el presente documento se refiere a una unidad físicamente discreta de una nanopartícula apropiada para el paciente objeto de tratamiento. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones se decidirá por parte del facultativo responsable de la atención dentro del ámbito del juicio médico correcto. Para cualquier nanopartícula, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente bien en ensayos de cultivos celulares o bien en modelos con animales, normalmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo de animal también se usa para lograr un intervalo de concentración y una ruta de administración deseados. Dicha información se puede usar posteriormente para determinar dosis útiles y rutas de administración en humanos. La eficacia terapéutica y la toxicidad de las nanopartículas se pueden determinar por medio de procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED_{50} (la dosis es terapéuticamente eficaz en un 50 % de la población) y LD_{50} (la dosis es letal para un 50 % de la población). La proporción de dosis de efectos tóxicos con respecto a efectos terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la proporción, LD_{50}/ED_{50}. Las composiciones farmacéuticas que exhiben índices terapéuticos grandes pueden resultar útiles en algunas realizaciones. Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivos celulares y estudios con animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para uso humano.

En algunas realizaciones, se contempla una composición apropiada para congelación, que incluye nanopartículas desveladas en el presente documento y una solución apropiada para congelación, por ejemplo, se añade un azúcar tal como un mono, di o poli sacárido, por ejemplo, sacarosa y/o trehalosa, y/o una sal y/o una solución de ciclodextrina a la suspensión de nanopartículas. El azúcar (por ejemplo, sacarosa o trehalosa) puede actuar, por ejemplo, como crioprotector para evitar que las partículas se agreguen tras la congelación. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionar una formulación de nanopartículas que comprende una pluralidad de nanopartículas desveladas, sacarosa, un haluro iónico y agua; en la que nanopartículas/sacarosa/agua/haluro iónico es un 3-40 %/10-40 %/20-95 %/0,1-10 % (p/p/p/p) o 5-10 %/10-15 %/80-90 %/1-10 % (p/p/p/p). Por ejemplo, dicha solución puede incluir nanopartículas como se desvela en el presente documento, de un 5 % a un 20 % en peso de sacarosa y un haluro iónico tal como cloruro de sodio, en una concentración de 10-100 mM. En otro ejemplo, en el presente documento se proporcionar una formulación de nanopartículas que comprende una pluralidad de nanopartículas desveladas, trehalosa, ciclodextrina y agua; en la que las nanopartículas/trehalosa/agua/ciclodextrina es de un 3-40 %/1-25 %/20-95 %/1-25 % (p/p/p/p) o un 5- 10 %/1-25 %/80-90 %/10-15 % (p/p/p/p).

Por ejemplo, la solución contemplada puede incluir nanopartículas como se desvela en el presente documento, de un 1 % a un 25 % en peso de un disacárido tal como trehalosa o sacarosa (por ejemplo, de un 5 % a un 25 % de trehalosa o sacarosa, por ejemplo, un 10 % de trehalosa o sacarosa, o un 15 % de trehalosa o sacarosa, por ejemplo, un 5 % de sacarosa) en peso) y una ciclodextrina tal como β-ciclodextrina, en una concentración de un 1 % a un 25 % en peso (por ejemplo, de un 5 % a un 20 %, por ejemplo un 10 % o un 20 % en peso, o de un 15 % a un 20 % e peso de ciclodextrina). Las formulaciones contempladas pueden incluir una pluralidad de nanopartículas desveladas (por ejemplo, nanopartículas que tienen PLA-PEG y un agente activo) y de un 2 % a un 15 % en peso (o de un 4 % a un 6 % en peso, por ejemplo, un 5 % en peso) de sacarosa y de un 5 % en peso a un 20 % (por ejemplo, de un 7 % en peso a un 12 % en peso, por ejemplo, un 10 % en peso) de una ciclodextrina, por ejemplo, HPbCD).

La presente divulgación hace referencia en parte a composiciones farmacéuticas liofilizadas que, cuando se reconstituyen, tienen una cantidad mínima de agregados grandes. Dichos agregados grandes pueden tener un tamaño mayor que 0,5 µm, mayor que 1 µm, o mayor que 10 µm, y pueden resultar indeseables en la solución reconstituida. Los tamaños de agregado se pueden medir usando una diversidad de técnicas que incluyen las indicadas en U.S. Pharmacopeia en 32 <788>, incorporado por referencia en el presente documento. Los ensayos resaltados en el documento US 32 <788> incluyen un ensayo de conteo de partícula con oscurecimiento de luz, ensayo de conteo de partículas al microscopio, difracción láser y detección óptica de partículas individuales. En una realización, el tamaño de partícula en una muestra concreta se mide usando difracción láser y/o detección óptica de partículas individuales.

El documento USP 32 <788>, por medio de ensayos de conteo de partículas por oscurecimiento de luz, explica las recomendaciones para la toma de muestra de tamaños de partícula en una suspensión. Para soluciones de igual o menos de 100 ml, la preparación cumple con el ensayo si el número promedio de partículas presentes no supera 6000 por recipiente que sean > 10 µm y 600 por recipiente que sean > 25 µm.

Como se comenta en el documento USP 32 <788>, el ensayo de conteo de partículas al microscopio explica las recomendaciones para determinar las cantidades de partículas usando un microscopio binocular ajustado a un aumento de 100 ± 10 que tiene un micrómetro ocular. Un micrómetro ocular es una cuadrícula de diámetro circular que consiste en un círculo dividido en cuadrantes con círculos negros de referencia que indican 10 µm y 25 µm cuando se observan con 100 aumentos. Se proporciona una escala lineal por debajo de la cuadrícula. Se cuenta visualmente el número de partículas con referencia a 10 µm y 25 µm. Para soluciones de igual o menos de 100 ml, la preparación cumple con el ensayo si el número promedio de partículas presentes no supera 3000 por recipiente que sean > 10 µm y 300 por recipiente que sean > 25 µm.

En algunas realizaciones, una muestra acuosa de 10 ml de una composición desvelada tras reconstitución comprende menos de 600 partículas por ml que tienen un tamaño igual o mayor que 10 micrómetros; y/o menos de 60 partículas por ml que tienen un tamaño mayor o igual que 25 micrómetros.

Se puede usar dispersión de luz dinámica (DLS) para medir el tamaño de partícula, pero se base en el movimiento Browniano de manera que la técnica no detecta partículas bastante grandes. La difracción de láser se basa en las diferencias en el índice de refracción entre la partícula y el medio de suspensión. La técnica es capaz de detectar partículas en el intervalo sub-micrónico a milimétrico. Se pueden determinar cantidades relativamente pequeñas (por ejemplo, 1-5 % en peso) de partículas grandes en las suspensiones de nanopartículas. La detección óptica de partículas individuales (SPOS) usa oscurecimiento de luz de suspensiones diluidas para contar las partículas individuales de aproximadamente 0,5 µm. Conociendo la concentración de partículas de la muestra medida, se puede calcular el porcentaje en peso de agregados o la concentración de agregados (partículas/ml).

La formación de agregados puede tener lugar durante la liofilización debido a la deshidratación de la superficie de las partículas. Esta deshidratación se puede evitar por medio del uso de lioprotectores, tales como disacáridos, en la suspensión antes de la liofilización. Los disacáridos apropiados incluyen sacarosa, lactulosa, lactosa, maltosa, trehalosa o celobiosa y/o mezclas de los mismos. Otros disacáridos contemplados incluyen kojibiosa, nigerosa, isomaltosa, β,β-trehalosa, α,β-trehalosa, soforosa, laminaribiosa, gentiobiosa, turanosa, maltulosa, palatinosa, gentiobiulosa, mannobiasa, melibiosa, melibiulosa, rutinosa, rutinulosa y xilobiosa. La reconstitución muestra distribuciones de tamaño DLS equivalentes cuando se compara con la suspensión de partida. Sin embargo, la difracción de láser puede detectar partículas de > 10 µm de tamaño en algunas soluciones reconstituidas. Adicionalmente, SPOS también puede detectar partículas de tamaño > 10 µm a una concentración por encima de las recomendaciones FDA (10^4-10^5 partículas/ml para partículas de >10 µm).

En algunas realizaciones, se pueden usar uno o más sales de haluro iónico como lioprotector adicional para un azúcar, tal como la sacarosa, trehalosa o mezclas de los mismos. Los azúcares pueden incluir disacáridos, monosacáridos, trisacáridos y/o polisacáridos y pueden incluir otros excipientes, por ejemplo, glicerol y/o tensioactivos. Opcionalmente, se puede incluir una ciclodextrina como lioprotector adicional. La ciclodextrina se puede añadir en lugar de la sal de haluro iónico. Alternativamente, la ciclodextrina se puede añadir además de la sal de haluro iónico.

Las sales de haluro iónico pueden incluir cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de cinc o mezclas de los mismos. Las sales de haluro iónico apropiadas adicionales incluyen cloruro potásico, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, bromuro de sodio, bromuro de calcio, bromuro de cinc, bromuro de potasio, bromuro de magnesio, bromuro de amonio, yoduro de sodio, yoduro de calcio, yoduro de cinc, yoduro de potasio, yoduro de magnesio, o yoduro de amonio y/o mezclas de los mismos. En una realización, se puede usar de un 1 a un 15 por ciento en peso con una sal de haluro iónico. En una realización, la composición farmacéutica liofilizada puede comprender de 10 a 100 mM de cloruro de sodio. En otra realización, la composición farmacéutica liofilizada puede comprender de 100 a 500 mM de sal de cloruro iónico divalente, tal como cloruro de calcio o cloruro de cinc. En otra realización más, la suspensión objeto de liofilización puede además comprender una ciclodextrina, por ejemplo, se puede usar de un 1 a un 25 por ciento en peso de ciclodextrina.

Una ciclodextrina apropiada puede incluir una α-ciclodextrina, β-ciclodextrina, γ-ciclodextrina o mezclas de las mismas. Las ciclodextrinas a modo de ejemplo contempladas para su uso en las composiciones desveladas en el presente documento incluyen hidroxipropil-p-ciclodextrina (HPbCD), hidroxietil-β-ciclodextrina, sulfobutiléter-β-ciclodextrina, metil-β-ciclodextrina, dimetil-β-ciclodextrina, carboxima- til-p-ciclodextrina, carboximetil etil-β-ciclodextrina, dietil-β-ciclodextrina, tri-O-alquil-β-ciclodextrina, glocosil-β-ciclodextrina y maltosil-β-ciclodextrina. En una realización, de un 1 a un 25 por ciento en peso de trehalosa (por ejemplo de un 10 % a un 15 %, por ejemplo de un 5 a un 20 % de trehalosa) se puede usar con la ciclodextrina. En una realización, la composición farmacéutica liofilizada puede comprender de un 1 a un 25 por ciento en peso de β-ciclodextrina. Una composición a modo de ejemplo puede comprender nanopartículas que comprenden PLA-PEG, un agente activo/terapéutico, de un 4 % a un 6 % (por ejemplo, un 5 % por ciento) de sacarosa, y de un 8 a un 12 por ciento en peso (por ejemplo, un 10 % en peso) de HPbCD.

Una composición farmacéutica liofilizada puede comprender nanopartículas desveladas, en las que tras la reconstitución de la composición farmacéutica liofilizada a una concentración de nanopartículas de 50 mg/ml, es menor que 100 ml de un medio acuoso, la composición reconstituida apropiada para administración parenteral comprende menos de 6000, tal como menos de 3000, micropartículas de igual o más de 10 micrómetros; y/o menos de 600, tal como menos de 300, micropartículas de igual o más de 25 micrómetros.

El número de micropartículas se puede determinar por medios tales como el documento USP 32 <788> por medio de ensayo de conteo de partículas por oscurecimiento de luz, el ensayo de conteo de partículas al microscopio del documento USP 32 <788>, difracción láser y detección óptica de partículas individuales.

Una composición farmacéutica apropiada para uso parenteral tras reconstitución puede comprender una pluralidad de partículas terapéuticas que comprenden cada una de ellas un copolímero que tiene un segmento polimérico hidrófobo y un segmento polimérico hidrófilo; un agente activo; un azúcar; y una ciclodextrina.

Por ejemplo, el copolímero puede ser un copolímero de poli(ácido láctico)-bloques-poli(etilen)glicol. Tras reconstitución, la muestra acuosa de 100 ml puede comprender menos de 6000 partículas que tienen un tamaño igual o mayor que 10 micrómetros; y menos de 600 partículas que tienen un tamaño mayor o igual que 25 micrómetros.

La etapa de adición de un disacárido y una sal de haluro iónico puede comprender la adición de un 5 a un 15 por ciento de sacarosa o de un 5 a un 20 por ciento de trehalosa (por ejemplo, de un 10 a un 20 por ciento de trehalosa) y de 10 a 500 mM de sal de haluro iónico. La sal de haluro iónico puede estar seleccionada entre cloruro de sodio, cloruro de calcio, y cloruro de cinc o mezclas de los mismos. En una realización, también se añade de un 1 a un 25 por ciento en peso de ciclodextrina.

La etapa de adición de un disacárido y una ciclodextrina puede comprender la adición de un 5 a un 15 por ciento de sacarosa o de un 5 a un 20 por ciento de trehalosa (por ejemplo, de un 10 a un 20 por ciento de trehalosa) y de 1 a un 25 por ciento en peso de ciclodextrina. Como ejemplo, se añade de un 10 a un 15 por ciento en peso de ciclodextrina. La ciclodextrina puede estar seleccionada entre α-ciclodextrina, β-ciclodextrina, γ-ciclodextrina o mezclas de las mismas.

Un procedimiento para evitar la agregación de las partículas en una composición farmacéutica de nanopartículas comprende añadir un azúcar y una sal a la formulación liofilizada para evitar la agregación de las nanopartículas tras la reconstitución. Como ejemplo, también se añade una ciclodextrina a la formulación liofilizada. En otro aspecto más, un procedimiento para evitar la agregación sustancial de partículas en una composición farmacéutica de nanopartículas comprende añadir un azúcar y una ciclodextrina a la formulación liofilizada para evitar la agregación de las nanopartículas tras reconstitución.

Una composición liofilizada contemplada puede tener una concentración de partículas terapéuticas de más de 40 mg/ml. La formulación apropiada para administración parenteral puede tener menos de 600 partículas que tienen un tamaño mayor de 10 micrómetros en una dosis de 10 ml.

La liofilización puede comprender la congelación de la composición a una temperatura mayor de -40 ºC o, por ejemplo, menor de -30 ºC, formando una composición congelada; y secar la composición congelada para formar la composición liofilizada. La etapa de secado puede tener lugar a 50 mTorr a una temperatura de -25 a -34 ºC o de -30 a -34 ºC.

Procedimientos de Tratamiento

Las nanopartículas de actuación dirigida se pueden usar para tratar, aliviar, recuperar, mitigar, retrasar la aparición de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas de características de una enfermedad, trastorno y/o afección. Las nanopartículas de actuación dirigida se pueden usar para tratar tumores sólidos, por ejemplo, cáncer y/o células cancerígenas. Las nanopartículas de actuación dirigida se pueden usar para tratar cualquier cáncer, en el que PSMA se expresa sobre la superficie de las células cancerígenas o en la neovasculatura del tumor en un sujeto que lo necesita, incluyendo la neovasculatura de próstata o tumores sólidos que no son de próstata. Los ejemplos de indicación relacionada con PSMA incluyen, aunque sin limitación, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma colo-rectal y glioblastoma.

El término "cáncer" incluye cánceres pre-malignos y malignos. Los cánceres incluyen, aunque sin limitación, sangre (por ejemplo, leucemia mielógena crónica, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda de cromosoma de Filadelfia positivo, linfoma de células de corteza cerebral, próstata, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de piel, por ejemplo, melanomas o carcinomas de células basales, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de bronquios, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de cerebro o sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de esófago, cáncer de la cavidad oral o faringe, cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular), cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales), cáncer testicular, cáncer del tracto biliar, cáncer de apéndice o intestino delgado, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de glándula salival, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, osteosarcoma, condrosarcoma, cáncer de tejidos hematológicos y similares. Las "células cancerígenas" pueden estar en forma de un tumor (es decir, un tumor sólido), existir solas dentro de un sujeto (por ejemplo, células de leucemia) o ser estirpes celulares procedentes de un cáncer.

El cáncer se puede asociar a una diversidad de síntomas físicos. Generalmente, los síntomas del cáncer dependen del tipo y ubicación del tumor. Por ejemplo, el cáncer de pulmón puede provocar tos, insuficiencia respiratoria y dolor en el pecho, mientras que, con frecuencia, el cáncer de colon provoca diarrea, estreñimiento y sangre en las deposiciones. Sin embargo, por aportar unos pocos ejemplos, con frecuencia, generalmente los siguientes síntomas se asocian a muchos tipos de cáncer: fiebre, escalofríos, sudoración nocturna, tos, disnea, pérdida de peso, pérdida

de apetito, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, anemia, ictericia, hepatomegalia, hemoptisis, fatiga, malestar, disfunción cognitiva, depresión, molestias hormonales, neutropenia, dolor, úlceras que no cicatrizan, nódulos linfáticos de mayor tamaño, neuropatía periférica y disfunción sexual.

Las nanopartículas obtenidas por medio del procedimiento de la invención se pueden usar para tratar el cáncer. El tratamiento del cáncer puede comprender la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las partículas de actuación dirigida de la invención a un sujeto que lo necesita, en cantidades tales y durante un tiempo tal que resulte necesario para lograr el resultado deseado. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una partícula de actuación dirigida de la invención puede significar la cantidad eficaz para el tratamiento, alivio, mejora, mitigación, retraso de la aparición de, inhibición de la progresión de, reducción de la gravedad y/o reducción de la incidencia de uno o más síntomas o características del cáncer.

Las composiciones de la invención se pueden administrar a un sujeto que padece cáncer (por ejemplo, leucemia). Las partículas se pueden administrar a un sujeto en cantidades tales y durante un tiempo tal que sea necesario para lograr el resultado deseado (es decir, el tratamiento del cáncer). Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una partícula de actuación dirigida de la invención puede ser la cantidad eficaz para el tratamiento, alivio, mejora, mitigación, retraso de la aparición de, inhibición de la progresión de, reducción de la gravedad y/o reducción de la incidencia de uno o más síntomas o características del cáncer. Los protocolos terapéuticos pueden implicar la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de actuación dirigida de la invención a un individuo sano (es decir, un sujeto que no muestra ningún síntoma de cáncer y/o al que no se ha diagnosticado cáncer). Por ejemplo, los individuos sanos pueden estar "inmunizados" con una partícula de actuación dirigida de la invención antes del desarrollo de cáncer y/o la aparición de los síntomas del cáncer; en individuos de riesgo (por ejemplo, pacientes que tienen un historial familiar de cáncer; pacientes que portan una o más mutaciones genéticas asociadas al desarrollo de cáncer; pacientes que tienen un polimorfismo genético asociado al desarrollo de cáncer; pacientes infectados por un virus asociado al desarrollo de cáncer; pacientes con hábitos y/o estilos de vida asociados al desarrollo de cáncer; etc.) se pueden tatar de forma sustancialmente contemporánea con (por ejemplo, a las 48 horas, 24 horas, o 12 horas) de la aparición de los síntomas de cáncer. Por supuesto, los individuos que se sabe que tienen cáncer puede recibir el tratamiento de la invención en cualquier momento.

Las nanopartículas desveladas se pueden usar para inhibir la proliferación de las células cancerígenas, por ejemplo, células cancerígenas de leucemia mielógena. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "inhibe la proliferación de células cancerígenas" o "inhibición de la proliferación de células cancerígenas" hace referencia a cualquier ralentización de la tasa de proliferación y/o migración de células cancerígenas, detención de la proliferación y/o migración de células cancerígenas y muerte de células cancerígenas, de manera que la tasa de proliferación de células cancerígenas se reduce en comparación con la tasa predicha u observada de proliferación de una célula cancerígena de control no tratada. La expresión "inhibe la proliferación" también puede hacer referencia a una reducción de tamaño o desaparición de la célula cancerígena o tumor, así como también a una reducción de su potencial metastásico. Preferentemente, dicha inhibición a nivel celular puede reducir el tamaño, disuadir la proliferación, reducir la agresividad, o evitar o inhibir la metástasis de un cáncer en un paciente. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente, por medio de una diversidad de indicios apropiados, si se inhibe la proliferación de células cancerígenas.

La inhibición de la proliferación de células cancerígenas puede quedar evidenciada, por ejemplo, por medio de la detención de las células cancerígenas en una fase particular del ciclo celular, por ejemplo, detención en la fase G2/M del ciclo celular. La inhibición de la proliferación de células cancerígenas también puede quedar evidenciada por la medición directa o indirecta del tamaño de la célula cancerígena o tumor. En personas con cáncer, dichas mediciones generalmente se realizan usando procedimientos bien conocidos de formación de imágenes tales como formación de imágenes por resonancia magnética, tomografía axial computerizada y rayos-X. La proliferación de células cancerígenas también se puede determinar por vía indirecta, tal como mediante determinación de los niveles de antígeno carcinoembrionario en circulación, antígeno específico de próstata u otros antígenos específicos de cáncer que están correlacionados con la proliferación de células cancerígenas. La inhibición de la proliferación del cáncer generalmente también está correlacionada con supervivencia prolongada y/o mayor salud y bienestar del sujeto.

Ejemplos

La invención se describe a continuación generalmente, se comprenderá mejor por medio de la referencia a los siguientes ejemplos que se incluyen simplemente con fines de ilustración de determinados aspectos y realizaciones, y no se pretende que limiten la invención en modo alguno.

Ejemplo 1: Preparación de Nanopartículas que Contienen Sunitinib (por referencia)

Preparación de la fase orgánica. (Etapa 1, preparación de solución polimérica). A un primer frasco de vidrio de 7 ml se añaden un copolímero de dibloques de poli(ácido láctico)-poli(etilen glicol) (PLA-PEG) y acetato de etilo. Se somete la mezcla a agitación vorticial hasta disolver el polímero. (Etapa 2, preparación de una solución de fármaco). Se añade una cantidad apropiada de alcohol bencílico a un segundo frasco de vidrio de 7 ml que contiene sunitinib, y se somete la mezcla a agitación vorticial hasta disolver el sunitinib. Alternativamente, se añade una cantidad apropiada de ácido oleico a alcohol bencílico para preparar una solución de 3-15 % (p/p), que posteriormente se añade a un segundo

frasco de 7 ml que contiene sunitinib y se somete la mezcla a agitación vorticial hasta disolver el sunitinib. (Etapa 3). La solución polimérica y la solución de fármaco se combinan y se someten a agitación vorticial durante unos pocos minutos antes de la formulación de las nanopartículas.

Preparación de la fase acuosa. (Para una solución de colato de sodio al 0,07 %). Se añaden colato de sodio (SC) (0,7 g) y agua desionizada (959,3 g) a una botella de 1 l. Se agita la mezcla sobre una placa de agitación hasta disolver. Se añadió alcohol bencílico (40 g) al colato de sodio/agua y se agitó la mezcla sobre una placa de agitación hasta disolver. (Para una solución de colato de sodio al 0,25 %). Se añaden colato de sodio (SC) (2,5 g) y agua desionizada (957,5 g) a una botella de 1 l. Se agita la mezcla sobre una placa de agitación hasta disolver. Se añadió alcohol bencílico (40 g) al colato de sodio/agua y se agitó la mezcla sobre una placa de agitación hasta disolver.

Formación de la emulsión. La proporción de fase acuosa con respecto a fase orgánica es de 5:1. La fase orgánica se vierte en la fase acuosa y se homogeneiza la mezcla usando un homogeneizador manual durante 10 segundos a temperatura ambiente para formar una emulsión basta. La emulsión basta se alimenta a través de un homogeneizador de alta presión (1 10S) con un ajuste de presión a 0,28-0,31 MPa de medidor para un 1 paso discreto con el fin de formar una nanoemulsión (emulsión fina).

Formación de nanopartículas. Se vierte la nanoemulsión en un agente de inactivación (agua desionizada) a menos de 5 ºC al tiempo que se agita sobre una placa de agitación para formar una fase inactivada. La proporción de inactivación con respecto a emulsión es de 8:1. Se añade a la fase inactivada Tween 80 en agua (35 % (p/p)) a una proporción de 150: 1 de Tween 80 con respecto a fármaco.

Concentración de nanopartículas a través de filtración de flujo tangencial (TFF). Se concentra la fase inactivada usando TFF con un casete Pall de 300 kDa (2 membranas) para formar un concentrado de nanopartículas de ~100 ml. El concentrado de nanopartículas se somete a diafiltración con ~20 diavolúmenes (2 l) de agua desionizada fría. El volumen del concentrado de nanopartículas diafiltradas se reduce a un volumen mínimo. Se añade agua fría (100 ml) al recipiente y se bombea a través de la membrana para enjuagar y formar una suspensión. Se recoge la suspensión (100-180 ml) en un frasco de vidrio. Se concentra la suspensión de forma adicional usando un aparato TFF pequeño hasta un volumen final de 10-20 ml de suspensión final.

Determinación de concentración de sólidos de suspensión final no filtrada. Se añade un volumen de suspensión final a un frasco de centelleo de 20 ml tarado, que se seca al vacío en un liofilizador/horno. Se determina el peso de las nanopartículas en el volumen de suspensión seca. Se añade sacarosa concentrada a la suspensión final (0,666 g/g) para lograr un 10 % de sacarosa.

Determinación de la concentración de sólidos de suspensión final filtrada a 0,45 µm. Se filtra una parte de la muestra de suspensión final a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm antes de la adición de sacarosa. Se añade un volumen de muestra filtrada a un frasco de centelleo de 20 ml tarado, que se seca al vacío usando un liofilizador/horno. La muestra restante de la suspensión final no filtrada con sacarosa se congela.

Se prepararon once formulaciones de sunitinib, con o sin impurificación de ácido oleico. La carga teórica, la concentración de sólidos, la carga observada y el tamaño de partículas de las formulaciones preparadas sin impurificación de ácido oleico se listan en la Tabla 1:

Tabla 1. Formulaciones de sunitinib sin ácido oleico.

Lote N.º	Descripción	Carga teórica de Sunitinib	Concentración de sólidos	% de carga	tamaño (nm)
140-10-1	16/5 PLA/PEG, 7,5 % de agua en BA	35 %	6 %	2,78	136,20
140-10-2	16/5 PLA/PEG, 7,5 % de agua en BA	35 %	6 %	2,91	120,70
140-10-3	16/5 PLA/PEG, sin agua, 100 % de BA	35 %	6 %	1,63	151,60
140-10-4	16/5 PLA/PEG, sin agua, 100 % de BA	35 %	6 %	2,60	111,10

Como se puede observar en la Tabla 1, en el caso de la formulación 16/5 PLA/PEG con o sin agua (16/5 PLA/PEG corriente), la carga de fármaco dentro de las nanopartículas fue menor de un 3 %. La concentración de ácido oleico usada para disolver sunitinib, la carga teórica, la concentración de sólidos, la carga observada y el tamaño de partícula de las formulaciones preparadas con impurificación de ácido oleico se listan en la Tabla 2:

Tabla 2. Formulaciones de sunitinib con ácido oleico.

Lote N.º	Descripción	Concentración de ácido oleico (% en BA)	Carga teórica de Sunitinib	Concentración de sólidos	% de carga	tamaño (nm)
140-60-1	16/5 PLA/PEG	3	40 %	4,7 %	5,01	86,6
140-20-1	16/5 PLA/PEG	6	40 %	4,7 %	5,87	119,1
140-20-2	16/5 PLA/PEG	9	40 %	4,7 %	8,81	120,4
140-30-2	16/5 PLA/PEG	9	40 %	4,7 %	9,52	122,4
140-20,3	16/5 PLA/PEG	12	40 %	4,7 %	8,06	138,8
140-30-3	16/5 PLA/PEG	12	40 %	4,7 %	10,36	134,6
140-30-1	16/5 PLA/PEG	15	40 %	4,7 %	9,47	119,8

Como se puede observar en la Tabla 2, cuando se añade ácido oleico a sunitinib en disolvente orgánico, la carga de sunitinib en las nanopartículas aumentó significativamente hasta más de un 10 %, dependiendo de la concentración de ácido oleico usando en la formulación. En comparación con las formulaciones preparadas con ácido oleico, que tuvieron una carga de fármaco de menos de un 3 % (véase Tabla 1), el aumento de la carga de fármaco observado para las formulaciones que contienen ácido oleico fue significativo.

La Figura 3 muestra los perfiles de liberación in vitro para nanopartículas que contienen sunitinib, con o sin impurificación de ácido oleico. Las nanopartículas con impurificación de ácido oleico mostraron perfiles de liberación similares al de las nanopartículas de sunitinib formadas sin ácido oleico. Por tanto, a una concentración particular de sólidos, el ácido oleico no afecta significativamente al perfil de liberación de las nanopartículas de sunitinib con respecto a las formulaciones formadas sin ácido oleico.

Ejemplo 2: Preparación de Nanopartículas que Contienen Imatinib (por referencia)

Preparación de la fase orgánica. (Etapa 1, preparación de solución polimérica). A un primer frasco de vidrio de 7 ml se añaden un copolímero de dibloques de poli(ácido láctico)-poli(etilen glicol) (PLA-PEG) y acetato de etilo. Se somete la mezcla a agitación vorticial hasta disolver el polímero. (Etapa 2, preparación de una solución de fármaco). Se añade una cantidad apropiada de alcohol bencílico a un segundo frasco de vidrio de 7 ml que contiene imatinib, y se somete la mezcla a agitación vorticial hasta disolver el imatinib. Alternativamente, se añade una cantidad apropiada de ácido oleico a alcohol bencílico para preparar una solución de un 9 % (p/p), que posteriormente se añade a un segundo frasco de 7 ml que contiene imatinib y se somete la mezcla a agitación vorticial hasta disolver el imatinib. (Etapa 3). La solución polimérica y la solución de fármaco se combinan y se someten a agitación vorticial durante 10-30 segundos antes de la formulación de las nanopartículas.

Preparación de la fase acuosa. Se prepara una solución de un 0,05-0,5 % de colato de sodio/alcohol bencílico al 4 % en agua (p/p) disolviendo colato de sodio en agua desionizada y posteriormente disolviendo alcohol bencílico en la solución acuosa de colato de sodio.

Formación de la emulsión. La proporción de fase acuosa con respecto a fase orgánica es de 5:1. La fase orgánica se vierte en la fase acuosa y se homogeneiza la mezcla usando un homogeneizador manual durante 5-10 segundos a temperatura ambiente para formar una emulsión basta. La emulsión basta se alimenta a través de un homogeneizador de alta presión (M-l 10S) con un ajuste de presión a 0,30-0,34 MPa de medidor para un 1 paso discreto con el fin de formar una nanoemulsión (emulsión fina).

Formación de nanopartículas. Se vierte la nanoemulsión en un agente de inactivación (agua desionizada) a menos de 5 ºC al tiempo que se agita sobre una placa de agitación para formar una fase inactivada. La proporción de inactivación con respecto a emulsión es de 10:1. Se añade Tween 80 en agua (35 % (p/p)) a la fase inactivada en una proporción de 150:1 de Tween 80 con respecto a fármaco para la formulación que contiene ácido oleico y a una proporción de 50:1 de Tween 80 con respecto a fármaco para las formulaciones sin ácido oleico.

Concentración de nanopartículas a través de filtración de flujo tangencial (TFF). Se concentra la fase inactivada usando TFF con un casete Pall de 300 kDa (2 membranas) para formar un concentrado de nanopartículas de -200 ml. Se somete el concentrado de nanopartículas a diafiltración con -20 diavolúmenes (4 l) de agua desionizada fría (menos de 5 ºC). El volumen del concentrado de nanopartículas diafiltradas se reduce a un volumen mínimo. Se añade agua fría (30-75 ml) al recipiente y se bombea a través de la membrana para enjuagar y formar una suspensión final. Se recoge la suspensión (50-100 ml) en un frasco de vidrio.

Se añade sacarosa concentrada (0,666 g/g) a la suspensión final para lograr un 10 % de sacarosa, que posteriormente se congela y se almacena a -20 ºC.

Se prepararon once formulaciones de imatinib, con o sin impurificación de ácido oleico. La carga teórica, la concentración de sólidos, la carga observada, el tamaño de partícula, la concentración de colato de sodio (SC), el número de pases de homogeneizador y la presión correspondiente para las formulaciones preparadas sin impurificación de ácido oleico se listan en la Tabla 3:

Tabla 3. Formulaciones de imatinib sin ácido oleico.

Lote N.º	Descripción	Carga teórica de Imatinib	Concentración de sólidos	% de carga	tamaño (nm)	% de SC, N.º pases @ MPa
168-29-1	16/5 PLA/PEG	30 %	4,7 %	1,0	134	SC al 0,2 %, 2@0,34 MPa
168-29-2	16/5 PLA/PEG	30 %	4,7 %	0,4	106	SC al 0,5 %, 2@0,30 MPa
168-49-1	16/5 PLA/PEG	30 %	4,7 %	0,43	120	SC al 0,35 %, 1@0,34 MPa
168-81-2	16/5 PLA/PEG	30 %	15 %	6,8	110	SC al 0,25 %, 1@0,34 MPa
168-103.1	16/5 PLA/PEG	30 %	15 %	8,1	108	0,25 % de SC. 1@0,34 MPa

Como se puede observar en la Tabla 3, las formulaciones preparadas sin ácido oleico a un 4,7 % y un 15 % de sólidos tuvieron como resultado una carga de fármaco de aproximadamente un 0,4-1 % y de aproximadamente un 7-8 % respectivamente. La mayor concentración de sólidos tuvo como resultado una mayor carga de fármaco.

La carga teórica, la concentración de sólidos, la carga observada, el tamaño de partícula, la concentración de colato de sodio (SC), el número de pases de homogeneizador y la presión correspondiente para las formulaciones preparadas sin impurificación de ácido oleico se listan en la Tabla 4:

Tabla 4. Formulaciones de imatinib con ácido oleico.

Lote N.º	Descripción	Concentración de ácido oleico (% en BA)	Carga teórica de Imatinib	Concentración de sólidos	% de carga	tamaño (nm)	% de SC, N.º pases @ MPa
168-29-5	16/5 PLA-PEG, proporción molar 2:1 de ácido oleico:fármaco	9	30 %	4,7 %	8,2	118	0,1 % de SC, 1@0,34 MPa
168-29-6	16/5 PLA-PEG, proporción molar 2:1 de ácido oleico:fármaco	9	30 %	4,7 %	7,8	116	0,1 % de SC, 1@0,34 MPa
168-103-6	16/5 PLA-PEG, proporción molar 1,1:1 de ácido oleico:fármaco	9	30 %	9,0 %	6,4	120	0,05 % de SC, 1@0,34 MPa
Lote N.º	**Descripción**	**Concentración de ácido oleico (% en BA)**	**Carga teórica de Imatinib**	**Concentración de sólidos**	**% de carga**	**tamaño (nm)**	**% de SC, N.º pases @ MPa**
168-103-7	16/5 PLA-PEG, proporción molar 1,1:1 de ácido oleico:fármaco	9	30 %	9,0 %	8,2	121	0,05 % de SC 1@0,34 MPa
168-49-3	16/5 PLA-PEG, proporción molar 0,6:1 de ácido oleico:fármaco	9	30 %	15,0 %	8,07	102	0,1 % de SC, 1@0,34 MPa
168-103-5	16/5 PLA-PEG, proporción molar 0,6:1 de ácido oleico:fármaco	9	30 %	15,0 %	8,9	108	0,05 % de SC 1@0,34 MPa

Como se puede observar en la Tabla 4, las formulaciones preparadas con ácido oleico tuvieron como resultado cargas de fármaco de aproximadamente un 6-9 % en todas las concentraciones de sólidos sometidas a ensayo y proporciones molares de ácido oleico con respecto a fármaco.

La Figura 4 muestra los perfiles de liberación *in vitro* para nanopartículas que contienen imatinib que tienen diferente concentración de sólidos y sin impurificación de ácido oleico. La liberación *in vitro* es más lenta a concentraciones de sólidos más elevadas (líneas continuas en la gráfica), mientras que un tamaño de partícula más grande a menores valores de sólidos (líneas discontinuas en el gráfico) también ralentiza la liberación.

La Figura 5 muestra los perfiles de liberación *in vitro* para formulaciones de imatinib preparadas con ácido oleico. Los perfiles de liberación *in vitro* son similares y varían de aproximadamente un 68-75 % de fármaco liberado durante 4 horas.

Tal como se muestra en la FIG. 6, cuando los perfiles de liberación para formulaciones sin ácido se comparan con los perfiles de liberación para formulaciones con ácido oleico, se aprecia que los perfiles de liberación para las formulaciones que contienen concentraciones mayores de sólidos (por ejemplo, un 15 % de sólidos) y sin ácido son similares. Sin embargo, a concentraciones menores de sólidos (por ejemplo, un 4,7 %), las formulaciones con ácido oleico muestran perfiles de liberación más lentos en comparación con las formulaciones sin ácido oleico. Por tanto, la inclusión

de ácido oleico en una formulación puede afectar al perfil de liberación de la formulación, en comparación con las formulaciones sin ácido oleico a una concentración de sólidos concreta.

Ejemplo 3: Preparación de Nanopartículas que Contienen Dasatinib - Procedimiento de Emulsión 1 (referencia)

Preparación de la fase orgánica. Se añadieron un copolímero de dibloques de poli(ácido láctico)-poli(etilen glicol) (PLA-PEG) (950 mg) y alcohol bencílico (9 g) a un frasco de vidrio de 20 ml. Se sometió la mezcla a agitación vorticial para proporcionar una solución de polímero-BA. Antes de la formulación de las nanopartículas, se añaden 50 mg de dasatinib a la solución de polímero-BA y se somete la mezcla a agitación vorticial hasta disolver el dasatinib.

Preparación de la fase acuosa. Se añaden colato de sodio (SC) (4,75 g) y agua desionizada (955,25 g) a una botella de 1 l. Se agita la mezcla sobre una placa de agitación hasta disolver. Se añadió alcohol bencílico (40 g) al colato de sodio/agua y se agitó la mezcla sobre una placa de agitación hasta disolver.

Formación de la emulsión. La proporción de fase acuosa con respecto a fase orgánica es de 5:1. Se vierte la fase orgánica en la fase acuosa y se homogeneiza la mezcla usando un homogeneizador manual durante 10 segundos a temperatura ambiente para formar una emulsión basta. La emulsión basta se alimenta a través de un homogeneizador de alta presión (110S) con un ajuste de presión a 0,32 MPa de medidor para 2 pasos discretos con el fin de formar una nanoemulsión (emulsión fina). (Nota: tras el primer paso, se impurificó un 5 % de SC en la emulsión fina para lograr una concentración final de SC de un 0,5 %.)

Formación de nanopartículas. Se vierte la nanoemulsión en un agente de inactivación (agua desionizada) a menos de 5 ºC al tiempo que se agita sobre una placa de agitación para formar una fase inactivada. La proporción de inactivación con respecto a emulsión es de 10:1. Se añade a la fase inactivada Tween 80 en agua (35 % (p/p)) a una proporción de 100:1 de Tween 80 con respecto a fármaco.

Concentración de nanopartículas a través de filtración de flujo tangencial (TFF). Se concentra la fase inactivada usando TFF con un casete Pall de 300 kDa (2 membranas) para formar un concentrado de nanopartículas de -200 ml. El concentrado de nanopartículas se somete a diafiltración con -20 diavolúmenes (4 l) de agua desionizada fría. El volumen del concentrado de nanopartículas diafiltradas se reduce a un volumen mínimo. Se añade agua fría (100 ml) al recipiente y se bombea a través de la membrana para enjuagar y formar una suspensión. Se recoge la suspensión (-100 ml) en un frasco de vidrio.

Determinación de concentración de sólidos de suspensión final no filtrada. Se añade un volumen de suspensión final a un frasco de centelleo de 20 ml tarado, que se seca al vacío en un liofilizador/horno. Se determina el peso de las nanopartículas en el volumen de suspensión seca. Se añade sacarosa concentrada a la suspensión final (0,666 g/g) para lograr un 10 % de sacarosa.

Determinación de la concentración de sólidos de suspensión final filtrada a 0,45 µm. Se filtra una parte de la muestra de suspensión final a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm antes de la adición de sacarosa. Se añade un volumen de muestra filtrada a un frasco de centelleo de 20 ml tarado, que se seca al vacío usando un liofilizador/horno. La muestra restante de la suspensión final no filtrada con sacarosa se congela.

Ejemplo 4: Preparación de Nanopartículas que Contienen Dasatinib - Procedimiento de Emulsión 2 (por referencia)

Preparación de la fase orgánica. Se añadieron un copolímero de dibloques de poli(ácido láctico)-poli(etilen glicol) (PLA-PEG) (890 mg) y acetato de etilo (16,22 g) a un frasco de vidrio de 20 ml. Se sometió la mezcla a agitación vorticial

para proporcionar una solución de polímero-EA. Se añaden 1 10 mg de dasatinib y 4,06 g de ácido oleico al 9 % recién preparado en alcohol bencílico (BA) a un segundo frasco de vidrio de 20 ml y se somete la mezcla a agitación vorticial durante la noche para proporcionar una solución de fármaco-ácido-BA. Antes de la formulación de las nanopartículas, se añade la solución de polímero-EA a la solución de fármaco-ácido-BA y se somete la mezcla a agitación vorticial para formar la fase orgánica.

Preparación de la fase acuosa. Se añaden colato de sodio (SC) (1,2 g) y agua desionizada (955 g) a una botella de 1 l. Se agita la mezcla sobre una placa de agitación hasta disolver. Se añadió alcohol bencílico (40 g) al colato de sodio/agua y se agitó la mezcla sobre una placa de agitación hasta disolver.

Formación de la emulsión. La proporción de fase acuosa con respecto a fase orgánica es de 5:1. Se vierte la fase orgánica en la fase acuosa y se homogeneiza la mezcla usando un homogeneizador manual durante 10 segundos a temperatura ambiente para formar una emulsión basta. La emulsión basta se alimenta a través de un homogeneizador de alta presión (110S) con un ajuste de presión a 0,32 MPa de medidor para 1 paso con el fin de formar una nanoemulsión (emulsión fina).

Formación de nanopartículas. Se vierte la nanoemulsión en un agente de inactivación (agua desionizada) a menos de 5 ºC al tiempo que se agita sobre una placa de agitación para formar una fase inactivada. La proporción de inactivación con respecto a emulsión es de 10:1. Se añade a la fase inactivada Tween 80 en agua (35 % (p/p)) a una proporción de 100:1 de Tween 80 con respecto a fármaco.

Concentración de nanopartículas a través de filtración de flujo tangencial (TFF). Se concentra la fase inactivada usando TFF con un casete Pall de 300 kDa (2 membranas) para formar un concentrado de nanopartículas de -200 ml. El concentrado de nanopartículas se somete a diafiltración con -20 diavolúmenes (4 l) de agua desionizada fría. El volumen del concentrado de nanopartículas diafiltradas se reduce a un volumen mínimo. Se añade agua fría (100 ml) al recipiente y se bombea a través de la membrana para enjuagar y formar una suspensión. Se recoge la suspensión (-100 ml) en un frasco de vidrio.

Determinación de concentración de sólidos de suspensión final no filtrada. Se añade un volumen de suspensión final a un frasco de centelleo de 20 ml tarado, que se seca al vacío en un liofilizador/horno. Se determina el peso de las nanopartículas en el volumen de suspensión seca. Se añade sacarosa concentrada a la suspensión final (0,666 g/g) para lograr un 10 % de sacarosa.

Determinación de la concentración de sólidos de suspensión final filtrada a 0,45 µm. Se filtra una parte de la muestra de suspensión final a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm antes de la adición de sacarosa. Se añade un volumen de muestra filtrada a un frasco de centelleo de 20 ml tarado, que se seca al vacío usando un liofilizador/horno. La muestra restante de la suspensión final no filtrada con sacarosa se congela.

Ejemplo 5: Solubilidad de Dasatinib en Soluciones de Ácido Oleico/Alcohol Bencílico (por referencia)

Como se muestra en la Tabla 5, se puede mejorar la solubilidad de dasatinib en aproximadamente 2-3 veces cuando se impurifica alcohol bencílico con ácido oleico. La solubilidad de dasatinib en alcohol bencílico, acetato de etilo y mezclas de ácido oleico y alcohol bencílico se cuantifica usando HPLC.

Tabla 5. Solubilidad de dasatinib en disolventes seleccionados con o sin impurificación de ácido oleico.

Disolventes con o sin impurificación de ácido	Solubilidad de dasatinib (mg/ml, por HPLC)
BA	9,45
EA	0,32
3 % de ácido oleico en BA	16,82
6 % de ácido oleico en BA	25,18
9 % de ácido oleico en BA	29,84

Ejemplo 6: Formulaciones de Nanopartículas que Contienen Dasatinib Impurificadas con Ácido Oleico (por referencia)

Se prepararon once formulaciones de dasatinib, con o sin impurificación de ácido oleico. Las condiciones de formulación y caracterización se proporcionan en la Tabla 6. Se prepararon formulaciones de dasatinib como nanopartículas corrientes sin impurificación de ácido oleico o nanopartículas impurificadas con ácido oleico. Se usaron dos concentraciones de sólidos de un 4,7 % y un 10 %. La formulación corriente (lote 170-51-1) usó BA únicamente como disolvente orgánico, mientras que todas las formulaciones de ácido oleico usaron una mezcla 20/80 de BA/EA (p/p) como disolvente orgánico. Se añadió EA para pre-disolver la solución de fármaco en una mezcla de ácido oleico-BA justo antes del emulsionado.

Tabla 6. Condiciones de Formulación y Caracterización.

Lote N.º	Ácido oleico		Dasatinib	Conc. Sólidos	% de carga	tamaño (nm)	% de SC, N.º pasos @ MPa	NP Sólidos (mg/ml)
	% en peso en BA	Proporcionar molar de ácido/fármaco	Teo. Carga					
170-51-1	ND		5 %	10 %	0,87 %	113,3	0,475 % de SC, 1@0,32 MPa, impurificado con 0,35 g de 5 % de SC a -0,50 %, 1@0,32 MPa	5,43
170-100-1	3 %	3,48	6 %	4,70 %	0,20 %	127,8	0,10 % de SC, 1@0,32 MPa	7,08
170-65,3	6 %	5,706	7,6 %	4,58 %	0,54 %	113,6	0,125 % de SC, 1@0,31 MPa	6,57
170-100-2		4,622	4 %	10 %	0,58 %	108,7	0,12 % de SC, 1@0,32 MPa	6,48
170-139-7		4,608	4 %	10 %	0,61 %	111,1	0,10 % de SC, 1@0,32 MPa	6,20
170-100-3		4,686	9 %	4,7 %	1,17 %	130,5	0,12 % de SC, 2@0,32 MPa	6,51
170-139-8		4,668	9 %	4,7 %	1,26 %	116,5	0,12 % de SC, 2@0,32 MPa	6,30
170- 100-4	9 %	5,565	5 %	10 %	1,90 %	111,3	0,12 % de SC, 1@0,32 MPa	5,56
170-139-9		5,560	5 %	10 %	1,43 %	109,8	0,12 % de SC, 1@0,32 MPa	6,01
170-100-5		5,74	11 %	4,7 %	1,99 %	115,5	0,12 % de SC, 1 @0,32 MPa	7,25
170-139-10		5,732	11 %	4,7 %	1,91 %	109,6	0,12 % de SC, 1 @0,32 MPa	6,68

Como se muestra en la Tabla 6, los tamaños de partículas de todas las formulaciones se controlaron bien dentro del intervalo de 100-130 nm. En condiciones similares con el objetivo de lograr tamaños de partículas similares, los lotes que usan ácido-BA como disolvente orgánico tendieron a usar muchos menos colato de sodio que los lotes sin ácido oleico. Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, este resultado se puede deber al efecto parcial de tensioactivo de los ácidos grasos (por ejemplo, ácido oleico), que podría contribuir a estabilizar la emulsión. Un 3 % de ácido oleico proporcionó un 0,20 % de carga de fármaco, lo cual no mejoró en comparación con un 0,87 % para el lote de control (formulación sin ácido oleico). Sin embargo, cuando se usa ácido oleico al 6 %, se logró > 1 % de carga de fármaco con un 4,7 % de sólidos y un 9 % de carga de fármaco teórica. Cuando se aumentó la concentración de ácido oleico hasta un 9 % en BA, la carga de fármaco aumentó hasta ~2 %, que es aproximadamente dos veces la carga del lote de control.

Los perfiles de liberación *in vitro* se muestran en las Figuras 7 y 8 siguientes. (Debido a que desatinib se degrada tras 24 horas en el tampón de liberación a 37 ºC, únicamente se presentaron datos de liberación hasta 6 horas.) Tal como se muestra en la FIG. 7, el lote de ácido oleico al 3 % proporcionó una liberación repentina y la más rápida en comparación con las nanopartículas de control formuladas sin ácido oleico y las nanopartículas formuladas con un 6 % de ácido oleico. Los lotes de ácido oleico al 6 % proporcionaron liberaciones repentinas de ~10 %, es similar a la liberación repentina de las nanopartículas de control. Dos lotes con las cargas de fármaco más elevadas, lotes 170-100-3 y 170-139-8, proporcionaron una liberación más lenta que el lote de control, con liberaciones acumuladas de 4 horas de un 34,2 % y un 43,5 %, respectivamente, frente a un 60,99 % para el lote de control.

Tal como se muestra en la FIG. 8, cuando se usa ácido oleico al 9 %, se evitó en gran medida la liberación repentina por debajo de > 5 % y la tasa de liberación también se ralentizó. La liberación de fármaco a las 4 horas estuvo dentro del intervalo de aproximadamente un 29 % a aproximadamente un 38 %, que es ligeramente más lenta que los lotes de liberación lenta de un ácido oleico al 6 %, lotes 170-100-3 y 170-139-8.

Las formulaciones anteriores demuestran la capacidad del ácido oleico al 9 % en BA tanto para mejorar la carga de fármaco como para ralentizar la tasa de liberación de fármaco.

Ejemplo 7: Formulaciones de Nanopartículas que Contienen Dasatinib Impurificadas con Ácidos Cólicos (por referencia)

Se prepararon nueve formulaciones de dasatinib impurificadas con ácidos cólicos. Las condiciones de formulación y la caracterización se proporcionan en la Tabla 7. Se usaron dos concentraciones de sólidos de un 2,0 y un 3,0 %. Se

varió la proporción molar de ácido/fármaco en las formulaciones.

Tabla 7. Condiciones de Formulación y Caracterización

Lote N.º	Ácido			Dasatinib	Conc. Sólidos	% de carga	tamaño (nm)	% de SC, N.º pasos @ pd	NP Sólidos (mg/ml)
	% en BA	Proporción molar de aditivo/fármaco (alimentación)	Proporción molar de ácido/fármaco en NPs	Teo. Carga					
145-54-1	12 % de ácido cólico	3,09	2 30	30 %	3,0 %	2,1 %	168,6	SC al 0,05 %, 1@0,32 MPa	2,37
145-54-1R			2,04	30 %	3,0 %	2,0 %	144,2	SC al 0,075 %, 1@0,32 MPa	2,56
145-107-1			1,50	30 %	3,0 %	2,3 %	132,2	SC al 0,1 %, 1@0,32 MPa	2,50
145-54-2	6 % de ácido desoxicólico	3,65	3,50	30 %	2,0 %	1,7 %	124,6	SC al 0,075 %, 1@0,32 MPa	2,41
145-54-2R			3,32	30 %	2,0 %	1,9 %	130	SC al 0,075 %, 1@0,32 MPa	2,89
145-107-2			2,13	30 %	2,0 %	1,8 %	125,7	SC al 0,08 %, 1@0,32 MPa	2,33
145-54-3	3 % de ácido litocólico	1,91	2,35	30 %	2,0 %	3,5 %	149,9	SC al 0,05 %, 1@0,32 MPa	2,41
145-54			2,28	30 %	2,0 %	2,1 %	124,8	SC al 0,075 %,	2,82

Lote N.º	Ácido			Dasatinib	Conc. Sólidos	% de carga	tamaño (nm)	% de SC, N.º pasos @ pd	NP Sólidos (mg/ml)
	% en BA	Proporción molar de ácido/fármaco (alimentación)	Proporción molar de ácido/fármaco en NPs	Teo. Carga					
3R								1@0,32 MPa	
145-107-*3*			1,51	30 %	2,0 %	2,2 %	130,5	SC al 0,08 %, 1@0,32 MPa	2,64

Como se muestra en la Tabla 7, los tamaños de partículas de todas las formulaciones se controlaron generalmente bien dentro del intervalo de 120-150 nm. Se obtuvieron propiedades de nanopartícula pequeña usando cada uno de los tres ácidos cólicos; sin embargo, el uso del derivado de ácido litiocólico en lugar de ácido cólico permitió el uso de cuatro veces menos ácido, obteniéndose propiedades similares de nanopartícula. Cuando se usa ácido desoxicólico al 6 %, se obtuvieron tamaños de partícula bien controlados y cargas de fármaco bajo una diversidad de condiciones.

Los perfiles de liberación *in vitro* se muestran en la Tabla 8 y la Figura 9. (Debido a que desatinib se degrada tras 24 horas en el tampón de liberación a 37 ºC, únicamente se presentaron datos de liberación hasta 6 horas.) Como se muestra en la Tabla 8 y en la Figura 9, cuando se usa ácido litiocólico al 3 %, la liberación repentina fue < 7 % y la tasa de liberación se controló bien. La liberación de fármaco a las 4 horas estuvo dentro del intervalo de aproximadamente un 22 % a aproximadamente un 34 %. La formulación 145-54-3, que usa la cantidad más elevada de colato de sodio en la fase acuosa, dio como resultado la menor cantidad de liberación repentina (< 5 %). Las formulaciones 145-54-3R y 145-107-3 tuvieron una liberación repentina ligeramente más elevada y una liberación

global de dasatinib a largo plazo ligeramente más rápida.

Tabla 8. Propiedades de Liberación *in vitro* de Nanopartículas de Dasatinib Impurificado con Ácido Litocólico.

Tiempo (horas)	145-54-3: 16/5,3 % ácido litocólico, 30 % de carga, 2 % de sólidos, 149,9 nm. 3,5 %	145-54-3R: 16/5, 3 % de ácido litocólico, 30 % de carga, 2 % de sólidos, 1248nm, 2,1 %	145,107-3: 16/5, 3 % de ácido litocólico, 130,3nm, 2,2 %
0	4,77	6,66	6,62
1	9,31	12,65	13,91
2	13,59	17,08	20,03
4	22,63	31,74	33,32
6	31,52	43,71	46,00

Las formulaciones anteriores demuestran la capacidad de ácido litocólico al 3 % en BA por un lado para mejorar la carga de fármaco y por otro, para ralentizar la tasa de liberación de fármaco en comparación con las nanopartículas preparadas sin ácido.

Ejemplo 8: Preparación de Nanopartículas que Contienen Dasatinib-Procedimiento de Emulsión 3

Preparación de tampón. Para preparar 1000 ml de fosfato 0,5 M (pKa_2 = 7,2) Tampón: pH= 6,5, disolver 68,995 g de NaH_2PO_4 H_2O (M_r = 137,99) en aproximadamente 900 ml de agua pura. Valorar a pH 6,49 a la temperatura de laboratorio de 25 ºC con base fuerte de NaOH según sea necesario. Rellenar hasta un volumen de 1000 ml con agua pura. Para preparar 1000 ml de fosfato 0,37 M (pKa_2 = 7,2) Tampón: pH= 6,5, disolver 46,92 g de NaH_2PO_4 H_2O (M_r = 137,99) en aproximadamente 900 ml de agua pura. Valorar a pH 6,49 a la temperatura de laboratorio de 25 ºC con base fuerte de NaOH según sea necesario. Rellenar hasta un volumen de 1000 ml con agua pura. Para preparar 1000 ml de fosfato 0,17 M (pKa_2 = 7,2) Tampón: pH= 6,5, disolver 23,46 g de NaH_2PO_4 H_2O (M_r = 137,99) en aproximadamente 900 ml de agua pura. Valorar a pH 6,49 a la temperatura de laboratorio de 25 ºC con base fuerte de NaOH según sea necesario. Rellenar hasta un volumen de 1000 ml con agua pura.

Preparación de solución de ácido pamoico. Se preparó una solución al 29 % (p/p) de ácido pamoico por medio de mezcla de 2,9 g de ácido pamoico con 7,1 g de DMSO en un recipiente. Se calentó el recipiente en un horno de calentamiento a 70-80 ºC hasta disolver todo el ácido pamoico.

Preparación de solución de TFA al 8 %/agua al 7,5 %/alcohol bencílico al 84,5 % (% en peso). Se combinaron ácido trifluoroacético (TFA) (3,2 g), agua desionizada (DI) (3,0 g) y alcohol bencílico (BA) (33,8 g) para preparar la solución de 8 % de TFA/7,5 % de agua/84,5 % de alcohol bencílico (% en peso).

Preparación de la fase orgánica. Se añadieron un copolímero de dibloques de poli(ácido láctico)-poli(etilen glicol) (PLA-PEG) (700 mg) y acetato de etilo (7,583 g) a un frasco de vidrio de 20 ml. Se sometió la mezcla a agitación vorticial durante la noche para proporcionar una solución de polímero-EA. Se añadieron 300 g de fármaco (dasatinib) a un segundo frasco de vidrio de 20 ml, 1,736 g de la solución anterior de 8 % de TFA/7,5 % de agua/BA y 792 mg de la solución anterior de 29 % de ácido pamoico/DMSO y se sometió la mezcla a agitación vorticial hasta obtener una solución de fármaco transparente para proporcionar una solución de fármaco-ácido-BA. Antes de la formulación de las nanopartículas, se añade la solución de polímero-EA a la solución de fármaco-ácido-BA y se somete la mezcla a agitación vorticial para formar la fase orgánica.

Preparación de la fase acuosa (0,09 % de Brij 100, 4 % de alcohol bencílico en agua). A una botella de 1 l se añaden Brij 100 (0,9 g) y agua desionizada (959,1 g). Se agita la mezcla sobre una placa de agitación hasta disolver. Se añade alcohol bencílico (40 g) a Brij/agua y se agita la mezcla sobre una placa de agitación hasta disolver.

Formación de la emulsión. La proporción de fase acuosa con respecto a fase oleosa es de 5:1. Se vierte la fase orgánica en la fase acuosa y se homogeneiza la mezcla usando un homogeneizador manual durante 10 segundos a temperatura ambiente para formar una emulsión basta. La emulsión basta se alimenta a través de un homogeneizador de alta presión (110S) con un ajuste de presión a ~ 75,82 MPa de medidor para un 1 paso discreto con el fin de formar una nanoemulsión (emulsión fina).

Formación de nanopartículas. Se vierte la nanoemulsión en un agente de inactivación (tampón de fosfato de pH 6,5 con moles apropiados) a menos de 5 ºC al tiempo que se agita sobre la placa de agitación para formar una fase inactivada. La proporción de inactivación con respecto a emulsión es de 10:1. Se añade a la fase inactivada Tween 80 en agua (35 % (p/p)) a una proporción de 100: 1 de Tween 80 con respecto a fármaco.

Concentración de nanopartículas a través de filtración de flujo tangencial (TFF). Se concentra la fase inactivada usando TFF con un casete Pall de 300 kDa (2 membranas de 0,1 m^2) para formar un concentrado de nanopartículas de ~200 ml. El concentrado de nanopartículas se somete a diafiltración con ~20 diavolúmenes (4 l) de agua desionizada fría. El volumen del concentrado de nanopartículas diafiltradas se reduce a un volumen mínimo. Se añade agua fría (100 ml) al recipiente y se bombea a través de la membrana para enjuagar y formar una suspensión. Se recoge la suspensión (~100 ml) en un frasco de vidrio.

Determinación de concentración de sólidos de suspensión final no filtrada. Se añade un volumen de suspensión final

a un frasco de centelleo de 20 ml tarado, que se seca al vacío en un liofilizador/horno. Se determina el peso de las nanopartículas en el volumen de suspensión seca. Se añade sacarosa concentrada a la suspensión final (0,666 g/g) para lograr un 10 % de sacarosa.

Determinación de la concentración de sólidos de suspensión final filtrada a 0,45 µm. Se filtra una parte de la muestra de suspensión final a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm antes de la adición de sacarosa. Se añade un volumen de muestra filtrada a un frasco de centelleo de 20 ml tarado, que se seca al vacío usando un liofilizador/horno. La muestra restante de la suspensión final no filtrada con sacarosa se congela.

Ejemplo 9: Efecto de pH de Inactivación sobre la Carga de Fármaco

Se prepararon ocho formulaciones de dasatinib impurificadas con ácido pamoico usando el protocolo del Ejemplo 8. Las Tablas 9 y 10 proporcionan las condiciones de la formulación y caracterización. Las condiciones de formulación incluyeron bien un tampón cítrico/fosfato (pH 4,5) como agente de inactivación (de acuerdo con las reivindicaciones) o bien agua desionizada como agente de inactivación (ejemplo de referencia). Las soluciones fueron transparentes y estables durante el período de formulación, y las emulsiones fueron suficientemente estables durante la formulación.

Como se muestra en las Tablas 9 y 10, la carga de fármaco fue más del doble para las formulaciones que incluyeron el agente de inactivación de tampón cítrico/fosfato en comparación con las formulaciones que incluyeron el agente de inactivación de agua desionizada. Adicionalmente, la retención SQ tuvo como resultado una pérdida de un 2-3 % de carga de fármaco (por ejemplo, una reducción mayor de un 14 % hasta aproximadamente un 11 %).

Las formulaciones de ácido pamoico que incluyeron agente de inactivación de agua desionizada también tuvieron una carga de fármaco mayor en comparación con las formulaciones análogas impurificadas con ácido oleico y ácidos cólicos en lugar de ácido pamoico (véase las Tablas 6 y 7 anteriores).

Tabla 9. Condiciones de Formulación y Caracterización.

Lote N.º	Agente de inactivación	Fármaco Teor. Carga (%)	Conc. Sólidos	pH antes de la inactivación	pH después de la inactivación	% de carga	tamaño (nm)	% Brij. N.º pasos @ MPa	NP Sólidos (mg/ml)	Proporción molar de ácido/fármaco
212-38-1	Tampón. sin retención SQ	22	10 %			14,50 %	100,2	0,06 % de Brij. l@0,28 MPa	2,51	1,000
212. 38-1R	Tampón. sin retención SQ	24	10 %	4,57	4,59	14,66 %	98,8	0,06 % de Brij. l@0,32 MPa	2,48	1,000
212-38-2	Tampón	22	10 %	4,57	4,57	10,82 %	95	0,06 % de Brij. l@0,32 MPa	2,30	1,000
212-38-2R	Tampón	22	10 %			12,16 %	99,2	0,06 % de Brij, l@0,32 MPa	2,27	1,000
212-38-3	Agua sin retención SQ	22	10 %	5,9	3,28	6,15 %	101,8	0,06 % de Brij. l@0,32 MPa	2,36	1,000
212-38-3R	Agua	22	10 %			3,98 %	97,7	0,06 % de Brij. l@0,32 MPa	2,30	1,000
212-38-4	Agua	22	10 %	5,9	3,19	4,23 %	111,2	0,06 % de Brij. l@0,32 MPa	3,52	1,000
212-38-4R	Agua. 10 minutos de retención	22	10 %			5,84 %	383,1	0,06 % de Brij. l@0,32 MPa	2,28	1,000

Tabla 10. Condiciones de Formulación y Caracterización.

Lote N.º	Medio de inactivación	pH del medio de inactivación		Carga teórica (%)	Conc. Sólidos	Proporción de alimentación ácido/fármaco	Carga de fármaco	tamaño (nm)	Eficacia de encapsulado
		Antes de la adición de la emulsión	Después de la adición de la emulsión						
212-38-3	Agua	5,9	3,28	22	10 %	1,000	6,15 %	101,8	27,93 %
212-38-1R	Tampón	4,57	4,59	22	10 %	1,000	14,66 %	98,8	66,65 %

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una nanopartícula terapéutica, que comprenden:

combinar una primera fase orgánica con una primera solución acuosa para formar una segunda fase;
emulsionar la segunda fase para formar una fase de emulsión, en la que la fase de emulsión comprende un primer polímero, un agente terapéutico básico que tiene un nitrógeno protonable, y ácido pamoico; e
inactivar la fase de emulsión formando de este modo una fase inactivada;
en la que la inactivación de la fase de emulsión comprende mezclar la fase de emulsión con una segunda solución acuosa que tiene un pH entre 4 y 7, y la segunda solución acuosa comprende un agente tampón de concentración suficiente para que la fase inactivada tenga un pH que difiera del pH de la segunda solución acuosa en menos de 1 unidad de pH.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pH de la segunda solución acuosa está entre 4 y 5.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pH de la segunda solución acuosa está entre 6 y 7.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la segunda solución acuosa comprende fosfato.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la segunda solución acuosa comprende citrato.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la segunda solución acuosa comprende una mezcla de fosfato y citrato.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la segunda solución acuosa comprende una mezcla de borato, fosfato y acetato.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la fase inactivada tiene un pH igual al de la segunda solución acuosa.

9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la fase inactivada tiene un pH entre 4 y 7.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la fase inactivada tiene un pH entre 4 y 5.

11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la fase inactivada tiene un pH entre 6 y 7.

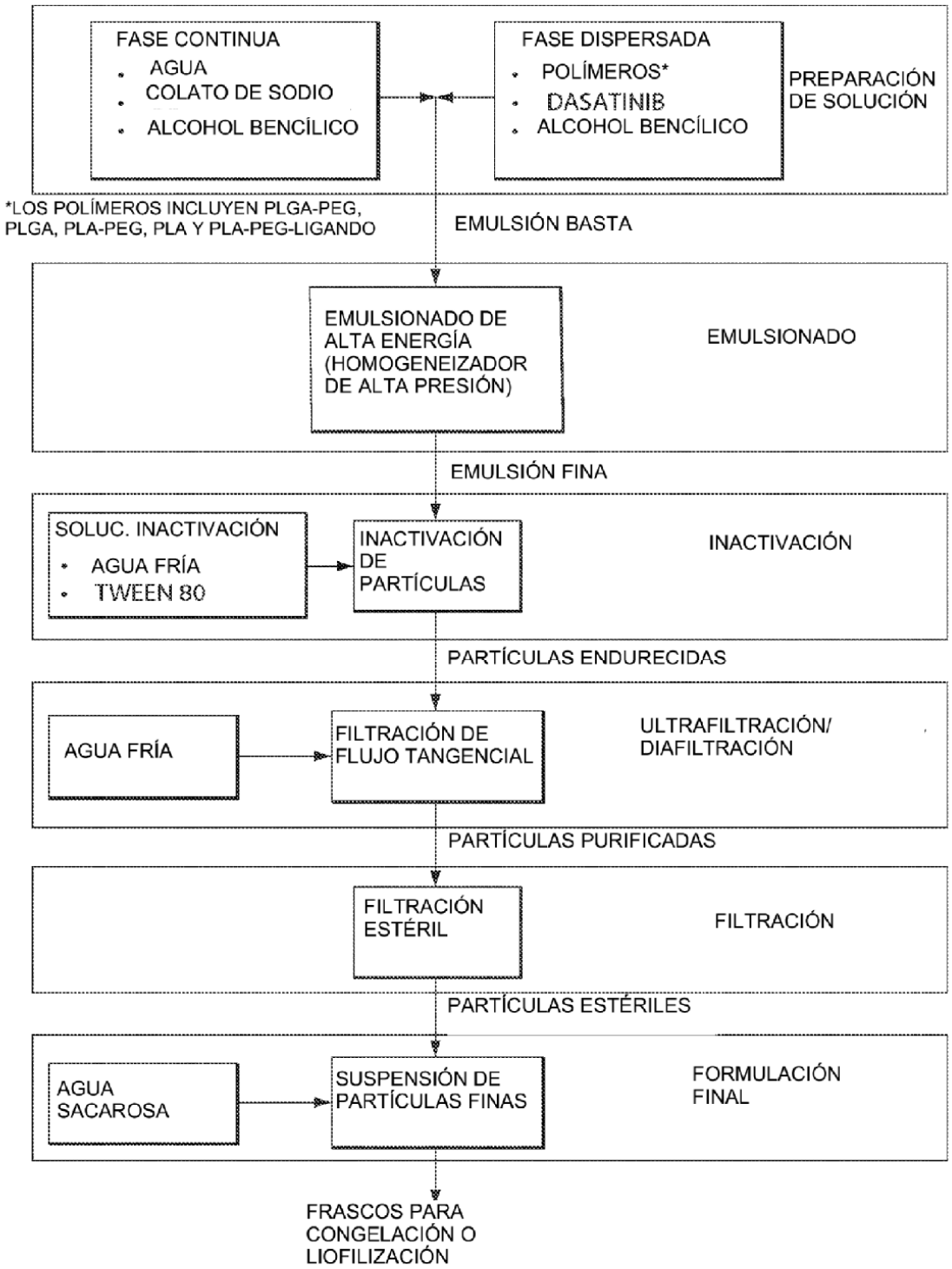

FASE CONTINUA
AGUA
COLATO DE SODIO
ALCOHOL BENCÍLICO
FASE DISPERSADA
POLÍMEROS*
DASATINIB
ALCOHOL BENCÍLICO
PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN
*LOS POLÍMEROS INCLUYEN PLGA-PEG, PLGA, PLA-PEG, PLA Y PLA-PEG-LIGANDO
EMULSIÓN BASTA
EMULSIONADO DE ALTA ENERGÍA (HOMOGENEIZADOR DE ALTA PRESIÓN)
EMULSIONADO
EMULSIÓN FINA
SOLUC. INACTIVACIÓN
AGUA FRÍA
TWEEN 80
INACTIVACIÓN DE PARTÍCULAS
INACTIVACIÓN
PARTÍCULAS ENDURECIDAS
AGUA FRÍA
FILTRACIÓN DE FLUJO TANGENCIAL
ULTRAFILTRACIÓN/ DIAFILTRACIÓN
PARTÍCULAS PURIFICADAS
FILTRACIÓN ESTÉRIL
FILTRACIÓN
PARTÍCULAS ESTÉRILES
AGUA SACAROSA
SUSPENSIÓN DE PARTÍCULAS FINAS
FORMULACIÓN FINAL
FRASCOS PARA CONGELACIÓN O LIOFILIZACIÓN

Fig. 1

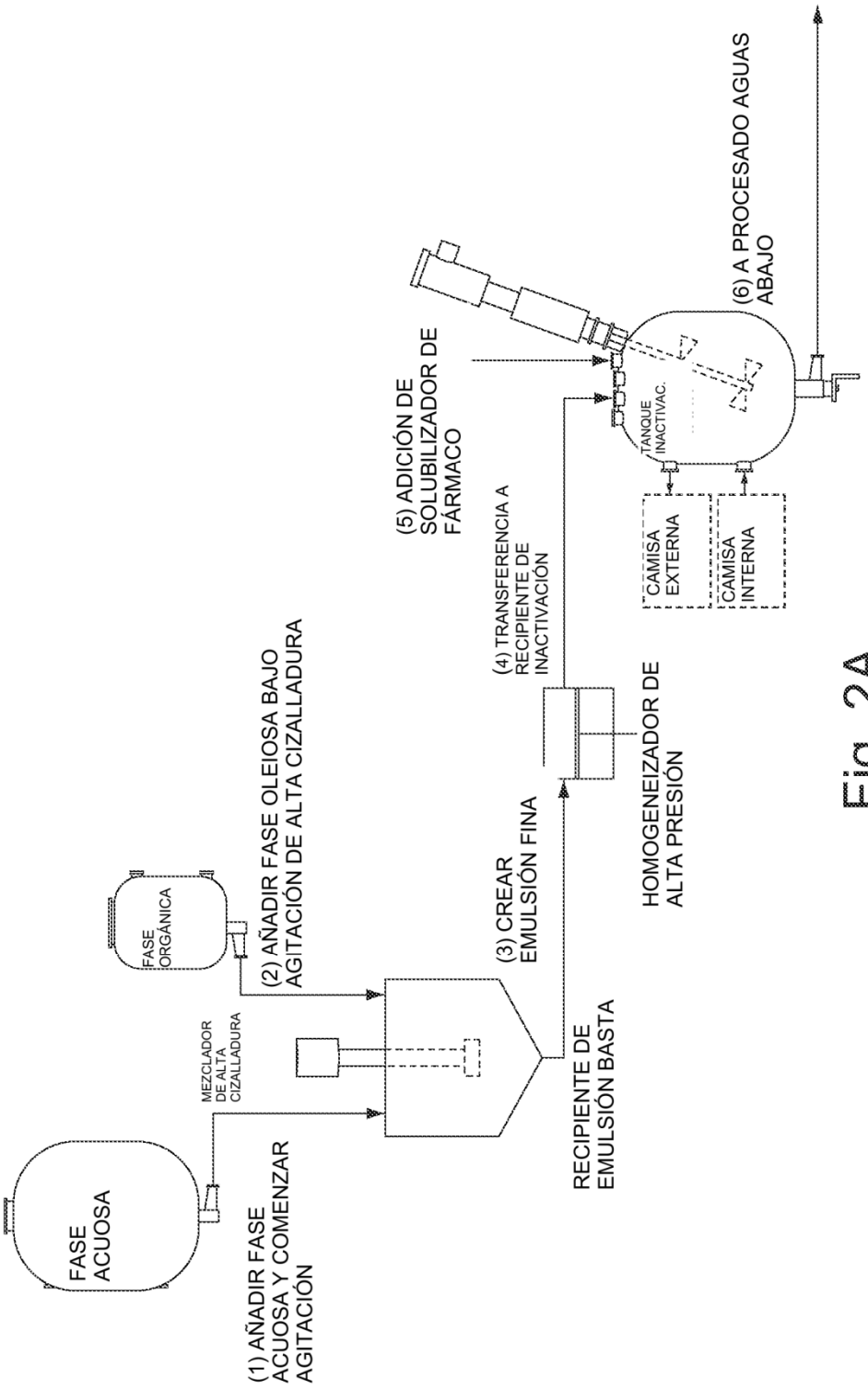

FASE ACUOSA
(1) AÑADIR FASE ACUOSA Y COMENZAR AGITACIÓN
MEZCLADOR DE ALTA CIZALLADURA
FASE ORGÁNICA
(2) AÑADIR FASE OLEIOSA BAJO AGITACIÓN DE ALTA CIZALLADURA
RECIPIENTE DE EMULSIÓN BASTA
(3) CREAR EMULSIÓN FINA
HOMOGENEIZADOR DE ALTA PRESIÓN
(4) TRANSFERENCIA A RECIPIENTE DE INACTIVACIÓN
(5) ADICIÓN DE SOLUBILIZADOR DE FÁRMACO
TANQUE INACTIVAC.
CAMISA EXTERNA
CAMISA INTERNA
(6) A PROCESADO AGUAS ABAJO

Fig. 2A

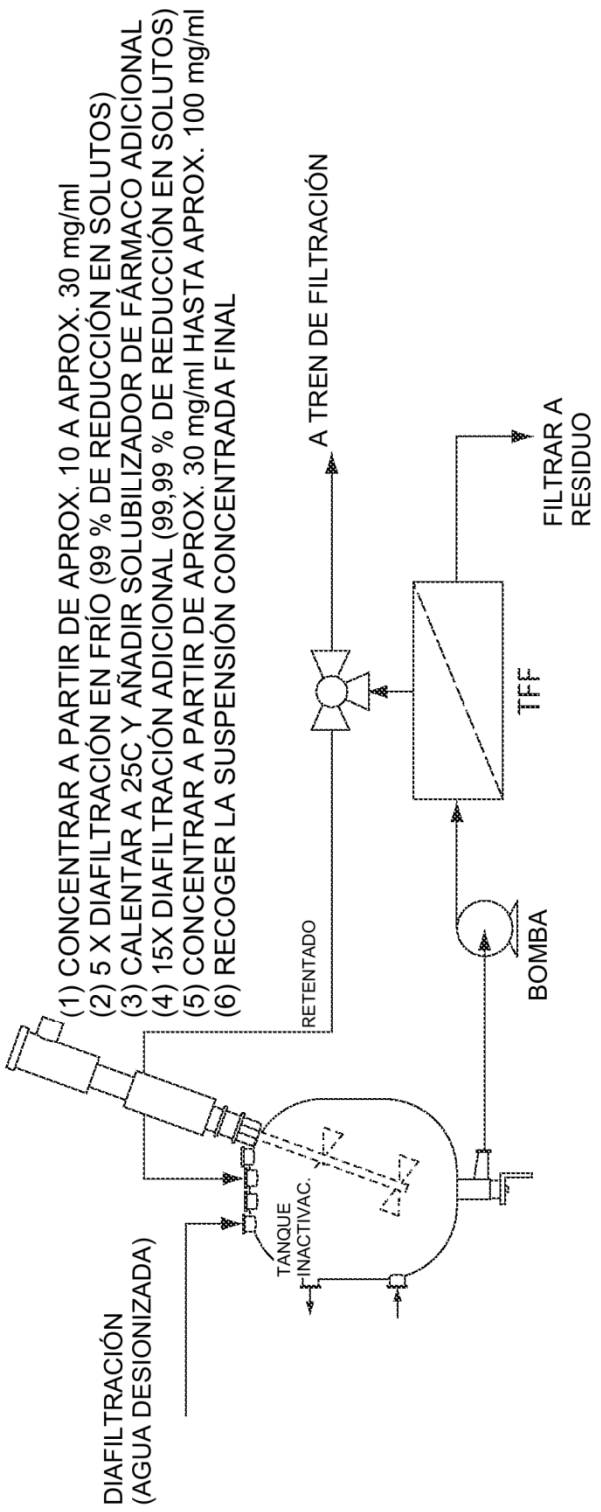

(1) CONCENTRAR A PARTIR DE APROX. 10 A APROX. 30 mg/ml
(2) 5 X DIAFILTRACIÓN EN FRÍO (99 % DE REDUCCIÓN EN SOLUTOS)
(3) CALENTAR A 25C Y AÑADIR SOLUBILIZADOR DE FÁRMACO ADICIONAL
(4) 15X DIAFILTRACIÓN ADICIONAL (99,99 % DE REDUCCIÓN EN SOLUTOS)
(5) CONCENTRAR A PARTIR DE APROX. 30 mg/ml HASTA APROX. 100 mg/ml
(6) RECOGER LA SUSPENSIÓN CONCENTRADA FINAL
A TREN DE FILTRACIÓN
RETENTADO
TFF
FILTRAR A RESIDUO
BOMBA
TANQUE INACTIVAC.
DIAFILTRACIÓN (AGUA DESIONIZADA)

Fig. 2B

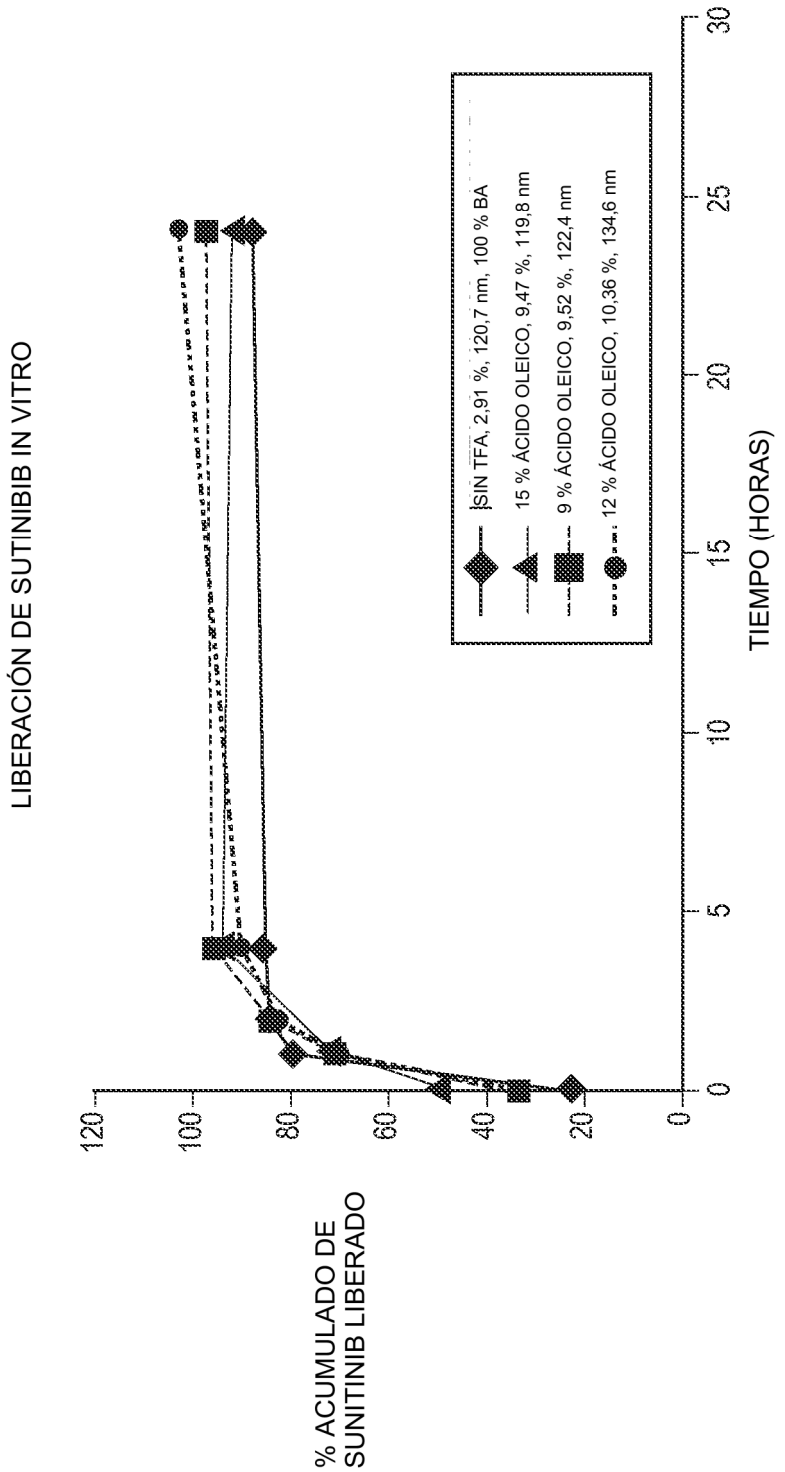

LIBERACIÓN DE SUTINIBIB IN VITRO
% ACUMULADO DE SUNITINIB LIBERADO
TIEMPO (HORAS)
0
5
10
15
20
25
30
20
40
60
80
100
120
SIN TFA, 2,91 %, 120,7 nm, 100 % BA
15 % ÁCIDO OLEICO, 9,47 %, 119,8 nm
9 % ÁCIDO OLEICO, 9,52 %, 122,4 nm
12 % ÁCIDO OLEICO, 10,36 %, 134,6 nm

FIG. 3

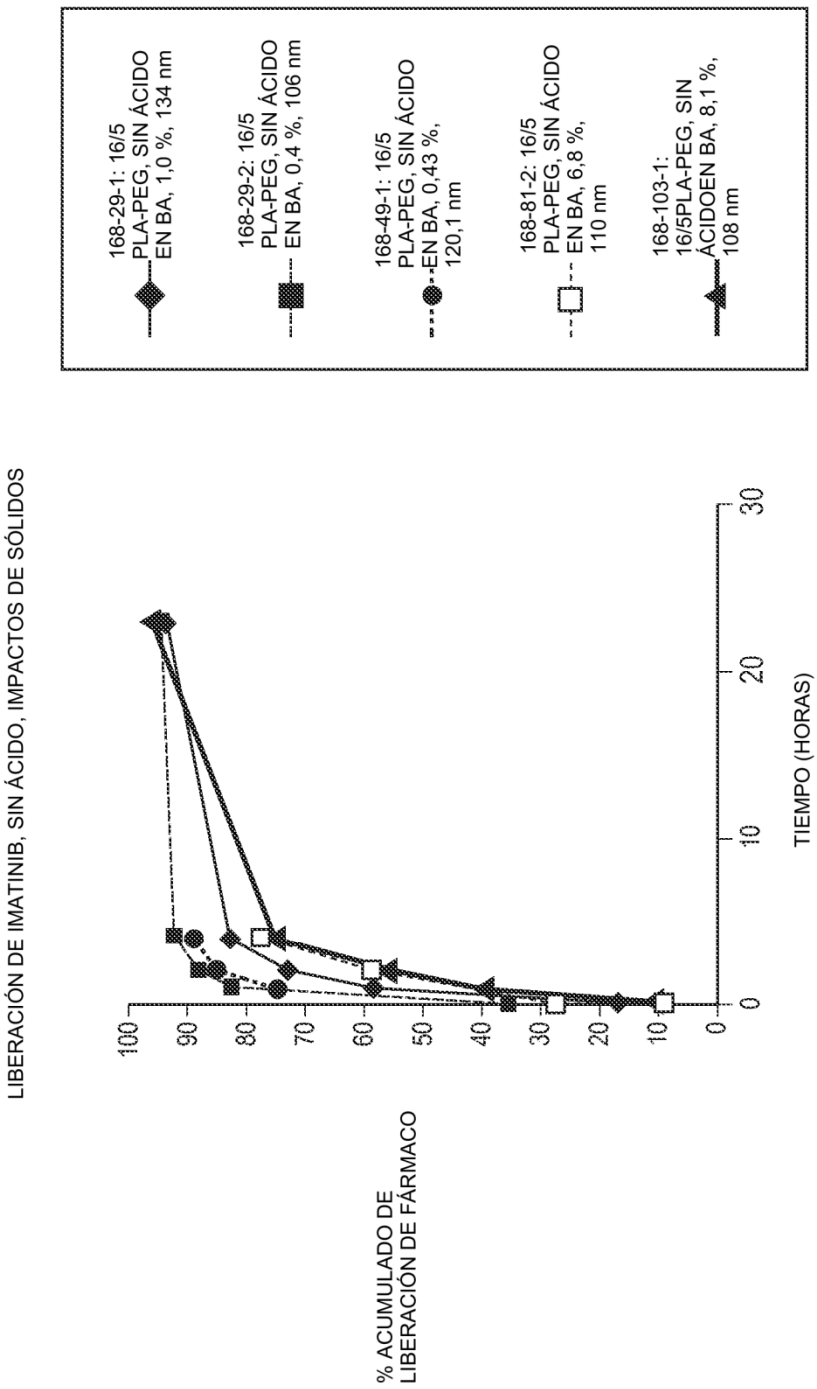

LIBERACIÓN DE IMATINIB, SIN ÁCIDO, IMPACTOS DE SÓLIDOS
% ACUMULADO DE LIBERACIÓN DE FÁRMACO
TIEMPO (HORAS)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
10
20
30
168-29-1: 16/5 PLA-PEG, SIN ÁCIDO EN BA, 1,0 %, 134 nm
168-29-2: 16/5 PLA-PEG, SIN ÁCIDO EN BA, 0,4 %, 106 nm
168-49-1: 16/5 PLA-PEG, SIN ÁCIDO EN BA, 0,43 %, 120,1 nm
168-81-2: 16/5 PLA-PEG, SIN ÁCIDO EN BA, 6,8 %, 110 nm
168-103-1: 16/5PLA-PEG, SIN ÁCIDOEN BA, 8,1 %, 108 nm

FIG. 4

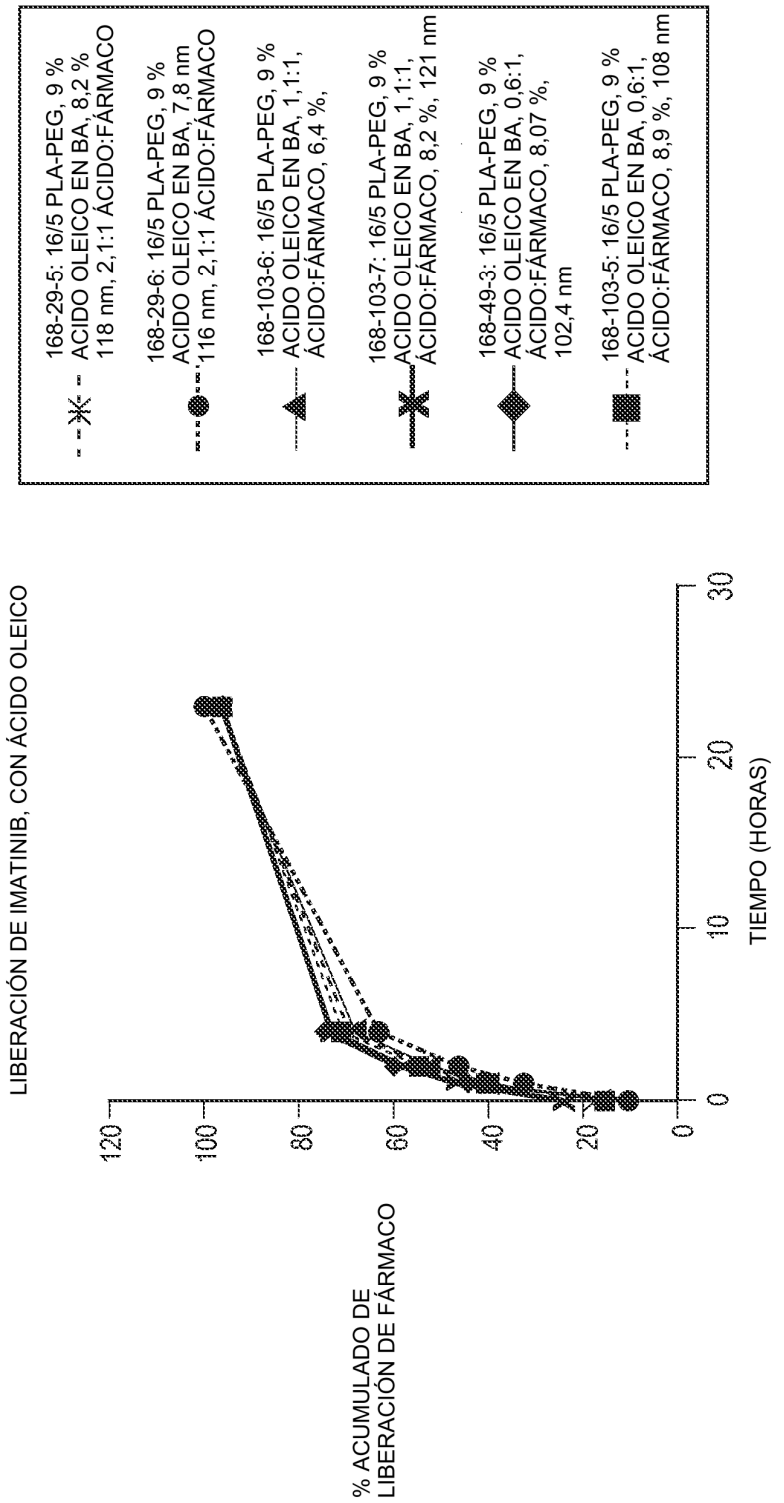

LIBERACIÓN DE IMATINIB, CON ÁCIDO OLEICO
% ACUMULADO DE LIBERACIÓN DE FÁRMACO
TIEMPO (HORAS)
0
20
40
60
80
100
120
0
10
20
30
168-29-5: 16/5 PLA-PEG, 9 % ACIDO OLEICO EN BA, 8,2 % 118 nm, 2,1:1 ÁCIDO:FÁRMACO
168-29-6: 16/5 PLA-PEG, 9 % ACIDO OLEICO EN BA, 7,8 nm 116 nm, 2,1:1 ÁCIDO:FÁRMACO
168-103-6: 16/5 PLA-PEG, 9 % ACIDO OLEICO EN BA, 1,1:1, ÁCIDO:FÁRMACO, 6,4 %,
168-103-7: 16/5 PLA-PEG, 9 % ACIDO OLEICO EN BA, 1,1:1, ÁCIDO:FÁRMACO, 8,2 %, 121 nm
168-49-3: 16/5 PLA-PEG, 9 % ACIDO OLEICO EN BA, 0,6:1, ÁCIDO:FÁRMACO, 8,07 %, 102,4 nm
168-103-5: 16/5 PLA-PEG, 9 % ACIDO OLEICO EN BA, 0,6:1, ÁCIDO:FÁRMACO, 8,9 %, 108 nm

FIG. 5

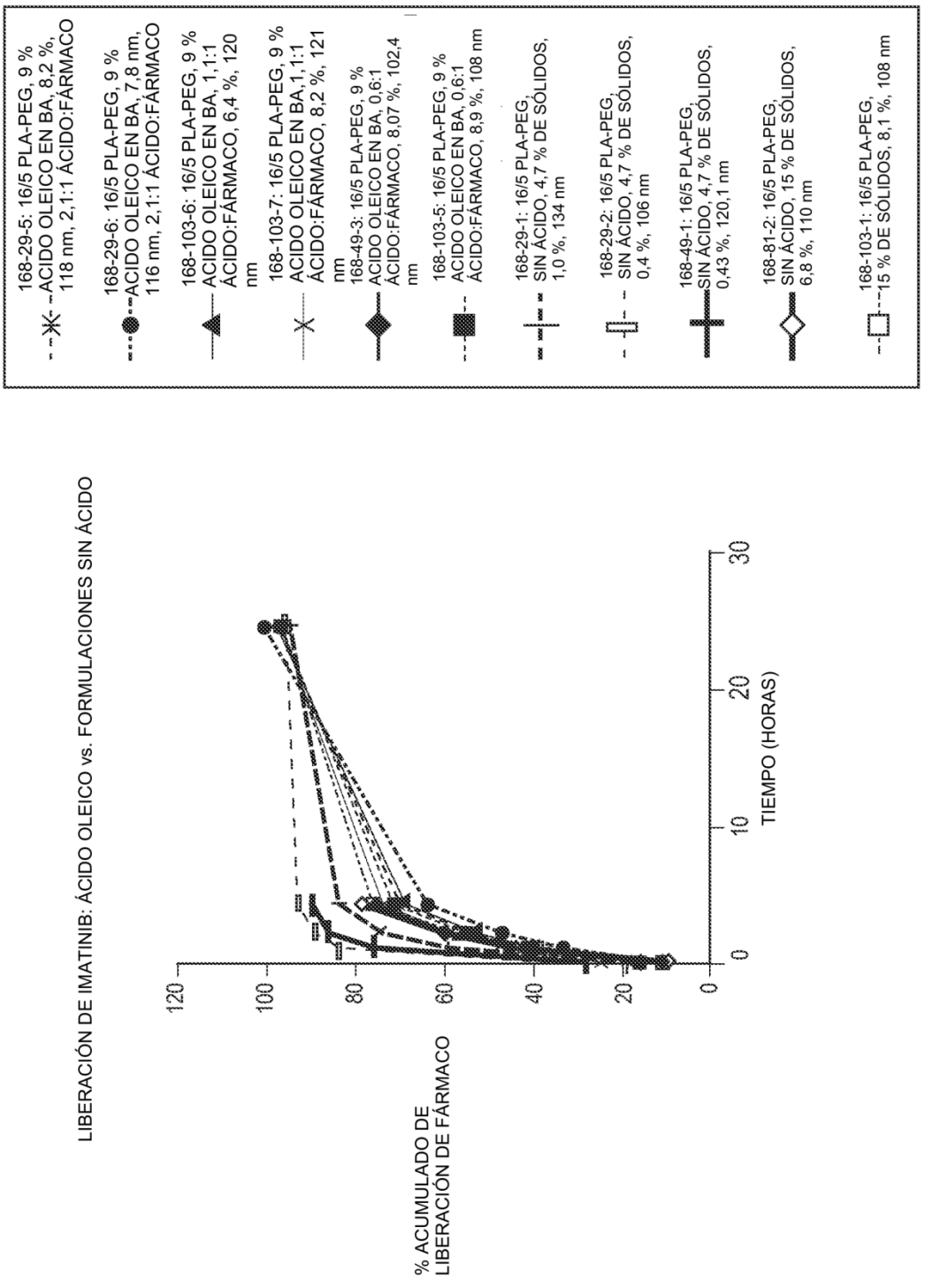

LIBERACIÓN DE IMATINIB: ÁCIDO OLEICO vs. FORMULACIONES SIN ÁCIDO
% ACUMULADO DE LIBERACIÓN DE FÁRMACO
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
TIEMPO (HORAS)
168-29-5: 16/5 PLA-PEG, 9 % ACIDO OLEICO EN BA, 8,2 %, 118 nm, 2,1:1 ÁCIDO:FÁRMACO
168-29-6: 16/5 PLA-PEG, 9 % ACIDO OLEICO EN BA, 7,8 nm, 116 nm, 2,1:1 ÁCIDO:FÁRMACO
168-103-6: 16/5 PLA-PEG, 9 % ACIDO OLEICO EN BA, 1,1:1 ÁCIDO:FÁRMACO, 6,4 %, 120 nm
168-103-7: 16/5 PLA-PEG, 9 % ACIDO OLEICO EN BA,1,1:1 ÁCIDO:FÁRMACO, 8,2 %, 121 nm
168-49-3: 16/5 PLA-PEG, 9 % ACIDO OLEICO EN BA, 0,6:1 ÁCIDO:FÁRMACO, 8,07 %, 102,4 nm
168-103-5: 16/5 PLA-PEG, 9 % ACIDO OLEICO EN BA, 0,6:1 ÁCIDO:FÁRMACO, 8,9 %, 108 nm
168-29-1: 16/5 PLA-PEG, SIN ÁCIDO, 4,7 % DE SÓLIDOS, 1,0 %, 134 nm
168-29-2: 16/5 PLA-PEG, SIN ÁCIDO, 4,7 % DE SÓLIDOS, 0,4 %, 106 nm
168-49-1: 16/5 PLA-PEG, SIN ÁCIDO, 4,7 % DE SÓLIDOS, 0,43 %, 120,1 nm
168-81-2: 16/5 PLA-PEG, SIN ÁCIDO, 15 % DE SÓLIDOS, 6,8 %, 110 nm
168-103-1: 16/5 PLA-PEG, 15 % DE SÓLIDOS, 8,1 %, 108 nm

FIG. 6

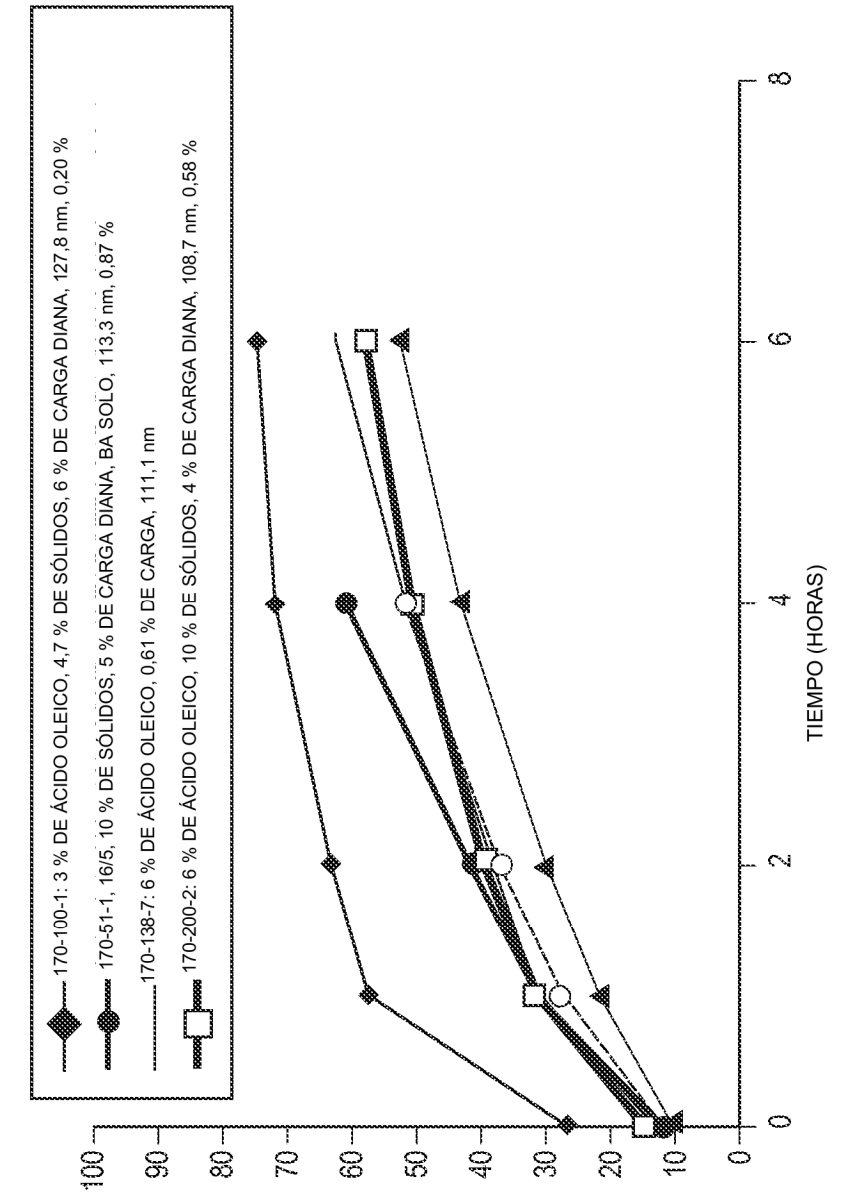

170-100-1: 3 % DE ÁCIDO OLEICO, 4,7 % DE SÓLIDOS, 6 % DE CARGA DIANA, 127,8 nm, 0,20 %
170-51-1, 16/5, 10 % DE SÓLIDOS, 5 % DE CARGA DIANA, BA SOLO, 113,3 nm, 0,87 %
170-138-7: 6 % DE ÁCIDO OLEICO, 0,61 % DE CARGA, 111,1 nm
170-200-2: 6 % DE ÁCIDO OLEICO, 10 % DE SÓLIDOS, 4 % DE CARGA DIANA, 108,7 nm, 0,58 %
LIBERACIÓN ACUMULADA (%)
TIEMPO (HORAS)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
2
4
6
8

FIG. 7

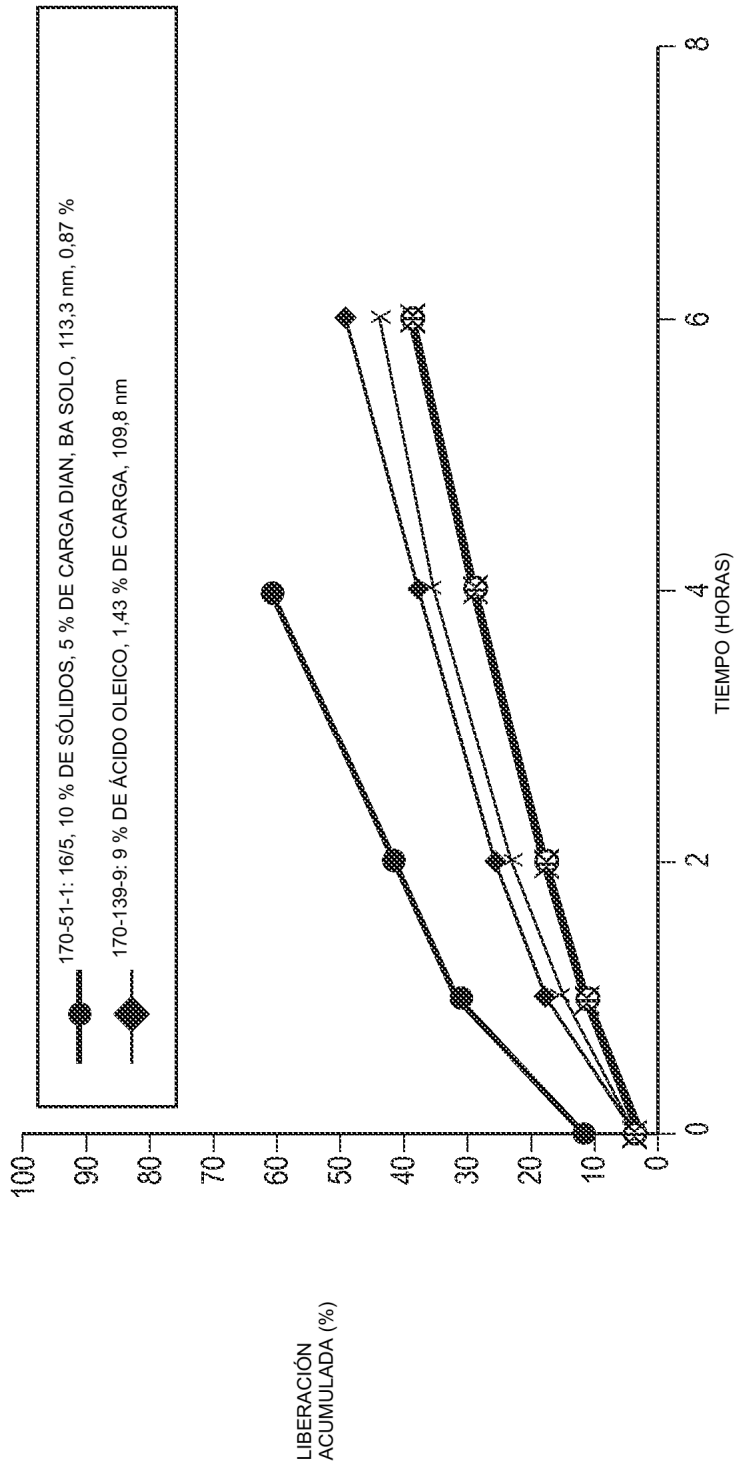

170-51-1: 16/5, 10 % DE SÓLIDOS, 5 % DE CARGA DIAN, BA SOLO, 113,3 nm, 0,87 %
170-139-9: 9 % DE ÁCIDO OLEICO, 1,43 % DE CARGA, 109,8 nm
LIBERACIÓN ACUMULADA (%)
TIEMPO (HORAS)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
2
4
6
8

FIG. 8

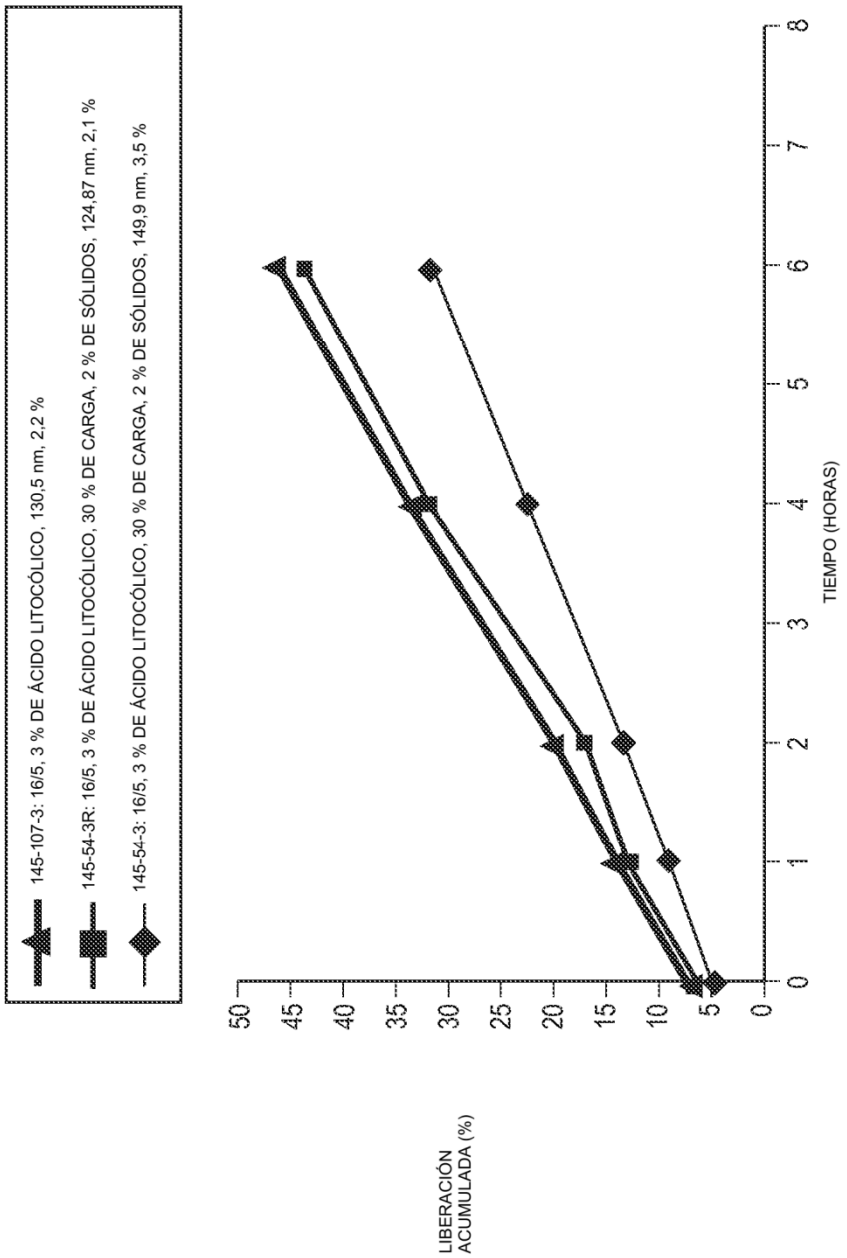

145-107-3: 16/5, 3 % DE ÁCIDO LITOCÓLICO, 130,5 nm, 2,2 %
145-54-3R: 16/5, 3 % DE ÁCIDO LITOCÓLICO, 30 % DE CARGA, 2 % DE SÓLIDOS, 124,87 nm, 2,1 %
145-54-3: 16/5, 3 % DE ÁCIDO LITOCÓLICO, 30 % DE CARGA, 2 % DE SÓLIDOS, 149,9 nm, 3,5 %
LIBERACIÓN ACUMULADA (%)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
TIEMPO (HORAS)
0
1
2
3
4
5
6
7
8

FIG. 9