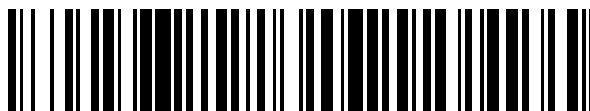


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 126**

51 Int. Cl.:

A61K 9/32	(2006.01)
A61K 9/51	(2006.01)
A61K 9/22	(2006.01)
A61K 9/16	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61K 9/19	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2009 PCT/US2009/068028**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010 WO10075072**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2009 E 09835578 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 2379064**

54 Título: **Nanopartículas de circulación prolongada para la liberación sostenida de agentes terapéuticos**

30 Prioridad:

11.11.2009 US 260200 P
06.10.2009 US 249022 P
15.12.2008 US 122479 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ZALE, STEPHEN, E.;
TROIANO, GREG;
ALI, MIR, MUKKARAM;
HRKACH, JEFF;
WRIGHT, JAMES y
LOW, SUSAN

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 776 126 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas de circulación prolongada para la liberación sostenida de agentes terapéuticos

5 Las nanopartículas para la administración de agentes terapéuticos tienen el potencial de sortear muchos desafíos asociados con los enfoques de administración tradicionales, incluida la falta de cumplimiento del paciente con la terapia prescrita, los efectos adversos y la eficacia clínica inferior debido a la falta de administración dirigida. Las ventajas tecnológicas importantes de las nanopartículas para la administración de fármacos incluyen la capacidad de administrar fármacos insolubles en agua e inestables, la incorporación de agentes terapéuticos tanto hidrófobos como hidrófilos, y la capacidad para utilizar diversas vías de administración. Los sistemas de administración de nanopartículas también pueden facilitar la administración dirigida de fármacos y las aplicaciones de liberación controlada, mejorar la biodisponibilidad del fármaco en el sitio de acción, reducir la frecuencia de dosificación y minimizar los efectos secundarios.

15 Debido a estas posibles ventajas, se han examinado sistemas de nanopartículas para su uso como vehículos de administración de fármacos, incluyendo micelas poliméricas, polímeros, liposomas, lipoproteínas de baja densidad, dendrímeros, complejos hidrofílicos fármaco-polímero y nanopartículas cerámicas. Los materiales poliméricos típicos utilizados en los sistemas de administración de fármacos particulados poliméricos incluyen ácido poliláctico (PLA), poli (D,L-glicólido) (PLG) y poli (lactida-co-glicólido) (PLGA). PLA y PLGA se enumeran como generalmente reconocidos como seguros (GRAS) en las Secciones 201(s) y 409 de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, y están aprobados para su uso en sistemas de micropartículas disponibles comercialmente, incluyendo Decapeptyl®, Parlodel LA® y Enantone Depot®, así como en dispositivos de implante, tal como Zoladex®.

20 Sin embargo, ciertos sistemas de nanopartículas, tales como liposomas, no se pueden usar con ciertos agentes terapéuticos. Las nanopartículas poliméricas desarrolladas hasta la fecha tienen una eficacia limitada, en parte porque tales nanopartículas se eliminan del cuerpo rápidamente una vez administradas y/o pueden acumularse en el tejido sano donde no se necesita tratamiento. El control de la administración de un agente activo, usando nanosistemas, sigue siendo un desafío.

25 Por lo tanto, existe la necesidad de composiciones biocompatibles capaces de administrar de forma prolongada agentes activos, por ejemplo, agentes antineoplásicos, que proporcionan concentraciones plasmáticas prolongadas y/o elevadas de fármacos en un paciente, especialmente en comparación con la administración de un agente activo solo.

Sumario

30 La invención proporciona una composición de nanopartículas biocompatibles que comprende una pluralidad de nanopartículas de circulación prolongada, comprendiendo cada una:

copolímero de bloques de ácido poli(láctico)-poli(etilenglicol), en el que el ácido poli(láctico) tiene un peso promedio en número de aproximadamente 16 kDa y el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio en número de aproximadamente 5 kDa;

35 un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en vincristina, vinblastina, metotrexato, paclitaxel y sirolimus; y

un polímero biocompatible acoplado a un resto dirigido;

40 en el que las nanopartículas de circulación prolongada comprenden de aproximadamente 80 a aproximadamente 90 por ciento en peso de copolímero de bloques de ácido poli(láctico)-poli(etilenglicol) y de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 % en peso del polímero biocompatible acoplado a un resto dirigido;

proporcionando dicha composición una concentración plasmática elevada del agente terapéutico durante al menos 12 horas cuando la composición se administra a un paciente.

45 La matriz polimérica biocompatible libera el agente terapéutico a una velocidad que permita la liberación controlada del agente durante al menos aproximadamente 12 horas o, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 24 horas. Cuando la composición se administra a un paciente, el área bajo la curva de la concentración plasmática-tiempo (AUC) puede incrementarse en al menos un 100 % sobre la AUC proporcionada cuando el agente terapéutico se administra solo a un paciente.

50 En algunas realizaciones, las nanopartículas desveladas pueden proporcionar una concentración plasmática máxima real ($C_{m\acute{a}x}$) que es al menos un 10 % más alta o incluso al menos un 100 % más alta, en comparación con una $C_{m\acute{a}x}$ de dicho agente terapéutico cuando se administra solo. Las nanopartículas desveladas, por ejemplo, pueden proporcionar un volumen de distribución cuando se administran al paciente que es menor o igual a aproximadamente 5 volúmenes plasmáticos. Por ejemplo, las nanopartículas y/o composiciones desveladas pueden disminuir el volumen de distribución (V_z) en al menos un 50 % en comparación con la V_z del paciente cuando el agente terapéutico se administra solo.

Las composiciones de nanopartículas biocompatibles desveladas incluyen nanopartículas de circulación prolongada que comprenden un polímero biocompatible acoplado a un resto dirigido, por ejemplo, un resto dirigido que se selecciona del grupo que consiste en una proteína, péptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, sacárido, carbohidrato, molécula pequeña, glicano, citocina, quimiocina, nucleótido, lectina, lípido, receptor, esteroide, neurotransmisor, marcador de superficie celular, antígeno de cáncer o antígeno de glucoproteína. Un resto dirigido de ejemplo puede unirse al antígeno prostático específico de membrana (PMSA). Por ejemplo, una nanopartícula desvelada puede incluir un polímero biocompatible acoplado a un resto dirigido, por ejemplo, una nanopartícula puede incluir ácido PLA-PEG-((S,S-2-{3-[1-carboxi-5-amino-pentil]-ureido})-pentanodioico).

Las nanopartículas de circulación prolongada desveladas incluyen de 1 a aproximadamente 4 % en peso o de 2 % a aproximadamente 4 % en peso, de un polímero biocompatible acoplado a un resto dirigido.

En algunas realizaciones, las nanopartículas de circulación prolongada desveladas pueden comprender además un polímero biodegradable, tal como ácido poli(láctico). Las composiciones que incluyen tales nanopartículas biocompatibles y un agente terapéutico pueden proporcionar una concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) de un agente terapéutico al menos 100 % más alta que la $C_{m\acute{a}x}$ del agente terapéutico cuando se administra solo y/o el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (AUC) puede aumentar en al menos un 200 % sobre la AUC del agente terapéutico cuando se administra solo al paciente.

Las composiciones de nanopartículas desveladas incluyen un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en vincristina, vinblastina, metotrexato, paclitaxel y sirolimus. Las composiciones de nanopartículas desveladas pueden incluir además una solución acuosa de un sacárido.

También se proporciona en el presente documento una composición de nanopartículas desvelada para su uso en un procedimiento de tratamiento de un cáncer de tumor sólido, que comprende administrar una composición de nanopartículas desvelada a un paciente (por ejemplo, un mamífero o un primate) que lo necesite. Tales procedimientos pueden proporcionar en los que al menos 24 horas después de la administración, un tumor sólido tiene una concentración significativa de agente terapéutico. La composición puede tener una cantidad de agente terapéutico eficaz para inhibir el crecimiento de dicho tumor, por ejemplo, una dosis única de dicha composición puede proporcionar concentraciones plasmáticas elevadas extendidas de dicho agente terapéutico en el paciente durante al menos un día, (por ejemplo, la concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) del agente terapéutico después de la administración de la composición al mamífero es al menos un 10 % mayor que la $C_{m\acute{a}x}$ de dicho agente terapéutico si se administra en una formulación sin nanopartículas).

También se proporciona en el presente documento una composición de nanopartículas desvelada para su uso en un procedimiento para minimizar los efectos secundarios no deseados o la toxicidad de un agente activo en un paciente, en el que dicha composición es capaz de administrar una concentración plasmática más alta de agente terapéutico al paciente en comparación con la administración del agente terapéutico solo, y en el que al administrar la composición de nanopartículas se reduce la distribución de volumen del agente activo en el paciente, en comparación con la distribución de volumen si el agente terapéutico se administró solo.

La invención puede entenderse más completamente teniendo en cuenta la siguiente descripción detallada de diversas realizaciones de la invención en relación con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una ilustración esquemática de una nanopartícula de acuerdo con un aspecto de la presente invención.

La figura 2 es un diagrama de bloques del procedimiento de emulsión usado en la fabricación de nanopartículas en un aspecto de la presente invención.

La figura 3 representa la liberación *in vitro* de docetaxel desde nanopartículas y docetaxel convencional.

La figura 4 representa la farmacocinética de docetaxel encapsulado en nanopartículas y docetaxel convencional en ratas.

La figura 5 representa la distribución de radiactividad determinada en tejidos seleccionados de ratas después de la administración I.V. de nanopartículas que contienen polímero dirigido a ^{14}C (triángulo), nanopartículas que contienen ^{14}C -docetaxel (cuadrados) y ^{14}C -docetaxel convencional (rombos).

La figura 6 representa la concentración de docetaxel en tejido tumoral después de la administración de docetaxel encapsulado en nanopartículas o docetaxel convencional a ratones SCID portadores de tumor LNCaP.

La figura 7 representa la reducción en el volumen tumoral en ratones con xenoinjertos de LNCaP que expresan PSM A cuando se tratan con docetaxel encapsulado en nanopartículas o docetaxel convencional.

La figura 8 representa la farmacocinética de vincristina encapsulada en las nanopartículas desveladas y vincristina convencional en ratas.

La figura 9 representa la farmacocinética de metotrexato encapsulado en las nanopartículas desveladas y metotrexato convencional en ratas.

La figura 10 representa la farmacocinética de paclitaxel encapsulado en las nanopartículas desveladas y paclitaxel convencional en ratas.

5 La figura 11 representa la farmacocinética de rapamicina (sirolimus) encapsulada en las nanopartículas desveladas y rapamicina convencional en ratas.

La figura 12 representa la acumulación tumoral de docetaxel en las nanopartículas desveladas en un modelo de tumor de mama de ratón MX-I.

10 La figura 13 representa la farmacocinética de docetaxel en un modelo de NHP usando varias nanopartículas desveladas.

Descripción detallada

15 Tal como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "uno/una" y "el/la" incluyen las referencias en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Adicionalmente, a menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto habitual en la materia.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa más o menos el 10 % del valor numérico del número para el que se está utilizando. Por tanto, aproximadamente 50 % significa en el intervalo de 40 % -60 %.

20 Una "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" de una composición, tal como se usa en el presente documento, es una cantidad predeterminada calculada para lograr un efecto deseado.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "de circulación prolongada" se refiere a una mayor estabilidad en el sistema circulatorio de un paciente, con independencia de la actividad biológica.

25 Tal como se usa en el presente documento, el prefijo "nano" y los términos "nanofase" y "tamaño nano" se refieren a un estado especial de subdivisión que implica que una partícula tiene una dimensión promedio menor que aproximadamente 1000 nm (1000×10^{-9} m).

Tal como se usa en el presente documento, los términos "poli(etilenglicol)" o "PEG" y "poli(óxido de etileno)" o "PEO" denotan poliéteres que comprenden unidades repetidas de $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$. PEG y/o PEO pueden ser diferentes polímeros dependiendo de los grupos terminales y los pesos moleculares. Tal como se usa en el presente documento, poli(etilenglicol) y PEG describen cualquier tipo de polímero.

30 Un "a-hidroxipoliéster" se refiere a polímeros que tienen monómeros basados en uno o más α -hidroxiácidos, tal como ácido poli(láctico), ácido poli(glicólico), ácido poli-láctico-co-glicólico, policaprolactona.

El término "objetivo", tal como se usa en el presente documento, se refiere al tipo de célula o tejido al que se desea la administración mejorada del agente terapéutico. Por ejemplo, el tejido enfermo puede ser un objetivo para la terapia.

35 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "agente terapéutico" significa un compuesto utilizado para copiar, impactar, tratar, combatir, mejorar, evitar o mejorar una dolencia o enfermedad indeseada de un paciente.

40 Las nanopartículas están diseñadas para circular en un compartimento vascular de un paciente durante un período prolongado de tiempo, distribuir y acumular en un objetivo, y liberar el agente terapéutico encapsulado de manera controlada. Estas características pueden dar como resultado un mayor nivel de agente terapéutico en el objetivo y una posible reducción en la exposición fuera del objetivo. Por ejemplo, las nanopartículas desveladas permanecen en circulación más tiempo porque, tras la administración a un paciente (por ejemplo, un mamífero, un primate (por ejemplo, un ser humano)), las nanopartículas desveladas se limitan sustancialmente al compartimento vascular del paciente y se diseñan para que se eliminen muy lentamente.

45 La actividad de muchos agentes terapéuticos depende de su comportamiento farmacocinético. Este comportamiento farmacocinético define las concentraciones del fármaco y el período de tiempo durante el cual las células están expuestas al fármaco. Para la mayoría de las terapias, por ejemplo agentes antineoplásicos, se prefieren tiempos de exposición más largos, ya que esto da como resultado una mayor destrucción de las células cancerosas. En general, se utilizan varios parámetros para describir la farmacocinética del fármaco. La concentración plasmática pico o concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) y el área bajo la curva (AUC) son ejemplos. El AUC es una medida de los niveles plasmáticos de fármacos a lo largo del tiempo y proporciona una indicación de la exposición total al fármaco. Generalmente, la concentración plasmática y el AUC plasmático para un agente terapéutico se correlacionan con una mayor eficacia terapéutica.

La combinación de tiempo de circulación prolongado, confinamiento de partículas en el compartimento vascular y la

liberación controlada del fármaco dan como resultado concentraciones de fármaco circulantes más altas durante períodos de tiempo más largos (como lo demuestra un AUC más alto y un V_d más bajo) que el fármaco solo, o, por ejemplo, fármaco en nanopartículas poliméricas de PLA que no incluye PLA-PEG, o que no incluye, por ejemplo, PLA solo.

- 5 Las composiciones de nanopartículas desveladas pueden proporcionar un efecto terapéutico durante al menos 12 horas, al menos 24 horas o al menos 36 horas, o 48 horas o más, tras la administración a un paciente. En algunas realizaciones, la concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) del agente terapéutico de tales nanopartículas, por ejemplo, cuando la composición se administra a un paciente, puede ser al menos un 10 % más alto, un 20 % más alto o aproximadamente 10 % a aproximadamente 100 % más alto, o más, que la $C_{m\acute{a}x}$ del mismo agente terapéutico cuando se administra solo. La concentración plasmática máxima real del agente terapéutico administrado incluye tanto el agente que se libera de la nanopartícula (por ejemplo, después de la administración) como el agente terapéutico que queda en cualquier nanopartícula que quede en el plasma, por ejemplo, en un momento dado.

- 15 Las nanopartículas desveladas pueden proporcionar, tras la administración a un paciente, un área bajo la curva de concentración plasmática tiempo (AUC), que puede incrementarse al menos en un 100 %, al menos un 200 % o de aproximadamente un 100 % a aproximadamente un 500 % o más, sobre la AUC del agente terapéutico cuando se administra solo al paciente y puede disminuir el volumen de distribución (V_z) del agente activo distribuido, tras la administración, en un paciente en al menos un 10 % o en al menos un 20 % o de aproximadamente 10 % a aproximadamente 100 %, en comparación con el V_z del paciente cuando el agente terapéutico se administra solo. Por ejemplo, una composición de nanopartículas proporcionada puede proporcionar un V_z en un paciente que es del mismo orden de magnitud que el volumen plasmático y/o un volumen de distribución inferior a aproximadamente 10 volúmenes de plasma. Por ejemplo, una composición de nanopartículas desvelada puede proporcionar un V_z que es menor, o aproximadamente, 2 veces el volumen de plasma, o menor o aproximadamente 8 volúmenes de plasma. En una realización, una composición de nanopartículas desvelada puede proporcionar un V_z en un paciente que es de aproximadamente el mismo orden de volumen de plasma, (por ejemplo, aproximadamente 5 litros para un paciente de ejemplo de 70 kg), por ejemplo aproximadamente un V_z que indica que las nanopartículas administradas están sustancialmente en el plasma del paciente y no sustancialmente en otros tejidos.

- 20 En algunas realizaciones, las nanopartículas desveladas pueden usarse como un vehículo de administración de fármacos basado en la encapsulación de un agente terapéutico en una matriz polimérica con porosidad controlada y/o una cubierta o matriz soluble que, después de la disolución, libera el agente terapéutico en la vecindad inmediata del área objetivo. La protección del agente terapéutico proporcionado por la cubierta o matriz de polímero permite la administración de agentes terapéuticos que son insolubles o inestables en agua. Además, la cinética de disolución del polímero puede diseñarse para proporcionar una liberación sostenida de agentes terapéuticos en un objetivo durante un período prolongado de tiempo. Las nanopartículas desveladas se pueden usar para diversas aplicaciones, tales como, aunque sin limitaciones, administración de fármaco, terapia génica, diagnóstico médico y terapéutica médica para cáncer, enfermedades transmitidas por patógenos, enfermedades relacionadas con hormonas, subproductos de reacción asociados con trasplantes de órganos y otros crecimientos anormales de células o tejidos.

- 30 Las nanopartículas desveladas pueden usarse en procedimientos para tratar a un paciente, por ejemplo, un mamífero que sufre cáncer, por ejemplo, un cáncer de tumor sólido, cáncer de próstata, cáncer de mama o cáncer de pulmón. Sin embargo, las enfermedades contempladas que pueden tratarse usando nanopartículas desveladas incluyen una amplia gama de enfermedades y encuentran limitación solo, por ejemplo, el agente terapéutico, la disponibilidad de un marcador y/o un ligando dirigido para la enfermedad.

En otras realizaciones, se proporciona un sistema de administración de nanopartículas que mitiga la inestabilidad coloidal, la aglomeración, la polidispersidad en tamaño y forma de las nanopartículas, la hinchazón y las fugas de materiales encapsulados.

- 45 Las nanopartículas desveladas pueden exhibir eficiencia de la encapsulación. La eficiencia de la encapsulación se ve afectada por factores, que incluyen, por ejemplo, características del material del polímero utilizado como matriz portadora, las propiedades químicas y físicas del agente terapéutico a encapsular, y el tipo de disolventes utilizados en el procedimiento de fabricación de nanopartículas.

- 50 La nanopartícula desvelada puede exhibir heterogeneidad de partículas. Las técnicas convencionales de fabricación de nanopartículas poliméricas generalmente proporcionan distribuciones multimodales del tamaño de partícula como resultado de la autoagregación durante la nanoprecipitación tanto del polímero como de las moléculas de fármaco.

- 55 Las nanopartículas desveladas pueden reducir o eliminar los efectos de liberación en descarga. Los vehículos convencionales de nanopartículas poliméricas exhiben frecuentemente un patrón bimodal de liberación de fármaco con hasta aproximadamente un 40-80% o más del fármaco encapsulado liberado durante las primeras horas. Después de 24 a 48 horas, la liberación del fármaco se reduce significativamente debido al aumento de la barrera de difusión para las moléculas del fármaco ubicadas en las profundidades de la matriz polimérica. En tales sistemas convencionales de vehículos de nanopartículas, las moléculas de fármaco mal encapsuladas se difunden rápidamente en solución, que puede conducir a una toxicidad significativa *in vivo*. Adicionalmente, para cuando las nanopartículas evacuadas lleguen y se acumulen en el sitio objetivo (por ejemplo, tejido tumoral), las nanopartículas generalmente

tienen poca o ninguna eficacia terapéutica restante.

Las nanopartículas desveladas pueden evadir la captura rápida por el sistema reticuloendotelial (RES), lo que lleva a un tiempo de circulación prolongado y una concentración elevada de las nanopartículas en la sangre. La captura y eliminación rápida generalmente es causada por el procedimiento de opsonización en el cual las proteínas opsoninas presentes en el suero sanguíneo se unen rápidamente a las nanopartículas convencionales, permitiendo que los macrófagos reconozcan y eliminen fácilmente estas partículas antes de que puedan realizar su función terapéutica diseñada. El alcance y la naturaleza de la adsorción de opsonina en la superficie de las nanopartículas y su depuración sanguínea simultánea dependen de las propiedades fisicoquímicas de las partículas, tales como el tamaño, la carga superficial y la hidrofobicidad superficial. En otra realización más, se proporciona una composición de nanopartículas que incluye una matriz polimérica biodegradable y/o biocompatible y un agente terapéutico acoplado a la matriz polimérica biodegradable y/o biocompatible en la que la velocidad de eliminación de dicho agente terapéutico acoplado a la matriz polimérica biodegradable y/o biocompatible es inferior a la tasa de depuración de dicho agente terapéutico cuando se administra solo.

En determinadas realizaciones, se proporcionan procedimientos que enmascaran o camuflan las nanopartículas desveladas para evadir la absorción por parte del RES. Uno de estos procedimientos es la ingeniería de partículas en las que los poliéteres, tales como poli(etilenglicol) (PEG) o tensioactivos que contienen PEG, se despliegan en la superficie de las nanopartículas. La presencia de PEG y/o copolímeros que contienen PEG, por ejemplo en la superficie de las nanopartículas puede dar como resultado un aumento de la semivida de la circulación sanguínea de las nanopartículas en varios órdenes de magnitud. Este procedimiento crea una capa protectora hidrofílica alrededor de las nanopartículas que puede repeler la absorción de las proteínas opsoninas a través de las fuerzas de repulsión estérica, bloqueando y retrasando así la primera etapa en el procedimiento de opsonización.

La figura 1 ilustra esquemáticamente una nanopartícula de acuerdo con un aspecto de la presente invención. Tal como se muestra en la FIG. 1, el docetaxel 100, un agente antineoplásico aprobado para el tratamiento del cáncer de próstata refractario a hormonas (HRPC), está encapsulado en una matriz 110 derivada de los polímeros biodegradables y/o biocompatibles de PLA y poli(láctida-*b*-etilenglicol) (PLA-PEG). La matriz de polímero 110 contiene un polímero de direccionamiento (PLA-PEG-lys (urea)glu) 120 que está funcionalizado en el extremo (a través del resto 5 amino) con el heterodímero de lisina-urea-glutamato ácido (S,S-2-{3-[1-carboxi-5-amino-pentil]-ureido}-pentanodioico (lys (urea) glu) 130, un ligando de molécula pequeña que se une selectivamente a PSMA, un marcador de superficie celular de cáncer de próstata clínicamente relevante.

Una vez que las nanopartículas, por ejemplo, como se proporcionan en el presente documento, se administran, al menos partes del o los polímeros de nanopartículas pueden degradarse biológicamente mediante, por ejemplo, actividad enzimática o maquinaria celular en monómeros y/u otros restos que las células pueden usar o excretar. En ciertos aspectos de la invención, la velocidad de disolución o degradación de las nanopartículas se ve afectada por la composición de la cubierta o matriz del polímero. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la semivida del polímero (el tiempo en el que el 50 % del polímero se degrada en monómeros y/u otros restos no poliméricos) puede ser del orden de días, semanas, meses o años, dependiendo del polímero.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, las características de administración de nanopartículas, tal como la absorción de agua, la liberación controlada del agente terapéutico y la cinética de degradación del polímero pueden optimizarse mediante la selección de la composición de la cubierta o matriz de polímero.

Las nanopartículas desveladas pueden incluir de aproximadamente 10 a 15 por ciento en peso de agente activo y de aproximadamente 86 a aproximadamente 90 por ciento en peso de PLA-PEG (con PLA aproximadamente 16 kDa y PEG aproximadamente 5 kDa, por ejemplo, aproximadamente 87,5 % de PLA-PEG (16kDa/5kDa)) y, opcionalmente, por ejemplo, PLA-PEG-lys(urea)-glu (por ejemplo, al 2,5 por ciento en peso).

Tal ácido poli(láctico) o poli(láctico)-co-poli(glicólico) sustancialmente homopolimérico puede tener un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 10 a aproximadamente 130 kDa, por ejemplo, de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 kDa o de aproximadamente 100 a aproximadamente 130 kDa. Tal PLA homopolimérico puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 5 a aproximadamente 90 kDa o de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 kDa, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 kDa o de aproximadamente 60 a aproximadamente 90 kDa. El PLA homopolimérico de ejemplo puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 80 kDa o un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 124 kDa. Como se sabe en la materia, el peso molecular de los polímeros puede estar relacionado con una viscosidad inherente. En algunas realizaciones, el PLA homopolimérico puede tener una viscosidad inherente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,4, por ejemplo, aproximadamente 0,3; en otras realizaciones, el PLA puede tener una viscosidad inherente de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 0,8. El PLGA de ejemplo puede tener un peso molecular promedio en número de aproximadamente 8 a aproximadamente 12 kDa.

En otras realizaciones, la química de superficie modificada y/o el tamaño de partícula pequeño de las nanopartículas desveladas pueden contribuir a la efectividad de las nanopartículas en la administración de un agente terapéutico. Por ejemplo, en un aspecto desvelado, la carga superficial de nanopartículas puede modificarse para lograr una biodegradación lenta y reducir la eliminación de las nanopartículas. En otro aspecto, la porosidad de la cubierta o

matriz de polímero está optimizada para lograr una liberación prolongada y controlada del agente terapéutico. Por ejemplo, en una realización de la invención, las nanopartículas pueden tener porosidad en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 90 por ciento y/o diámetros de poro en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,01 micrómetros. Adicionalmente, sin desear quedar ligado a teoría alguna, debido a su pequeño tamaño y persistencia en la circulación, las nanopartículas de acuerdo con algunas realizaciones de la invención pueden penetrar en la vasculatura alterada y a menudo comprometida de los tumores a través del efecto de permeabilidad y retención (EPR) mejorado que da como resultado una acumulación preferente de nanopartículas en el intersticio tumoral.

En algunas realizaciones, las nanopartículas contempladas pueden incluir más de un agente terapéutico. Tales nanopartículas pueden ser útiles, por ejemplo, en aspectos en los que es deseable controlar un resto dirigido, ya que dicho resto dirige una nanopartícula que contiene un fármaco a un objetivo particular en un sujeto.

Las nanopartículas desveladas pueden formarse usando un procedimiento de emulsión, por ejemplo, tal como se presenta como un diagrama de bloques en la figura 2. Tal como se muestra en la FIG. 2, una solución orgánica de polímero/fármaco que contiene docetaxel, PLA, PLA-PEG y PLA-PEG-lys(urea)glu disueltos en una mezcla de codisolvente de acetato de etilo y alcohol bencílico se dispersa en una solución acuosa de colato de sodio, acetato de etilo y alcohol bencílico para formar una emulsión gruesa. En algunos aspectos, las condiciones bajo las cuales se realiza el procedimiento de emulsión favorecen la orientación de las cadenas de PEG y/o polímero de PEG-lys(urea)glu hacia la superficie de la partícula. En otros aspectos, se logra una orientación en la que el PEG se pliega dentro de la cubierta o matriz de polímero de las nanopartículas.

Como se presenta en la figura 2, se puede pasar una emulsión gruesa a través de un homogeneizador de alta presión para reducir el tamaño de gota, formando una emulsión fina. La emulsión fina se diluye en un volumen en exceso de una solución de enfriamiento rápido de agua fría que contiene polisorbato 80. La presencia de polisorbato 80 sirve para eliminar el exceso de agente terapéutico que no se ha encapsulado en la nanopartícula. En algunos aspectos de la presente invención, el polisorbato 80 también puede adherirse o asociarse con superficies de nanopartículas. Aunque sin desear quedar ligados a teoría alguna, el polisorbato 80 acoplado a las superficies de nanopartículas puede afectar a características tales como la liberación controlada de agente terapéutico y la cinética de degradación del polímero. El enfriamiento se puede realizar al menos parcialmente a una temperatura de aproximadamente 5 °C o menos. Por ejemplo, el agua utilizada en el enfriamiento puede estar a una temperatura inferior a la temperatura ambiente (por ejemplo, de aproximadamente 0 a aproximadamente 10 °C o de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 °C).

En algunas realizaciones, no todo el agente terapéutico se encapsula en las partículas en esta etapa y se añade un solubilizante del fármaco a la fase inactivada para formar una fase solubilizada. El solubilizante del fármaco puede ser, por ejemplo, Tween 80, Tween 20, polivinilpirrolidona, ciclodextrano, dodecilsulfato sódico o colato de sodio. Por ejemplo, Tween-80 puede añadirse a la suspensión de nanopartículas inactivadas para solubilizar el fármaco libre y evitar la formación de cristales de fármaco. En algunas realizaciones, una relación entre el solubilizante de fármaco y el agente terapéutico (por ejemplo, docetaxel) es de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 10:1.

El acetato de etilo y el alcohol bencílico se extraen de las gotas de la fase orgánica, dando como resultado la formación de una suspensión de nanopartículas endurecida. Por ejemplo, el agente activo puede encapsularse a, por ejemplo, un nivel de carga del 10 % p/p; correspondiente a más de 10.000 moléculas de fármaco por nanopartícula.

La suspensión de nanopartículas se procesa utilizando ultrafiltración/diafiltración de flujo tangencial (UF/DF) con agua fría para eliminar los auxiliares de procesamiento y concentrar las nanopartículas a un valor deseado. Los materiales precursores residuales y el exceso de materia orgánica presentes en las suspensiones de nanopartículas sin lavar pueden tener un impacto perjudicial sobre las aplicaciones biomédicas, así como efectos tóxicos no deseados en el sistema fisiológico. La suspensión de nanopartículas lavadas se hace pasar a través de un prefiltro y al menos dos filtros de grado esterilizante.

Una vez que se han preparado las nanopartículas, pueden combinarse con un vehículo aceptable para producir una formulación farmacéutica, de acuerdo con otro aspecto de la invención. Como apreciaría un experto en esta técnica, el vehículo puede seleccionarse en función de factores que incluyen, aunque sin limitaciones, la vía de administración, la localización del tejido enfermo objetivo, el agente terapéutico que se está administrando y/o el curso temporal de la administración del agente terapéutico. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 2, se añade asépticamente una solución concentrada de sacarosa a la suspensión estéril de nanopartículas para producir una formulación farmacéutica. La sacarosa sirve como crioprotector y agente de tonicidad. En esta realización, la formulación farmacéutica resultante es una suspensión acuosa inyectable estéril de docetaxel encapsulado en nanopartículas compuestas por polímeros biocompatibles y biodegradables. Se analiza el contenido del fármaco en la suspensión y se puede diluir asépticamente a la concentración deseada. En algunas realizaciones, la suspensión de partículas se carga asépticamente en viales de vidrio y se sella. En otras realizaciones, la suspensión del fármaco a granel se almacena congelada a -20 °C +/- 5 °C antes de llenar los viales.

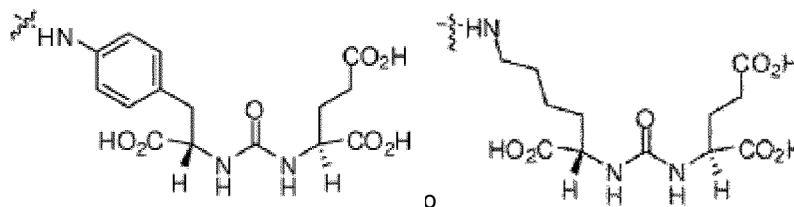
Los procedimientos de fabricación para las nanopartículas de la invención pueden modificarse en algunas realizaciones para lograr las características deseadas de administración de fármacos. Por ejemplo, las características

de nanopartículas, tal como la funcionalidad de la superficie, la carga superficial, el tamaño de partícula, el potencial zeta (ζ), la hidrofobicidad, la capacidad de liberación controlada y la capacidad para controlar la inmunogenicidad, y similares, pueden optimizarse para la administración efectiva de diversos agentes terapéuticos. Además, las nanopartículas de circulación prolongada producidas de acuerdo con el procedimiento de emulsión mostrado en la figura 2 están bien dispersas y sin aglomerar, lo que facilita la conjugación o funcionalización de las superficies de nanopartículas con restos dirigidos.

Las nanopartículas desveladas pueden incluir restos dirigidos opcionales, que pueden seleccionarse para garantizar que las nanopartículas se unan o se asocien de forma selectiva a un marcador u objetivo seleccionado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las nanopartículas desveladas pueden funcionalizarse con una cantidad de resto dirigido eficaz para el tratamiento del cáncer de próstata en un sujeto (por ejemplo, un ligando de PSMA de bajo peso molecular). A través de la funcionalización de superficies de nanopartículas con tales restos dirigidos, las nanopartículas son efectivas solo en sitios objetivo, lo que minimiza los efectos secundarios adversos y mejora la eficacia. La administración dirigida también permite la administración de una dosis más baja de agente terapéutico, lo que puede reducir los efectos secundarios indeseables que normalmente se asocian con los tratamientos tradicionales de la enfermedad.

En determinados aspectos, las nanopartículas desveladas pueden optimizarse con una densidad específica de restos dirigidos sobre la superficie de las nanopartículas, de forma que, por ejemplo, se asocia una cantidad eficaz de resto dirigido con la nanopartícula para la administración de un agente terapéutico. Por ejemplo, la fracción de la matriz polimérica biodegradable y/o biocompatible funcionalizada con un resto dirigido puede ser inferior al 80 % del total. De acuerdo con otra realización, la fracción de la matriz polimérica biodegradable y/o biocompatible funcionalizada con un resto dirigido es inferior a aproximadamente el 50 % del total. La densidad aumentada del resto dirigido puede, en algunas realizaciones, aumentar la unión al objetivo (enlace celular/absorción del objetivo).

Los restos dirigidos de ejemplo incluyen, por ejemplo, proteínas, péptidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, sacáridos, hidratos de carbono, glucanos, citocinas, quimiocinas, nucleótidos, lectinas, lípidos, receptores, esteroides, neurotransmisores y combinaciones de los mismos. La elección de un marcador puede variar según el objetivo seleccionado, pero, en general, los marcadores que pueden ser útiles en realizaciones de la invención incluyen, aunque sin limitaciones, marcadores de superficie celular, un antígeno de cáncer (CA), un antígeno glicoproteico, un antígeno asociado a melanoma (MAA), una enzima proteolítica, un marcador de angiogénesis, un antígeno prostático específico de membrana (PMSA), un antígeno de carcinoma de pulmón microcítico (SCLCA), un receptor de hormonas, un antígeno del gen supresor tumoral, un antígeno regulador del ciclo celular, un marcador de proliferación y un antígeno de carcinoma humano. Los restos dirigidos de ejemplo incluyen:



-lys-(urea)glu, que puede conjugarse con PEG, por ejemplo una nanopartícula desvelada puede incluir un resto dirigido a PLA-PEG, por ejemplo, ácido S,S-2-{3-[1-carboxi-5-amino-pentil]-ureido}-pentanodioico. Por ejemplo, las nanopartículas desveladas pueden incluir de aproximadamente 10 a 15 por ciento en peso de agente activo y de aproximadamente 86 a aproximadamente 90 por ciento en peso de PLA-PEG (con PLA aproximadamente 16 kDa y PEG aproximadamente 5 kDa), y de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 por ciento en peso de PLA-PEG-lys(urea)glu (16kDa/5kDa de PLA-PEG).

En otros aspectos de la invención, los restos dirigidos lo están a un antígeno asociado con una enfermedad del sistema inmunitario de un paciente o una enfermedad transmitida por un patógeno. En otro aspecto más, los restos dirigidos se dirigen a las células presentes en condiciones sanas normales. Tales restos dirigidos pueden estar dirigidos directamente a una molécula u otro objetivo o indirectamente a una molécula u otro objetivo asociado con una ruta molecular biológica relacionada con una afección.

La cantidad de nanopartículas administradas a un paciente puede variar y puede depender del tamaño, la edad y la salud del paciente, el agente terapéutico que se va a administrar, la enfermedad que se está tratando y la localización del tejido enfermo. Por otra parte, la dosis puede variar según el modo de administración.

En el presente documento se contemplan varias vías de administración. En un aspecto particular, las nanopartículas se administran a un sujeto por vía sistémica. Adicionalmente, en algunos aspectos, los procedimientos de administración pueden incluir, aunque sin limitaciones, inyección intravascular, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea e inyección intramuscular. De acuerdo con aspectos de la presente invención, las nanopartículas requieren solo una o muy pocas sesiones de tratamiento para proporcionar un tratamiento efectivo de la enfermedad, que, en última instancia, puede facilitar el cumplimiento del paciente. Por ejemplo, en algunos

aspectos, la administración de las nanopartículas puede producirse por infusión intravenosa una vez cada tres semanas.

5 Las nanopartículas desveladas pueden usarse en procedimientos para tratar tumores sólidos, por ejemplo, de próstata, de pulmón, de mama y de otros tipos, que comprende administrar una composición de nanopartículas desvelada a un paciente, por ejemplo, un mamífero que lo necesita. Por ejemplo, después de tal administración, por ejemplo, al menos después de 12 horas, 24 horas, 36 horas o 48 horas o más después de la administración, el tumor sólido puede tener una concentración significativa de agente terapéutico, por ejemplo, puede tener un aumento en la concentración de fármaco tumoral de al menos aproximadamente 20 % o al menos aproximadamente 30 % o más de agente activo en comparación con la cantidad presente en un tumor después de la administración (por ejemplo, la misma dosis) de agente terapéutico solo (por ejemplo, no en una composición de nanopartículas desvelada).

10 Las nanopartículas desveladas se pueden usar en un procedimiento para tratar un tumor sólido en un mamífero en el que la composición tiene una cantidad de agente terapéutico eficaz para inhibir el crecimiento de dicho tumor, por ejemplo, en el que la dosis única de dicha composición proporciona una liberación prolongada de dicho agente terapéutico durante al menos un día. Dichos procedimientos pueden proporcionar una concentración plasmática máxima real ($C_{m\acute{a}x}$) del agente terapéutico después de la administración de la composición al mamífero que es al menos un 10 % más alta o al menos un 20 % más alta o un 100 % más alta o más que la $C_{m\acute{a}x}$ de dicho agente terapéutico agente si se administra en una formulación sin nanopartículas. Los procedimientos desvelados pueden proporcionar, tras la administración de nanopartículas, un área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (AUC) en un paciente que se incrementa en al menos un 100 % sobre la AUC proporcionada cuando el agente terapéutico se administra solo a un paciente. En algunas realizaciones, los procedimientos desvelados también pueden, de forma individual o además de los parámetros plasmáticos anteriores, disminuir el volumen de distribución (V_z) del agente terapéutico tras la administración en al menos un 50 % en comparación con el V_z del paciente cuando el agente terapéutico se administra solo.

15 Las nanopartículas desveladas, pueden, tras la administración, proporcionar una mayor concentración plasmática de agente terapéutico en comparación con la administración de una dosis equivalente de agente terapéutico solo. Sin embargo, tras la administración, en algunas realizaciones, las nanopartículas desveladas circulan sustancialmente en el compartimento vascular y, por lo tanto, pueden no contribuir significativamente a otras áreas que pueden causar toxicidad o efectos secundarios no deseados.

20 Para que la invención desvelada en el presente documento pueda entenderse de manera más eficiente, se proporcionan ejemplos a continuación. Debe entenderse que estos ejemplos son únicamente para fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención de ningún modo.

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1 Liberación *in vitro* de docetaxel a partir de nanopartículas

35 Una suspensión de docetaxel encapsulado en nanopartículas fabricadas de acuerdo con el procedimiento de emulsión representado en la figura 2 y el ejemplo de referencia 12 usando un 87,5 por ciento en peso de PLA-PEG, 10 % en peso de docetaxel y 2,5 % en peso de docetaxel (Formulación A) (todas las formulaciones de nanopartículas de docetaxel utilizadas en estos Ejemplos estaban en una composición del 5 % de nanopartículas, 65 % de agua y 30 % de sacarosa), se introdujo en un casete de diálisis y se incubó en un depósito de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 37 °C con agitación. Se recogieron muestras de dializado y se analizaron para docetaxel usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa. A efectos de comparación, el docetaxel convencional se analizó con el mismo procedimiento.

40 La figura 3 presenta el perfil de liberación *in vitro* de docetaxel encapsulado en nanopartículas en comparación con el docetaxel convencional. La liberación del docetaxel encapsulado de la matriz polimérica fue esencialmente lineal durante las primeras 24 horas y el resto se liberó gradualmente durante un período de aproximadamente 96 horas.

45 **Ejemplo de referencia 2** Estudio farmacocinético de dosis única de docetaxel encapsulado en nanopartículas y docetaxel convencional en ratas Sprague-Dawley

50 A ratas macho Sprague-Dawley de seis a ocho semanas de edad se les administró una dosis única en bolo (5 mg/kg de docetaxel) de docetaxel encapsulado en nanopartículas o docetaxel convencional a través de una vena de la cola. Los grupos de dosis consistieron en seis ratas cada uno. Se extrajo sangre a 0,083, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 y 24 horas después de la dosificación y se procesó en plasma. La concentración de docetaxel total en plasma se midió mediante un procedimiento de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) después de la extracción con éter metil-*terc*-butílico (MTBE). La extracción en MTBE no diferencia el docetaxel encapsulado en nanopartículas del docetaxel liberado de las nanopartículas al plasma, y como tal, los datos de LC-MS no distinguen entre los dos.

55 La figura 4 y la Tabla 2.1 del ejemplo presentan los perfiles farmacocinéticos observados y los parámetros farmacocinéticos, respectivamente, de docetaxel encapsulado en nanopartículas y docetaxel convencional. La tabla de ejemplo 2.1 incluye además datos del desarrollo preclínico de TAXOTERE® para referencia comparativa (Bissery y col., 1995). Los resultados del docetaxel convencional fueron consistentes con los notificados en la literatura (Bissery

y col., 1995), lo que era indicativo de que docetaxel se eliminó rápidamente de la sangre y se distribuyó a los tejidos. La concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) se observó en el primer punto de tiempo de muestreo para todos los tratamientos.

5 La $C_{m\acute{a}x}$ y la AUC del docetaxel encapsulado en nanopartículas fueron aproximadamente 100 veces más altas que las del docetaxel convencional. La diferencia en la $C_{m\acute{a}x}$ puede atribuirse a haber perdido la fase inicial rápida de distribución tisular para el docetaxel convencional. Los datos indican que el docetaxel encapsulado en nanopartículas permanece en gran parte en circulación tras la inyección y se elimina lentamente durante un período de 24 horas. Los datos muestran además que docetaxel se libera de las nanopartículas de manera controlada durante el período de 24 horas (por ejemplo, no se observa una liberación de descarga rápida). Si las nanopartículas se eliminaran rápidamente de la circulación, no se observaría el gran aumento de la AUC. De manera similar, si hubiera liberación de descarga rápida de docetaxel a partir de las nanopartículas, se esperaría que el perfil farmacocinético se asemejara más al del docetaxel convencional.

Tabla de ejemplo 2.1. Resumen de docetaxel encapsulado en nanopartículas y parámetros farmacocinéticos del docetaxel convencional

	Especie	Dosis (mg/kg)	$t_{m\acute{a}x}$ (min)	$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ml)	$t_{1/2}$ (h)	AUC _{0-∞} (ng/ml·h)	CL (l/h/kg)
Docetaxel convencional (Bissery y col., 1995)	Ratas Sprague-Dawley	5	2	4.100	0,8 ^b	910	5,5
Docetaxel convencional	Ratas Sprague-Dawley	5	5	600	4,4 ^c	623	2,33
Docetaxel encapsulado en nanopartículas	Ratas Sprague-Dawley	5	5	54.800	2,6 ^c	57.300	0,01

^aPara cada tratamiento, $t_{m\acute{a}x}$ equivale al primer tiempo de muestreo.
^bLa duración del estudio fue de 6 horas.
^cSe determinó una semivida de 2-12 horas.

15 **Ejemplo de referencia 3.** Estudio de distribución tisular de docetaxel encapsulado en nanopartículas y docetaxel convencional en ratas Sprague-Dawley

A las ratas macho Sprague-Dawley de seis a ocho semanas de edad se les administró una dosis intravenosa única de uno de los siguientes: (1) docetaxel encapsulado en nanopartículas en las que el ligando del polímero dirigido a PLA-PEG-lys (urea)glu se marcó con ¹⁴C, (2) docetaxel encapsulado en nanopartículas en las que el docetaxel encapsulado estaba marcado con ¹⁴C, (3) docetaxel convencional marcado con ¹⁴C.

Se extrajo sangre a las 1, 3, 6, 12 y 24 horas después de la dosificación y se procesó en plasma. Inmediatamente después de la extracción de sangre, se sacrificó a las ratas mediante asfixia con CO₂ y los tejidos se recogieron inmediatamente, se transfirieron, se pesaron y se congelaron en hielo seco. Las muestras de tejido se almacenaron congeladas (aproximadamente a -70 °C) hasta el análisis de radiactividad por recuento de centelleo líquido (LS).

25 Como se muestra en la Figura 5, el docetaxel encapsulado en nanopartículas se eliminó gradualmente del plasma, exhibiendo una disminución aproximada de 2 veces en la concentración plasmática durante el período de 24 horas estudiado. Estos resultados son indicativos de un aclaramiento de las nanopartículas limitado o retardado a través del sistema de fagocitos mononucleares (MPS) en relación con el observado a menudo para las formulaciones de partículas. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, esta diferencia en los tiempos de aclaramiento plasmático puede atribuirse a ciertas características de las nanopartículas, incluyendo el tamaño de partícula y las propiedades de la superficie (por ejemplo, carga superficial y porosidad).

Las distinciones en los perfiles plasmáticos de docetaxel encapsulado en nanopartículas y docetaxel convencional indican que la encapsulación de docetaxel en las nanopartículas evita que se distribuya rápidamente desde el compartimento plasmático, lo que da como resultado valores de $C_{m\acute{a}x}$ y AUC significativamente más altos en relación con el docetaxel convencional.

Las diferencias en los perfiles de docetaxel encapsulado en nanopartículas en las que el ligando del polímero dirigido de PLA-PEG-lys (urea) glu estaba marcado con ¹⁴C y el docetaxel encapsulado en nanopartículas en las que el docetaxel encapsulado estaba marcado con ¹⁴C refleja la liberación controlada de docetaxel de la matriz polimérica de las nanopartículas. Si docetaxel se liberara muy rápidamente de las nanopartículas, se esperaría que se distribuyera rápidamente desde el plasma, lo que daría un perfil similar al del docetaxel convencional. Por el contrario, si el docetaxel se retuviera en las nanopartículas durante este período de tiempo, los perfiles del docetaxel encapsulado en nanopartículas en las que el ligando del polímero dirigido de PLA-PEG-lys (urea) glu estaba marcado con ¹⁴C y el docetaxel encapsulado en nanopartículas en las que el docetaxel encapsulado estaba marcado con ¹⁴C serían superponibles.

45 Las Tablas de ejemplo 3.1, 3.2 y 3.3 presentan la distribución tisular de la radiactividad determinada en ratas después de la administración intravenosa (I.V.) de (1) docetaxel encapsulado en nanopartículas en las que el ligando del

polímero dirigido de PLA-PEG-lys (urea) glu estaba marcado con ¹⁴C, (2) docetaxel encapsulado en nanopartículas en las que el docetaxel encapsulado estaba marcado con ¹⁴C y (3) docetaxel convencional marcado con ¹⁴C, respectivamente. La Figura 5 de ejemplo contiene las curvas de concentración de radiactividad de los artículos de prueba determinados en plasma, hígado, bazo y médula ósea.

5 Se detectaron niveles más bajos de nanopartículas (es decir, radiactividad del polímero dirigido marcado con ¹⁴C) en todos los tejidos en relación con el plasma, excepto en el bazo, donde las concentraciones de nanopartículas fueron más altas que las plasmáticas a las 12 y 24 horas. No se puede determinar en qué medida la radiactividad en los tejidos refleja el contenido en la sangre contenida dentro de los tejidos frente a los tejidos mismos, porque no se había exanguinado a los tejidos.

10 En momentos puntuales que siguen a la administración, la concentración de docetaxel encapsulado en nanopartículas fue mayor en la mayoría de los tejidos que el docetaxel convencional. Después de 24 horas, la concentración de docetaxel derivada de las nanopartículas fue menor o aproximadamente la misma que la concentración de docetaxel convencional en todos los tejidos evaluados, excepto el bazo.

15 Aunque la concentración de docetaxel encapsulado en nanopartículas fue mayor que la del docetaxel convencional en los puntos de tiempo tempranos y durante el período de 24 horas en el bazo, las nanopartículas dopadas con docetaxel fueron bien toleradas a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg de docetaxel. Además, los cambios en el peso corporal y las observaciones clínicas en las ratas Sprague-Dawley indican que el docetaxel encapsulado en nanopartículas fue tolerado, así como el docetaxel convencional a través de un intervalo de dosis agudas (5-30 mg/kg de docetaxel).

20 **Tabla de ejemplo 3.1.** Distribución tisular de la radiactividad determinada en ratas después de la administración I.V. de nanopartículas que contienen polímero dirigido ¹⁴C.

Tiempo (h)	Plasma (nCi/ml)	Hígado (nCi/g)	Bazo (nCi/g)	Corazón (nCi/g)	Pulmones (nCi/g)	Médula ósea (nCi/g)	Intestino delgado (nCi/g)	Intestino grueso (nCi/g)
1	2341 ± 168	337 ± 14	829 ± 26	180 ± 23	294 ± 78	109 ± 25	56 ± 2,5	36 ± 3,1
3	2023 ± 58	334 ± 43	1141 ± 75	190 ± 62	264 ± 38	191 ± 122	50 ± 5,4	33 ± 3,6
6	2001 ± 71	364 ± 23	1789 ± 173	174 ± 25	263 ± 40	372 ± 8,7	48 ± 8,0	43 ± 10
12	1445 ± 59	375 ± 41	2079 ± 205	151 ± 21	266 ± 24	390 ± 58	71 ± 3,6	40 ± 6,1
24	998 ± 55	398 ± 59	2808 ± 238	119 ± 11	218 ± 26	594 ± 248	88 ± 17	38 ± 5,0

Tabla de ejemplo 3.2. Distribución tisular de la radiactividad determinada en ratas después de la administración I.V. de nanopartículas que contienen ¹⁴C-docetaxel.

Tiempo (h)	Plasma (nCi/ml)	Hígado (nCi/g)	Bazo (nCi/g)	Corazón (nCi/g)	Pulmones (nCi/g)	Médula ósea (nCi/g)	Intestino delgado (nCi/g)	Intestino grueso (nCi/g)
1	753 ± 149	267 ± 45	889 ± 43	156 ± 15	277 ± 27	142 ± 20	409 ± 158	71 ± 24
3	265 ± 52	127 ± 12	999 ± 94	80 ± 3,6	154 ± 9,0	127 ± 17	219 ± 30	151 ± 37
6	140 ± 38	88 ± 9,7	972 ± 44	69 ± 9,8	118 ± 23	121 ± 5,9	119 ± 20	133 ± 38
12	24 ± 1,9	47 ± 6,3	854 ± 56	41 ± 2,1	58 ± 8,4	89 ± 9,3	50 ± 2,7	98 ± 14
24	5,7 ± 1,0	22 ± 3,1	634 ± 95	23 ± 1,3	44 ± 2,5	33 ± 8,2	43 ± 9,3	58 ± 4,9

25 **Tabla de ejemplo 3.3.** Distribución tisular de la radiactividad determinada en ratas después de la administración I.V. de ¹⁴C-docetaxel convencional.

Tiempo (h)	Plasma (nCi/ml)	Hígado (nCi/g)	Bazo (nCi/g)	Corazón (nCi/g)	Pulmones (nCi/g)	Médula ósea (nCi/g)	Intestino delgado (nCi/g)	Intestino grueso (nCi/g)
1	4,9 ± 0,4	78 ± 15	100 ± 9,4	71 ± 2,5	82 ± 9,6	97 ± 4,2	517 ± 99	54 ± 3,6
3	1,9 ± 0,2	49 ± 7,3	81 ± 7,5	39 ± 1,5	66 ± 0,7	83 ± 1,0	122 ± 43	166 ± 37
6	1,6 ± 0,5	49 ± 11	82 ± 4,6	33 ± 1,3	993 ± 1605*	78 ± 1,9	62 ± 5,2	185 ± 82
12	0,8 ± 0,2	55 ± 7,4	77 ± 11	28 ± 1,7	1438 ± 1218*	62 ± 9,4	41 ± 4,9	83 ± 18
24	0,6 ± 0,1	43 ± 4,0	85 ± 8,6	24 ± 2,6	962 ± 99*	41 ± 6,8	47 ± 19	48 ± 34

*Muestras probablemente contaminadas durante la recolección/análisis

Ejemplo de referencia 4. Direccionamiento tumoral de docetaxel encapsulado en nanopartículas y docetaxel convencional después de una dosis única en un modelo de xenoinjerto de tumor humano (LNCaP)

En ratones macho con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) se inocularon células de cáncer de próstata humano LNCaP. Tres a cuatro semanas después de la inoculación, se asignó a los ratones a diferentes grupos de tratamiento de manera que el volumen tumoral promedio en cada grupo fue de 300 mm³. En ese momento, se administró una dosis intravenosa (I.V.) única de 50 mg/kg de docetaxel como docetaxel encapsulado en nanopartículas o docetaxel convencional. Se sacrificó a los sujetos de prueba 2 horas o 12 horas después de la dosis. Los tumores de cada grupo fueron extirpados y analizados para determinar el docetaxel usando cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS).

Las concentraciones de docetaxel medidas en tumores extirpados de los sujetos de prueba dosificados con docetaxel encapsulado en nanopartículas o docetaxel convencional se presentan en la Tabla de ejemplo 4.1 y la figura 6. A las 12 horas después de la dosis, la concentración de docetaxel en el tumor en sujetos de prueba que recibieron docetaxel encapsulado en nanopartículas fue aproximadamente 7 veces mayor que en los sujetos de prueba que recibieron docetaxel convencional. Estos resultados son consistentes con los datos de farmacocinética y distribución tisular, así como con el mecanismo de acción propuesto en el que las nanopartículas dopadas con docetaxel están diseñadas para proporcionar tiempos de circulación de partículas prolongados y la liberación controlada de docetaxel desde las nanopartículas para que las partículas puedan marcarse con un marcador u objetivo y unirse a él para aumentar la cantidad de docetaxel administrado al tumor.

Tabla de ejemplo 4.1. Concentración de docetaxel medida en tumores tratados con docetaxel encapsulado en nanopartículas y docetaxel convencional

Tiempo (h)	Concentración de docetaxel en el tumor (ng/mg)	
	Docetaxel convencional	Docetaxel encapsulado en nanopartículas
2	12,9 ± 7,9	14,8 ± 6,5
12	3,6 ± 2,1	25,4 ± 15,1

Ejemplo de referencia 5 Actividad antitumoral de docetaxel encapsulado en nanopartículas y docetaxel convencional después de dosis repetidas en un modelo de xenoinjerto de tumor humano (LNCaP)

En ratones macho con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) se inocularon células de cáncer de próstata humano LNCaP. Tres a cuatro semanas después de la inoculación, se asignó a los ratones a diferentes grupos de tratamiento de manera que el volumen tumoral promedio en cada grupo fue de 250 mm³. Posteriormente, se trató a los ratones cada dos días (Q2D) durante cuatro dosis, con un descanso de ocho días, seguido de otras cuatro dosis en la posología Q2D.

Los volúmenes tumorales promedio para cada grupo de tratamiento se muestran en la Figura 7 del ejemplo. El tratamiento con docetaxel convencional o docetaxel encapsulado en nanopartículas dio como resultado una reducción apreciable del volumen tumoral. La reducción del volumen tumoral fue mayor en los sujetos de prueba que recibieron docetaxel encapsulado en nanopartículas en comparación con docetaxel convencional. Estos resultados sugieren que el aumento en la concentración tumoral de docetaxel en los sujetos de prueba que recibieron nanopartículas dopadas con docetaxel, en comparación con docetaxel convencional, puede dar lugar a un efecto citotóxico más pronunciado.

Ejemplo de referencia 6 Estudio de búsqueda de intervalo de dosis aguda de docetaxel encapsulado en nanopartículas en ratas Sprague-Dawley

Se asignó a sesenta ratas Sprague-Dawley (30/sexo) a 10 grupos de dosis (3 ratas/sexo/grupo) y se les administró una dosis única de docetaxel encapsulado en nanopartículas (5,7, 7,5, 10, 15 o 30 mg/kg de peso corporal) o docetaxel convencional (5,7, 7,5, 10, 15 o 30 mg/kg de peso corporal). Las composiciones terapéuticas se administraron por infusión intravenosa (I.V.) durante un período de 30 minutos el día 1, después de lo cual se observó a los sujetos de prueba durante 7 días antes de someterse a una necropsia macroscópica.

Todos los sujetos de prueba sobrevivieron a su necropsia programada. Las observaciones clínicas consideradas potencialmente relacionadas con la administración incluyeron piloerección, que apareció cerca del final del período de observación de 7 días y se descarga por la nariz y los ojos. Se observó piloerección para una rata macho a la que se administraron 15 mg/kg de docetaxel encapsulado en nanopartículas y para 5/9 ratas macho y 1/9 ratas hembra dosificadas con 10 mg/kg de docetaxel convencional o superior. La naturaleza y el tiempo de aparición de este signo clínico fueron consistentes con la toxicidad que se esperaría de los fármacos citotóxicos como el docetaxel. Las descargas nasales y oculares aparecieron con un patrón que no estaba relacionado con el nivel de dosis, el artículo de prueba, el sexo de los animales o el tiempo después de la dosificación, y este signo clínico se consideró posiblemente relacionado con docetaxel y/o el estrés por el procedimiento de dosificación. Como se muestra en la Tabla de ejemplo 6.1, las ratas macho y hembra a las que se administró docetaxel convencional o docetaxel encapsulado en nanopartículas mostraron en general déficit menores en el aumento de peso corporal o pérdidas reales de peso corporal que se consideraron debidas a la toxicidad por docetaxel. El nivel de efecto no adverso (NOAEL) de las nanopartículas dopadas con docetaxel en este estudio se consideró de 7,5 mg/kg.

Tabla de ejemplo 6.1. Comparación de los cambios de peso corporal en machos y hembras

Sexo	Dosis (mg/kg)	Cambio de peso corporal (%) con docetaxel encapsulado en nanopartículas	Cambio de peso corporal (%) con docetaxel convencional
M	5,7	4,60	8,60
M	7,5	1,67	1,21
M	10	-3,15	-11,55
M	15	-6,23	-9,48
M	30	-7,16	-8,66
F	5,7	3,63	0,34
F	7,5	3,25	-0,11
F	10	-2,49	-0,17
F	15	-2,50	-6,86
F	30	-5,66	-5,89

Ejemplo 7 Farmacocinética de nanopartículas de vincristina dirigidas pasivamente en ratas

5 Similar al procedimiento en el Ejemplo de referencia 2, se administró a las ratas por vía intravenosa con 0,5 mg/kg con cualquiera de las nanopartículas preparadas como en la Figura 2 y el Ejemplo 14 que tienen vincristina y PLA-PEG, y sin resto dirigido específico (nanopartículas dirigidas pasivamente (PTNP); o vincristina sola. Los perfiles de liberación se muestran en la Figura 8.

Las muestras de plasma se analizaron usando LC/MS y el análisis FC se realizó usando el software WinNonlin. Una comparación de la farmacocinética de las nanopartículas con vincristina sola es la siguiente:

	Comparación con vincristina sola
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ ml)	↑ 69 veces
$t_{1/2}$ (h)	↓ 1,88 veces
AUC_{inf} (h*ng/ml)	↑ 312 veces
V_z (ml/kg)	↓ 592 veces
Cl (ml/h/kg)	↓ 322 veces

Ejemplo 8 Farmacocinética de nanopartículas de metotrexato dirigidas pasivamente en ratas

10 Similar al procedimiento en el Ejemplo de referencia 2, se administró a las ratas por vía intravenosa con 0,5 mg/kg con cualquiera de las nanopartículas preparadas como en la Figura 2 y el Ejemplo 15 que tienen metotrexato y PLA-PEG, y sin resto dirigido específico (nanopartículas dirigidas pasivamente (PTNP); o metotrexato solo. Los perfiles de liberación se muestran en la Figura 9.

15 Las muestras de plasma se analizaron usando LC/MS y el análisis FC se realizó usando el software WinNonlin. Una comparación de la farmacocinética de las nanopartículas con metotrexato solo es la siguiente:

	Comparación con metotrexato solo
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ ml)	↑ 10 veces
$t_{1/2}$ (h)	↓ 16 veces
AUC_{inf} (h*ng/ml)	↑ 296 veces
V_z (ml/kg)	↓ 19 veces
Cl (ml/h/kg)	↓ 302 veces

Ejemplo 9 Farmacocinética de nanopartículas de paclitaxel dirigidas pasivamente en ratas

20 Similar al procedimiento en el Ejemplo de referencia 2, se administró a las ratas por vía intravenosa 1,0 mg/kg de las nanopartículas preparadas como en la Figura 2 que tienen paclitaxel y PLA-PEG (formulación C) y sin resto dirigido específico (nanopartículas dirigidas pasivamente (PTNP); o paclitaxel solo. Los perfiles de liberación se muestran en la Figura 10.

Las muestras de plasma se analizaron usando LC/MS y el análisis FC se realizó usando el software WinNonlin. Una comparación de la farmacocinética de las nanopartículas con paclitaxel solo es la siguiente:

	Comparación con paclitaxel solo
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ ml)	↑ 297 veces
$t_{1/2}$ (h)	↓ 3 veces
AUC_{inf} (h* ng/ml)	↑ 600 veces
V_z (ml/kg)	↓ 1512 veces
Cl (ml/h/kg)	↓ 516 veces

Ejemplo 10 Farmacocinética de nanopartículas de rapamicina (sirolimus) dirigidas pasivamente en ratas

Similar al procedimiento en el Ejemplo de referencia 2, se administró a las ratas por vía intravenosa 2,0 mg/kg de nanopartículas preparadas como en la Figura 2 y el Ejemplo 16, que tienen rapamicina y PLA-PEG y no tienen un resto dirigido específico (nanopartículas dirigidas pasivamente (PTNP); o rapamicina sola. Los perfiles de liberación se muestran en la Figura 11.

Las muestras de plasma se analizaron usando LC/MS y el análisis FC se realizó usando el software WinNonlin. Una comparación de la farmacocinética de las nanopartículas con rapamicina sola es la siguiente:

	Comparación con rapamicina solo
C _{máx} (ng/ml)	↑ 297 veces
t _{1/2} (h)	↓ 3 veces
AUC _{inf} (h*ng/ml)	↑ 600 veces
V _z (ml/kg)	↓ 1512 veces
Cl (ml/h/kg)	↓ 516 veces

Ejemplo de referencia 11 Acumulación tumoral de nanopartículas de docetaxel en tumores de mama MX-I en ratones.

Se asignó aleatoriamente a los ratones con tumores de mama MX-1 a tres grupos, que recibían docetaxel (3 ratones), nanopartículas dirigidas pasivamente (Formulación A, sin un resto dirigido, PTNP) o Formulación A. La masa tumoral promedio fue de 1,7 g (RSD 34 %). A continuación se inyectó a los ratones 10 mg/kg del artículo de prueba, después, fueron sacrificados 24 horas después y se extrajeron los tumores y se analizaron para determinar el contenido de docetaxel usando LC/MS/MS. Los resultados se representan en la Figura 12. El porcentaje de dosis inyectada en el tumor fue del 3 % (solo para docetaxel), 30 % para PTNP y 30 % de formulación A.

Ejemplo de referencia 12 Farmacocinética de nanopartículas de docetaxel en primates

A los primates no humanos intactos (3 machos y 3 hembras) se les administró docetaxel, nanopartículas de docetaxel (Formulación A) o nanopartículas de docetaxel (Formulación B: 43,25 % de PLA-PEG (16/5), 43,25 % de PLA (75kDa), 10 % de docetaxel, 2,5 % de PLA-PEG-lys(urea)glu, preparado como en el Ejemplo 14), utilizando y siguiendo pautas éticas apropiadas en todo momento. Se usaron 1 macho y 1 hembra por grupo de dosis. El día de dosificación fue de 1 día y las formulaciones se administraron por infusión I.V. de 30 minutos docetaxel a 25 mg/m² o docetaxel a 50 mg/m² (se aleatorizó a los animales y, a continuación, se les administraron 50 mg/m² el día 29 y se midieron la FC, la hematología y la bioquímica clínica durante 21 días). Al final del estudio, se evaluaron la FC, la hematología y la bioquímica clínica durante un período de 21 días. La Figura 12 representa los resultados de PNP de machos (M) y hembras (F). Una comparación de la farmacocinética de las nanopartículas de la formulación A (dosis de 25 mg/m²) con docetaxel solo es la siguiente:

	Comparación con docetaxel solo
C _{máx} (ng/ ml)	↑ 180 veces
t _{1/2} (h)	↓ 3 veces
AUC _{inf} (h* ng/ml)	↑ 213 veces
V _z (ml/kg)	↓ 617 veces
Cl (ml/h/kg)	↓ 212 veces

La farmacocinética fue la siguiente para cada grupo de NHP:

A. Docetaxel solo

	25 ms/m ²		50 mg/m ²	
	M	F	M	F
C _{máx} (ng/ ml)	364	596	1210	835
C _{máx} /D	14,6	23,8	24,2	16,7
AUC (h*ng/ml)	2553	2714	3285	3599
AUC/D	1 02	109	76,5	72
t _{1/2} (h)	18	31	39	39
V _z (ml/m ²)	253783	412186	743682	788340
Cl (ml/h/m ²)	9794	9213	13073	13893

B. Formulación A

	25 mg/m ²		50 mg/m ²	
	M	F	M	F
C _{máx} (ng/ ml)	89500	85500	95700	117000

(continuación)

	25 mg/m ²		50 mg/m ²	
	M	F	M	F
C _{máx} /D	3580	3420	1914	2340
AUC (h*ng/ml)	495408	627216	352778	748073
AUC/D	19816	25089	7056	14961
t _{1/2} (h)	7,6	9,1	5,6	6,8
V _z (ml/m ²)	554	526	1140	654
Cl (ml/h/m ²)	50	40	142	67

C. Formulación B

	25 mg/m ²		50 mg/m ²	
	M	F	M	F
C _{máx} (ng/ml)	64500	101500	128000	116000
C _{máx} /D	2580	4060	2560	2320
AUC (h* ng/ml)	956312	1442885	1960145	1395580
AUC/D	38252	57715	39203	27912
t _{1/2} (h)	13,9	17,8	17,8	15,5
V _z (ml/m ²)	525	445	657	803
Cl (ml/h/m ²)	26,1	17,3	25,5	35,8

Ejemplo de referencia 13 Preparación de nanopartículas de docetaxel

Se forma una fase orgánica compuesta por una mezcla de docetaxel (DTXL) y polímero (homopolímero, copolímero y copolímero con ligando). La fase orgánica se mezcla con una fase acuosa a una relación aproximadamente 1:5 (fase oleosa:fase acuosa) donde la fase acuosa está compuesta por un tensioactivo y algo de disolvente disuelto. Para lograr una alta carga de fármaco, se usa aproximadamente un 30 % de sólidos en la fase orgánica.

La emulsión gruesa primaria se forma mediante la combinación de las dos fases bajo una simple mezcla o mediante el uso de un homogeneizador con rotor estator. El rotor/estator dio una solución lechosa homogénea, mientras que la barra de agitación produjo una emulsión gruesa visiblemente mayor. Se observó que el procedimiento de la barra de agitación daba gotas de fase oleosa significativa que se adherían al lado del vaso de alimentación, lo que sugiere que aunque el tamaño de la emulsión gruesa no es un parámetro del procedimiento crucial para la calidad, debe ajustarse adecuadamente para evitar la pérdida de rendimiento o la separación de fases. Por tanto, el rotor estator se usa como procedimiento estándar para la formación de emulsión gruesa, aunque un mezclador de alta velocidad puede ser adecuado a una escala mayor.

A continuación, la emulsión primaria se transforma en una emulsión fina mediante el uso de un homogeneizador de alta presión.

Después de 2-3 pases, el tamaño de partícula no se redujo significativamente y pases sucesivos pueden producir incluso un incremento del tamaño de partícula. La fase orgánica se emulsionó a 5:1 de Ac: A con una fase acuosa estándar y se realizaron múltiples pases pequeños, inactivando una pequeña porción de la emulsión después de cada pase. La escala indicada representa los sólidos totales de la formulación.

El efecto de la escala sobre el tamaño de partícula mostró una sorprendente dependencia de la escala. La tendencia muestra que en el intervalo de tamaño del lote de 2-10 g, lotes más grandes producen partículas más pequeñas. Se ha demostrado que esta dependencia de la escala se elimina al considerar lotes mayores de 10 g de escala. La cantidad de sólidos usada en la fase oleosa fue de aproximadamente un 30 %. Las figuras 8 y 9 representan el efecto de la concentración de los sólidos sobre el tamaño de la partícula y la carga del fármaco; con la excepción de las series 15-175, todos los lotes son placebo. Para los lotes de placebo, el valor para el % de sólidos representa el % de sólidos con fármaco presente al 20 % p/p estándar.

La Tabla A resume los parámetros del procedimiento de emulsificación.

TABLA A

Parámetro	Valor
Formación de emulsión gruesa	Homogeneizador con rotor estator
Presión de la alimentación del homogeneizador	4.000-5.000 psi por cámara
Cámara(s) de interacción	Cámara Z de 2x200 µm
Número de pases homogeneizadores	2-3 pases

30

(continuación)

Parámetro	Valor
Fase acuosa [colato de sodio]	0,1 %
Relación A:Ac	5:1
[Sólidos] en fase oleosa	30 %

La emulsión fina se inactiva a continuación mediante la adición de agua desionizada a una temperatura dada con mezclado. En la operación de la unidad de inactivación, la emulsión se agrega a una inactivación acuosa fría con agitación. Esto sirve para extraer una porción significativa de los disolventes en fase oleosa, lo que endurece de forma efectiva las nanopartículas para la filtración corriente abajo. Enfriar la inactivación mejoró significativamente la encapsulación del fármaco. La relación inactivación:emulsión es aproximadamente 5:1.

Se añade una solución del 35 % (% en peso) de Tween 80 a la inactivación para lograr aproximadamente 2 % de Tween 80 en general. Después de que la emulsión se inactiva, se añade una solución de Tween-80 que actúa como solubilizador del fármaco, lo que permite la eliminación efectiva del fármaco sin encapsular durante la filtración. La Tabla B indica cada uno de los parámetros del procedimiento de inactivación.

Tabla B: Resumen de los parámetros del procedimiento de inactivación.

Parámetro	Valor
Temperatura inicial de inactivación	< 5 °C
Solución de [Tween-80]	35 %
Relación Tween-80:fármaco	25:1
Relación Q:E	5:1
Retención de inactivación/Temp. de procesamiento	≤ 5 °C (con relación actual de Q:E de 5: 1, relación de Tween-80:fármaco de 25:1)

La temperatura debe permanecer lo suficientemente fría con una suspensión lo suficientemente diluida (concentración suficientemente baja de disolventes) para permanecer por debajo de la T_g de las partículas. Si la relación Q:E no es lo suficientemente alta, la mayor concentración de disolvente plastifica las partículas y permite la fuga de fármaco. Por el contrario, las temperaturas más frías permiten una alta encapsulación del fármaco a bajas relaciones de Q:E (a aproximadamente 3:1), lo que hace posible realizar el procedimiento con mayor eficiencia.

A continuación, las nanopartículas se aíslan a través de un procedimiento de filtración de flujo tangencial para concentrar la suspensión de nanopartículas y el intercambio de tampón de los disolventes, el fármaco libre y el solubilizador de fármaco de la solución de inactivación en agua. Se utiliza una membrana de celulosa regenerada con un límite de peso molecular (MWCO) de 300.

Se realiza una diafiltración a volumen constante (DF) para eliminar los disolventes de inactivación, fármaco libre y Tween-80. Para realizar una DF A volumen constante, el tampón se añade al recipiente retenido a la misma velocidad en que se elimina el filtrado. Los parámetros del procedimiento para las operaciones de TFF se resumen en la Tabla C. La velocidad de flujo cruzado se refiere a la velocidad del flujo de la solución a través de los canales de alimentación y a través de la membrana. Este flujo proporciona la fuerza para barrer las moléculas que pueden ensuciar la membrana y restringir el flujo de filtrado. La presión transmembrana es la fuerza que impulsa las moléculas permeables a través de la membrana.

Tabla C: Parámetros TFF

Parámetro	Valor
Material de membrana	Celulosa regenerada - Membrana de pantalla gruesa
Corte de peso molecular	300 kDa
Velocidad de flujo cruzado	11 l/min/m ²
Presión transmembrana	20 psid
Concentración de la suspensión de nanopartículas para diafiltración	30 mg/ml
Numero de diavolumenes	≥ 15 (basado en el aumento de flujo)
Área de membrana	~ 1 m ² /kg

A continuación, la suspensión de nanopartículas filtradas se somete a un ciclo térmico a una temperatura elevada durante el tratamiento. Una pequeña porción (normalmente 5-10 %) del fármaco encapsulado se libera de las nanopartículas muy rápidamente después de su primera exposición a 25 °C. Al exponer la suspensión de nanopartículas a temperatura elevada durante el tratamiento, el fármaco "encapsulado de forma laxa" puede eliminarse y mejorar la estabilidad del producto a expensas de una pequeña disminución de la carga del fármaco.

Después del procedimiento de filtración, la suspensión de nanopartículas (concentración 50 mg/ml) se pasa a través

de un filtro de calidad de esterilización (0,2 µm absoluto). Los prefiltros se utilizan para proteger el filtro de calidad de esterilización para utilizar un área/tiempo de filtración razonable para el procedimiento. La velocidad de flujo de la filtración es de aproximadamente 1,3 l/min/m².

5 El tren de filtración es un filtro de profundidad Ertel Alsop Micromedia XL con membrana M953P (0,2 µm nominal); Pall SUPRAcap con filtro de profundidad Seitz EKSP (0,1-0,3 µm nominal); Filtro PES de calidad de esterilización Pall Life Sciences Supor EKV 0.65/0,2 micrómetros. Se pueden utilizar 0,2 m de área de superficie de filtración por kg de nanopartículas para filtros de profundidad y 1,3 m² de área de superficie de filtración por kg de nanopartículas para los filtros de calidad de esterilización.

Ejemplo de referencia 13a Preparación de nanopartículas con propiedades de liberación prolongada

10 El protocolo de preparación de nanopartículas descrito en el Ejemplo de referencia 12 se modificó para producir nanopartículas de liberación lenta.

15 Se produjo un lote de nanopartículas que incorporaron una relación 50:50 de 100 DL 7E PLA (véase la Tabla 1) con el copolímero 16/5 PLA-PEG. Se cree que la adición de PLA de peso molecular alto disminuye la difusión del fármaco al aumentar la cristalinidad, elevar la temperatura de transición vítrea o reducir la solubilidad del fármaco en el polímero.

Tabla 1: PLA de peso molecular alto probado

PLA	Fabricante	Peso Molecular (Mn)	Peso Molecular (Mw)
100 DL 7E	Polímero Lakeshore	80 kDa	124 kDa

20 La adición de PLA de peso molecular alto dio como resultado un tamaño de partícula más grande cuando todas las demás variables de formulación se mantuvieron constantes. Para obtener nanopartículas de liberación lenta con tamaños comparables a los de las nanopartículas preparadas sin el PLA de peso molecular alto, se redujo la concentración de sólidos en la fase oleosa y se aumentó la concentración de colato de sodio en la fase acuosa. La Tabla 2 ilustra la formulación de nanopartículas de liberación lenta.

Tabla 2: Resumen de formulación de liberación lenta

Polímeros usados	% de sólidos en	% de Sodio	% de Fármaco	Partícula
	Fase oleosa	Colato en fase de agua	Carga	Tamaño (nm)
50% B1 16/5 de PLA-PEG 50% de Lakeshore 100 DL 7E PLA	20 %	2,0 %	11,7 %	139,8

Ejemplo 14 Nanopartículas con vincristina

25 Se prepararon lotes de nanopartículas usando el procedimiento general del Ejemplo de referencia 12, con 80 % (p/p) de polímero-PEG o polímero-PEG con homopolímero PLA al 40 % (p/p) cada uno, con un lote de % de sólidos totales del 5 %, 15 % y 30 %. Los disolventes utilizados fueron: 21 % de alcohol bencílico y 79 % de acetato de etilo (p/p). Por cada tamaño de lote de 2 gramos, se usaron 400 mg de fármaco y se usaron 1,6 g de 16-5 polímero-PEG o 0,8 g de 16-5 polímero-PEG + 0,8 g de PLA de 10 kDa (homopolímero). Se usó el polímero dibloque de 16-5 PLA-PEG o PLGA-PEG (50:50 L:G) y, si se usó, el homopolímero: PLA con un Mn = 6,5 kDa, Mw = 10 kDa, y Mw/Mn = 1,55.

30 La fase orgánica (fármaco y polímero) se prepara en lotes de 2 g: A un vial de centelleo de 20 ml, añadir el fármaco y el o los polímeros. La masa de disolventes necesarios al %, la concentración de sólidos es: 5 % de sólidos: 7,98 g de alcohol bencílico + 30,02 g de acetato de etilo; 30 % de sólidos: 0,98 g de alcohol bencílico + 3,69 g de acetato de etilo.

35 Se prepara una solución acuosa con 0,5 % de colato de sodio, 2 % de alcohol bencílico y 4 % de acetato de etilo en agua. Añadir a la botella 7,5 g de colato de sodio, 1402,5 g de agua DI, 30 g de alcohol bencílico y 60 g de acetato de etilo, y mezclar en una placa de agitación hasta que se disuelva.

40 Para la formación de la emulsión, una relación entre la fase acuosa y a fase oleosa es 5:1. La fase orgánica se vierte en la solución acuosa y se homogeneiza usando IKA durante 10 segundos a temperatura ambiente para formar una emulsión gruesa. La solución se alimenta a través del homogeneizador (110S) a 9 Kpsi (45 psi en calibre) durante 2 pases discretos para formar una nanoemulsión.

La emulsión se vierte en inactivación (agua DI) a <5 °C mientras se agita en la placa de agitación. La relación entre la inactivación y la emulsión es 8:1. Se añade Tween 80 al 35 % (p/p) en agua para inactivar a una relación de 25:1 de Tween 80 y fármaco. Las nanopartículas se concentran a través de TFF y la inactivación se concentra en TFF con un casete Pall de 500 kDa (2 membranas) a -100 ml. La diafiltración se usa usando aproximadamente 20 diavolumenes

(2 litros) de agua DI fría y el volumen se reduce al volumen mínimo y luego se recoge la suspensión final, aproximadamente 100 ml. La concentración de sólidos de la suspensión final sin filtrar se determina usando un vial de centelleo tarado de 20 ml y añadiendo 4 ml de suspensión final y se seca al vacío en lio/horno y se determina el peso de las nanopartículas en los 4 ml de suspensión seca. Se añade sacarosa concentrada (0,666 g/g) a la muestra final de la suspensión para obtener 10 % de sacarosa.

La concentración de sólidos de la suspensión final filtrada de 0,45 µm se determinó filtrando aproximadamente 5 ml de muestra de suspensión final antes de la adición de sacarosa a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm; a un vial de centelleo tarado de 20 ml, añadir 4 ml de muestra filtrada y secar al vacío en lio/horno.

La muestra restante de la suspensión final sin filtrar se congeló con sacarosa.

10 Formulaciones de vincristina

Componentes	Composición por peso (%)
<i>m</i> PEG(5k)-/PLA(16K)/Vincristina	96/4
<i>m</i> PEG(5k)-/PLA(16K)/Vincristina	95/5
<i>m</i> PEG(5k)-/PLA(16K)/Vincristina	96/4
<i>m</i> PEG(5k)-/PLA(16K)//PLA(16K)/Vincristina	46/46/8
<i>m</i> PEG(5k)-/PLA(16K)//PLA(16K)/Vincristina	47/47/6

Caracterización analítica de las formulaciones de vincristina:

Tamaño (nm)	Carga de fármaco (%)	Eficiencia de encapsulación (%)
103	4,4	21,8
110	4,6	22,8
115	4,2	20,8
146	8,3	41,6
98	6,0	30,0

Ejemplo 15 Nanopartículas con metotrexato

El fármaco se disolvió en la fase acuosa interna que consiste en agua con 1-arginina o NaOH utilizada para solubilizar el fármaco. El polímero (16-5 PLA-PEG) se disolvió en el sistema de disolvente orgánico en fase oleosa, tal como diclorometano (DCM) a una concentración de sólidos del 20 %. La fase acuosa externa consistió principalmente en agua con 1 % de colato de sodio (SC) como tensioactivo, a menos que se indique lo contrario. La emulsión de a/ac se preparó añadiendo la fase acuosa interna a la fase oleosa bajo homogeneización con rotor estator o sonicación (usando Branson Digital Sonifier) en una relación de a/ac de 1:10. La emulsión gruesa de a/ac/a también se preparó añadiendo la emulsión de a/ac en una fase acuosa externa bajo homogeneización con rotor estator o sonicación a una relación de ac/a de 1:10. La emulsión a/ac/a fina se preparó después procesando la emulsión gruesa a través de un homogeneizador de alta presión Microfluidics (MHOS pneumatic) a 45.000 psi con una cámara de interacción Z de 100 µm. La emulsión fina se inactivó después en agua DI fría a una relación de enfriamiento:emulsión de 10:1. Estas relaciones e a/ac, ac/a y emulsión:inactivación se mantuvieron a 1:10 para todos los experimentos de a/ac/a, a menos que se indique lo contrario. A continuación se añadió polisorbato 80 (Tween 80) como un solubilizante de procedimiento para solubilizar el fármaco sin encapsular. No se observó precipitación del fármaco en una relación fármaco:Tween 80 de 1:200. A continuación, el lote se procesó con ultrafiltración, seguido de diafiltración para eliminar los disolventes, el fármaco no encapsulado y el solubilizante. Las mediciones del tamaño de partícula se realizaron mediante Brookhaven DLS y/o difracción láser Horiba. Para determinar la carga del fármaco, las muestras de suspensión se analizaron por HPLC y análisis de la concentración de sólidos. A continuación, las suspensiones retenidas se diluyeron con sacarosa al 10 % antes de congelar. Todas las relaciones enumeradas son según el p/p, a menos que se especifique otra cosa.

El uso de 16/5 PLA-PEG disuelto en acetato de etilo proporcionó partículas entre 77-85 nm de tamaño a <6 % de concentración de sólidos en una fase acuosa externa que consiste en 1 % de SC en agua DI. Las emulsiones se formaron con ultrasonidos a una amplitud del 30 %. La formación de gel se produjo en la emulsión inicial de a/ac con > 6 % de concentración de sólidos. La concentración de MTX en la fase acuosa interna se incrementó a 225 mg/ml usando 1-arginina. El lote se realizó con 20 % de sólidos en la fase oleosa, que consiste en 28/5 de PLGA-PEG disuelto en DCM. En esta ocasión, tanto las emulsiones a/ac interna como a/ac/a externa se formaron por homogeneización con rotor estator, seguido de 2 pases a 45k psi usando un homogeneizador de alta presión. La suspensión de nanopartículas se inactivó en agua DI fría, seguido de tratamiento de ultrafiltración/diafiltración. El análisis por HPLC y PSD se usó para determinar que la carga del fármaco se mantuvo en 0,38 % para partículas de 131 nm.

Se pueden preparar tres lotes diferentes de acuerdo con el procedimiento general con las siguientes modificaciones; la concentración de MTX en fase acuosa interna fue de 225 mg/ml en solución de NaOH 0,66N, es decir, una relación molar de 1-arginina:MTX de 1,45:1; Se usó la mezcla de tensioactivos Span 80/Tween 80 (HLB = 6,2) como tensioactivo en fase oleosa; Se usó el lote 55-IOIC: 16/5 PLA-PEG en lugar de 28/5 PLGA-PEG. El procedimiento de

emulsión para los tres lotes siguió siendo similar. La carga de fármaco más alta se obtuvo para el lote de PLA-PEG 16/5 a 2,23 %, mientras que la carga de fármaco fue de 0,2 % y 0,04 % para otros lotes.

Ejemplo 16 Preparación de nanopartículas de sirolimus

- 5 Se forma una fase orgánica compuesta por una mezcla de sirolimus y polímero (homopolímero, copolímero y copolímero con ligando). La fase orgánica se mezcla con una fase acuosa a una relación aproximadamente 1:5 (fase oleosa:fase acuosa) donde la fase acuosa está compuesta por un tensioactivo y algo de disolvente disuelto. Para lograr una alta carga de fármaco, se usa aproximadamente un 30 % de sólidos en la fase orgánica. La emulsión gruesa primaria se forma mediante la combinación de las dos fases bajo una simple mezcla o mediante el uso de un homogeneizador con rotor estator.
- 10 A continuación, la emulsión primaria se transforma en una emulsión fina mediante el uso de un homogeneizador de alta presión. El procedimiento continúa como en el Ejemplo de referencia 12.

Formulaciones representativas de rapamicina (sirolimus):

Nombre	Polímero	Tamaño (nm)	Carga del fármaco
5 % de sólidos	16/5 PLA/PEG	123,1	3,61 %
	16/5 PLA/PEG + PLA	119,7	4,49 %
15 % de sólidos	16/5 PLA/PEG	82,1	4,40 %
	16/5 PLA/PEG + PLA	120,6	11,51 %
23 % de sólidos	16/5 PLA/PEG	88,1	7,40 %
	16/5 PLA/PEG + PLA	118,3	7,8 %
30 % de sólidos	16/5 PLA/PEG	88,5	10,26 %
	16/5 PLA/PEG + PLA	118,3	10,18 %

REIVINDICACIONES

1. Una composición de nanopartículas biocompatibles que comprende una pluralidad de nanopartículas de circulación prolongada, comprendiendo cada una:
- 5 copolímero de bloques de ácido poli(láctico)-poli(etilen)glicol, en el que el ácido poli(láctico) tiene un peso promedio en número de aproximadamente 16 kDa y el poli(etilen)glicol tiene un peso molecular promedio en número de aproximadamente 5 kDa;
- un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en vincristina, vinblastina, metotrexato, paclitaxel y sirolimus; y
- 10 un polímero biocompatible acoplado a un resto dirigido;
- en el que las nanopartículas de circulación prolongada comprenden de aproximadamente 80 a aproximadamente 90 por ciento en peso de copolímero de bloques de ácido poli(láctico)-poli(etilen)glicol y de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 % en peso del polímero biocompatible acoplado a un resto dirigido;
- proporcionando dicha composición una concentración plasmática elevada del agente terapéutico durante al menos 12 horas cuando la composición es administrada a un paciente.
- 15 2. La composición de nanopartículas biocompatibles de la reivindicación 1, en la que la composición proporciona una concentración plasmática elevada del agente terapéutico durante al menos 24 horas.
3. La composición de nanopartículas biocompatibles de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el resto dirigido es seleccionado del grupo que consiste en una proteína, péptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, sacárido, carbohidrato, molécula pequeña, glicano, citocina, quimiocina, nucleótido, lectina, lípido, receptor, esteroide, neurotransmisor, marcador de superficie celular, antígeno de cáncer o antígeno de glucoproteína.
- 20 4. La composición de nanopartículas biocompatibles de la reivindicación 3, en la que el resto dirigido se une al antígeno prostático específico de membrana (PMSA).
5. La nanopartícula biocompatible de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el polímero biocompatible acoplado al resto dirigido es ácido PLA-PEG-((S,S-2-{3-[1-carboxi-5-amino-pentil]-ureido})-pentanodioico).
- 25 6. La composición de nanopartículas biocompatibles de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que las nanopartículas de circulación prolongada comprenden además un polímero biodegradable.
7. La composición de nanopartículas biocompatibles de la reivindicación 6, en la que el polímero biodegradable es ácido poli(láctico).
- 30 8. La composición de nanopartículas biocompatibles de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además una solución acuosa de un sacárido.
9. La composición de nanopartículas biocompatibles de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el paciente es un mamífero o un primate.
10. La composición de nanopartículas biocompatibles de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un cáncer de tumor sólido, opcionalmente en la que al menos 24 horas después de la administración, el tumor sólido tiene una concentración significativa de agente terapéutico.
- 35 11. La composición de nanopartículas biocompatibles de la reivindicación 10, para su uso en un procedimiento de tratamiento de un cáncer de tumor sólido, en la que se minimizan los efectos secundarios no deseados del agente terapéutico en un paciente.

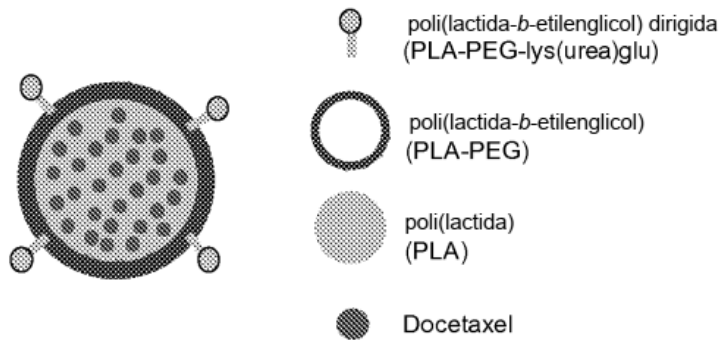


FIGURA 1

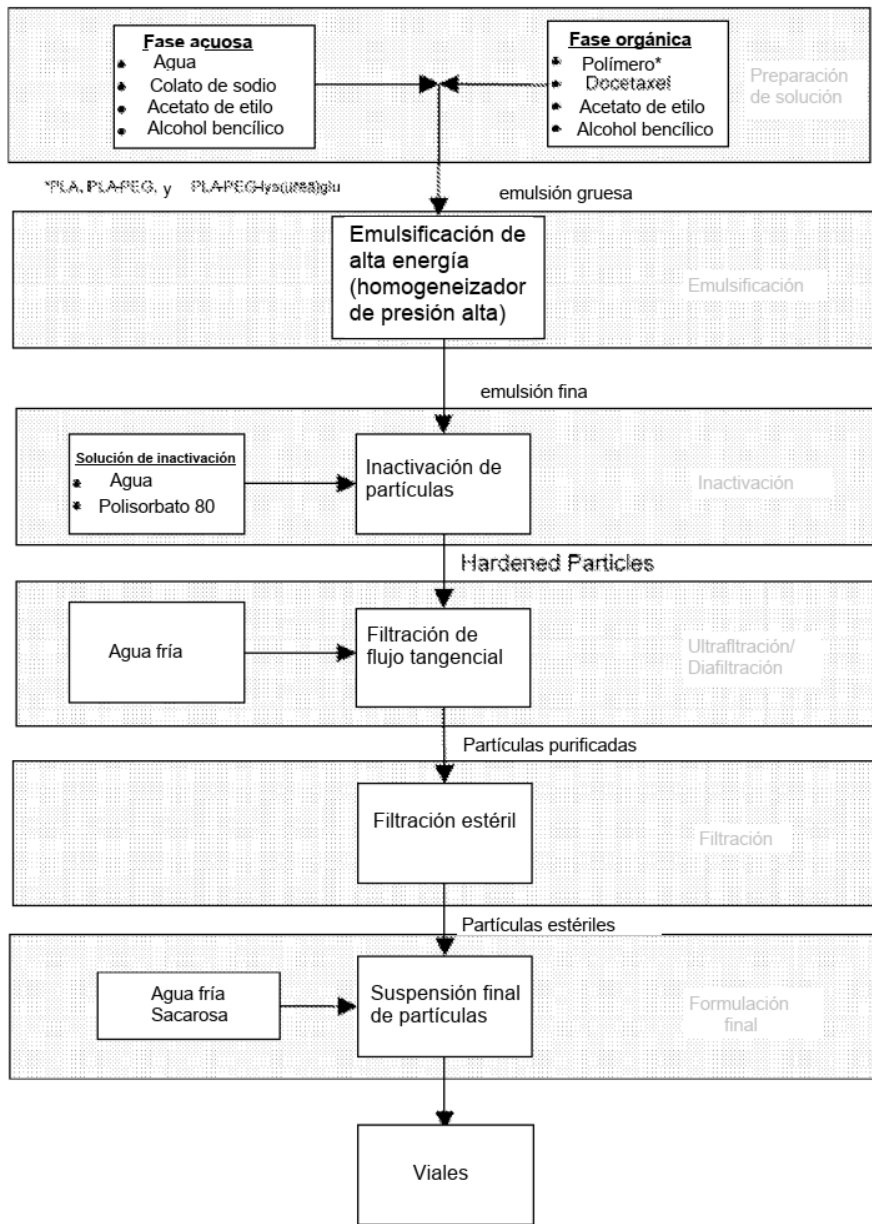


FIGURA 2

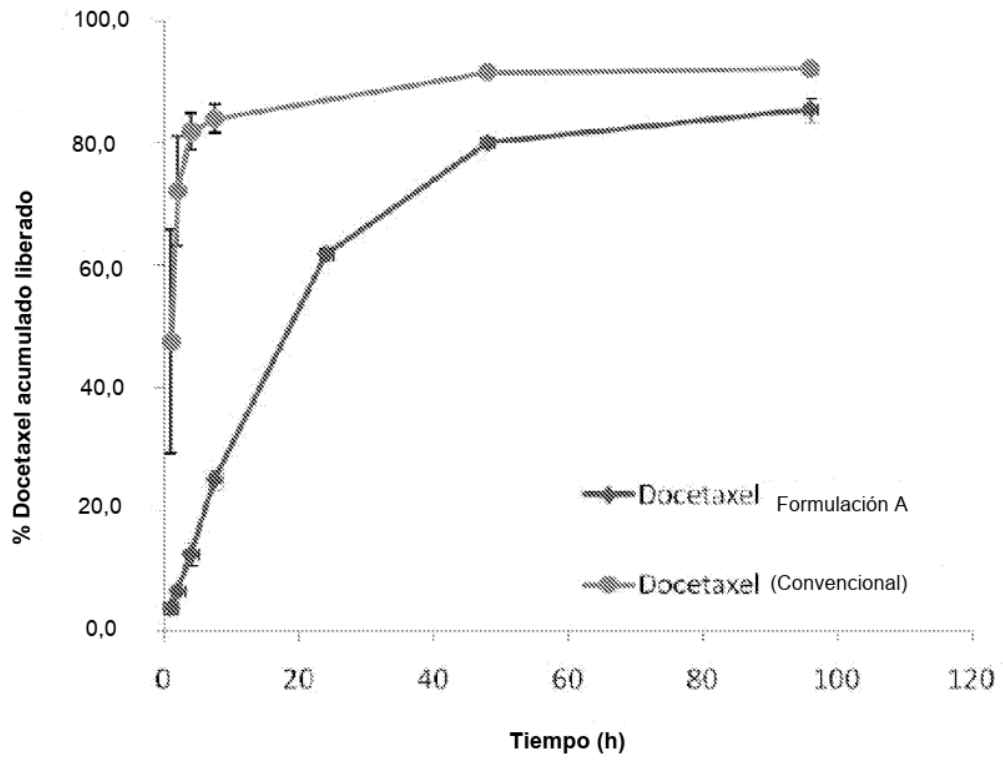


FIGURA 3

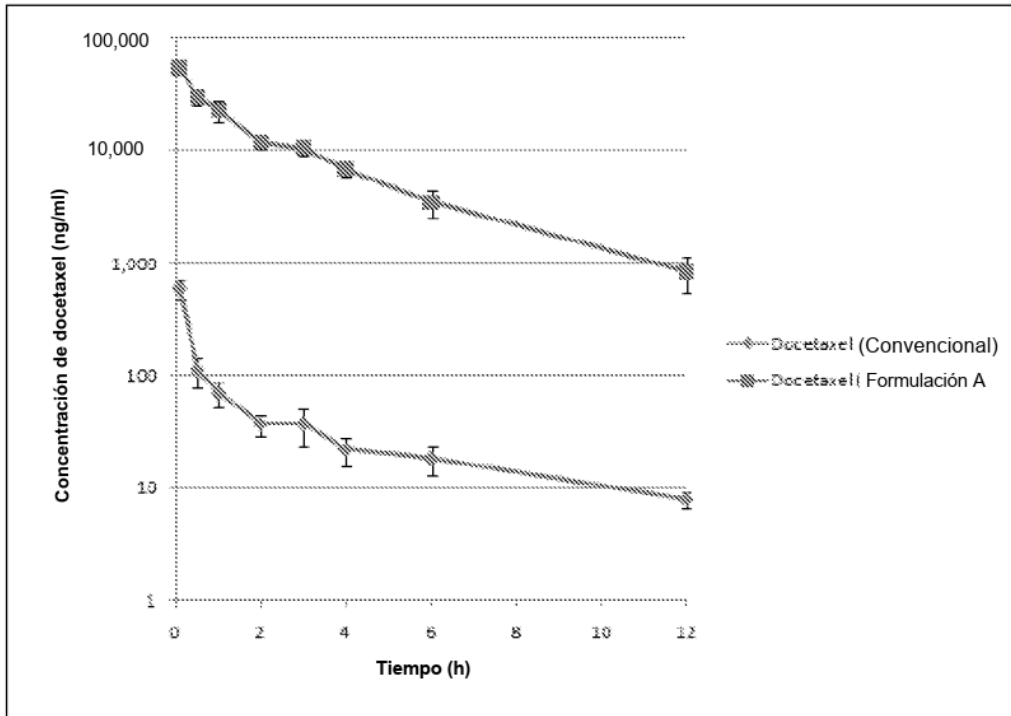


FIGURA 4

Nanopartículas que contienen polímero dirigido-¹⁴C (▲) [Formulación A]
 Nanopartículas que contienen Docetaxel-¹⁴C (⊞)
 Docetaxel-¹⁴C convencional (◆)

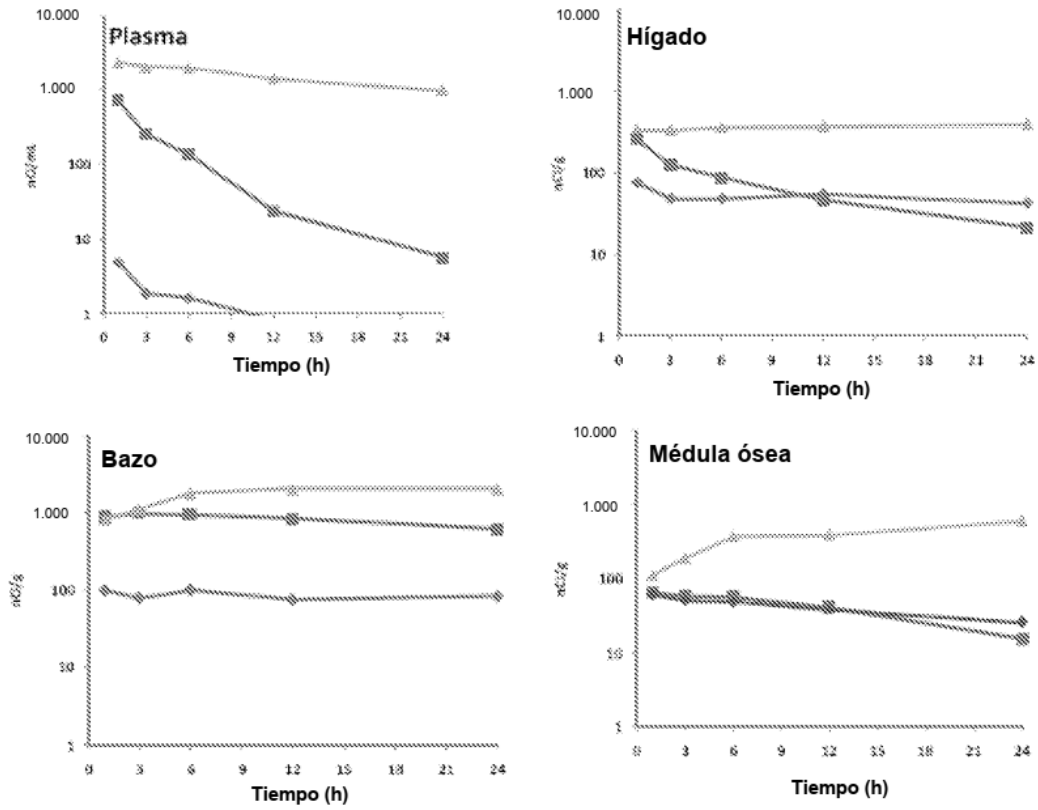


FIGURA 5

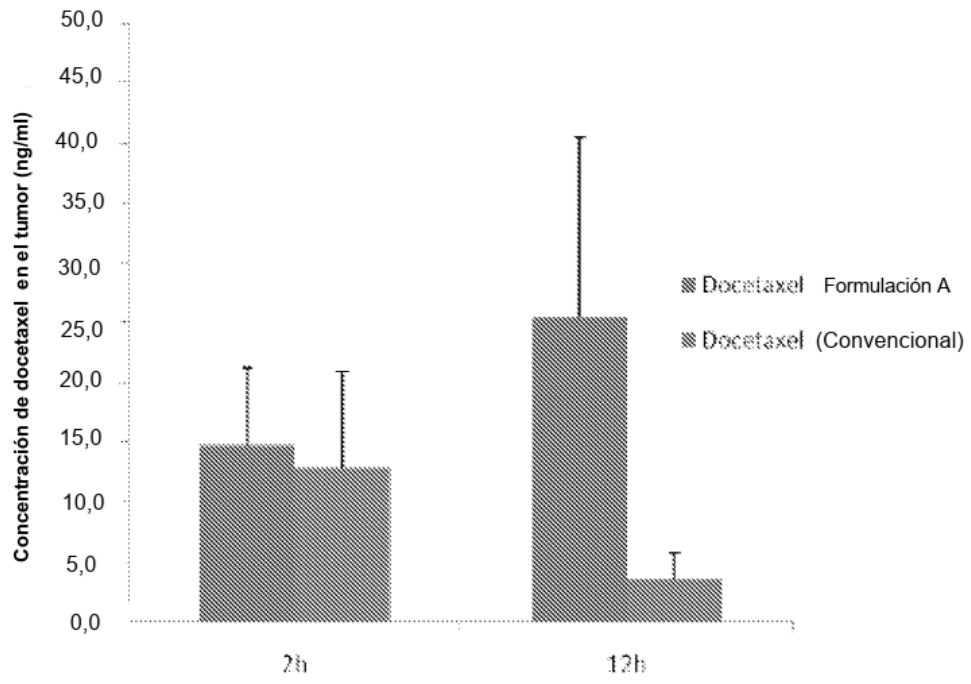


FIGURA 6

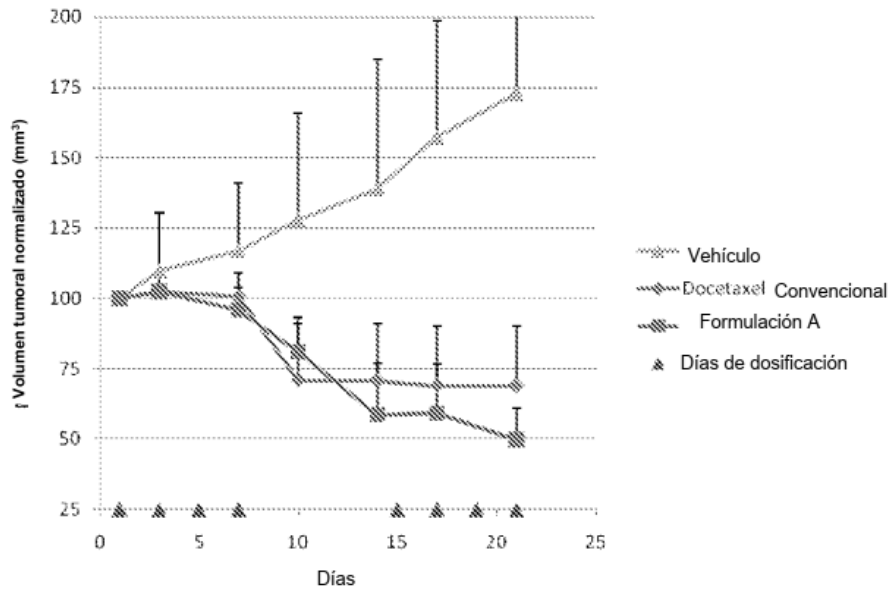


FIGURA 7

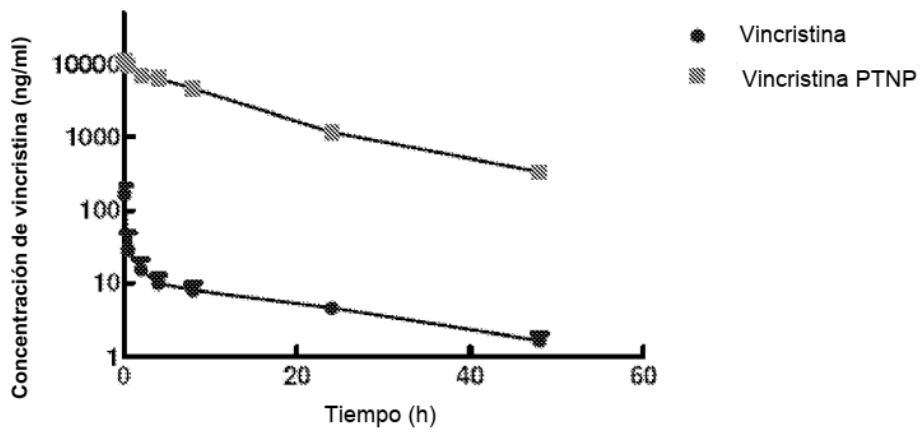


FIGURA 8

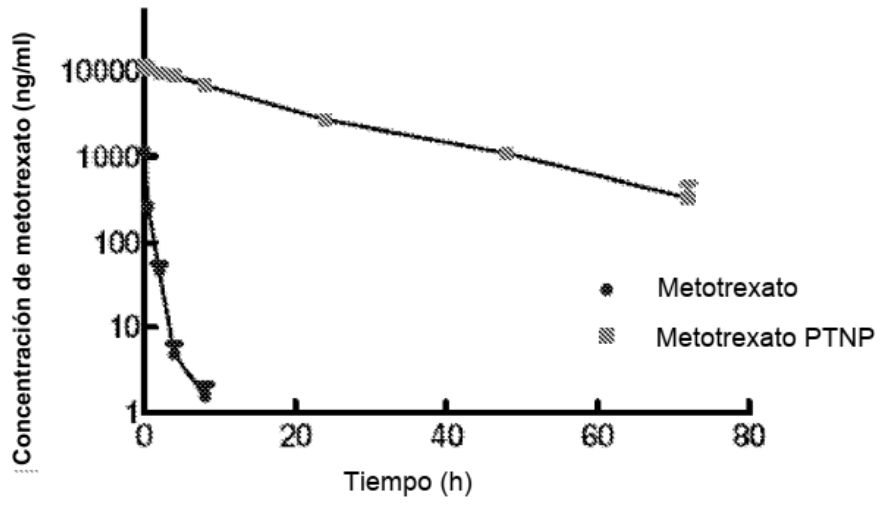


FIGURA 9

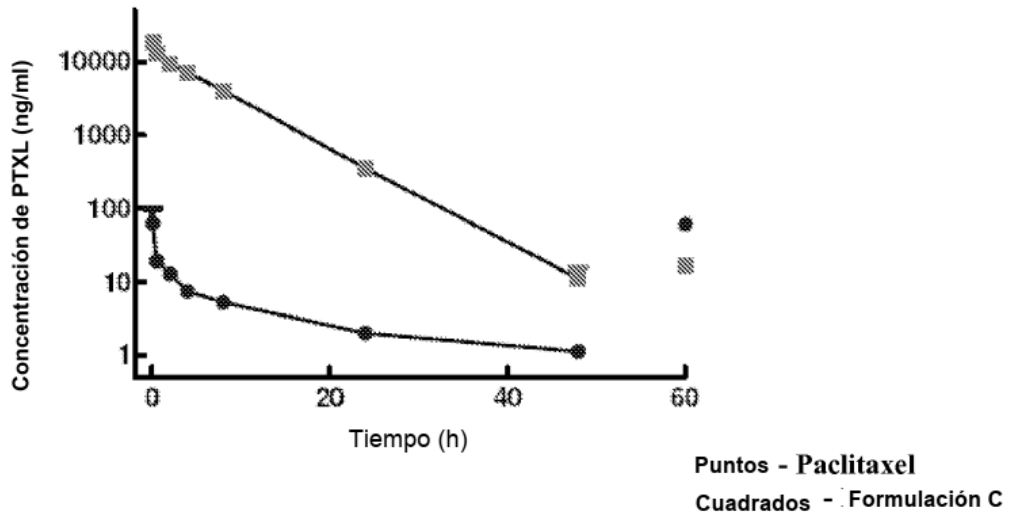


FIGURA 10

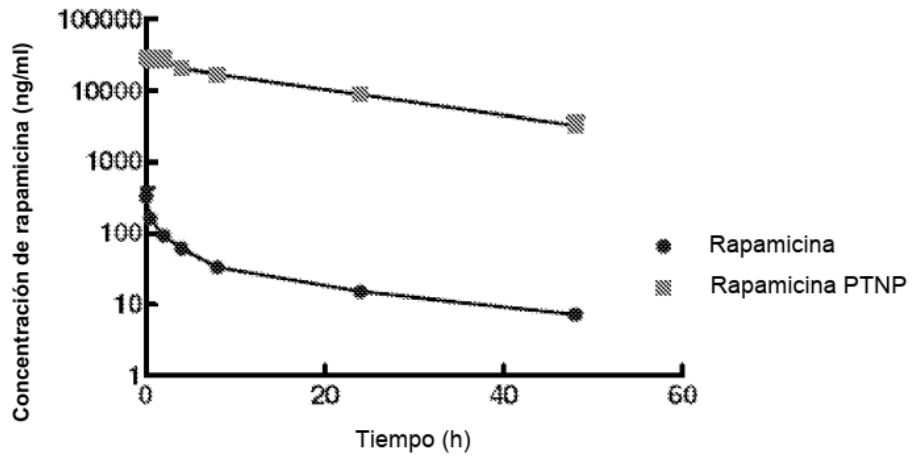


FIGURA 11

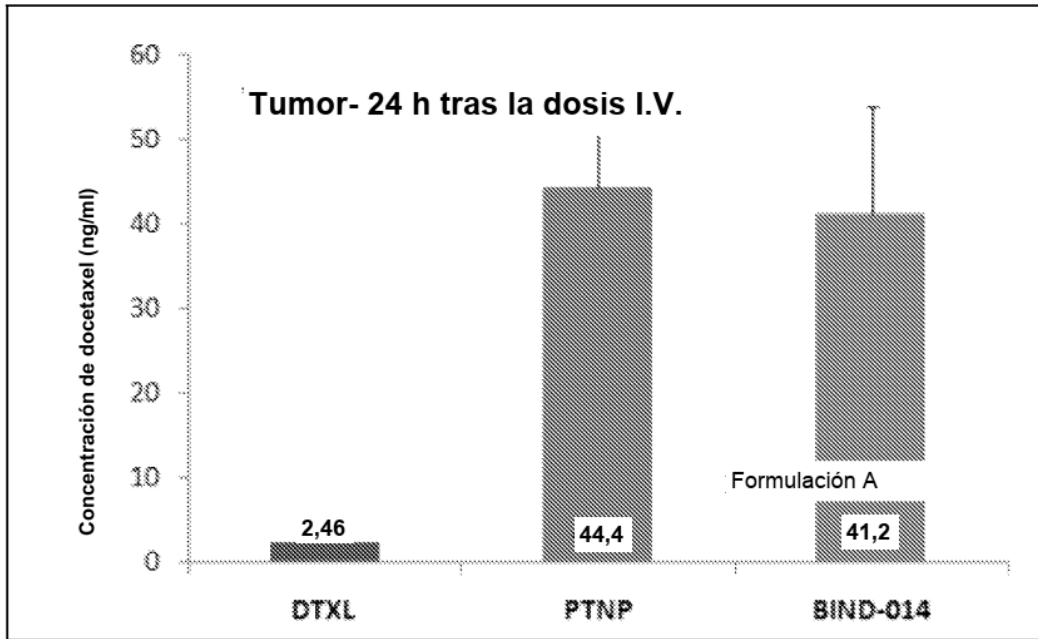


FIGURA 12

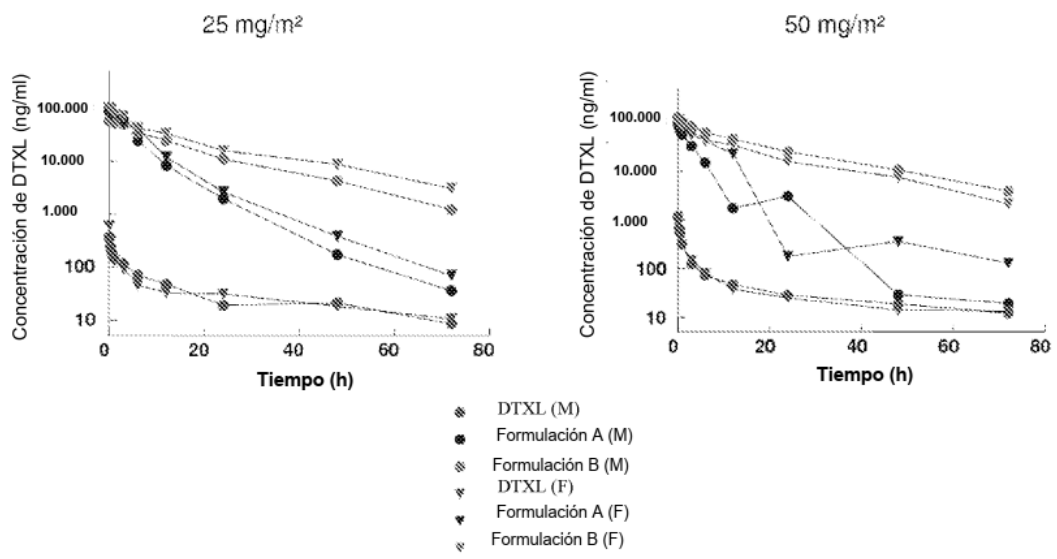


FIGURA 13